

SHANKLIŞ PEYNİRİNDEN İZOLE EDİLEN ENDOJEN MAYALARIN MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE ENZİMATİK KARAKTERİZASYONU

Halil İbrahim Kahve*

Aksaray Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Aksaray, Türkiye

Geliş/Received: 02.02.2024; Kabul /Accepted: 18.14.2024; Online baskı /Published online: 24.04.2024

Kahve, H. İ. (2024). Shanklish peynirinden izole edilen endojen mayaların moleküler tanımlanması ve enzimatik karakterizasyonu. GIDA (2024) 49 (3) 408-420 doi: 10.15237/ gida.GD24020

Kahve, H. İ. (2024). Molecular identification and enzymatic characterization of endogenous yeast isolated from Shanklish cheese. GIDA (2024) 49 (3) 408-420 doi: 10.15237/ gida.GD24020

ÖZ

Bu çalışmada, Ortadoğu'da uzun yıllardan beri tüketilen ve son yıllarda Türkiye'de de üretilmeye başlanan Shanklish peynirlerinden mayaların izolasyonu, Start Codon Targeted (SCoT) markör yöntemi kullanılarak identifikasyonu ve enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Olgunlaştırılmış peynirlerden 24 adet maya izole edilmiş, SCoT markör yöntemiyle DNA parmak izleri elde edilerek gruplandırılmış ve her gruptan temsili izolatlar sekanslanarak identifikasyon sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, 19 adet *Kluyveromyces lactis*, 2 adet *Pichia kudriavzevii*, 1 adet *Pichia fermentans*, 1 adet *Pichia membranifaciens* ve 1 adet *Clavispora lusitaniae* suşu tanımlanmış ve API-ZYM enzim test kiti yardımıyla enzimatik karakterizasyonları belirlenmiştir. Bu suşlar arasında *K. lactis* ANO17 suşu yüksek esteraz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, asit fostataz, Naftol-as-bi-fosfohidroliz, α -glukosidaz ve β -glukosidaz aktivitesi gösterirken orta seviyede esteraz, β -galaktosidaz ve düşük seviyede alkalik fostataz aktivitesi göstermiş ve bu suş enzimatik aktivite yönünden en umut verici suş olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, *K. lactis* ANO17 suşunun olası starter/destek kültür kombinasyonlarında laktik asit bakterileriyle birlikte kullanımının teknolojik yönden üstün peynir elde edilmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Shanklish peyniri, SCoT markör, destek starter, maya, enzimatik aktivite

MOLECULAR IDENTIFICATION AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF ENDOGENOUS YEAST ISOLATED FROM SHANKLISH CHEESE

ABSTRACT

In this study, the isolation of yeasts originated from Shanklish cheeses produced and consumed in Turkey, their identification using the SCoT marker method, and the determination of their enzymatic activities were aimed. Twenty-four yeasts were isolated from these ripened Shanklish cheeses and they are grouped by obtaining DNA fingerprints using the SCoT marker method and then representative isolates from each group were sequenced for identification. Based on the identification results, 19 *Kluyveromyces lactis*, 2 *Pichia kudriavzevii*, 1 *Pichia fermentans*, 1 *Pichia membranifaciens* and 1 *Clavispora lusitaniae* strains were identified and their enzymatic characterizations were determined using the API-ZYM enzyme test kit. Among these strains, *K. lactis* ANO17 showed high esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, cysteine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -glucosidase, and β -glucosidase activities, while showing moderate esterase, β -galactosidase, and low-level alkaline phosphatase activities and so this strain was identified as the

* Sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: hibrahimkahve@gmail.com

☎: (+90) 382 288 3552

Halil İbrahim Kahve; ORCID no: 0000-0001-6599-1309

most promising strain in terms of its enzymatic activity. According to these study results, it is considered that the use of *K. lactis* ANO17 strain in potential starter/adjunct culture combinations with lactic acid bacteria can be utilized to obtain technologically superior cheese.

Keywords: Shanklish cheese, SCoT marker, adjunct starter, yeast, enzymatic characterization

GİRİŞ

Fermantasyon ile üretilen peynirler ve süt ürünleri özellikle Akdeniz ülkelerinde yaşayan insanlar için beslenmenin önemli bir parçasıdır. Shanklish peyniri ise bunlardan birisi olup Lübnan, Suriye, Irak başta olmak üzere tüm Ortadoğu'da tüketilmektedir (Nehme vd., 2019). Bu bölgenin dışında 1860 Lübnan iç savaşı nedeniyle Arjantin'in Corrientes şehrine göç eden Lübnanlılar nedeniyle Arjantin'de de tüketilen bir peynir haline gelmiştir (Patino vd., 1999). Benzer şekilde 2010 yılında Suriye'de başlayan iç savaş nedeniyle ülkemize göç eden bölge halkı nedeniyle de ülkemizde tanınırlığı ve tüketimi artmıştır.

Shanklish peyniri, Türkiye'de üretilen ve coğrafi işareti alınmış Antakya Sürk peyniriyle benzerlikler taşısa da olgunlaşma periyodu ve üretim metodlarındaki farklılıklar ile Antakya Sürk peynirinden ayrılmaktadır. Shanklish üretimi için ilk olarak koyun sütünden yoğurt yapılır ve elde edilen yoğurt 2-3 gün buzdolabında dinlendirilir. Mevsimsel farklılıklara ve bölge tercihlerine göre koyun sütü yanında keçi ve inek sütleri de tercih edilebilmektedir. Dinlendirilen yoğurt proteinlerin koagülasyonu için ısıtılır ve çökelti toplanarak tülbent yardımıyla süzülür. Daha sonra tuz ilave edilerek top haline gelecek şekilde şekillendirilir. Hazırlanan taze peynirler kimyon, kekik ve kırmızıbiber tozu ile kaplanarak çeşnilendirilir. Son olarak çeşnilendirilen toprak kavanozlara doldurularak birkaç hafta olgunlaşmaya bırakılır. Elde edilen sert peynir zeytinyağında 1-2 yıla kadar muhafaza edilmektedir (Nehme vd., 2019; Addas, 2013, Toufeili vd., 1995).

