

**GELENEKSEL VE ENDÜSTRİYEL
YÖNTEMLERLE ÜRETİLMİŞ SALAMURA
ASMA YAPRAKLARININ MİKROFLORASININ
BELİRLENMESİ**

Mehmet Çağlar FIRAT

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Bülent Çetin
2012
Her hakkı saklıdır**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GELENEKSEL VE ENDÜSTRİYEL YÖNTEMLERLE ÜRETİLMİŞ
SALAMURA ASMA YAPRAKLARININ MİKROFLORASININ
BELİRLENMESİ**

Mehmet Çağlar FIRAT

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2012

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Geleneksel ve Endüstriyel olarak üretilmiş Salamura Asma Yapraklarının Mikroflorasını Belirlenmesi

Yrd. Doç. Dr. Bülent Çetin danışmanlığında, Mehmet Çağlar Fırat tarafından hazırlanan bu çalışma 10/08/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy~~ **çokluğu (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Kamil Haliloğlu

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mustafa Gürses

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bülent Çetin

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2011/388

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı. 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GELENEKSEL ve ENDÜSTRİYEL YÖNTEMLERLE ÜRETİLMİŞ SALAMURA ASMA YAPRAKLARININ MİKROFLORASININ BELİRLENMESİ

Mehmet Çağlar FIRAT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇETİN

Bu çalışma, geleneksel ev tipi ve endüstriyel salamura asma yapraklarının mikroflorasını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Yapraklar, ülkemizde yoğun olarak üretim yapılan Tokat, Manisa ve Erzincan yörelerinden seçilmiştir. Denemede ürünün gıda güvenliği ve fermantasyonda rol alabilecek muhtemel floranın belirlenmesi amaçlanmış, bu nedenle Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB), Psikrotrofilik, *Pseudomonas*, Maya ve Küf (PDA ve YGC’de gelişen), Laktik Asit Bakterileri (Laktokoklar ve Laktobasiller), *Enterobacteriaceae*, Enterekoklar, *Staphylococcus aureus* sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayımı yapılan mikroorganizmalarda ortalama sayı sırası ile; 0.88, <2, <2, 3.92, 4.01, <2, <2, 0.09, 0.04, <2 olarak tespit edilmiştir. Kimyasal analizlerden ise pH, asitlik ve tuz tayini yapılmış olup ortalamalar sırası ile; 3.37, %1.32, %12.62 olarak tespit edilmiştir. Tuz oranlarının %1,75 ila %25,00 gibi geniş bir aralıkta değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda; salamura asma yapraklarının mikroflorasının genel olarak maya türleri tarafından oluştuğu görülmüş olup 12 farklı maya suşu izole edilmiştir. Tür bazında ise; izole edilen mayalar *Pichia subpelliculosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Pichia membranifaciens*, *Hanseniaspora uvarum* olarak tanımlanmıştır.

2012, 51 Sayfa

Anahtar kelimeler: Salamura asma yaprağı, maya, moleküler tanı (PCR), M13

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION of BRINED GRAPEVINE LEAVES MICROFLORA PRODUCED BY TRADITIONAL AND INDUSTRIAL METHODS

Mehmet Çağlar FIRAT

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Bülent ÇETİN

This study has been carried out to identify the microflora of brined grapevine leaves which were produced by traditional methods. Leaves were collected primarily from Manisa, Tokat and Erzincan regions where brined grape leaf production is made mostly. In the study, Total Aerobic Mesophilic Bacteria (TAMB), Psychrotrophic bacteria, Pseudomonas, Yeast and Mould (on PDA and YGC), Lactic Acid Bacteria (presumptive lactic acid bacteria on MRD and M17), Enterobacteriaceae, *Enterococcus* and *S.aureus*, were counted in order to identify the microflora which have a role in food safety and fermentation. In sequence, means of enumerations are found; 0.88, <2, <2, 3.92, 4.01, <2, <2, 0.09, 0.04, <2. As of chemical analyses pH, acidity and salt was measured. Means of chemical analyses are found; 3.37, 1.32%, and 12.62%, respectively. Salt percentages varies from 1,75 to 25,00%. As a result, microflora of brined grape leaves consists of yeast species which are *Pichia subpelliculosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Pichia membranifaciens*, *Hanseniaspora uvarum*.

2012, 51 pages

Keywords: Brined grape leaves, yeast, molecular identification (PCR), M13

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşmasında; planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde maddi manevi her türlü yardımı sağlayan tüm bilimsel birikimini benimle paylaşan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇETİN'e...

Hayatım boyunca hep desteklerini gördüğüm sevgili aileme ve eşime...

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mehmet Çağlar FIRAT

Ağustos, 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1. Mikrobiyolojik Analizler.....	16
3.1.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı	17
3.1.2. Psikrotrofilik bakteri sayımı	18
3.1.3. Pseudomonas'ların sayımı.....	18
3.1.4. Maya ve küf sayımı	19
3.1.5. Enterekokların sayımı.....	19
3.1.6. Laktobasillerin sayımı	19
3.1.7. Laktokokların sayımı.....	20
3.1.8. Staphylococcus aureus sayımı.....	20
3.1.9. Enterobacteriaceae sayımı.....	20
3.1.10. Mikroskopi ve görüntüleme	21
3.2. İzolatların Tanısı.....	21
3.2.1. İzolatların tekrar canlandırılması.....	21
3.2.2. İzolatların genetik tanısı	22
3.2.3. İzolatların biyokimyasal tanısı	23
3.3. Kimyasal Analizler.....	23
3.3.1. pH tayini	23
3.3.2. Tuz tayini.....	24
3.3.3. Asitlik tayini	24
3.4. İstatistik Analizler	25

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	26
4.1 Mikrobiyolojik Bulgular.....	26
4.2. Kimyasal Bulgular.....	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Act	cycloheximide
Bç	baz çifti
Ce	D-CELLobiose
Ery	ERYthritol
g	gram
g	yerçekimi kuvveti
Gal	D-Galactose
Gln	Glucosamine
Glu	D-Glucose
Gly	Glycerol
gnt	Potassium gluconate
Grt	Sodium glucuronate
H	Saat
ha	hektar
Kob/g	Koloni oluşturan birim/gram
Lac	D-Lactose
Lat	Lactic acid
maks	maksimum
Mal	D-Maltose
Man	D-Mannitol
Mdg	Methyl α D-glucopyranoside
Mel	D-Melibiose
min	minimum
ml	mililitre
Mlz	D-Melezitose
Nag	D-acetyl-glucosamine
Ple	Palatinose
Raf	D-Raffinose
rDNA	Ribozomal DNA
Rib	D-Ribose
Sac	D-Saccharose
Sbe	L-Sorbose
Sor	D-Sorbitol
Tre	D-Trehalose
Xyl	D-Xlyose
YTL	Yeni Türk Lirası
\$	Amerikan Doları
μ l	mikro litre
2kg	potassium 2-KetoGluconate

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Olgun bir asma yaprağının çeşitli kısımları.....	2
Şekil 1.2. Salamura Asma Yapağı Üretim Akışı	4
Şekil 1.3. ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri ve universal primerleri	10
Şekil 4.1.a. Temsili izolatların mikroskopik görüntüleri	31
Şekil 4.1.b. Temsili izolatların mikroskopik görüntüleri.....	32
Şekil 4.2. İzole edilen farklı suşların agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş hali	33
Şekil 4.3. 26S rRNA D1/D2 bölgesi amplifiye edilen mayaların elektroforez görüntüsü	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

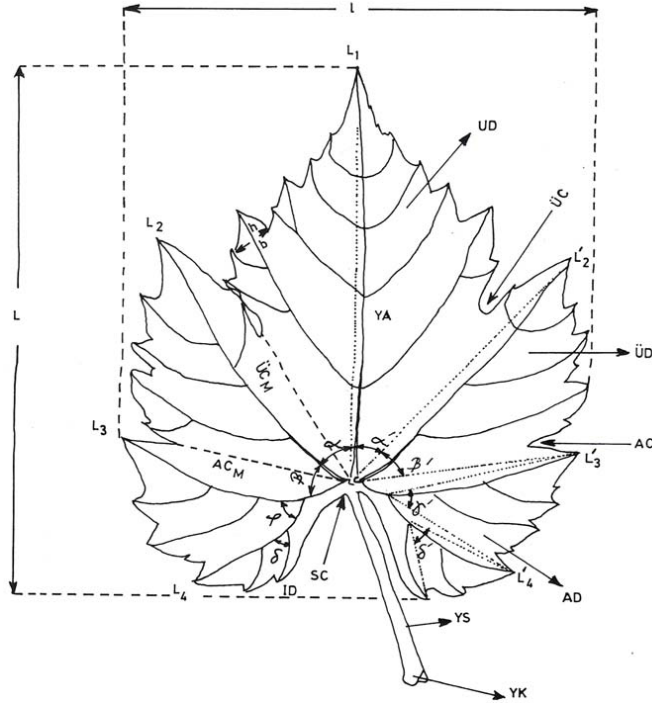
Çizelge 1.1. Sebzelerin doğal fermentasyonu sırasında baskın mikrofloranın değişimi ..	6
Çizelge 3.1. Denemede kullanılan yaprak örneklerinin yöreleri ve özellikleri	17
Çizelge 4.1. Kullanılan asma yapraklarına ait mikrobiyolojik sonuçlar (log kob/g).....	26
Çizelge 4.2. Sekans analizi sonucunda elde edilen bulgular	35
Çizelge 4.3. Biyokimyasal ve moleküler sonuçların karşılaştırılması	36
Çizelge 4.4. Numunelerin asitlik, tuz ve pH ölçümleri.....	37

1. GİRİŞ

Asma, *Vitis vinifera* L. türüne ait kök, dal, yaprak ve meyvelerden oluşan bir ılıman iklim bitkisi ve bağcılık dünyada, genel olarak kuzey yarımkürede 20°-50°, güney yarımkürede ise 20°-40° enlemleri arasında yapılmaktadır. Dünya genelinde 7.792.000 ha alanda bağcılık yapılmaktadır. Sıcaklık, bağcılığın kuzeye doğru yayılmasını engelleyen en önemli faktördür (Taşkaya 2003). 36-42 kuzey enlemleri arasında bulunan ve asmanın anavatanı olarak kabul edilen Türkiye’de, yaklaşık olarak 1200’ün üzerinde üzüm çeşidinin varlığı saptanmıştır. Ancak bunlardan 70–80 kadarının ekonomik öneminin olduğu ve geniş çapta yetiştirildiği bildirilmektedir (Anonim 2003).

Ülkemiz dünya genelindeki toplam 7.792.000 dekar asma alanında % 7,8’lik bir üzüm üretim payına sahiptir (Anonim 2007). Bağcılık temel olarak sofralık üzüm eldesi amacıyla yapılmaktadır. Bunun yanında şaraplık ve kurutmalık üzüm için de asma üretimi gerçekleştirilmektedir. Ancak üreticiler daha fazla gelir kaynağı elde etmek için asma yapraklarını da satmaktadır. Bu denli güçlü üretim payına sahip olduğumuz asmanın en önemli yan ürünü olan salamura yaprakların ticaretinde de söz sahibi olmak içten bile değildir. Nitekim Türkiye aralık ayı sonuna kadar, asma üzerinde üzüm bulunan yegâne ülkedir (Çeliker 2000).

Asma yaprağı genellikle dilimli olup kenarları dişilidir. Yaprak dilimleri, damarlar arasındaki üst ve alt ceplerin derinliklerine göre farklı sayıda olabilmektedir (Şekil 1.1.). Yapraklar genellikle beş dilimli olmakla beraber, dilimsiz, üç dilimli ve nadir de olsa yedi dilimli olabilmektedir. Yaprak sapının aya kısmına birleştiği yerde bir sap cebi bulunmaktadır. Sap cebi V şeklinde veya U şeklinde olabildiği gibi, açık, kapalı, O şeklinde, üst üste binmiş şekilde de olabilmektedir. Yaprak ayasının tam büyüklüğünü alabilmesi için oluşumundan itibaren 30–40 günlük bir süreye ihtiyaç bulunmaktadır. Yapraklar bu dönemden 3–4 ay sonra yaşlanmaya ve yaprak dökümü için ayrım tabakası oluşturmaya başlar. Yapraklar yaşlanma ile birlikte kalınlaşırlar (Weaver 1976).



Şekil 1.1. Olgun bir asma yaprağının çeşitli kısımları

*YS: Yaprak sapı, YK: Yaprak kulakçığı (stipula), YA: Yaprak ayası, UD: Uç dilim, ÜD: Üst yan dilim, AD: Alt yan dilim, SC: Sap cebi, ÜC: Üst cep, AC: Alt cep, ÜCM: Üst cep mesafesi, ACM: Alt cep mesafesi, ID: ilk diş, L1, L2, L3, L4, (L1', L2', L3', L4') :Ana ve tali damarlar, α , β , γ , P (α' , β' , γ' , P'): Damarlar arası açılar, L: Yaprak uzunluğu, I: Yaprak eni, h: Diş yüksekliği, b: Diş genişliği (Demirhan 2006).

Asma yaprağı, Codex Alimentarius verilerine göre şu şekilde sınıflandırılmıştır:

Sınıf: Bitki kökenli temel besin ürünü

Tip: Sebze

Kategori: Yapraksı sebze (Brassica dahil) (Anonim 2010).

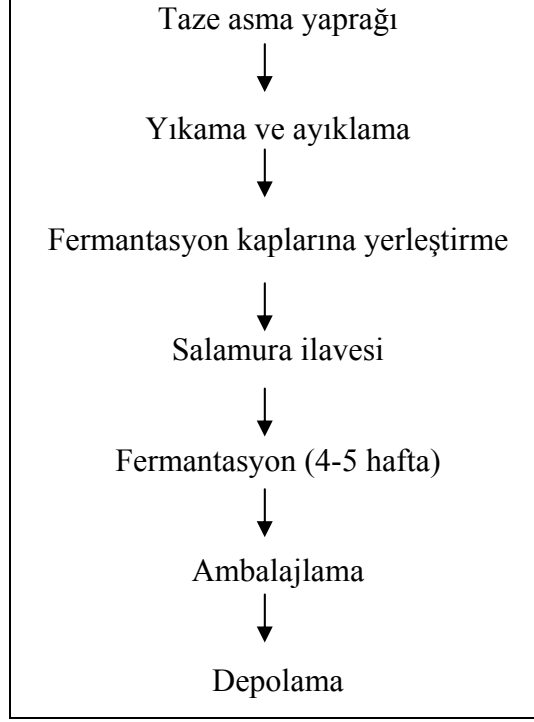
Codex Alimentarius asma yapraklarını temel besin ürünü olarak nitelemiştir. Nitekim Balkanlar, Türkiye ve birçok Ortadoğu ülkesinde salamura asma yaprakları dolma yapımında kullanılmaktadır (Şat vd 2002). Birçok ülkede bilinip tüketilen asma yaprağının besin bileşenleri yaprak sebzelerle kıyaslanabilecek düzeydedir (Kara vd

2006). Asma yaprağının 100g yenilebilir kısımlarındaki besin değeri; 5.60 g protein, 17.30g karbonhidrat, 11.00g lif, 363.08 mg kalsiyum, 91.02g fosfor, 11.10g C vitamini şeklindedir (Kara 2007). Çeşitli kaynaklarda C vitamini için farklı rakamlar zikredilmekte olup 100 g yaprakta 120 mg'a vardığı bildirilmektedir (Baysal 1993). Ayrıca kırmızı üzüm yaprakları antosiyanin ve oligomerik proantosianidin (OPC) gibi flavonoidleri içerir (Anonim 2010).

TÜİK verilerine göre ülkemizde 2011 yılı ekili asma arazisi 4.725.454 dekar, üzüm üretimi ise 4.296.351 tondur. Bu üretimin %52'si sofralık, %36'sı kurutmalık, %12'si ise şaraplık olarak kullanılmıştır (Anonim 2012b). Türkiye özellikle kuru üzümde dünya ticaretinde en önemli üreticidir (Anonim 2007). Geçtiğimiz yıllarda 'Asma bitkisinin üretiminde asıl maksat üzüm üretimidir' inancı olsa da artık bu inanış değişmiş ve salamura asma yaprağı da karlı bir bağcılık ürünü olarak ele alınmaya başlanmıştır. Salamuralık yapraklar ülkemizde özellikle Manisa ve Tokat illerinde yoğun olarak üretilmektedir. Özellikle Tokat yöresinde salamuralık asma yaprağı üretimini esas amaç olarak kabul eden bir bağcılık yapılmaktadır (Ağaoğlu vd 1988).

Asma yaprağı üretim miktarları ve ihracatı hakkında son yıllar için resmi net bir bilgi bulunmamakla birlikte Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre 2003 yılı salamura üzüm yaprağı tüketim miktarının 319.427 kg ve bunun mali değerinin 576.476 YTL olduğu; aynı şekilde Yaprak Dolma (Hazır Yemek Konservesi Teneke Kutuda) tüketim miktarının 4851 kg olduğu bunun mali değerinin 22.434 YTL olduğu, Yaprak Dolma (Hazır Yemek ve Meze) tüketim miktarının 13.696 kg olduğu bunun mali değerinin 45.909 YTL olduğu bildirilmiştir (Anonim 2003). Bu rakamın 2003'den bu yana geçen yıllar ve kayıt dışı üretim de göz önüne alındığında çok daha fazla olacağı düşünülmektedir. Nitekim 2008 yılında yapılan başka bir çalışmada sadece Tokat ilinde ortalama yaprak üretiminin işletme büyüklük grupları itibarı ile 190,34 kg ile 868,89 kg arasında değiştiği, işletmeler ortalaması da 400,27 kg olduğu bildirilmiştir (Elmalı, 2008). Ayrıca Manisa'dan 2003 yılı itibarıyla 1000 ton yaprağın 8 farklı ülkeye ihraç edildiği bilinmektedir (Anonim 2004). 2012 yılı için tahminleri ise sadece Manisa'nın Sarıgöl ilçesindeki yaprak üretiminin 10.000 ton olacağı yönündedir (Anonim 2012a).

Ülkemizde asma yaprağı üretiminde farklı uygulamalar bulunmakta olup, genel üretim şeması aşağıda görülmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Salamura Asma Yaprığı Üretim Akışı (Gülcü 2009)

Yöreden yöreye değişmekle beraber geleneksel üretim yöntemi ise sadece fermantasyon kaplarındaki yapraklara salamura ilavesi şeklinde değil, yıkama ayıklama ve tasnif işleminden sonra; 20–30 adet (1 dizi) yaprağın merkezinin kaya tuzu ile tuzlanması, kendi eksenini etrafında kıvrılarak silindirik şeklinde sıkıştırılması ardından fermantasyon kabına konması şeklinde veya kıvrılmadan dizi dizi kaba yerleştirilen yaprakların kaya tuzu ile yüzeyi kapatacak kadar serpilmesi, tüm kabın dolmasından sonra üzerine salamura suyu konması ve hava almayacak şekilde kapatılması şeklinde yapılmaktadır. Fermantasyon kabında iki sıra yaprak dizisi üzerine 1 sıra tuz konulmaktadır.

Taze asma yaprakları yöresine göre değişmekle birlikte Mayıs ayının ortalarında toplanmaya başlamakta ve salamura yapılmaktadır. Günümüzde Manisa, Tokat ve Erzincan gibi illerde sayıları gittikçe artmaya başlayan ticari işletmeler bu süreçte bağ

sahiplerinden kilo ile yaprak alımı yapmaktadır. Manisa ilinin Sarıgöl ilçesinde Mayıs 2012 itibarı ile taze uç yapraklar 2 TL (1,09 \$), diğer yapraklar ise 1 TL (0,55 \$) den alınmaktadır (Anonim 2012).

Salamura asma yaprakları birçok kaynakta fermente ürün olarak nitelenmiştir (Dalgıç ve Akbulut 1988; Demirci 2002; Koşar vd 2007; Gülcü 2009; Başoğlu vd 2009). Fermantasyon, mikroorganizmaların biyolojik aktivitesine bağlı olarak oluşan ve gıdalarda istenmeyen mikrofloranın gelişmesi ve hayatta kalmasını engelleyen birçok metabolitin üretildiği aynı zamanda ürünü aromatik açıdan zenginleştiren bir prosestir. MÖ 6000 yıllarında peynir ve ekmek üretimi ile uygulamaya başlandığı düşünülen bu süreç günümüze binlerce ürün çeşidine ulaşmıştır (Ross vd 2002). Fermantasyonun ana mekanizması fruktoz, glukoz ve sakkaroz gibi şekerlerin parçalanarak başta laktik asit olmak üzere çeşitli asitlerin teşekkülü şeklinde olup; başlangıç, birincil fermentasyon, ikincil fermentasyon ve post fermentasyon olmak üzere 4 basamaktan oluşur (Çizelge 1.1). Fermantasyon sonucunda gıdalar doğal özelliğini tamamen yitirerek farklı özelliklerde yeni ürünler meydana gelir. Fermantasyon ile gıdalar uzun süre korunabilmektedir. Örneğin eski zamanlarda uzun gemi yolculuklarında gemicilerde vuku bulan skorbit hastalığı, diyetlere turşu eklenmesi buna bağlı olarak C vitamini eksikliğinin giderilmesi ile ortadan kalkmıştır (Demirci 2002).

Fermantasyon ile üretilmiş yöreye özgü ve tüm dünyada tanınan birçok gıda maddesi bulunmaktadır. Bunlara sirke, sauerkraut, turşu, ekmek, ekşi hamur ekmeği, çeşitli peynirler, yoğurt, shoyu, miso, fermente balık ve soslar, çeşitli şaraplar örnek olarak gösterilebilir (Wood 1997).

Çizelge 1.1. Sebzelerin doğal fermentasyonu sırasında baskın mikrofloranın değişimi

Basamak	Baskın mikroorganizma
1-Başlangıç	Çeşitli Gram (+) ve Gram (-) bakteriler
2-Birincil fermentasyon	Laktik asit bakterileri ve mayalar
3-İkincil fermentasyon	Mayalar
4-Postfermentasyon	Aerobik: Yüzeyde oksidatif mayalar, küf ve bakteriler, Anerobik: Yok

Çizelgeden de (Daeschel *et al.* 1987) görülebildiği gibi sebzelerdeki fermentasyon çeşitli laktik asit bakterileri (LAB) ve maya türleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Gıda fermentasyonunda rol alan LAB'ler; *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* (Wessels 2004), önemli mayalar ise *Saccharomyces* spp., *Kluyveromyces* spp. gibi fermentatif mayalar ve *Hansenula* spp., *Pichia* spp., *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii* gibi oksidatif mayalardır. Sebze fermentasyonuna bunlara ilave olarak, mezofil aerob bakteriler, koliform bakteriler ve farklı mayalar da katkı yapabilir (Harris 1998).

Fermentasyonda genel olarak 2 ana maya grubu rol oynar. Bunlardan ilki fermente edilebilir şekerler olduğu sürece salamurada alkolik fermentasyon yapan ve istenilen aromatik yan ürünleri oluşturan mayalardır. Şekerler tükendiğinde ise bakterilerin ürettiği asitlerini oksitleyen ve post fermentasyon sırasında yüzeyde gelişen mayalar ise ikinci grubu oluşturur. Gıdadaki maya popülasyonu üretim şekline bağlı olarak değişir. % 15 ve üstü yüksek tuz konsantrasyonundaki turşular ile %5 ve altı tuz konsantrasyonlarındaki diğer sebze salamuralarının maya florası farklılık arz eder (Pederson 1971; Etchells *et al.* 1975; Fleming 1982).

Mayalar, insan hayatı ve gıdalar ile iç içe girmiştir. Gıdaların doğal yapısında birden çok maya türü mevcuttur. Bunlardan; meyvelerden 18 (Deák 1988), süt mısırından 20 (Deák and Beuchat 1988), havuçtan 11 (Babic *et al.* 1992), portakal konsantresinden 12 (Deák and Beuchat 1993b), üzüksü bitkilerden 23 (Deák 1988), turşulardan 5 (Deák

1988), zeytin salamurasından 13 (Marquina *et al.* 1992), kefirde ise 4 (Rohm *et al.* 1992) maya türü izole edilmiştir.

Fermente sebzelerdeki bozulma genellikle mayalara atfedilmektedir (Savard *et al.* 2002). Bozulma pektinlerin enzimatik yıkımı veya gaz fermantasyonu sonrası kabarma oluşması ile yapıda yumuşama şeklinde olabilmektedir. Birçok maya (ör. *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea kluyveri*, ve *Pichia anomala*) bitki dokularını yıkıcı etkiye sahip pektinesteraz ve poligalakturonaz gibi enzimlere sahip olsalar da, çoğu tüm pektinolitik enzimlere sahip değildir. Ancak oksidatif mayalar yüzeyde gelişerek laktik asidi parçalar ve diğer mikroorganizmalar tarafından yapılan bozulmayı kolaylaştırıcı etkide bulunur (Etchells *et al.* 1975).

Gıda maddeleri ve mikrodünyanın bu derece ilişkili olması; hangi gıda maddesinde hangi mikroorganizmanın yaşadığının, hangilerinin baskın olduğunun, insan sağlığı açısından hangilerinin risk oluşturduğunun ve gıda maddelerinin yapımında hangilerinin olumlu ya da olumsuz rol oynadığının belirlenmesi yıllardır mikrobiyologlar için birincil görev haline gelmiştir. Gıdalardaki mikroorganizmaların tanısı genellikle klasik ve moleküler metotlar olmak üzere ikiye ayrılabilir. Aslında bu metotlar birbirleri ile ilişkilidir. Zira bir bakteri veya mayanın morfolojik özelliklerinin belirlenmesi moleküler özelliklerinin belirlenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır.

Klasik tiplendirme yöntemleri daha çok fenotipik, fizyolojik özellikler, besiyerinde gelişim şekli ve hücre morfolojisine dayanmaktadır (Gadrini *et al.* 2001; N'ũnez *et al.* 1996). Bunlarda; öncelikle gıda numunesinden desimal dilisyonlar hazırlanarak çeşitli agarlara ekimi yapılır ve uygun sıcaklıklarda inkübe edilir. Oluşan farklı kolonilerden elde edilen mikroorganizmalar mikroskopta boyanarak ve/veya boyanmadan morfolojik cins özelliklerinin belirlenmesini takiben, farklı koloniler petrilerden izole edilerek saflaştırılır ve şeker, aminoasit, organik asit kullanımı gibi biyokimyasal özelliklerine bakılır. Tür ve suş ayrımı bu şekilde yapılabilir. Ancak mayaların beslenme şekilleri oldukça değişken olup, mutasyona da açık özelliklerdir ve genetik geçişler, yanlış sınıflandırma ve tiplendirmeye sebep olabilecek bir veya birçok karakteristik özelliğin

diğer mayalara geçişini sağlayabilmektedir. Bu genetik değişkenlik biyokimyasal ve geleneksel tanı metotlarını yetersiz kılmaktadır (Boekhout and Robert 2003; Fern'andez- Espinar *et al.* 2006).

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı klasik metotlarda kesin sonuç alma ihtimali düşmektedir. 1985 yılında Poymerase Chain Reaction'ın (Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR) keşfedilmesi ile DNA'nın hücre dışında çoğaltılabileceği anlaşılmıştır. Bu durum mikroorganizmaların tanısı için bir mihenk taşı olmuştur. Çünkü saf kültürün doğrudan DNA'sı izole edilerek; DNA'da her cins için farklı olan bölgeler çoğaltılabilmiş, böylece suş bazında ayırım kesin olarak yapılabilmektedir.

Gıda kaynaklı mayaların tanımlanmasında son yıllarda moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar arasında RFLP (restriction fragment length polymorphism), PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) gösterilebilir (Karasu Yalçın vd 2010).

Mikrosatelitler, arka arkaya tekrar eden kısa DNA parçacıklarıdır (Chen *et al.* 2011). Bu tekrar grupları genellikle (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n veya (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. Mikrosatelit (Litt and Luty, 1989) veya basit dizi tekrarları (Tautz *et al.* 1986) olarak adlandırılan (GA)_n ve (GT)_n gibi her birinin uzunluğu 1-10 baz çifti arasında değişen DNA'nın art arda gelen tekrar birimleri ökaryotik genomlarda yaygın bir şekilde mevcuttur (Sönmezoğlu 2006). Birçok omurgalı hayvanda bulunan mikrosatelitlerin temel motifi ise (CA)_n şeklindedir. Mikrosatelitler genom içerisinde rastgele dağılmışlardır (Ün vd 2000). Mikrosatelitler, hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde bulunur (Chen *et al.* 2011) ve ökaryotik organizmalardaki varlığı 1970'lerden beri bilinmektedir (Chistiakov *et al.* 2006).