Shanklish peynirinin mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özellikleri üzerine çeşitli araştırmalar devam etmektedir. Suriye'de geleneksel yöntemlerle üretilmiş Shanklish peynirlerinin laktik asit bakterileri (LAB) florasının polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) yöntemi kullanılarak belirlendiği bir çalışmada,

araştırmacılar 82 adet LAB izole etmişlerdir. Bunlardan 35 tanesi *Lactobacillus paracasei*, 20 tanesi *Lb. plantarum*, 18 tanesi *Lb. lactis*, 7 tanesi *Lb. brevis* ve 2 tanesi *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır (Abou Younes vd., 2018). Shanklish peynirlerinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlendiği başka bir çalışmada, araştırmacılar koyun sütü kullanarak ürettikleri Shanklish peynirlerinde %55.97 nem, %32.15 protein, %6.06 yağ ve %2.99 kül miktarı tespit etmişlerdir. Ayrıca bu peynirlerin 70 günlük olgunlaşma periyodu sonunda pH değerlerinin 5.14 olduğunu bulmuşlardır (Toufeili vd., 1995). El Mayda (2007) tarafından yürütülen bir başka çalışmada ise keçi sütü kullanılarak üretilen Shanklish peynirlerinin nem içeriği %30.2, protein içeriği %46.6, yağ içeriği %5.4, kül miktarı %7 ve pH değeri 4.5 olarak tespit edilmiştir.

Bunlarla birlikte, Shanklish peyniri üretiminde henüz standart bir üretim yöntemi yoktur ve kullanılan starter kültür olmadığından son ürün üreticiden üreticiye değişim göstermektedir. Bu peynirin çeşitli baharatlarla kaplanması veya olgunlaşma süresinden ötürü karmaşık bir floraya sahip olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar daha önce yapılan çalışmalarda LAB florası ortaya çıkarılmış olsa da Shanklish peynirinin sahip olduğu maya florası hakkında henüz bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Öte yandan mayaların peynirlerin olgunlaşma aşamasında faaliyete geçip, LAB tarafından üretilen laktik asidi parçalayarak ortamın pH'sını yükselttikleri ve böylece olgunlaşmada rol olan florayı destekledikleri bildirilmektedir (Suzzi vd., 2001). Dahası, peynirlerden izole edilen maya suşlarının lipolitik, proteolitik ve/veya enzimatik aktivitelere sahip olabileceği, böylece gerçekleşen lipoliz ve proteoliz sayesinde peynirin yapı ve aromasına katkı sunabileceği belirtilmektedir (Martin vd., 2001; Kesenkaş ve Akbulut, 2006; McSweeney, 2004). Üretilen peynirlerin kalite karakteristiklerini geliştirmeleri yanında son yıllarda probiyotik özellikler taşıyan mayalar da araştırmacıların dikkatini çekmiş ve bu konu üzerine yapılan çalışmalar giderek artmıştır

(Psomas vd, 2001). Mayaların aroma gelişime katkıları, olgunlaşmanın hızlandırılması ve probiyotik potansiyel barındırmalarından ötürü peynir üretiminde kullanılan starter LAB ile birlikte destek kültür olarak kullanılmaları birçok araştırmacı tarafından tavsiye edilmektedir (Tempel ve Jakobsen, 1998; Klein vd., 2002; Ferreira ve Viljoen, 2003).

Mayaların moleküler karakterizasyonunda kullanılan her DNA markör yönteminin bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Konu hakkında çalışan pek çok laboratuvarında bir markör yönteminin seçimi çalışılan materyale, teknik uzmanlığa, mevcut ekipmanlara ve araştırma bütçesine göre değişmektedir. Start Codon Targeted (SCoT) poliformizm markör yöntemi Collard ve Mackill (2009) tarafından bitki genomunun başlangıç kodonuna dayanarak geliştirilmiş bir yöntemdir. İleri ve geri primer olarak tek primer kullanılır ve bu açıdan bakıldığında RAPD veya ISSR markör yöntemlerine benzemektedir. SCoT markörleri ATG başlangıç kodonunu çevreleyen gen bölgelerini hedef alacak şekilde tasarlandığından diğer markör yöntemlerine göre daha çoğaltılabilir bir yöntemdir (Tikendra vd., 2021; Amom vd., 2020; Gogoi vd., 2020).

Dünya genelinde çok farklı peynir çeşidinin (Tulum, Otlu, Fossa, Serpa peynirleri) maya floraları tanımlanmış bu kültürlerin teknolojik/probiyotik özellikleri araştırılmıştır (Karasu-Yalcin vd., 2012; Güneş vd., 2021; Biagiotti vd., 2018; Dos Santos vd., 2017). Ancak yapılan literatür araştırmasında Shanklish peynirinin maya florası hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, farklı şehirlerden toplanan Shanklish peynirlerinin maya florasının SCoT primerleri kullanılarak moleküler yöntemlerle tanımlanmasını ve enzimatik karakterizasyonunu belirlemeyi amaçlamaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan beş adet Shanklish peyniri örneği farklı şehirlerde (Hatay, Gaziantep, İstanbul, Mersin, Kilis) evlerinde geleneksel yöntemlerle üretim yapan ailelerden toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Toplanan peynirlerin

üretiminde koyun sütü kullanıldığı ve oda sıcaklığında toprak kaplarda 1 ay süresince olgunlaşmaya bırakıldığı, olgunlaşma periyodunun sonunda peynirlerin cam kavanozlara alınarak kavanozların zeytinyağı ile doldurulduğu ve peynirlerin 3 ay boyunca zeytinyağı içerisinde muhafaza edildiği bilinmektedir. Olgunlaştırılmış peynir örneklerinden maya izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yöntem

Mayaların izolasyonu

Shanklish peynirlerinin maya popülasyonunu belirlemek için Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC, Merck, Darmstadt, Almanya) agar kullanılmıştır. Örneklerden 10 gram alınarak 90 ml %0.90'lık steril fizyolojik tuzlu suya aktarılmıştır. Homojenizasyon işlemi bir stomacher (MAYO, hg-400, Avustralya) yardımı ile gerçekleştirilmiş ve daha sonra 10^{-5} 'e kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlar YGC agara yayma kültür yöntemi ile ekilerek 28°C 'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Moleküler karakterizasyon için saf kültür izole edilmesi amacıyla morfolojik olarak farklı görünen koloniler seçilmiş ve sürme yöntemiyle kolonilerin saflaştırılması sağlanmıştır. Son olarak izolatlar %20 gliserol içeren cryo tüplerde -80°C 'de ve gliserol içermeyen %1.5 agar (Sigma Aldrich, ABD) eklenmiş besiyerlerinde yatık olarak stoklanmıştır.