Mikrosatelit lokusları ile ilgili genel olarak resmi olmayan bir isimlendirme benimsenmiştir. Bu isimlendirme üç harf ve bir numarayı içerir. Bu üç harf kodu mikrosatelitlerin geliştirildiği türlere göre oluşturulmaktadır. Bu kodlamadaki ilk harf, cins adının ilk harfi, diğer iki harf tür isminin ilk harfleridir (örneğin; *Salmo trutta*, Str

olabilir). Üç harften sonra kullanılan rakam ise bilgiye dayalı olmayan referanstır. Farklı laboratuvarların yanlışlıkla benzer sayıları kullanması nedeniyle rakamdan sonra, mikrosatelitlerin geliştirildiği enstitü veya laboratuvarlardaki bazı grupların adı mikrosatelit lokus adına dört harfli kod olarak eklenmiştir. Örneğin Ssa85DALH, Dalhousie’de geliştirilen bir mikrosatelit lokusu olabilir. Sonuç olarak, mikrosatelit belirteçlerinin isimlendirilmesi için türün ilk üç harfi, bir sayı ve mikrosatelitin geliştirildiği laboratuvarın dört harfli kodu kullanılabilir (Arslan 2006).

Mikrosatelitler DNA’nın yapısını oluşturan elemanlardan biridir. Mikrosatelitlerin protein sentezinde doğrudan görev almadığı bilinmesine rağmen hücrede gen düzenlenmesi, transkripsiyon ve protein mekanizmasında önemli rol oynadığı ile ilgili kanıtlar bulunmaktadır (Chen *et al.* 2011).

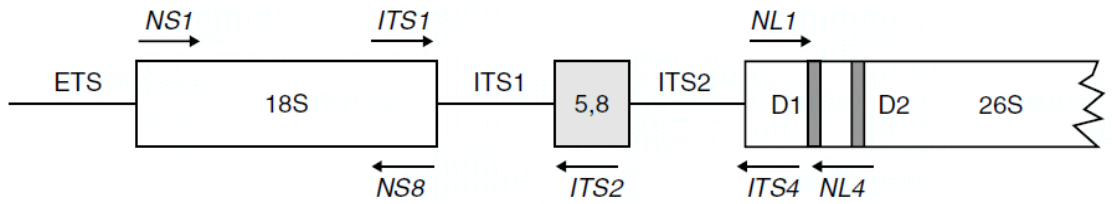
Bir türün popülasyonları gibi genetik olarak yakın canlı gruplarının karşılaştırmalı olarak çalışılacağı ya da popülasyonlarda yakın zamanda oluşmuş olan bir olayın izlerinin aranacağı bir durumda en çok kullanılan genetik işaretlerden biri de mikrosatellitlerdir (Togan vd 2003). Yüksek organizmalarda ise canlının genetik yapısı daha yaşamının başında analize hazır olduğundan bu yöntemin çok erken yaşta (yaşa bağlı olmaksızın) uygulanabilmesini olası kılmaktadır (Ün vd 2000).

Mikrosatelitlerin avantajları sıralanırsa:

- Genomda bol sayıda bulunmakta olup rastgele dağılmışlardır.
- Laboratuvarlar arasında paylaşımı kolaydır.
- Yüksek oranda polimorfiktir.
- Diğer fingerprinting metotlarına göre daha kolay uygulanabilir (Klug *et al.* 2009).

Mikrosatelitlerin dezavantajları ise ilk marker geliştirme işleminin pahalı ve çok zaman alıcı olması ve bu markerlerin türe spesifik olmasıdır (Sezer 2000).

Ancak farklı tür ve suşların belirlenmesinde sadece farklı fingerprintlerin belirlenmesi yeterli olmamaktadır. Bu amaçla standart organizmalar da eşzamanlı olarak benzer işlemlere tabi tutularak elde edilen fingerprintler yorumlanmaktadır. Fakat bu durum farklı mikroorganizmalarla karşılaşılabileceği, özellikle gıda mikroflorasının belirlenmesi gibi çalışmalarda daha objektif metod gerektirmektedir. Günümüzde daha doğru tanı amacı ile en çok kullanılan metod ise tanıya yönelik genetik bölgelerin sekans işlemlerinin gerçekleştirilerek ilgili kütüphanelerde standart suşlarla karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla bakterilerde genellikle 16S rDNA, maya ve küflerde ise ITS (internal transcribed spacer) ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri kullanılmaktadır. Aşağıda ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri şematik olarak gösterilmektedir (Deak 2008).



Şekil 1.3. ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri ve üniversal primerleri (Deak 2008)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Konu ile ilgili fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Asma yaprağı ile ilgili mevcut çalışmalarda çoğunlukla kimyasal ve duyuşal testlere odaklanılmış veya asma verimini arttırıcı deneyler yapılmıştır.

Asma yaprağı, *Vitis vinifera* L. bitkisinin yaprağı olup günümüzde önemi gittikçe artan bir bağcılık yan ürünüdür. Anadolu'da bağcılık, 7-8 bin yıllık tarihi süreçte değişik uygarlıkların ekonomik yapısına etkili olarak günümüze kadar önemli bir tarımsal üretim alanı olmuştur. Kültür asması (*Vitis vinifera* L.) ılıman iklim bitkisi olup dünyada 30° ile 40° kuzey ve güney enlem dereceleri arasında en ideal yetişme alanları arasında yayılmıştır (Oraman 1972). Sıcaklık asmanın kuzeye yayılmasını engelleyen en büyük sebeptir. Dünya'da toplam 7.485.608 ha alanda 62.150.308 ton üzüm üretilmektedir. Üretim alanlarının kıtalara göre sıralanışı Avrupa, Asya, Amerika, Afrika ve Okyanusya; üretim bakımından ise Avrupa, Amerika, Asya, Afrika ve Okyanusya şeklindedir (Oraman 1972).

Ülkemiz bağcılığında büyük verim kayıplarına neden olan sorunlar bulunmaktadır. Ürün kalitesindeki olumsuzluklar da bu sorunlara eklendiğinde üreticilerin birim bağ alanından elde ettiği gelir daha da azalmaktadır. Üreticiler bağlarından topladıkları asma yaprağını taze ve salamura halinde pazarlayarak bağın işletme giderlerini karşılamayı ve gelirlerini arttırmayı amaçlamaktadırlar. Asma yaprağı ülkemizde özellikle iç pazarda taze ve salamuraya işledikten sonra tüketilmek üzere önemli bir talebe sahip bulunmaktadır. Bu nedenle yapılacak kaliteli bir üretim hem tüketiciye kaliteli ürünün sunulmasını sağlayacağı gibi üreticiye de iyi bir gelir sağlayabilecektir. Ülkemizde gerek tat özellikleri gerekse kalite bakımından uygun olan salamuralık asma yaprağı pazarda önemli yer bulmaktadır. Bu nedenle bu alanda yapılacak kaliteli bir üretim hem tüketiciye istenilen ürünün sunulmasını sağlayacaktır hem de üreticiye iyi gelir sağlayacaktır (Demirhan 2006).

Ortadoğu’da salamura asma yaprakları geniş bir skalada üretilip tüketilmekte olup ihracat için bir şans oluşturmaktadır. Salamura asma yaprağının yıllık üretimi ve ihracatının tam rakamını kestirmek ürünün geleneksel bir ürün olması sebebiyle zordur. (Ağaoğlu *et al.* 1988).

İç ve Denli (1997) Sultani asma yapraklarında salamura yaprak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yaprakları %5 tuz ve %0,25 laktik asit içeren salamura 4 ve 8 hafta doğal fermentasyona bırakmışlardır. Ürünlerde 2 yıl boyunca pH, titrasyon asitliği, tuz ve indirgen şeker analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ürünün mikrobiyolojik incelemesi gerçekleştirilmemiştir.

Asma yapraklarının mikroflorası ile ilgili yapılan bir çalışmada; Sultani asma yapraklarına 4 farklı tuz ve 3 farklı SO₂ konsantrasyonu uygulanmıştır. Yaprakların salamuraadaki koruma mekanizmasının mayalar tarafından düzenlendiği ve laktik asit bakterilerinin izole edilemediği bildirilmiştir. Buna sebep olarak ise; salamuraya üretimin başında eklenen asitlerin yaprak dokuları tarafından emilmesi ile pH seviyesinin 3,0-3,3 civarlarında seyretmesi, bunun ise Laktobasiller için olumsuz etkiye neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada salamuraadaki SO₂’nin de istenmeyen bakteri gelişiminde negatif etki gösterdiği vurgulanmıştır (Katsaboxakis *et al.* 1986).

Yapılan bir diğer çalışmada asma yaprakları salamura spontan fermentasyona bırakılmış ayrıca *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* kültürleri ile inoküle edilmiştir. İnoküle edilen örneklerde asit miktarının en fazla olduğu ve ayrıca Sultani, Alphons and Erenköy beyazı türlerinden en iyi duyuusal sonuçların Sultani asmalarından alındığı bildirilmiştir. Çalışmada mikrofloranın değişimi incelenmemiştir (Başoğlu vd 1996).

Asma yaprak alanı, tane kalitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Drissi ve ark. 2009). Yaprak konserveçiliğinde başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birini de çeşit seçimi oluşturmaktadır. Şekil, kalınlık, tüylülük, dilimlilik gibi karakterler bakımından çeşitler çok farklı özelliklere sahiptir. Bu nedenle her çeşidin yaprakları konserve

yapımında kullanılmamaktadır. Kalın tüylü ve dilimli yapraklar tüketiciler tarafından beğenilmediğinden böyle yapraklar konservecilikte tercih edilmemekte; ince tüysüz ve mümkün olduğunca dilimsiz bütün yapraklar kullanılmaktadır.

Yaprak alanı/asma ile ürün miktarı/asma arasında pozitif bir ilişki kurulurken, salkım sayısı/asma arasında ise negatif bir ilişki bildirilmektedir (Edson *et al.* 1995).

Salamuralık yaprak üretilen bağlarda farklı üretim modellerinin ekonomik analizinin yapıldığı başka bir çalışmada, üzüm yapraklarının salamura yapılarak kullanılmasının ekonomik açıdan üzümden daha çok getirisi olduğu ancak, fazlaca toplanan yaprakların üzüm verimini düşürdüğü ve üzümlerin koruk halinde toplanarak kullanılmasının yaprak üretimini de olumlu etkileyerek ekonomik açıdan en verimli modeli oluşturduğu bildirilmiştir (Cangi vd 2011).

Dalgıç ve Akbulut'un yaptığı çalışmada (1988), taze asma yapraklarına farklı tuz ve sitrik asit ilaveleri yapılmış ve yapraklar fermentasyona bırakılmıştır. Duyusal testlerde en iyi sonuç bitkinin sürgün ucundan itibaren 5. yaprakların %8 tuz konsantrasyonundaki fermentasyonu ile oluşan ürünlerden alındığı bildirilmiştir.

Şat vd (2002), taze asma yapraklarında çeşitli uygulamalar yapmışlar ve ürünlerin konservecilikte kullanılma olanakları üzerine çalışmışlardır. Bunun için salamuralarda çeşitli sitrik asit ve tuz konsantrasyonları denenmiş, yapraklar farklı ısı-süre kombinasyonlarına tabi tutulmuş, tüm örnekler 7 ay boyunca depolanmıştır. Duyusal analizlere göre Agrazaki, Kabuguyufka ve Karaerik türleri en yüksek skorları almıştır.

Gülcü ve Demirci (2011) Trakya İlkeren ve Tekirdağ Çekirdeksizi, Narince ve Yapıncak çeşidi asma yapraklarını, iki farklı tuz konsantrasyonlu (%10 ve 14,5) salamurada fermentasyona bırakmıştır. Taze asma yapraklarının kuru madde, ortalama ağırlık, tüylülük ve dilimlilik özellikleri belirlemiş, salamuranın titrasyon asitliği ve pH değişimi haftalık olarak takip edilmiştir. Salamura yapraklardan hazırlanan yaprak sarmalarında yapılan duyusal değerlendirmede, %14,5 tuzlu salamurada hazırlanan

yaprakların %10 tuzlu salamuradakilere göre daha çok beğenildiği, diğer taraftan Tekirdağ Çekirdeksizi ve Trakya İlkeren çeşidi asma yaprağı örneklerinin duyusal değerlendirmede yüksek puanlar alarak salamuraya işlemeye en az diğer çeşitler (Narince, Yapıncak) kadar uygun oldukları tespit edilmiştir.

Konu ile ilgili bir başka çalışmada ise iki üzüm çeşidi ve iki asma anacına ait yapraklar konserveye işlenerek, bunların yaprak konservesi olarak değerlendirilme olanakları incelenmiştir. Bu amaçla yapraklar %0,5 sitrik asit ve 3 değişik dozda tuz içeren (1,5- 3,5- 5) salamurayla pastörize edilerek konserveye işlenmişlerdir. Oda koşullarında 6 ay boyunca depolanan konserveler daha sonra duyusal analize tabi tutulmuşlardır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda %3,5 tuz oranına sahip yapraklar en fazla beğeniyi kazanmıştır. Ayrıca 41 BMG anacının yapraklarının da beğeni kazandığı ve konserveye başarı ile işlenebileceği bildirilmiştir (Göktürk vd 1997).

Ülkemizde gerek tat özellikleri gerekse kalite bakımından uygun olan salamuralık asma yaprağı pazarda önemli yer bulmaktadır. Bu nedenle bu alanda yapılacak kaliteli bir üretim hem tüketiciye istenilen ürünün sunulmasını sağlayacaktır hem de üreticiye iyi gelir sağlayacaktır (Demirhan 2006).

Konu ile ilgili çalışmaların azlığı yanında Türk Gıda Kodeksi'nde salamura yapraklar ile ilgili bir ürün tebliği de bulunmamaktadır (Anonim 2012 d). Aynı şekilde Türk Standartları Enstitüsü'nün de konu hakkında bir standardı bulunmamaktadır (Anonim 2012c).

Asma yaprağının yemek kültürümüzdeki yeri ve her gün artan ekonomik önemi düşünüldüğünde konu ile ilgili yapılan çalışmaların azlığı ve mikrobiyolojik özelliklerinin aydınlatılmamış olması oldukça düşündürücüdür. İlgili çalışmalar incelendiğinde mevcut az sayıdaki çalışmanın fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Bu nedenle üründe bulunabilecek bozucu ve patojen mikroorganizmalar ile ürün oluşumunda rol alabilecek muhtemel flora hakkında bilgiye ihtiyaç olduğu görülmektedir. Yapılan bu araştırma ile asma yaprağının mikroflorası

aydınlatılmaya çalışılmıştır. Böylece hem ürünün mikroflorası hakkında bilgi sahibi olunmuş hem de üretiminde olumlu rol alabilecek mikroorganizmalar ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Denemede kullanılan asma yaprağı örnekleri üretimin yoğun olarak yapıldığı Manisa ve Tokat başta olmak üzere Erzincan, İzmir, Bolu ve Adana illerinden temin edilmiştir. Bu amaçla toplam aerobik mezofilik bakteri, maya ve küf, koliform, enterekok, laktobasil, laktokok, *Staphylococcus aureus* ve psikrofil bakteri ve *Pseudomonas* sayımları yapılmıştır. Ayrıca kimyasal analizlerden de pH, asitlik ve tuz tayini gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Denemede üretim yerleri ve üretim şekillerine göre 48 farklı asma yaprağı örneği laboratuvara getirilerek mikrobiyolojik ve bazı kimyasal analizlere tabi tutulmuştur. Yaprak örnekleri ev yapımı ve endüstriyel üretim olarak ikiye ayrılmıştır. Ev tipi üretilmiş örnekler, yaprak sahiplerinin yaprakları muhafaza ettiği orijinal kaplardan steril poşetlere alınmış, endüstriyel olarak üretilen örnekler ise ürünün orijinal ambalajı içinde açılmadan hızlıca laboratuvara getirilerek analize tabi tutulmuştur. Örneklerin seçimi ülkemizde asma yaprağı üretiminin yoğun olarak yapıldığı şehirler göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin üretim bölgesi ve üretim şekline ait bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.1.Mikrobiyolojik Analizler

Denemede, ürünün gıda güvenliği açısından önemli mikroorganizmalar ve fermentasyonda rol alabilecek muhtemel floranın belirlenmesi amaçlanmış, bu nedenle Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB), Psikrotrofilik bakteri, *Pseudomonas*, Maya ve Küf, Enterekoklar, Laktik Asit Bakterileri (Laktokoklar ve Laktobasiller), *Staphylococcus aureus* ve Enterobacteriaceae sayımı gerçekleştirilmiştir.

İlk dilüsyonların hazırlanması amacı ile yaprak numunesinden steril kabinde bunzen alevi yanında steril pens yardımı ile steril stomacher poşetlerine 10 g yaprak tartılmış ve üzerine 90 ml %0,85’lik steril fizyolojik tuzlu su aktarılmıştır. Poşetler Stomacher cihazına dikkatlice konulmuş ve yaprakların homojenizasyonu sağlanmıştır. Desimal seyreltmenin ardından ilgili petriye seyreltik örnek aktarılarak mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur (Harrigan 1998).

3.1.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı

Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri sayımı için Plate Count Agar (PCA) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Sayım, Yayma Kültür Metoduna göre gerçekleştirilmiş olup, uygun dilüsyonlardan 0,1'er ml petri plağına ilave edilmiş ve steril drigalski spatülü ile yayılmıştır. Plaklar 30-32⁰C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda oluşan farklı koloniler lam-lamel arası prepreasyon ile incelenerek bakteri olduğu gözlenen koloniler sayılmıştır. Elde edilen sayı dilüsyon faktörü ile çarpılarak numunenin gramındaki miktarı bulunmuştur (Maturin and Peeler 1998).

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan yaprak örneklerinin yöreleri ve özellikleri

Örnek no	Yöresi	Ev tipi / Endüstriyel
1	Erzincan	Ev
2	Tokat	Endüstriyel
3	Tokat	Endüstriyel
4	Tokat	Endüstriyel
5	Tokat	Endüstriyel
6	Manisa	Endüstriyel
7	Tokat	Endüstriyel
8	Manisa	Endüstriyel
9	Tokat	Endüstriyel
10	Tokat	Endüstriyel
11	Tokat	Endüstriyel
12	Erzincan	Ev
13	Erzincan	Ev
14	Tokat	Endüstriyel
15	Erzincan	Ev
16	Manisa	Endüstriyel
17	Erzincan	Ev
18	Erzincan	Ev
19	Erzincan	Ev
20	Erzincan	Ev
21	Erzincan	Ev
22	Adana	Ev
23	Erzincan	Ev
24	Tokat	Endüstriyel
25	Erzincan	Ev
26	Erzincan	Ev
27	Erzincan	Endüstriyel
28	Manisa	Endüstriyel
29	Erzincan	Ev
30	Erzincan	Ev
31	Erzincan	Ev

Çizelge 3.1 (Devam)

32	Bolu	Ev
33	İzmir	Endüstriyel
34	Bolu	Ev
35	Erzincan	Ev
36	Manisa	Ev
37	Manisa	Ev
38	Manisa	Ev
39	Manisa	Ev
40	Manisa	Ev
41	Manisa	Ev
42	Manisa	Ev
43	Manisa	Ev
44	Manisa	Ev
45	Manisa	Ev
46	Manisa	Ev
47	Manisa	Ev
48	Tokat	Endüstriyel

3.1.2. Psikrotrofilik bakteri sayımı

Aerobik psikrotrofilik bakterilerin sayımı için Plate Count agar (PCA) (Merck) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan ekimi tamamlanan petriler 7⁰C’de 10 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda gözlenen koloniler mikroskopik özellikleri de göz önünde bulundurularak sayılmaya çalışılmıştır (Bailey *et al.* 2000).

3.1.3. Pseudomonas’ların sayımı

Pseudomonas’ların sayımı için CFC (Cephaloridine Fucidin Cetrime) Agar (Oxoid) kullanılmıştır. Bu amaçla sterilize edilen besiyerine soğuduktan (50⁰C) sonra Pseudomonas CFC Supplement (SR 103, Oxoid) ilave edilmiş ve besiyeri iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan besiyeri petrilere dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Petriler ekimin ardından 25⁰C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikroskopi eşliğinde oksidaz pozitif koloniler *Pseudomonas* olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır (Nel *et al.* 2004).

3.1.4. Maya ve Küf sayımı

Maya ve Küf sayımı için Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck) sterilize edildikten sonra %10'luk steril laktik asit çözeltisi kullanılarak asitlendirilmiş ve petri plaklarına dökülmüştür. Petriler katılaştıktan sonra uygun dilüsyonlardan ekim yapılmış ve 25⁰C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca üç petriden fazla istifleme yapılmamıştır. İnkübasyon sonunda gözlenen koloniler mikroskopik muayene eşliğinde sayılmıştır (Speck 1984; Tournas *et al.* 1998). Asma yaprağı örneklerinde bulunabilecek mayaların izolasyonu amacı ile ayrıca Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC, Merck) kullanılmıştır. Ekimi yapılan petrilere 25⁰C'de 5 günün ardından gözlenen koloniler mikroskopik muayenenin ardından farklılıklarına göre depolanmışlardır. İzolatlar -80⁰C'de LB Broth'da (Merck) %80 Gliserol eşliğinde depolanmıştır.

3.1.5. Enterekokların sayımı

Kanamycin Aesculin Azide Agar'a (KAA) (Merck) ekimin ardından petri kutuları 35-37⁰C'de 1-2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gözlenen siyah ve haleli koloniler sayılmıştır (Harrigan 1998).

3.1.6. Laktobasillerin sayımı

Laktobasillerin belirlenmesi amacı ile MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) Agar (Merck) kullanılmıştır. Ekimi yapılan petriler anaerobik kavanozda (Merck) 2-3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikroskopik muayene ve katalaz testi eşliğinde laktobasiller sayılmaya ve izole edilmeye çalışılmıştır (Speck 1984).

3.1.7. Laktokokların sayımı

Laktik kokların sayımı amacı ile M17 agar (Merck) kullanılmıştır. Ekim yapılan petriler aerobik şartlarda 24 saat 30-32°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikroskopik muayene eşliğinde laktokoklar belirlenmeye çalışılmıştır (Pichhardt 2004).

3.1.8. *Staphylococcus aureus* sayımı

Uygun dilüsyonlardan 0,1 ml önceden hazırlanmış Baird-Parker Agar'a (Merck) ilave edilerek steril drigalski spatülü yardımı ile petri yüzeyine yayılmıştır. Ekimi tamamlanan petriler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda koloni gelişimi gözlenmeyen durumlarda inkübasyona 24 saat daha devam edilmiştir. İnkübasyon sonunla tipik *S. aureus* kolonileri (1–1,5 mm çaplı, siyah, parlak, konveks, çevresinde 2–5 mm çapa kadar genişleyebilen opak zonlu) yatık agara alınarak; katalaz, koagülaz ve termonükleaz testleri gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Katalaz (+), Koagülaz (+) ve termonükleaz (+) koloniler patojenik *S.aureus* olarak değerlendirilmiştir (Horwitz and Latimer 2005).

3.1.9. Enterobacteriaceae sayımı

Enterobacteriaceae sayımı Violet Red Bile Dekstroze Agar (VRBD) (Merck) kullanılarak, dökme kültürel sayım metoduna göre yapılmıştır. Uygun dilüsyonlardan, çift petri plağına 1 ml aktarılmış ve üzerine 45°C'de 15 ml agar dökülerek homojen karışım sağlanmaya çalışılmıştır. Agar katılaştıktan sonra üzerine 5ml daha ilave edilerek 35-37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tipik koloniler sayılmıştır (Harrigan 1998).

3.1.10. Mikroskopi ve görüntüleme

Besiyerinde gelişen kolonilerin incelenmeleri lam-lamel arası preparasyon (Sert 2000) hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Mikroskopi ve görüntüleme amacı ile Olympus BX51T Scientific mikroskop ve Olympus C7070 görüntüleme sistemi (Olympus, Tokyo Japan) kombine edilerek kullanılmıştır.

3.2. İzolatların Tanısı

Denemede makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre tasnif edilerek depolanan mayalar tekrar canlandırılmış, ardından DNA izolasyonları gerçekleştirilip, suşlar arasındaki farklılıklar bakteriyofaj M13 primer kullanılarak fingerprintleri elde edilmiştir. Elde edilen Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprintleri gruplandırılmış, temsili izolatların 26S rRNA D1/D2 bölgelerinin sekans işlemleri ardından tanıları yapılmıştır. İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve ikinci bir tanı amacı ile API ID32C (bioMérieux) kit sistemi kullanılmıştır.

3.2.1. İzolatların tekrar canlandırılması

Deneme boyunca mikroskopik muayeneler sonucu PCA, MRS ve M17 agarlar da dahil olmak üzere üründe hakim mikrofloranın mayalardan oluştuğu gözlenmiştir. Bu nedenle tanı işlemleri mayaların identifiye edilmesi yönünde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sayım ve izolasyon aşamasında makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre tasnif edilen mayalar tanı amacı ile PDA agara üçlü çizim usulü ekilmişlerdir. Mayaların tanısı genetik ve biyokimyasal olarak gerçekleştirilmiş olup; inkübasyon, kültürlerin genç olarak kullanılmaları amacı ile 25⁰C'de 1-2 gün olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. İzolatların genetik tanısı

Genomik DNA izolasyonu Løoke *et al.* (2012) tarafından önerilen metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla genç kültürlerden 100-200 µL ($OD_{600}=0,4$) taze maya kültürü alınıp, 1ml steril saf su ilave edilerek vortekslenmiştir. Karışım 20000xg'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 100 µl 200mM LiOAc+%1 SDS çözeltisi eklenmiş, vortekslemenin ardından 70°C'de 5 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Muhtevaya 300 µl %96'lık soğuk etanol eklenmiştir. Vorteksleme işlemi ardından örnekler oda sıcaklığında 3 dakika 15000xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant atılmış ve üzerine 300 µl %70'lik soğuk etanol eklenmiştir. Karışım son olarak 15000xg'de 15s santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası örneklerden alkol uzaklaştırılmış, yerine 50 µl TE ilave edilerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA'ları saflaştırılan mayaların birbirinden farklı olanların belirlenmesi amacı ile bakteriyofaj M13 primeri kullanılarak RAPD fingerprintleri elde edilmiştir. Böylece hem maliyet azaltılmış hem de suş çeşitliliği belirlenmiştir. Bu amaçla 25 µl PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) master miksi (Qiagen), 18 µl su, 4 µl Kalıp DNA ve 3 µl M13 primeri (5'-GAGGAGGGTGGCGGTTCT-3') kullanılarak toplam 50 µl PCR karışımı hazırlanmıştır. Karışım Thermal Cyclerde (Eppendorf) 94°C'de 4 dakika ilk denatürasyon işlemi, 94°C'de 30sn denatürasyon, 36°C'de 45sn yapışma ve 72°C'de 45sn uzama ana PCR siklüsünün 35 tekrarı ve 72°C'de 7 dakika son uzama olacak şekilde amplifikasyona tabi tutulmuştur. PCR işlemi sonucu elde edilen ürün %1,2 agaroz jelde 30V gerilimde 10 saat yürütülerek fingerprintler görüntülenmiştir (Uvitech, Biolab) (Vasdinyei and Deak 2003).

Denemede elde edilen tüm izolatlara ait fingerprintler benzerliklerine göre gruplandırılarak her grubu temsil eden bir örnek yaklaşık 600 bç büyüklüğündeki 26S rRNA D1/D2 bölgesi amplifiye edilmek üzere tekrar PCR işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla PCR karışımı 15µl master mix (Qiagen), 0,5 µl NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'), 0,5 µl NL-4 (5'-

GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), 3 µl kalıp DNA ve 11 µl su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler, 95°C'de 15 dakika ilk denatürasyon, bunu takiben 35 döngü olacak şekilde 96°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 15 sn bağlanma ve 68°C'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72 °C'de 10 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi sonucu elde edilen ürün, %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (White *et al.* 1990; Hesham and Hashem 2010). Elde edilen amplikonlar saflaştırılarak sekans analizine tabi tutulmuş, sonuçlar BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak değerlendirilmiştir (Florez *et al.* 2007).