Maya izolatlarının moleküler karakterizasyonu

DNA izolasyonu

Maya izolatlarının DNA ekstraksiyonu için Harju vd. (2004) tarafından önerilen metot minör değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Bu amaçla maya izolatları YPD (Merck, Darmstadt, Almanya) broth besiyerinde 28°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktifleştirilmiştir. Daha sonra YGC agar besiyerine ekimleri yapılarak 48-72 saat inkübasyon sonucunda kolonilerden 3 öze dolusu alınarak 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Toplanmış kolonilerin üzerine 300 μL steril distile su eklenerek bir kuru blok ısıtıcıya (Dri-block DB-2A, Techne, Cambridge, BK) yerleştirilmiştir. İzolatlar kuru blok ısıtıcıda 85°C 'de 15 dakika kaynamaya maruz bırakıldıktan sonra üzerlerine 650 μL ekstraksiyon miksi (200 mM Tris-HCl pH: 8.5, 25 mM NaCl, 25 mM

EDTA, %0.5 SDS) eklenmiş ve 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüplere eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1 v/v, AppliChem, Darmstadt, Almanya) eklenmiş ve 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonunda ayrılan üst fazdan yaklaşık 500 µL alınarak 500 µL izopropanol ile karıştırılmış ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karışım 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet 100 µL %70'lik etanol ile yıkanmış ve 50 µL steril iki kez damıtılmış (ddH₂O) su içerisinde süspansiyon edilmiştir. DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde bir nanospektrofotometre (DS-11 FX, DeNovix Inc., Wilmington, DE, ABD) kullanılmış ve son olarak izole edilen DNA'lar -20°C'de stoklanmıştır.

SCoT primerleri ile DNA amplifikasyonu SCoT markörleri kullanılarak DNA amplifikasyon analizleri için Collard ve Mackill (2009) tarafından tasarlanan 36 primer arasından ekşi hamur örneklerinden izole edilen mayalarda ayırım gücü yüksek bulunan SCoT 12 primeri (ACGACATGGCGACCAACG) kullanılmıştır (Aydın vd., 2022). Daha sonra seçilen primer ile birlikte PCR reaksiyonları T100 termal cyclus (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için öncelikle 10x DreamTaq DNA polimeraz tamponu (Thermo Fischer Scientific, ABD), 0.24 mM dNTPs, 1 mL MgCl₂, 0.8 µM primer, 0.5 birim DreamTaq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ve 20 ng DNA içeren PCR miksi hazırlanmıştır. Daha sonra 95°C'de 3 dakika denatürasyon işlemi takiben 35 döngü 95°C'de 60 saniye denatürasyon, 72°C'de 1 dakika bağlanma ve son uzama safhası 72°C'de 5 dakika olacak şekilde PCR koşulları belirlenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri 1xTAE solüsyonunda %1.5'lik hazırlanmış agaroz jelde elektroforetik (90 dakika, 120 volt) ayırma tabi tutulmuş ve süre sonunda etidyum bromür ile boyanarak PCR ürünlerinin varlığı jel görüntüleme sisteminde (G: BOX F3, Syngene, İngiltere) kontrol edilmiştir.

Internal Transcribed Spacer (ITS) sekanslama SCoT primerleri kullanılarak elde edilen DNA parmak izlerine göre maya izolatları 5 grupta (19

adet *Kluyveromyces lactis* (Ana grup, temsilen 3 izolat), 2 adet *Pichia kudriavzevii* (temsilen 2 izolat), 1 adet *Pichia fermentans*, 1 adet *Pichia membranifaciens* ve 1 adet *Clavispora lusitanae*) toplanmıştır. PCR ürünlerinin doğrulanması için ana gruptan 3 izolat ve diğer grupları temsilen 2 ve 1'er izolat seçilerek sekanslama hizmetine gönderilmiştir. Bu amaçla, ITS1 (5'-CCG TAG GTG AAC CTG CGG-3') ve ITS 4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer çiftleri genomik DNA'nın dahili transkript ayırıcı (ITS) bölgesini amplifiye etmek için kullanılmıştır (White vd., 1990). Hazırlanan PCR miksi, 10x Dream Taq tamponu, 2.5 mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 100 µM ITS1 primeri, 100 µM ITS4 primeri, 5 µL DreamTaq DNA polimeraz, 50 ng DNA ve steril distile su içermektedir. PCR koşulları ise 95°C'de 2 dakika denatürasyon ardından 95°C'de 30 saniyelik 30 döngü, 52°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika ve 72°C'de 5 dakikalık son uzatma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri ticari bir şirkete (Atlas Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) gönderilerek ITS1 primeriyle tek yönlü sekanslamaya tabi tutulmuştur. Elde edilen sekans verileri MEGA X programı kullanılarak analiz edilmiş (Kumar vd., 2018) ve son olarak Gen Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adresinde yer alan BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Tüm diziler, PP258023'den PP258030'e kadar erişim numaraları ile GenBank veri tabanına işlenmiştir.

Enzimatik karakterizasyon

Mayaların enzimatik aktivitesini belirlemek için API-ZYM (BioMérieux, Fransa) test kiti kullanılmıştır. Bu amaçla aktive edilmiş maya izolatları YGC besiyerine sürülerek geliştirilmiş ve tekli kolonilerden alınarak distile su yardımıyla 5-6 McFarland bulanıklık seviyesine kadar süspansiyon edilmiştir. Hazırlanan süspansiyondan 65 µL alınarak kuyucuklara inoküle edildi ve her kuyucuğa ZYM A ve ZYM B reaktifleri eklenerek 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Fast Blue'ya bağlı sarı renk oluşumunu engellemek için seritler 1000 W'lık lamba altında 10 saniye tutuldu ve 5 dakika renk oluşumu için beklendi. Son olarak oluşan renkler API-ZYM renk reaksiyon kartıyla karşılaştırılarak 0'dan 5'e kadar

derecelendirildi. Aktivite olmayanlar (renk oluşmayan) 0 olarak kaydedilirken en yoğun renk 5 olarak kaydedilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Maya izolatlarının identifikasyon sonuçları

Olgunlaştırılmış Shanklish peynirlerinden izole edilmiş 24 adet endojen maya izolatu ITS1 bölgelerinin dizilenmesiyle tanımlanmıştır. Sekans sonuçlarına göre peynirlerden, 19 adet *Kluyveromyces lactis* (%79.16), 2 adet *Pichia*

kudriavzevii (%8.33), 1 adet *Pichia fermentans* (%4.17), 1 adet *Pichia membranifaciens* (%4.17) ve 1 adet *Clavispora lusitaniae* (%4.17) mayası olmak üzere toplam 24 maya izole edilerek tanımlanmıştır. Elde edilen sekans dizileri NCBI web sitesinde bulunan BLAST veritabanında analiz edilmiş ve %99-100 arasında benzerlik göstermiştir. Çalışmadan izole edilen ve tanımlanan mayaların bilgileri ve erişim numaraları Çizelge 1 ve Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 1. Shanklish peynirlerinden izole edilen mayalara ait bilgiler

Table 1. Information on yeasts isolated from Shanklish cheeses

1	Hatay	ANO1	<i>K. lactis</i>		
		ANO2	<i>K. lactis</i>	PP258025	%99.38
		ANO3	<i>P. kudriavzevii</i>	PP258023	%99.80
		ANO4	<i>K. lactis</i>		
		ANO5	<i>K. lactis</i>		
		ANO6	<i>P. fermentans</i>	PP258028	%99.84
2	Gaziantep	ANO7	<i>K. lactis</i>		
		ANO8	<i>K. lactis</i>		
		ANO9	<i>P. membranifaciens</i>	PP258029	%99.34
		ANO10	<i>K. lactis</i>		
3	İstanbul	ANO11	<i>K. lactis</i>		
		ANO12	<i>K. lactis</i>	PP258026	%99.38
		ANO13	<i>K. lactis</i>		
		ANO14	<i>K. lactis</i>		
4	Mersin	ANO15	<i>K. lactis</i>		
		ANO16	<i>K. lactis</i>	PP258027	%99.38
		ANO17	<i>K. lactis</i>		
		ANO18	<i>C. lusitaniae</i>	PP258030	%98.37
		ANO19	<i>K. lactis</i>		
5	Kilis	ANO20	<i>K. lactis</i>		
		ANO21	<i>P. kudriavzevii</i>	PP258024	%99.80
		ANO22	<i>K. lactis</i>		
		ANO23	<i>K. lactis</i>		
		ANO24	<i>K. lactis</i>		

Çalışmadan elde edilen verilere göre *K. lactis* olgunlaştırılmış Shanklish peynirlerinde baskın maya türü olarak tespit edilmiştir. *Kluyveromyces* cinsi mayalar, özellikle *Kluyveromyces lactis*, endüstriyel biyoteknoloji için en önemli maya türlerinden biridir ve endüstriyel olarak başta β -galaktosidaz enzimi olmak üzere çeşitli metabolitlerin ve proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır (Spohner vd., 2016). Bununla

birlikte bu maya, sıklıkla süt ve süt ürünlerinden özellikle peynirlerden (Canastra peyniri, French peyniri, Fiore Sardo peyniri, Tulum peyniri) izole edilmektedir (Oliveira vd., 2019; Andrade vd., 2017; Ceugniz vd., 2017; Fadda vd., 2017; Karasu-Yalcin vd., 2012). Bu mayanın en çarpıcı özelliklerinden birisi ise probiyotik özellikler barındırma potansiyelidir. Çeşitli araştırmalar *K. lactis*'in mide-bağırsak yolunda canlı kalabildiğini,

bağırsak epitel dokusuna yapışabileceğini, kısa zincirli yağ asitleri üretimi bakımından üstün olduğunu, gıda patojenlerine karşı inhibisyon etkisi olduğunu ve kanserli hücrelerde pro-apoptotik aktivite göstermesi gibi fonksiyonel özellikler barındırdığını ortaya koymuştur (Oliveira vd., 2019). Peynir üretiminde uygulanan olgunlaştırma aşamasının da, maya florasının çeşitliliğini doğrudan etkileyen bir faktör olduğu ve ticari olarak satılan ve yüzeyi olgunlaştırılmış birçok peynirden de *K. lactis* mayasının izole edildiği rapor edilmektedir (Karasu Yalçın vd., 2011). *K. lactis*'in peynirlerde proteolitik aktivite gösterdiği ve aminoasit, amin grubu bileşikler, uzun zincirli ketonlar ve monogliserid sentezleyerek peynirlerin tatlarında aromatik acı tat gelişmesinde öncü olduğu belirtilmektedir (Ozmen Togay vd., 2020; Geronikou vd., 2020). Ayrıca, *K. lactis*'in laktozu asimile etme yeteneği ve aminopeptidaz aktivitesi gibi enzimatik potansiyeli olduğu da bilinmektedir (Lenoir, 1984).

Çizelge 2. Shanklish peynirlerinden izole edilerek tanımlanan maya suşları ve sayıları

Table 2. Yeast strains and total of numbers isolated from Shanklish cheeses

Maya türleri / Yeast species	İzolat sayıları / Isolate number
<i>Kluyveromyces lactis</i>	19
<i>Pichia kudriavzevii</i>	2
<i>Pichia fermentans</i>	1
<i>Pichia membranifaciens</i>	1
<i>Clavispora lusitanae</i>	1
Toplam	24