3.2.3. İzolatların biyokimyasal tanısı

Denemede elde edilen izolatların ikinci bir tanı işleminin yapılması ve suşların biyokimyasal fingerprintinin elde edilmesi amacı ile API ID32C (bioMerieux) (REF 32 200) tanı sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla RAPD ile elde edilen temsili suşların PDA Agar'a üçlü çizimleri gerçekleştirilmiş, petriler 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Taze kültürler API® Suspension Medium içerisinde McFarland 2'ye ayarlanmış ardından API C Medium solüsyonuna 250 µl aktarılmıştır. Bu son bakteri karışımı vorteks yardımı ile homojenize edildikten sonra API ID32C test kiti tüpçüklerine 135 µl ilave edilmiştir. Kit muhtevası 30°C'de nemli ortamda 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpçükler incelenerek gelişme gözlenenler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar APILAB Plus Ver. 3.3 Programı yardımıyla değerlendirilmiştir.

3.3. Kimyasal Analizler

3.3.1. pH tayini

pH ölçümü Hanna pH-211 dijital pH-metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örneklerden 25 g tartılıp blender ile iyice parçalandıktan sonra 250ml'ye tamamlanmış ve beklenmeden örneğe pH metre probu daldırılması ile ölçüm gerçekleştirilmiştir (Cemeroğlu 2010).

3.3.2. Tuz tayini

Tuz tayini için Mohr yöntemi olarak adlandırılan titrimetrik metod kullanılmıştır. Örneklerden 25 g tartılıp blender ile iyice parçalandıktan sonra 250ml'ye tamamlanacak şekilde adi filtre yardımı ile kayıp olmadan süzölmüştür. Filtrattan 10 ml alınmış ve %5'lik KCl indikatöründen 2 ml eklendikten sonra 0,1 N AgNO₃ ile titre edilmiştir. Sonuçlar seyreltme faktörü de hesaplanarak kayıt altına alınmış ve aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Cemeroğlu 2010).

$$\% \text{Tuz (g)} = [(0,00585 \times V) / m] \times SF \times 100$$

V= Harcanan AgNO₃ çözeltisinin hacmi (mL)

N= Ayarlanan AgNO₃ çözeltisinin derişimi (normalite)

m = Alınan numune miktarı (g)

SF= Seyreltme faktörü

3.3.3. Asitlik tayini

Örneklerden 25,00g tartılıp blender ile iyice parçalandıktan sonra 250 ml'ye tamamlanacak şekilde adi filtre yardımı ile kayıp olmadan süzölmüştür. Süzöntüden 100 ml alınıp üzerine 1-2 damla fenolfitaleyn indikatörü katılıp, ayarlı 0,1N NaOH ile titre edilmiştir. Sonuçlar seyreltme faktörü de hesaplanarak kayıt altına alınmış ve aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Asitlik tayini laktik asit cinsinden yapılmıştır (Cemeroğlu 2010).

$$\% \text{ Toplam Asit Miktarı} = (V \times \text{Meq} \times 100) / m$$

V= Titrasyonda harcanan NaOH miktarı(ml)

Meq= Analizi yapılan gıdada en çok bulunan organik asidin eşdeğer ağırlığı

m= Örnek miktarı(g)

3.4. İstatistik Analizler

Deneme tam şansa bağlı deneme planına göre gerçekleştirilmiş ve analizler iki paralelli olarak yapılmıştır. Elde edilen veriler SPSS for Windows Release ver. 11.00 paket programı kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Ülkemizin özellikle Asma yaprağı üretimi ile bilinen çeşitli bölgelerinden 48 salamura yaprak örneği toplanmıştır. Ürünün oluşumuna olumlu yönde katkı sağlayabilecek, bozucu yönde rol oynayabilecek ve patojen mikroorganizmaların belirlenmesi amacı ile Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri sayımı, Psikrotrofilik Bakteri sayımı, Pseudomonasların sayımı, Maya ve Küf sayımı, Muhtemel Laktobasil ve Laktokokların sayımı, Enterobacteriaceae familyasının sayımı, Enterokokların sayımı ve *S. aureus* sayımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de görülmektedir. Kimyasal analizlerden ise pH, asitlik ve tuz tayini yapılmıştır (Çizelge 4.3).

4.1. Mikrobiyolojik Bulgular

Çizelge 4.1 Kullanılan asma yapraklarına ait mikrobiyolojik sonuçlar (log kob/g)

Numune	Tekerrür	TAMB	Psikrofilik	Pseudomonas	M-K -PDA	M-K -YGC	LB	LK	Enterobacteriaceae	Enterokok	<i>S.aureus</i>
1	1	<2	<2	<2	4,24	4,95	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	4,7	5,08	<2	<2	<1	<2	<2
2	1	<2	<2	<2	5,9	6,18	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,96	7,16	<2	<2	<1	<2	<2
3	1	<2	<2	<2	3,83	4,06	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	4,9	4,00	<2	<2	<1	<2	<2
4	1	<2	<2	<2	6,11	5,15	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,08	6,16	<2	<2	<1	<2	<2
5	1	2,3	<2	<2	2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2,3	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
6	1	2,69	<2	<2	2,6	2,7	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2,69	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2

Çizelge 4.1. (Devam)

7	1	2,6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2,6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
8	1	3	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	3	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
9	1	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
10	1	<2	<2	<2	5,79	4,3	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	5,65	5,28	<2	<2	<1	<2	<2
11	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
12	1	<2	<2	<2	6,08	5,6	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,16	6,57	<2	<2	<1	<2	<2
13	1	<2	<2	<2	6,4	6,3	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,31	7,29	<2	<2	<1	<2	<2
14	1	3,32	<2	<2	4,48	5,28	<2	<2	<1	<2	<2
	2	4	<2	<2	5,36	5,98	<2	<2	<1	<2	<2
15	1	<2	<2	<2	4,7	4,9	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	5,61	5,88	<2	<2	<1	<2	<2
16	1	<2	<2	<2	5,62	5,95	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,58	6,98	<2	<2	<1	<2	<2
17	1	<2	<2	<2	5,6	5,51	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,59	6,5	<2	<2	<1	<2	<2
18	1	<2	<2	<2	6,15	6,18	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,11	7,17	<2	<2	<1	<2	<2
19	1	3,11	<2	<2	<2	2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	4	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
20	1	<2	<2	<2	6,18	6,08	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,16	7,08	<2	<2	<1	<2	<2
21	1	2,6	<2	<2	3,77	3,9	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2,6	<2	<2	4	<2	<2	<2	<1	<2	<2
22	1	<2	<2	<2	5,61	5,78	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,47	6,75	<2	<2	<1	<2	<2
23	1	<2	<2	<2	5,44	6,28	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,82	7,26	<2	<2	<1	<2	<2

Çizelge 4.1. (Devam)

24	1	1	2	<2	<2	0	0	<2	<1	<2	<2
	2	2	2	<2	<2	0	0	<2	<1	<2	<2
25	1	<2	<2	<2	<2	4,6	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,52	4,6	<2	<2	<1	<2	<2
26	1	<2	<2	<2	4,51	4,19	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	4,7	<2	<2	<1	<2	<2
27	1	2	<2	<2	2,3	2,6	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
28	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
29	1	<2	<2	<2	6,48	6,4	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,44	7,42	<2	<2	<1	<2	<2
30	1	<2	<2	<2	6,4	6,48	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,33	7,36	<2	<2	<1	<2	<2
31	1	<2	<2	<2	6,33	6,1	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,39	7,07	<2	<2	<1	<2	<2
32	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2
33	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
34	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
35	1	4,05	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	4,05	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
36	1	3,5	<2	<2	5,11	5,3	<2	<2	2,5	2	<2
	2	3,5	<2	<2	6,08	6,26	<2	<2	2,5	2	<2
37	1	2,3	<2	<2	4,7	5,11	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2,5	<2	<2	5,65	6,09	<2	<2	<1	<2	<2
38	1	<2	<2	<2	4,62	4,95	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	5,61	5,9	<2	<2	<1	<2	<2
39	1	<2	<2	<2	6,11	4,65	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,08	5,63	<2	<2	<1	<2	<2
40	1	<2	<2	<2	5,15	5,54	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	6,11	6,49	<2	<2	<1	<2	<2
41	1	<2	<2	<2	4,48	4,9	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	5,4	5,85	<2	<2	<1	<2	<2

Çizelge 4.1. (Devam)

43	1	2	<2	<2	4,9	5,26	<2	<2	<1	<2	<2
	2	2	<2	<2	5,85	6,22	<2	<2	<1	<2	<2
44	1	<2	<2	<2	4,93	5,11	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	5,87	6,17	<2	<2	<1	<2	<2
45	1	<2	<2	<2	4,48	4,95	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	5,45	5,88	<2	<2	<1	<2	<2
46	1	<2	<2	<2	4,63	5,54	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	5,64	6,41	<2	<2	<1	<2	<2
47	1	<2	<2	<2	6,18	6,15	<2	<2	<1	<2	<2
	2	<2	<2	<2	7,16	7,13	<2	<2	<1	<2	<2
48	1	3,86	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
	2	3,75	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<1	<2	<2
Maks.		4,05	-	-	7,44	7,42	-	-	2,5	2,0	-
Min.		<2	-	-	<2	<2	-	-	<2	<2	-
Ev ort Standart Sapma		0,58 1,25	-	-	4,85 2,32	5,05 2,18	-	-	0,15 0,56	0,06 0,36	-
End. ort Standart Sapma		1,41 1,44	-	-	2,21 2,74	2,11 2,71	-	-	-	0,00 0,00	-
Genel Ortalama		0.88	-	-	3.92	4.01	-	-	0.09	0.04	-

Çizelge 4.1 incelendiğinde, ürünün baskın mikroflorasını mayaların oluşturduğu dolayısı ile en yüksek değerin YGC agarda (4.01 log kob/g) olduğu gözlenmektedir. Bunu PDA (3.92 log kob/g) izlemektedir. Her iki agara ait ortalamaların karşılaştırılmasında önemli bir benzerlik olduğu ($p<0,01$) görülmektedir. Üretim şekli göz önüne alındığında Ev tipi örneklerin daha yüksek maya ortalamasına ($p<0,01$) sahip olduğu ve bu durumun her iki besiyeri için de aynı olduğu belirlenmiştir.

Toplam aerobik mezofilik ve psikrotrofilik bakteri sayımında PCA'larda üreme olduğu gözlenmiş, ancak oluşan kolonilerin lam-lamel arası preperasyonu incelendiğinde kolonilerin birçoğunun maya olduğu anlaşılmıştır. TAMB sayımında 16 numunede bakteri üremesi gözlenirken psikrotrofik şartlarda inkübasyon sonunda bakteri gelişimine rastlanmamıştır. TAMB'de gelişme gözlenen 16 numunenin ortalama koloni sayısı 2,71 log kob/g olduğu, 48 örneğin tümü ele alındığında ortalama koloni sayısının

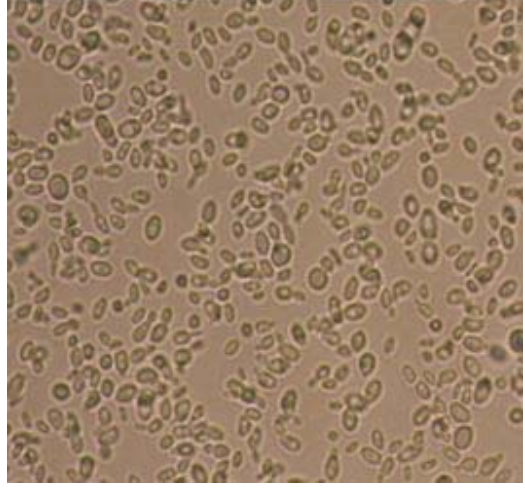
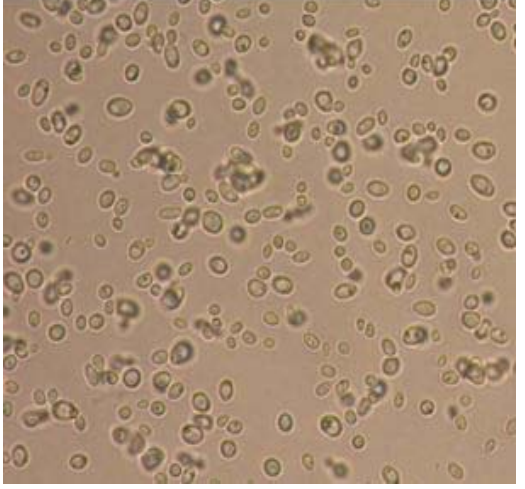
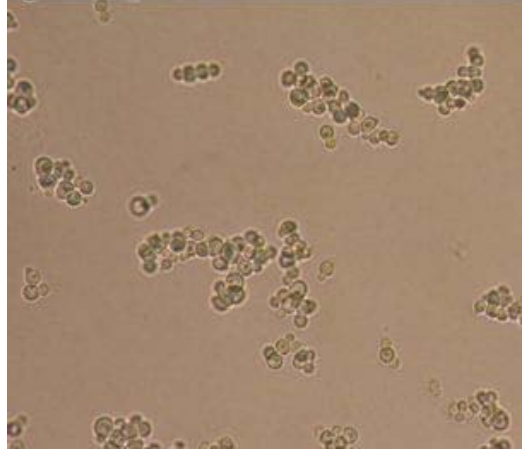
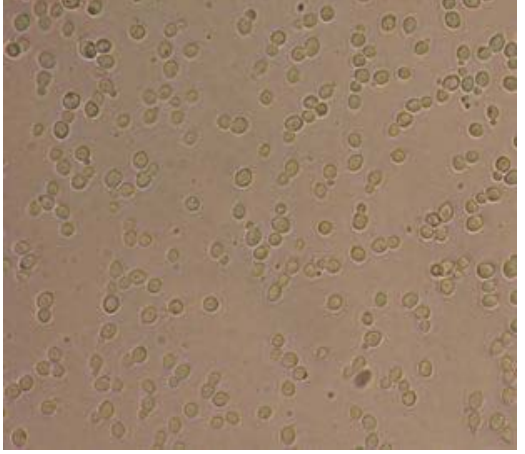
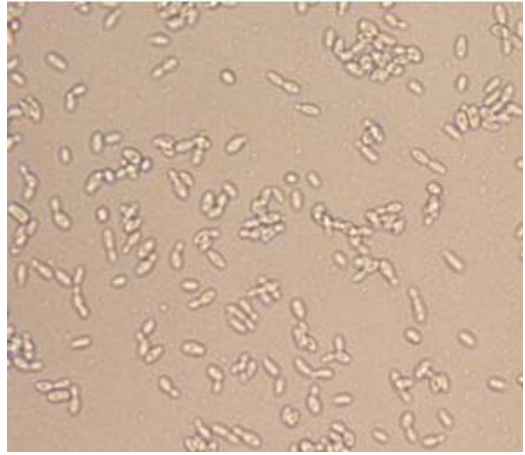
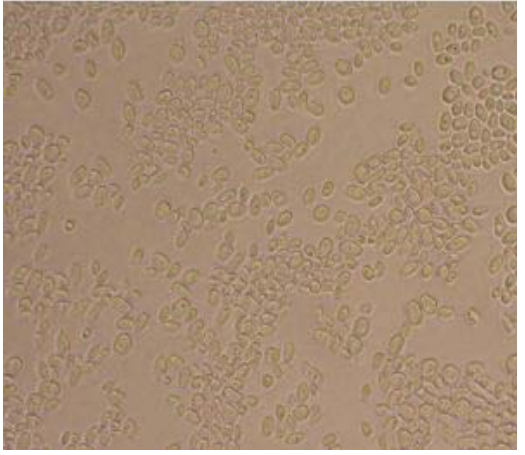
0,88 log kob/g sonucuna ulaşılmıştır. Üretim seklinin TAMB üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir (p=0,004)

Laktik asit bakterilerinin belirlenmesi amacı ile kullanılan besiyerlerinde bakteri gelişimi gözlenmemiş olup, PCA agarda olduğu gibi maya kolonileri gözlenmiştir. Dolayısı ile asma yaprağı fermantasyonunda laktobasil veya laktokokların rol almadığı görülmektedir.