K. lactis, *K. marxianus*, *Yarrowia lipolytica* ve *Debaryomyces hansenii* peynirlerden izole edilen başlıca maya izolatları olmasına rağmen bunların yanında daha az sayıda olmakla birlikte *Pichia* spp., *Geotrichum candidum* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalar da peynirlerden izole edilerek çeşitli teknolojik/probiyotik özellikleri sıklıkla araştırılmaktadır (Atanassova vd., 2016; Ceugniez vd., 2017; Aponte vd., 2010; Zheng vd., 2018). Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre Shanklish peynirlerinden 2 adet *P. kudriavzevii*, 1 adet *P. fermentans* ve 1 adet *P. membranifaciens* olmak üzere toplam 4 adet *Pichia* spp. cinsi maya izole

edilmiştir. *P. kudriavzevii* olası probiyotik özellikleri ve zorlu stres koşullarına karşı üstün performans göstermesinden ötürü son yıllarda artan bir ilgi görmektedir. Bu tür çok çeşitli fermente ürünlerden izole edilmekle birlikte, özellikle peynirlerde aromanın geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca bu türün hücre dışı proteaz ve lipaz aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (Chu vd., 2023) *P. kudriavzevii*'nin Kazak peynirlerinde destek kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada, bu mayanın brendi, otsu ve soğan aromaları gibi hoş bir tat oluşturduğu tespit edilmiştir (Zheng vd., 2018). Öte yandan *P. fermentans* ise Lor peyniri, Otlu peynir ve Feta peyniri gibi çeşitli peynirlerden izole edilmiştir (Güneş vd., 2021; Tokak vd., 2019; Zheng vd., 2021). Merchán vd. (2020) tarafından yapılan bir araştırmada, Extremadura bölgesindeki yumuşak tip peynirlerden izole edilen *P. fermentans*'ın yapay mide ortamında hayatta kalabildiği, yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu, antimikrobiyal potansiyelinin yüksek ve otoagregasyon/hidrofobite değerlerinde diğer suşlara göre en üstün tür olduğu ortaya konulmuştur. Shanklish peynirlerinden izole edilen bir diğer maya ise *P. membranifaciens* olup bu maya Cabrales peyniri (Álvarez-Martín vd., 2017) ve Civil peyniri (Yıldız vd., 2021) gibi peynirlerinde florasında bulunmaktadır ve destek kültür veya starter kültür olarak kullanılabilir önemli bir maya olduğu bildirilmektedir (Karasu-Yalçın vd., 2019).

C. lusitanae geniş yayılım gösteren bir maya olup Mozzarella peyniri (Facchin vd., 2013) ve Beyaz peynir (Gelen ve Ceylan, 2017) gibi süt ürünlerinde de izole edilmiştir. Bu maya hakkında çok sınırlı çalışma olmasına rağmen, probiyotik özellikler taşıdığı (Gürkan, 2018), lipid üretim yeteneğinin bulunduğu (Berikten vd., 2021) ve çeşitli enzim aktiviteleri gösterdiği (Müjdecı, 2012) yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur.

Enzim aktiviteleri

İzolatların API-ZYM test kiti ile elde edilmiş enzim aktiviteleri Çizelge 3'te verilmiştir. *K. lactis* suşlarının tamamına yakını yüksek lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, asit fostataz, Naftol-as-bi-fosfohidroliz, β -

galaktosidaz, α -glukosidaz ve β -glukosidaz enzim aktivitesi göstermiştir. Suşların enzim aktiviteyi yüzdeleri Şekil 1’de verilmiştir.

P. kudriavzevii ANO21 suşu iyi derecede esteraz lipaz ve Naftol-as-bi-fosfohidroliz aktivitesi gösterirken, *P. kudriavzevii* ANO3 ve *P. fermentans* ANO6 suşları ise lösün arilamidaz, asit fosfataz ve Naftol-as-bi-fosfohidroliz aktiviteyi iyi

derecede göstermiştir. *P. membranifaciens* ANO9 suşu ise diğer *Pichia* spp. cinsi suşlarla karşılaştırıldığında en yüksek asit fosfataz ve naftol-as-bi-fosfohidroliz aktivitesi gösteren suş olarak göze çarpmaktadır. *C. lusitaniae* ANO18 suşu ise yüksek lösün arilamidaz ve asit fosfataz aktivitesi göstermesine rağmen enzimatik aktivite yönünden diğer maya suşlarıyla rekabet edebilecek sonuçlar vermemiştir.

Çizelge 3. API-ZYM test kiti ile elde edilmiş mayaların enzimatik karakterizasyonu

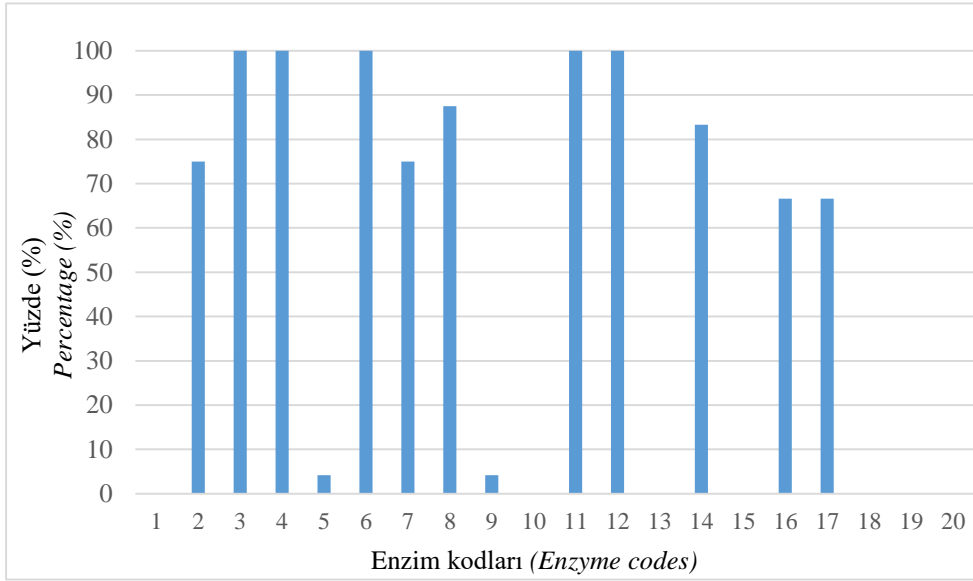
Table 3. Enzymatic characterization of yeasts obtained with API-ZYM test kit

İzolat No*/ Isolate number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ANO1	0	2	3	4	0	5	4	4	0	0	5	3	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO2	0	1	3	3	0	4	4	3	0	0	5	3	0	2	0	5	4	0	0	0
ANO3	0	0	3	3	0	4	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
ANO4	0	2	3	4	0	5	5	4	0	0	4	4	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO5	0	2	3	4	0	5	4	4	0	0	5	3	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO6	0	2	3	3	0	5	2	3	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
ANO7	0	0	1	1	0	4	0	1	0	0	3	3	0	4	0	0	0	0	0	0
ANO8	0	0	2	3	0	4	0	1	0	0	3	3	0	4	0	0	0	0	0	0
ANO9	0	3	4	3	1	5	4	4	1	0	5	5	0	1	0	0	0	0	0	0
ANO10	0	2	3	4	0	5	4	4	0	0	5	3	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO11	0	2	3	3	0	4	5	3	0	0	5	3	0	3	0	5	4	0	0	0
ANO12	0	2	3	4	0	5	5	4	0	0	4	4	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO13	0	2	3	4	0	5	4	4	0	0	5	3	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO14	0	0	2	2	0	4	0	2	0	0	3	3	0	4	0	0	0	0	0	0
ANO15	0	2	3	4	0	5	4	4	0	0	5	4	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO16	0	2	3	3	0	4	4	3	0	0	5	3	0	2	0	5	5	0	0	0
ANO17	0	2	3	4	0	5	5	4	0	0	5	4	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO18	0	0	2	1	0	5	1	0	0	0	5	1	0	0	0	3	3	0	0	0
ANO19	0	2	3	4	0	5	4	4	0	0	5	3	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO20	0	1	2	3	0	4	0	4	0	0	4	3	0	4	0	0	0	0	0	0
ANO21	0	0	3	4	0	3	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0
ANO22	0	2	3	3	0	5	5	4	0	0	5	3	0	3	0	5	5	0	0	0
ANO23	0	1	3	3	0	4	5	3	0	0	5	3	0	4	0	5	5	0	0	0
ANO24	0	2	3	4	0	5	3	4	0	0	4	4	0	3	0	5	5	0	0	0

1: Kontrol, 2: Alkalin fosfataz, 3: Esteraz, 4: Esteraz lipaz, 5: Lipaz, 6: Lösün arilamidaz, 7: Valin arilamidaz, 8: Sistin arilamidaz, 9: Tripsin, 10: Alfa simotripsin, 11: Asit fosfataz, 12: Naftol-as-bi-fosfohidroliz, 13: α -galaktosidaz, 14: β -galaktosidaz, 15: β -glukuronidaz, 16: α -glukosidaz, 17: β -glukosidaz, 18: N-asetil- β -glukozaminidaz, 19: α -mannosidaz, 20: α -fukosidaz

*ANO3 *P. kudriavzevii*, ANO6 *P. fermentans*, ANO9 *P. membranifaciens*, ANO18 *C. lusitaniae*, ANO21 *P. kudriavzevii*, diğer izolat kodları ise *K. lactis* suşlarına aittir. (ANO3 *P. kudriavzevii*, ANO6 *P. fermentans*, ANO9 *P. membranifaciens*, ANO18 *C. lusitaniae*, ANO21 *P. kudriavzevii*, and other isolate codes indicate *K. lactis* strains.)

Şekil 1. Maya izolatlarının enzim aktivitesi yüzdeleri
Figure 1. Enzyme activity percentages of yeast isolates



1: Kontrol, 2: Alkalın fosfataz, 3: Esteraz, 4: Esteraz lipaz, 5: Lipaz, 6: Lösin arilamidaz, 7: Valin arilamidaz, 8: Sistin arilamidaz, 9: Tripsin, 10: Alfa simotripsin, 11: Asit fosfataz, 12: Naftol-as-bi-fosfohidroliz, 13: α -galaktosidaz, 14: β -galaktosidaz, 15: β -glukuronidaz, 16: α -glukosidaz, 17: β -glukosidaz, 18: N-asetil- β -glukozaminidaz, 19: α -mannosidaz, 20: α -fukosidaz

Arilamidazlar peptid, ammid veya arilamidlerden N-terminal aminoasitlerin hidrolizini katalize etmektedirler (Dodor ve Tabatabai, 2007). Böylece, arilamidazların aminoasitlerin serbest bırakılmasında ve peynirde arzu edilen aromanın geliştirilmesinde önemli etkileri olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu enzimlerin peynirin olgunlaşması aşamasında gelişen acılığın giderilmesinde rol aldıkları bildirilmiştir (Herrerros vd., 2003).

Fosfatazların çeşitli fosfat esterlerinin C-O-P bağlarının hidrolizini katalize ettikleri bilinmektedir. Optimum pH değerlerine bağlı olarak asit veya alkalın olarak isimlendirilmektedirler. Peynirde her iki fosfataz enzimi bulunmasına rağmen peynirlerin düşük pH'ya sahip olmalarından ötürü asit fosfatazlar daha aktif rol oynamaktadırlar (Magboul ve McSweeney, 1999). Peynirlerin olgunlaşma aşamasında proteolize dirençli olan fosfat açısından zengin peptidlerin üretildiği bildirilmektedir. Peynirdeki asit fosfataz ve proteolitik enzimlerin aktivasyonu küçük

peptidler ve serbest aminoasitler geniş çapta üretilmektedir. Ayrıca, asit fosfataz enziminin proteoliz aktivitesi olduğu ve bu nedenle peynirde aroma oluşumuna katkı sunduğu da bildirilmiştir (Akuzawa ve Fox, 2004).

Esteraz ve lipazlar, lipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyerek peynirlerdeki serbest yağ asitlerinin miktarını artırmaktadırlar. Düşük konsantrasyonlardaki serbest yağ asitlerinin proteoliz ürünleri ve diğer reaksiyonlarla doğru şekilde dengelendiklerinde aromaya ve lezzete katkı sunabilecekleri belirtilmektedir (Herrerros vd., 2003). Yüksek esteraz veya esteraz lipaz aktivitesine sahip suşlarının peynirlerin olgunlaşma aşamasında lipolize katkıda bulunabilecekleri düşünülmektedir (Karasu-Yalcin vd., 2012).

β -galaktosidaz enzimi laktozu hidrolize etmekten sorumlu bir enzimdir. Peynir üretiminde bu enzim laktozu parçalayarak glikoz ve galaktoza dönüştürerek fermantasyon sürecinin hızlanmasına katkıda bulunur. Ayrıca peynirlerin

olgunlaşma aşamasında hem tekstürel özelliklerinin hem de tat profilinin geliştirilmesinde rol almaktadır (Saqib vd., 2017). α ve β -glukosidazların ana rolü ise süt ürünlerindeki glikozun ve glikoz içeren moleküllerin parçalamalarıdır. Böylece hem fermantasyon süreçlerine katkı verirler hem de olgunlaşma aşamasında peynirlerin tat profillerine katkıda bulunabilirler (de Morais vd., 2023).