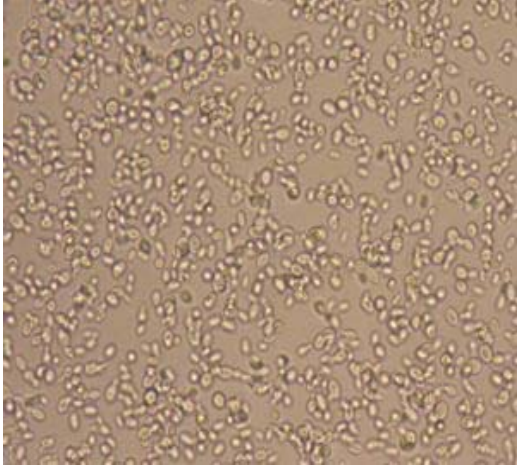
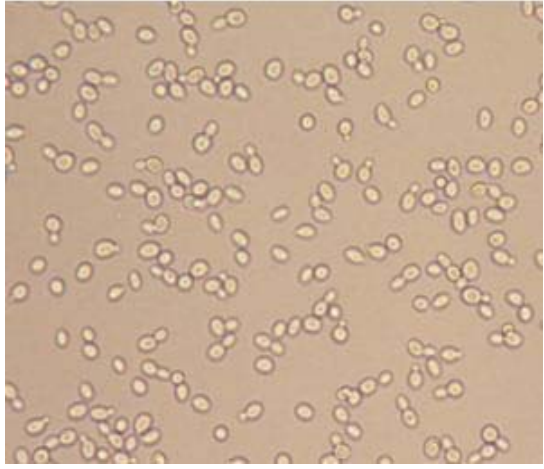
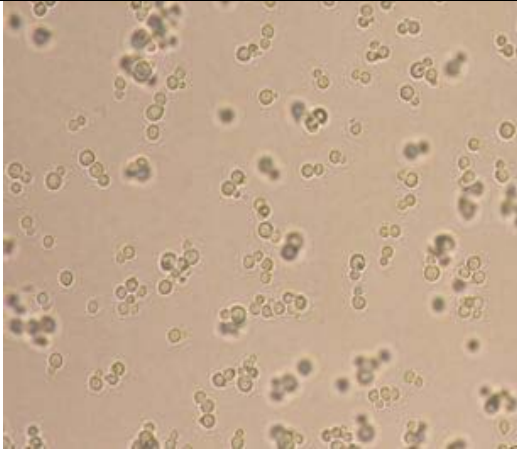
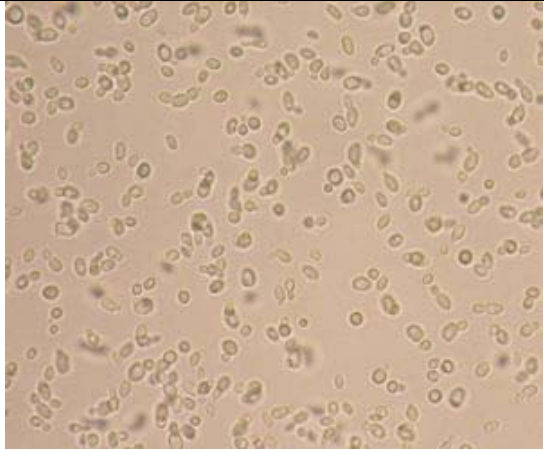
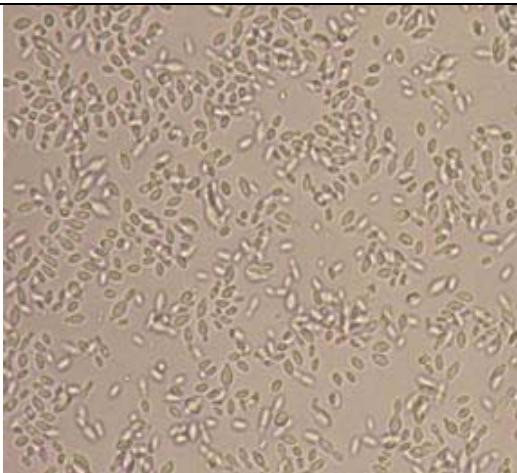
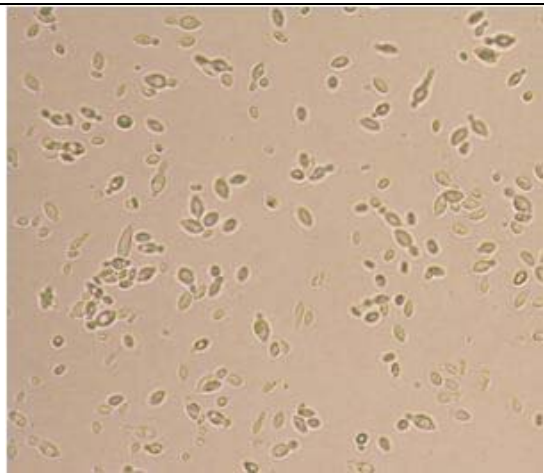
Üründe bulunabilecek muhtemel patojenlerin belirlenmesi amacı ile VRBD, KAA ve BPA agarlara ekimler yapılmıştır. Enterobacteriaceae sayımlarında sadece 32 ve 36 nolu örneklerde üreme olmuştur. 32 nolu örnekte 2 log kob/g ve 36 nolu örnekte 2,5 log kob/g sonucu bulunmuştur. KAA agar sayımlarında sadece 36 nolu örnekte 2 log kob/g seviyesinde Enterokok varlığı gözlenmiştir. BPA agarda ise tipik *S. aureus* kolonilerine rastlanmamıştır.

Denemede kullanılan CFC agarda da üreme gözlenmemiştir. Bu durum *Pseudomonas*'ların üründe etkili olmadığını göstermektedir.

Denemede identifikasyon amacı ile mayaların makroskopik ve mikroskopik özellikleri belirlenerek 54 adet izolat elde edilmiştir. Mevcut izolatların benzer olanlarını gruplandırmak üzere RAPD (M 13) fingerprintleri elde edilmiştir. Tüm izolatların fingerprintleri incelendiğinde toplam 54 izolatın aslında 12 farklı suştan oluştuğu gözlenmiştir. Bu suşlara ait RAPD profilleri (Şekil 4.2) ve mikroskopik (Şekil 4.1.a, 4.1.b.) görüntüleri ilgili şekillerde görülmektedir.

	
8 nolu örnek, <i>Pichia subpelliculosa</i>	13 nolu örnek, <i>Pichia subpelliculosa</i>
	
15 nolu örnek, <i>Debaryomyces hansenii</i>	17 nolu örnek, <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
	
19 nolu örnek, <i>Pichia membranifaciens</i>	22 nolu örnek, <i>Pichia subpelliculosa</i>

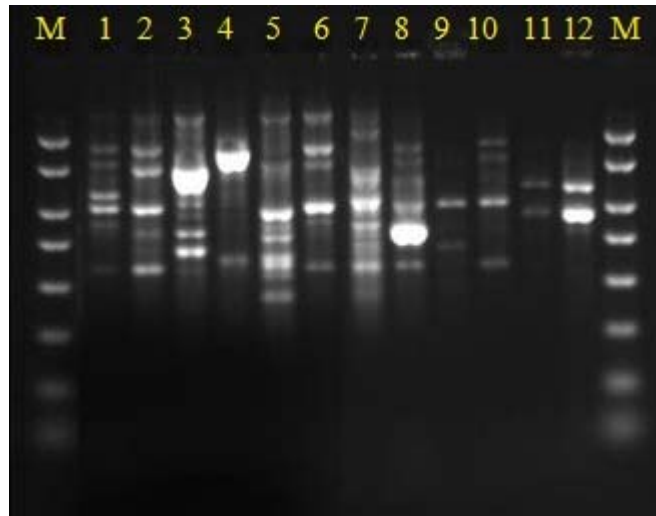
Şekil 4.1.a. Temsili izolatların mikroskopik görüntüleri

	
33 nolu örnek, <i>Pichia membranifaciens</i>	34 nolu örnek, <i>Pichia subpelliculosa</i>
	
57 nolu örnek, <i>Debaryomyces hansenii</i>	71 nolu örnek, <i>Pichia subpelliculosa</i>
	
77 nolu örnek, <i>Hanseniaspora uvarum</i>	78 nolu örnek, <i>Hanseniaspora uvarum</i>

Şekil 4.1.b. Temsili izolatların mikroskobik görüntüleri

Saf olarak elde edilen kùltùrlere gerekli işlemler uygulanıp DNA'ları saflaştırıldıktan sonra, M13 protokolù uygulanmıştır. RAPD olarak da adlandırılan bu yöntemde Genomik DNA'nın rastgele yerlerine yapışan primer, çeşitli uzunlukta DNA parçacıkları oluşturur. Bu DNA parçacıkları da agaroz jel elektroforezinde boyları ile ters orantılı olacak şekilde ilerler. Yani büyük DNA parçaları az, küçük DNA parçaları ise büyük mesafeler kat eder. Farklı suşların DNA'larından amplifiye olan parçalar da farklı olduğundan farklı bant görüntùleri ortaya çıkar.

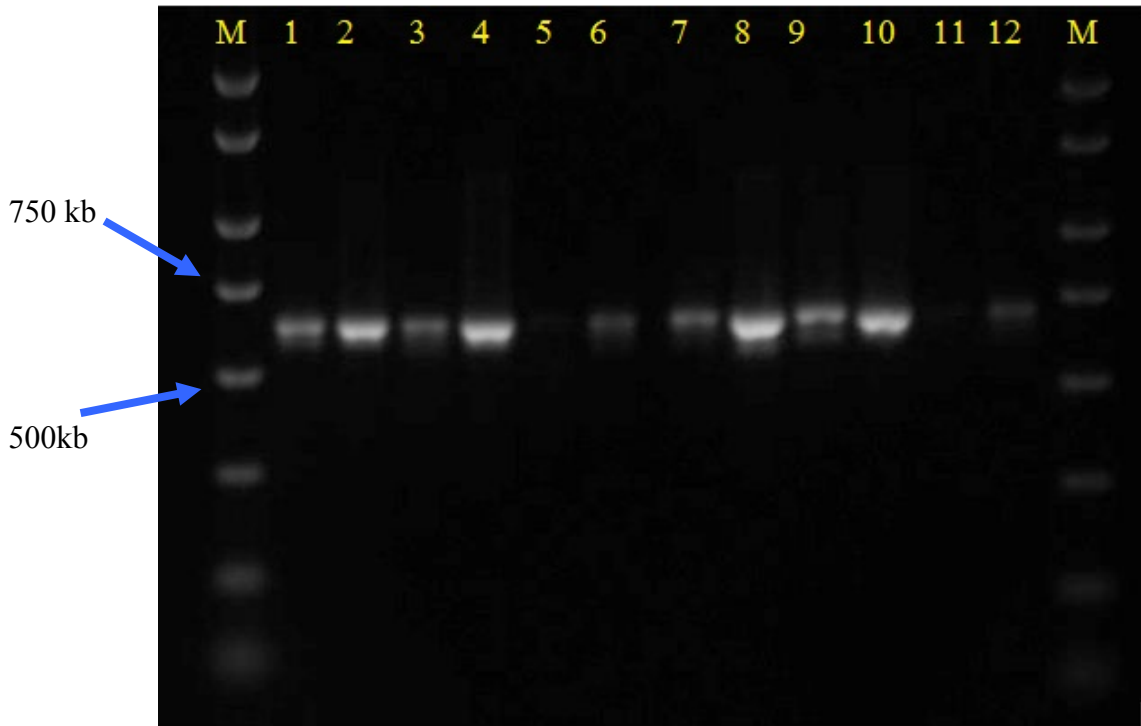
Denemede 48 yaprak numunesinden 54 maya izole edilmiş, bunların benzer olanları ilk elektroforez uygulaması ile elenmiştir. Birbirinden farklı olan 12 suşun elektroforez sonucu şekil 4.2'deki gibidir.



şekil 4.2. İzole edilen farklı suşların agaroz jeldeki görüntüsü

M: Marker, 1: *Pichia subpelliculosa* (8), 2: *Pichia subpelliculosa* (13), 3: *Debaryomyces hansenii* (15), 4: *Zygosaccharomyces bisporus* 17), 5: *Pichia membranifaciens* (19), 6: *Pichia subpelliculosa* (22), 7: *Pichia membranifaciens* (33), 8: *Pichia subpelliculosa* (34), 9: *Debaryomyces hansenii* (57), 10: *Pichia subpelliculosa* (71), 11: *Hanseniaspora uvarum* (77), 12: *Hanseniaspora uvarum* (78)

12 örneğe sekans analizi yapılması amacı ile 26S rRNA D1/D2 bölgesi hedef alınmış NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') ve NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. İşlem sonucu 600 bp uzunluğunda DNA parçacıkları amplifiye edilmiş ve oluşan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 4.3. 26S rRNA D1/D2 bölgesi amplifiye edilen mayaların elektroforez görüntüsü
 *M: Marker, 1: *Pichia subpelliculosa*, 2: *Pichia subpelliculosa*, 3: *Debaryomyces hansenii*, 4: *Zygosaccharomyces bisporus*, 5: *Pichia membranifaciens*, 6: *Pichia subpelliculosa*, 7: *Pichia membranifaciens*, 8: *Pichia subpelliculosa*, 9: *Debaryomyces hansenii*, 10: *Pichia subpelliculosa*, 11: *Hanseniaspora uvarum*, 12: *Hanseniaspora uvarum*

Elde edilen sekans sonuçları ilgili kütüphanelerle karşılaştırıldığında ilgili 12 suşun şu türlerden oluştuğu gözlenmiştir: *Pichia subpelliculosa* (%65), *Debaryomyces hansenii* (%7,4), *Zygosaccharomyces bisporus* (%3,70), *Pichia membranifaciens* (%11,1), *Hanseniaspora uvarum* (%12,96) (Çizelge 4.2.)

Çizelge 4.2. Sekans analizi sonucunda elde edilen bulgular

Sıra	Tanı sonucu genetik	Genetik benzerlik oranı	Referans suş no	Temsil ettiği izolat sayısı	Temsil ettiği izolatların numaraları
1	<i>Pichia subpelliculosa</i>	%99	EF550340.1	4	2, 5, 7, 8
2	<i>Pichia subpelliculosa</i>	%99	EF550340.1	7	4, 9, 10, 11, 12, 13, 56
3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	%99	HM988696.1	2	15,87
4	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	%95	AB375304.1	2	16,17
5	<i>Pichia membranifaciens</i>	%99	EU019218.1	3	14,19,35
6	<i>Pichia subpelliculosa</i>	%98	JQ419775.1	19	18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 37, 47, 48, 51, 69, 72
7	<i>Pichia membranifaciens</i>	% 99	EU019218.1	3	33,38,58
8	<i>Pichia subpelliculosa</i>	%99	JQ419771.1	3	34,66,68
9	<i>Debaryomyces hansenii</i>	%95	EU285526.1	2	42,57
10	<i>Pichia subpelliculosa</i>	%99	JQ419771.1	2	71,83
11	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	%99	JQ678687.1	2	77, 80
12	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	%99	EU004081.1	5	41,43,59,78,81

Denemede alternatif bir tanı metodu olarak, hem de izolatların biyokimyasal karakterlerinin belirlenmesi amacı ile API ID32C test kiti kullanılarak temsili suşlar incelenmiştir. Çizelge 4.3 incelendiğinde API ve moleküler sonuçların cins ve tür bazında örtüşmediği görülmektedir. Biyokimyasal yöntemde mayaların şeker kullanımına bakılırken moleküler yöntemde örneklere direk DNA sekansı yapılmıştır. Genetik tanı sonuçları incelendiğinde örnekler ile referans suşlar arasında %99 gibi bir oranda benzerlik bulunmuştur. Mayaların beslenme şekillerinin oldukça değişken olduğu ve bu özelliklerin mutasyona da açık özellikler olduğu düşünüldüğünde

Çizelge 4.3. Biyokimyasal ve moleküler sonuçların karşılaştırılması

	Tani sonucu API 32 C 24 s	Tani sonucu API 32 C 48 s	Biyokimyasal benzerlik oranı (%) 24/48 s	İlave test ihtiyacı	GENETİK tam sonucu	Temsil ettiği izolat sayısı/numaraları	Kullandığı enerji kaynakları 24 S	Kullandığı enerji kaynakları 48 S
1	-	<i>Candida pelliculosa</i>	- / -	Evet	<i>Pichia subpelliculosa</i>	4/ 2, 5, 7, 8	sac, cel, raf, mal, tre, mdg, gly, fte, mel, gnt, man, glu, sbe, gln,	gal, sac, lat, cel, raf, mal, tre, mdg, sor, xyl, rib, gly, ery, man, glu, ple
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	- / 99,9	Kismen	<i>Pichia subpelliculosa</i>	7/4, 9, 10, 11, 12, 13, 56	sac, cel, raf, mal, tre, mdg,	gal, sac, lat, cel, raf, mal, tre, mdg, sor, xyl, rib, gly, ery, glu, ple
3	<i>Saccharomyces kluyverii</i>	<i>Saccharomyces kluyverii</i>	70,3 / 70,3	Evet	<i>Debaryomyces hansenii</i>	2/15,87	gal, sac, nag, lat, cel, raf, mal, tre, 2kg, mdg, sor, ple, mlz, man, glu	-
4	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>	89,8 / 89,8	Kismen	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	2/16,17	sor, man, glu, sbe,	-
5	<i>Candida valida</i>	-	63,2 / 63,2	Kismen	<i>Pichia membranifaciens</i>	3/14, 19,35	sac, glu,	-
6	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	97,3 0 / 99,9	Kismen	<i>Pichia subpelliculosa</i>	19/18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 37, 47, 48, 51, 69, 72	sac, cel, raf, mal, tre, mdg, gly, fte, ery, man, glu	gal, sac, lat, cel, raf, mal, tre, mdg, sor, xyl, gly, ple, ery, gnt, man, glu
7	<i>Candida globosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	95,0 / -	Evet	<i>Pichia membranifaciens</i>	3/33, 38,58	sac, mal, mdg, gly, fte, man, glu,	sac, cel, raf, mal, tre, 2kg, sor, xyl, gly, ple, ery, man, glu
8	<i>Candida valida</i>	<i>Candida valida</i>	89,9 / 89,9	Evet	<i>Pichia subpelliculosa</i>	3/34, 66,68	gal, sac, nag, cel, raf, mal, tre, 2kg, mdg, sor, gly, fte, mlz, man, lac, glu	-
9	<i>Candida famata</i>	<i>Candida famata</i>	%99,3 - 77,1	Evet	<i>Debaryomyces hansenii</i>	2/42,57	sac, raf, mal, tre, sor, gly, fte, ery, man, glu	gal, sac, nag, lat, cel, raf, mal, tre, 2kg, sor, gly, ple, mlz, gnt, man, lac, glu, sbe, gln
10	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	58,2 - 95,1	Evet	<i>Pichia subpelliculosa</i>	2/71,83	act, cel, glu,	sac, cel, raf, mal, tre, mdg, sor, gly, ple, ery, man, glu,
11	<i>Kloeckera japonica</i>	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	92,7 - 99,9	Evet	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2/77, 80	act, cel, glu,	act, cel, gnt, glu,
12	<i>Kloeckera japonica</i>	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	99,5 - 67,4	Evet	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	5/41, 43, 59, 78, 81	act, cel,	act, cel, 2kg,

(Boekhout and Robert 2003; Fernandez-Espinar *et al.* 2006) moleküler yöntemin daha tutarlı olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan Biyokimyasal test sonuçlarının 24 ve 48 saatleri arasında belirgin farklar olduğu ayrıca test sonucunun teyidi açısından ilave testlere ihtiyaç duyması diğer bir olumsuzluk olarak dikkat çekmektedir.

4.2. Kimyasal Bulgular

Çalışmada özellikle mikrobiyolojik gelişmede rol oynayan pH, asitlik ve tuz analizleri de yapılmıştır. Denemede numunelerin kimyasal özelliklerine ait veriler Çizelge 4.3’de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Numunelerin asitlik, tuz ve pH ölçümleri

Üretim tipi	Numune no	Tekerrür	pH	Asitlik	Tuz
ev	1	1	3,54	1,2	7,61
		2	3,54	1,2	7,50
endüstriyel	2	1	4,06	0,4	5,52
		2	4,06	0,5	5,65
endüstriyel	3	1	3,66	0,5	8,14
		2	3,66	0,5	8,3
endüstriyel	4	1	4,07	0,3	6,1
		2	4,07	0,4	6,25
endüstriyel	5	1	3,77	0,7	19,77
		2	3,77	0,7	18,95
endüstriyel	6	1	3,81	0,8	17,73
		2	3,81	0,8	17,50
endüstriyel	7	1	3,02	1,0	9,53
		2	3,02	1,1	10,00
endüstriyel	8	1	3,75	1,0	17,44
		2	3,75	1,0	17,2
endüstriyel	9	1	3,45	1,2	7,56
		2	3,45	1,2	7,35
endüstriyel	10	1	3,78	0,8	10,58
		2	3,78	0,8	10,6
endüstriyel	11	1	3,56	1,3	7,84
		2	3,56	1,3	7,80
ev	12	1	3,14	1,5	15,19
		2	3,14	1,5	14,88

Çizelge 4.4 (Devam)

ev	13	1	3,22	1,2	11,69
		2	3,22	1,2	11,63
endüstriyel	14	1	3,26	0,8	21,92
		2	3,26	0,8	22,02
ev	15	1	3,44	0,6	4,67
		2	3,44	0,6	4,55
endüstriyel	16	1	3,45	0,9	11,98
		2	3,45	0,9	12,01
ev	17	1	2,91	3,1	1,75
		2	2,91	3,1	1,75
ev	18	1	3,32	1,3	12,85
		2	3,32	1,3	12,77
ev	19	1	2,99	3,6	14,61
		2	2,99	3,6	14,65
ev	20	1	4,6	0,7	6,72
		2	4,6	0,7	6,77
ev	21	1	3,61	0,5	9,06
		2	3,61	0,5	8,88
ev	22	1	3,22	1,2	12,27
		2	3,22	1,2	12,56
ev	23	1	3,38	0,6	15,19
		2	3,38	0,6	15,22
endüstriyel	24	1	3,29	1,3	18,41
		2	3,29	1,3	17,99
ev	25	1	3,18	2,2	13,15
		2	3,18	2,2	12,99
ev	26	1	3,35	1,0	13,44
		2	3,35	1,1	12,59

Çizelge 4.4 (Devam)

endüstriyel	27	1	3,55	0,99	21,04
		2	3,55	1,0	21,51
endüstriyel	28	1	3,51	1,0	23,37
		2	3,51	1,2	23,40
ev	29	1	3,36	1,5	6,72
		2	3,36	1,4	6,8
ev	30	1	3,48	0,9	9,05
		2	3,48	0,8	9,12
ev	31	1	3,45	0,9	13,15
		2	3,45	0,9	13,2
ev	32	1	3,02	2,8	24,83
		2	3,02	2,6	25,00
endüstriyel	33	1	3,28	1,4	7,01
		2	3,28	1,3	7,05
ev	34	1	2,93	1,8	21,62
		2	2,93	1,8	21,62
ev	35	1	3,01	2,3	24,84
		2	3,01	2,4	24,84
ev	36	1	3,17	1,3	10,52
		2	3,17	1,4	10,56
ev	37	1	3,3	0,8	9,93
		2	3,3	0,9	9,93
ev	38	1	3,31	0,8	7,88
		2	3,31	0,8	7,88
ev	39	1	3,05	1,6	14,61
		2	3,05	1,6	14,52
ev	40	1	3,11	1,8	12,56
		2	3,11	1,8	13,01

Çizelge 4.4 (Devam)

ev	43	1	3,11	2,0	11,39
		2	3,11	2,1	11,39
ev	44	1	3,01	1,5	12,56
		2	3,01	1,6	12,56
ev	45	1	3,18	1,7	14,9
		2	3,18	1,8	14,9
ev	46	1	3,01	1,7	12,27
		2	3,01	1,6	12,90
ev	47	1	3,13	1,4	10,22
		2	3,13	1,4	10,22
endüstriyel	48	1	3,53	1,0	12,56
		2	3,53	1,1	12,95
Maksimum değer			4,60	3,60	25,00
Minimum değer			2,91	0,30	1,75
Ev ort Standart Sapma			3,25 0,31	1,53 0,73	12,23 4,96
End. ort Standart Sapma			3,58 0,28	0,92 0,30	13,32 6,02
Genel Ortalama Standart sapma			3,36 0,33	1,31 0,67	12,62 5,35

Çizelge 4.3 incelendiğinde pH değerlerinin 4,60-2,91 arasında ortalama değer ise 3,36 olduğu görülmüştür. Üretim şekli açısından incelendiğinde ev tipi örneklerin 3,25 endüstriyel örneklerin ise 3,58 ortalama pH değerine sahip olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak incelendiğinde üretim şeklinin pH üzerine etkili bir parametre ($p<0,01$) olduğu görülmüştür. Benzer şekilde asitlik değerinin 0,30-3,60 arasında değiştiği ortalamasının 1,31 olduğu, üretim şeklinin de bu sonuçta oldukça etkili olduğu ($p<0,01$) gözlenmiştir. Örnekler arasındaki tuz değeri açısından oldukça büyük farklar görülüp değerler 1,75-25,00 arasındadır. Genel ortalama 12,62 olarak belirlenmiştir. Ancak üretim şeklinin tuz miktarı üzerinde etkili bir faktör olmadığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemizde asma yaprağının mikroflorasını belirlemek üzere yapılmış araştırma sonucuna rastlanmamıştır. Yaprakların mikroflorası ile ilgili literatürde bulunabilen tek çalışmada Katsaboxakis *et al.* (1986) derinlemesine bir mikrobiyolojik sonuç vermemiş, sadece farklı metotlarla ürettikleri asma yapraklarında laktik asit bakterisi tespit edilemediğinden ve maya varlığından bahsetmişlerdir. Ancak bunların hangi maya türleri olduğu konusunda bir bilgi verilmemiştir. Çalışmamız sonucunda üründe ana florayı mayaların oluşturduğunun gözlenmesi bu verilerle örtüşmektedir.