Suşların enzimatik aktivite sonuçlarına göre, *K. lactis* ANO17 suşu en üstün enzimatik aktivite gösteren suş olarak tespit edilmiştir. Bu suş, yüksek esteraz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, asit fostataz, Naftol-as-bi-fosfohidroliz α -glukosidaz ve β -glukosidaz aktivitesi gösterirken orta seviyede esteraz, β -galaktosidaz ve düşük seviyede alkalın fostataz aktivitesi göstermiştir. Olgunlaştırılmış Shanklish peynirinden izole edilen bu suş enzimatik aktivite yönünden oldukça üstün performans gösterdiğinden, daha ileri çalışmalarda veya starter kültür kombinasyonlarında destek kültür olarak kullanılabilme potansiyeli göstermektedir.

SONUÇ

Türkiye’de son yıllarda üretilmeye ve tüketilmeye başlanan Shanklish peynirinin maya florası SCoT markör yöntemi kullanılarak moleküler düzeyde tanımlanmış ve tanımlanan suşların enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre Shanklish peynirlerinden 19 adet *K. lactis*, 2 adet *P. kudriavzevii*, 1 adet *P. fermentans*, 1 adet *P. membranifaciens* ve 1 adet *C. lusitaniae* olmak üzere toplam 24 adet maya suşu izole edilmiştir. Bu suşlardan *K. lactis* ANO17 suşu esteraz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, asit fostataz, Naftol-as-bi-fosfohidroliz α -glukosidaz ve β -glukosidaz aktivitesi göstermiştir. Böylece, bu suşun peynirin olgunlaşması aşamasında önemli yapı, aroma ve tat geliştirme potansiyeli bulunduğu ve destek kültür kombinasyonlarında kullanılabilceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu suşun teknolojik ve probiyotik özelliklerinin araştırılarak ayrıca gıda güvenliği açısından değerlendirilmesine ve genel olarak Shanklish peyniri üzerine daha geniş ve kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu

çalışmanın, maya izolasyonu ve tanımlamasının peynir üretiminde kullanılan hammaddelerden ve üretimin farklı aşamalarından alınan örneklerde gerçekleştirilerek suşların izolasyon kaynaklarının da belirlenebileceği çalışmalara katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarın hiçbir kurum veya kuruluşla çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKÇA

Abou Younes, A., Salma A., Al-Eiq A. (2018). Identification lactobacilli according to the API and PCR techniques isolated from rustic Shanklish. *Damascus University Journal of Agricultural Sciences*, 34 (2).

Addas, M. (2013). Syrian Shanklish and its quality. Mediterranean Agronomic Institute of Chania. Master Thesis. <https://drive.google.com/file/d/1T4BhJCSBssI8Db4UteOK4rkammQ3-d6T/view>.

Akuzawa, R., Fox, P. F. (2004). Acid phosphatase in cheese. *Animal Science Journal*, 75(5), 385-391, <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2004.00202.x>

Álvarez-Martín, P., Flórez, A. B., López-Díaz, T. M., Mayo, B. (2007). Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 17(8), 961-967, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.11.005>

Amom, T., Tikendra, L., Apana, N., Goutam, M., Sonia, P., Kojjam, A. S., ... Nongdam, P. (2020). Efficiency of RAPD, ISSR, iPBS, SCoT and phytochemical markers in the genetic relationship study of five native and economical important bamboos of North-East India. *Phytochemistry*, 174, 112330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112330>

Andrade, R. P., Melo, C. N., Genisheva, Z., Schwan, R. F., Duarte, W. F. (2017). Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. *Food Research International*, 91, 72-79, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.032>

- Aponte, M., Pepe, O., Blaiotta, G. (2010). Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2358-2361, <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2948>
- Atanassova, M. R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I. C., Garabal, J. I., Centeno, J. A. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiology*, 53, 172-181, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.012>
- Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., Çakır, İ. (2022). Start Codon Targeted (SCoT) markers for the assessment of genetic diversity in yeast isolated from Turkish sourdough. *Food Microbiology*, 107, 104081, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104081>
- Berikten, D., Hoşgün, E. Z., Gökdal Otuzbiroğlu, A., Bozan, B., Kıvanç, M. (2021). Lipid production from crude glycerol by newly isolated oleaginous yeasts: strain selection, molecular identification and fatty acid analysis. *Waste and Biomass Valorization*, 1-10, <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01405-1>
- Biagiotti, C., Ciani, M., Canonico, L., Comitini, F. (2018). Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. *European Food Research and Technology*. 244 (11): 1921-1931, doi: 10.1007/s00217-018-3104-6
- Ceugniz, A., Coucheny, F., Jacques, P., Daube, G., Delcenserie, V., Drider, D. (2017). Anti-Salmonella activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. *Research in Microbiology*, 168(6), 575-582, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.03.004>
- Chu, Y., Li, M., Jin, J., Dong, X., Xu, K., Jin, L., ... Ji, H. (2023). Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. *Journal of Fungi*, 9(2), 170, <https://doi.org/10.3390/jof9020170>
- Collard, B. C., Mackill, D. J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27, 86-93, <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>
- de Morais, S. B., Florentino, B. M., Marinsek, S. R. M., de Rezende Bastos, A. A., Quirino, B. F. (2023). The potential of β -glucosidases for aroma and flavor improvement in the food industry. *The Microbe*, 100004, <https://doi.org/10.1016/j.microb.2023.100004>
- Dodor, D. E., Tabatabai, M. A. (2007). Arylamidase activity as an index of nitrogen mineralization in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(15-16), 2197-2207, <https://doi.org/10.1080/00103620701549132>
- Dos Santos, M.T.P.G., Benito, M. J., de Guía Córdoba, M., Alvarenga, N. And Herrera, S.R. M.S. (2017). Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and-independent DNA approaches. *International Journal of Food Microbiology*. 262: 63-70, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013
- El Mayda, E. (2007). Manufacture of local cheese from raw milk in Syria. In Proceedings International Symposium on 'Historical Cheeses of Countries around the Archipelago Mediterraneo', Thessaloniki, 6-8 December, Greece (pp. 6-8).
- Facchin, S., Barbosa, A. C., Carmo, L. S., Silva, M. C. C., Oliveira, A. L., Morais, P. B., Rosa, C. A. (2013). Yeasts and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo mozzarella produced and commercialized in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 701-707, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300006>
- Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT*, 75, 100-106, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.020>
- Ferreira, A. D., Viljoen, B. C. (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2),

- 131-140, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00252-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00252-6)
- Gelen, S. U., Ceylan, Z. (2017). Isolation and identification of yeasts in white cheese. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(2), 100-10, <https://doi.org/10.31797/vetbio.907007>
- Geronikou, A., Srimahaeak, T., Rantsiou, K., Triantafyllidis, G., Larsen, N., Jespersen, L. (2020). Occurrence of yeasts in white-brined cheeses: Methodologies for identification, spoilage potential and good manufacturing practices. *Frontiers in Microbiology*, 11, 582778, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582778>
- Gogoi, B., Wann, S. B., Saikia, S. P. (2020). Comparative assessment of ISSR, RAPD, and SCoT markers for genetic diversity in *Clerodendrum* species of North East India. *Molecular Biology Reports*, 47, 7365-7377. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05792-x>
- Güneş, E., Aydın, F., Çakır, İ. (2021). Enzymatic characterization of yeast isolated from naturally fermented Herbs. *Gıda*, 46(5), 1081-1091, <https://doi.org/10.15237/gida.GD21088>
- Gürkan, B. (2018). Çeşitli Kaynaklardan Probiyotik Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi.
- Harju, S., Fedosyuk, H., Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC Biotechnology*, 4(1), 1-6, <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-8>
- Herreros, M. A., Fresno, J. M., Prieto, M. G., Tornadijo, M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13(6), 469-479, [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00054-2)
- Karasu Yalçın, S., Ergül, Ş. Ş., Özbaş, Z. Y. (2011). Peynir mikroflorasındaki mayaların önemi. *Gıda*, 36(1), 55-62.
- Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergul, S., Ozbas, Z. Y. (2019). Yeast strains with technological and probiotic traits isolated from Mihalic cheese. *International Food Research Journal*, 26(4), 1359-1370.
- Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergul, S., Ozbas, Z.Y. (2012). Identification and enzymatic characterization of the yeasts isolated from Erzincan tulum cheese. *Mljekarstvo*. 62(1): 53-61.
- Kesenkaş, H., Akbulut, N. (2006). Mayaların peynir üretiminde destek starter kültür olarak kullanımı. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(2), 165-174.
- Klein, N., Zourari, A., Lortal, S. (2002). Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products—comparison with several dairy bacteria. *International Dairy Journal*, 12(10), 853-861, [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00081-X)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547, doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lenoir, J. (1984). The surface flora and its role in the ripening of cheese. *International Dairy Federation Bulletin*, 171, 3-20.
- Magboul, A. A., McSweeney, P. L. (1999). Purification and characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus plantarum* DPC2739. *Food Chemistry*, 65(1), 15-22, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00255-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00255-6)
- Martin, N., Berger, C., Le Du, C., Spinnler, H. E. (2001). Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2125-2135, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74657-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74657-7)
- McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
- Merchán, A. V., Benito, M. J., Galván, A. I., de Herrera, S. R. M. S. (2020). Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. *LWT*, 124,

- 109173, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109173>
- Müjdeci, G. N. (2012). Gemlik Çeşidi Siyah Sofralık Zeytinlerin Doğal Fermantasyonlarında Yer Alan Mayaların Ve Teknolojik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi.
- Nehme, L., Salameh, C., Tabet, E., Nehme, M., Hosri, C. (2019). Innovative improvement of Shanklish cheese production in Lebanon. *International Dairy Journal*, 90, 23-27, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.10.005>
- Oliveira, D. R., Lopes, A. C. A., Pereira, R. A., Cardoso, P. G., Duarte, W. F. (2019). Selection of potentially probiotic *Kluyveromyces lactis* for the fermentation of cheese whey-based beverage. *Annals of Microbiology*, 69, 1361-1372, <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01518-y>
- Ozmen Togay, S., Capece, A., Siesto, G., Aksu, H., Sandikci Altunatmaz, S., Yilmaz Aksu, F., Romano, P., Karagul Yuceer, Y. (2020). Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses. *Food Science and Technology*, 40, 871-876, <https://doi.org/10.1590/fst.24319>
- Patino, E. M., Giorgi, E. J., Mendez, F. Y. (1999). Shanklish cheese-an artisanal product from Corrientes Province, Argentina. *Revista Argentina de Lactologia*, 18(77), e81.
- Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A., Tzanetakis, N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 125-133, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00580-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00580-3)
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, 7, 1-7, <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>
- Spohner, S. C., Schaum, V., Quitmann, H., Czermak, P. (2016). *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 222, 104-116, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.023>
- Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R., Guerzoni, M. E. (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 69-77, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00574-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00574-8)
- Tempel van den, T., Jakobsen, M. (1998). Yeasts associated with Danablu. *International Dairy Journal*, 8(1), 25-31, [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00013-2)
- Tikendra, L., Potshangbam, A. M., Dey, A., Devi, T. R., Sahoo, M. R., Nongdam, P. (2021). RAPD, ISSR, and SCoT markers based genetic stability assessment of micropropagated *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f.-an important endangered orchid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 341-357. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00939-x>
- Tokak, S., Kiliç, İ. H., Yalçın, H. T., Duran, T. (2019). Detection of extracellular lipases and genotypic identification from yeast causing spoilage of some dairy products produced in Gaziantep. *Kabramanmaraş Sütlü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22, 206-211, DOI:10.18016/ksutarimdog.a.vi.555727
- Toufeili, I., Shadarevian, S., Artinian, T., Tannous, R. (1995). Ripening changes and sensory properties of bovine, caprine and ovine shankleesh. *International Dairy Journal*, 5(2), 179-189, [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)92209-M](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)92209-M)
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Yildiz, M., Turgut, T., Cetin, B., Kesmen, Z. (2021). Microbiological characteristics and identification of yeast microbiota of traditional mouldy civil cheese. *International Dairy Journal*, 116, 104955, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104955>

Zheng, X., Li, K., Shi, X., Ni, Y., Li, B., Zhuge, B. (2018). Potential characterization of yeasts isolated from Kazak artisanal cheese to produce flavoring compounds. *Microbiology Open*, 7(1), e00533, <https://doi.org/10.1002/mbo3.533>

Zheng, X., Shi, X., Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor

biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703284, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>