Ürünün mikroflorası ile ilgili kesin veriler bulunmamakla beraber meyve ve sebze kökenli diğer fermente gıdalar ile mukayese edildiğinde özellikle genetik tanı sonuçlarının benzer ürünlerde bulunabilecek maya türleri ile örtüştüğü gözlenmektedir (Fleming 1982; Deak 2008).

Pichia 100'ün üzerindeki türü ile bilinen en geniş 2. maya cinsidir. Denemenin en baskın türü olan *Pichia subpelliculosa*, *Hansenula subpelliculosa* ismi ile de bilinen amilolitik bir maya türüdür (Sanjeev *et al.* 2001) ve fermantasyon karakteristiği *Saccharomyces cerevisiae*'ya oldukça benzemektedir (Oliveira1 *et al.* 2004). Brezilya'nın yerel içeceklerinden Cachaça üretiminde *Debaryomyces hansenii* ile birlikte ara fermantasyondan itibaren izole edilebilir. Soya ürünlerinde yüzeyde gelişerek laktik asidi parçalayan *P.subpelliculosa*'nın, salamura yapraklarda da oksidatif etkide bulunabileceği düşünülmektedir. Zira yüksek tuz konsantrasyonunda sahip hıyar turşularında izole edilen başlıca türlerdendir (Deak 2008).

Debaryomyces hansenii peynir, et, şarap, bira, meyve gibi gıdalarda ve ayrıca turşu gibi yüksek tuz konsantrasyonuna sahip gıdalarda sıklıkla görülebilen bozucu bir maya türüdür (Deak 2008). *D. hansenii*'nin doğada yaygın bulunmasının nedenlerinin başında; tuz toleransı, proteolitik ve lipolitik enzim kapasitesi, süt, yağ ve proteinlerini metabolize etmesi, düşük sıcaklık ve su aktivitesinde gelişebilmesi gelmektedir (Wyder

and Puhan, 1999). Zira, *D. hansenii*, %24 NaCl'de ve 0.65 gibi düşük su aktivitesinde gelişebilme özelliğine sahip olması nedeniyle, tuzlu ürünlerde yaygın olarak bulunur (Praphailong and Fleet 1997). %25'e varan tuz konsantrasyonlarına sahip yaprak örneklerinin %7,4'ünde *D. hansenii* izole edilmiştir.

Hanseniaspora uvarum elma üzüm limon vişne ve erik gibi meyveler izole edilebilen ve şaraplarda bozulmanın ana etkenlerinden olan mayalardan biridir. *H. uvarum* ayrıca salamura, kakao, zeytin ve salatalardan da izole edilebilir. Maksimum 0,94 a_w'de (tuz) gelişebilir. *D. hansenii*'ye göre tuza daha dayanıksızdır. Denemede ürünlerin %12,96'sında izole edilmiştir. Bu maya türü tüm gıdaların %1.34'ünden izole edilebilmektedir (Deak 2008).

Denemedeki örneklerin %11,1'ini oluşturan *Pichia membranifaciens* telemorf safhasında *Candida valida* adı ile de bilinmektedir. %1 asetik aside dayanabildiğinden düşük pH'lı gıdalarda gelişebilir. Tüm gıdaların %4,32'sinden izole edilebilen bu maya türü ile ilgili biyokontrol konularında çalışmalar yapılmaktadır.

Zygosaccharomyces ozmofilik karakterde olup, özellikle yüksek şeker konsantrasyonuna sahip gıdalardan izolasyonu bildirilen bir maya cinsidir. Öte yandan yüksek tuz konsantrasyonuna sahip gıdalardan da izolasyonu bildirilmektedir. Ozaki *et al.* (2008) yüksek oranda tuz içeren ve bir tür erik olan Umami'nin kullanımı ile yapılan turşu benzeri yöresel bir üründe yüksek tuz toleranslı maya florasını incelemişlerdir. Çalışmada isolatların 4 farklı RAPD fingerprinti gözlenmiş olup, 26S rRNA D1/D2 bölgesinin sekansı sonucunda *Zygosaccharomyces bisporus* ve *Pichia subpelliculosa* türlerinin varlığını bildirmişlerdir.

Asma yaprakları ile ilgili piyasa örneklerine ait kimyasal özelliklerine dair veri gözlenmemekle beraber, asma yaprağı kullanılarak yapılan ürün geliştirme çalışmalarında kullanılan pH, asitlik ve tuz oranlarının özellikle düşük seviyelerdeki

örneklerle, nispeten benzer olduğu görülmüştür (Dalgıç ve Akbulut, 1988; Göktürk vd 1997; İç ve Denli, 1997; Şat vd 2002; Gülcü ve Demirci 2011).

Elde edilen bulgular maddeler halinde değerlendirildiğinde şu sonuçlara varılmıştır.

- Çalışmada incelenen 48 örnekte laktik asit bakterisine rastlanılmamıştır. Fermente ürünlerde laktik asit bakterisi faaliyeti beklenmektedir. Laktik asit bakterilerinin yokluğu ürünlerdeki yüksek tuz konsantrasyonuna ve ürünlerin haşlanmış olabileceği ihtimalini doğurmuştur.
- Ürünlerde psikrotrofilik bakterilere, *S. aureus*'a, *Pseudomonas*'a rastlanmamıştır.
- Mikroflorada baskın tür olarak mayalar gözlenmiştir. Yaprakların 1 gramında bulunan maya miktarı PDA için 3,92 log kob, YGC için 4,01 log kob olarak bulunmuştur.
- Endüstriyel olarak üretilen yapraklardaki maya yükü PDA sayıları incelendiğinde 2,21 log kob/g iken ev tipi yaprakların maya yükü 4,85 log kob/g'dır. Bu durum istatistiksel analizlerde oldukça önemli ($p<0,01$) olarak tespit edilmiş, dolayısı ile geleneksel olarak üretilen salamura yaprakların, endüstriyel olarak üretilenlere nazaran mikrobiyal yükünün fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum endüstriyel olarak üretilen yaprakların orijinal ambalajlarındaki içindekiler kısmında her ne kadar belirtilmemiş olsa da antimikrobiyal ajanların katılmış olma ihtimalini veya pastörizasyon yapılmış olma olasılığını düşündürmektedir.
- Fermente veya fermente olmayan diğer gıda ürünleri ile kıyaslandığında asma yapraklarının bakteri sayısının az olduğu görülmüştür. Bu yüzden salamura yaprakların bakterilerin de rol aldığı fermantasyon modeline/seyrine sahip olmadığı belirlenmiştir.

- Örneklerin içerdiği tuz miktarı ortalaması %12,62'dir. Örneklerdeki tuz oranlarının ise %1,75-25,00 gibi oldukça geniş bir aralıkta değiştiği görülmüştür. Bunun sebebi olarak standart olmayan geleneksel üretim uygulamaları olduğu düşünülmektedir. Zira geleneksel üretimde yaprak miktarına göre tuz eklenmemekte, göz kararı, bazen 1 kat yaprak 1 kat tuz, bazen 2 kat yaprak 1 kat tuz konulmaktadır.
- Örneklerdeki toplam asitlik ortalaması %1,31'dir. Şat vd (2002) taze yaprakların asitliğini %1,78-1,96 aralığında bulmuştur. Fermente bir ürün olduğu düşünülen salamura yapraklarda asitliğin daha düşük seyretmesi, oksidatif mayaların asitleri parçalamasıyla açıklanabilir.
- Üründen mikrosatelit markerler ile temsili olarak seçilen örneklerde izole edilen beş tür sırasıyla; *Pichia subpelliculosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Pichia membranifaciens*, *Hanseniaspora uvarum*'dur. Yapılan literatür çalışmasında belirtilen türlerin yüksek tuz konsantrasyonuna dayanabildiği görülmüştür. Ayrıca sonuçların fermente sebzelerden izole edilen türler (Harris 1998) ile örtüştüğü görülmektedir. Deneme sonucunda üründe hakim cinsin *Pichia* olduğu (%75) hakim türün ise *Pichia subpelliculosa* (%64,81) olduğu belirlenmiştir.
- Asitlik ve pH, üretim biçiminin geleneksel veya endüstriyel üretim olmasıyla ilişkili olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Ev üretimlerinde asitlik ortalaması %1,53 bulunurken, endüstriyel üretimde %0,92 bulunmuştur. Bu durum geleneksel üretimde mikrobiyal aktivitenin daha çok olduğunu göstermektedir.

Salamura asma yaprakları, geleneksel Türk diyetinde dolma yapımında kullanılmaktadır. Dolma günlük olarak tüketilebildiği gibi, özel yemek ve bayramlarda da misafirlere ikram edilmektedir. Hazır yemek konserveleri ise gün geçtikçe market raflarındaki yerini güçlendirmektedir. Bu denli tüketilen bir ürünün ne Gıda Tarım ve Hayvancılık bünyesinde ne de Türk Standartları Enstitüsü'nde bir standardı bulunmamaktadır. Baklava ve yoğurt gibi geleneksel Türk yemeklerini komşu ülkelerin sahiplenmesinden sonra, asma yapraklarının sahiplenilmesi içten bile değildir. Konu ile

ilgili çalışmalar arttırılmalı, standartlar belirlenmeli ve güncel üretim-ihracat rakamları hakkında araştırmalar yapılarak kamuoyu ile paylaşılmalıdır. Standart bir üretim modeli oluşturulup ihracatı arttıķa salamura üzüm yaprağının tanınırlığının artacağı ve ülke ekonomisine önemli bir girdi sağlayacağı aşıkârdır. Dolayısı ile ürün özelliklerini aydınlatıcı, yeni ürün üretim ve geliştirilmesine yönelik yapılacak bu tip çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Ağaoğlu, Y.S., Yazgan, A. Kara, Z., 1988. Tokat Yöresinde Yaprak Salamuracılığına Yönelik Asma Yetiştiriciliği Üzerinde Bir Araştırma. Türkiye II. Bağcılık Sempozyumu Bursa 31 5-03
- Anonim, 2002. Toplam Asit Tayini, TSE:1125, Necatibey Cad. No:112, Bakanlıklar, Ankara
- Anonim, 2003. Gıda maddeleri tüketim harcaması miktarları ve toplam değerleri, <http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do? 21,10,2011>
- Anonim 2004. <http://www.tumgazeteler.com/?a=608227 21,10,2011>
- Anonim 2007. Structure of the world Vitivinicultural industry in 2007. <http://www.oiv.int/oiv/info/enstatistiquessecteurvitivinicole#secteur 29.06.2012>
- Anonim 2010. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html?id=512 23,05,2012>
- Anonim 2010. Assessment report on *Vitis vinifera* L., folium European Medicines Agency, London
- Anonim 2012 a. <http://www.ajansmanisa.com/haber/sarigol/sarigolde-taze-bag-yapragi-alimlari-basladi/11049.html 19,05,2012>
- Anonim 2012 b www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=65 29.06.2012
- Anonim 2012c <https://www.tse.org.tr/TSEIntWeb/Standard/Standard/StandardAra.aspx 20.07.2012>
- Anonim 2012d <http://www.gkgm.gov.tr/ 20.07.2012>
- Apan, M., 2007. Beyaz Peynirlerin Yüzeyinde Gelişen Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Arslan, S., 2006. Türkiye doğal alabalık (*Salmo trutta* L., 1758) Populasyonlarında mikrocografik ve makrocoğrafik mikrosatelit DNA varyasyonu, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Babic, I., Hilbert, G., Nguyen-The, C., and Guiraud, J., 1992. The yeast flora of stored ready-to-use carrots and their role in spoilage. Int. J. Food Sci. Technol. 27:473–484.
- Bailey, J. S., Lyon B. G., Lyon C. E. and Windham W. R., 2000. The microbiological profile of chilled and frozen chicken, J Food Microbiol., 63(9)1228-1230.
- Başoğlu, F., İ. Şahin, M. Korukluoğlu, V. Uylaşer, A. Akpınar, 1996. Salamura Yaprak Üretiminde Fermentasyon Şekli ve Katkı Maddelerinin Kalite ve Dayanıklılığa Etkisinin Araştırılması ve Uygun Tekniğin Geliştirilmesi. Turk. J. Agric. For., 20, 535-545.
- Baysal, A., 1997. Genel Beslenme. Hatipoğlu yayınları Ankara.
- Boekhout, T., Robert, V. (2003). Yeast in food. Beneficial and detrimental aspects. Cambridge: CRC Press.
- Carr, J. G., Cutting, C. V., and Whiting, G. C., 1975. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food Academic Press, London. pp. 281–305
- Cemeroğlu, B. 2010. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:34
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa P., and Panijpan B., 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological

- control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*), *Biological Control* 42:326–335.
- Chen, M., Zeng, G., Tan, Z., Jiang, M., Zhang, J., Zhang, C., Lu, L., Yuzhen Lin, Y., Peng, J., 2011. Compound microsatellites in complete *Escherichia coli* genomes. *FEBS Letters*, 585, 1072–1076.
- Chistiakov, D.A., Helleman, B., Volckaert, F.A.M., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255, 1–29.
- Daeschel, M.A., Andersson, D.E., Flemming, H.P., 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials *FEMS Microbiology Reviews* 46 357–367
- Dalgıç, T., Akbulut, N., 1988. *Gıda* 13 175–182
- Deák, T., 1988. Experimental Microbial Ecology of Foods. D.Sc. Thesis, Hungarian Academy of Sciences, Budapest (in Hungarian).
- Deák, T. and Beuchat, L. R. 1993. Yeasts associated with fruit juice concentrates. *J. Food Protect.* 56:777–782.
- Deak, T., 2008. Handbook of Food Spoilage Yeasts, Second Edition. CRC Press Boca Raton
- Deák, T. and Beuchat, L. R., 1988. Evaluation of simplified and commercial systems for identification of foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 7:135–145.
- Demirci, M., 2002. Beslenme Rebel Yayıncılık İstanbul
- Demirci, AŞ., 2011. Salamura İşlenen Bazı Asma Yapraklarının Kalite Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 8- 3
- Demirhan, Y. 2006. Narince ve sultanî çekirdeksiz üzüm çeşitlerinden salamura asma yaprağı üretimine gibberellik asit ve hümitik asit uygulamalarının etkileri (Yüksek Lisans Tezi, Basılmamış), Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
- Edson, C.E., Howell, G.S. and Flore, J.A., 1995. Influence of Crop Load on Photosynthesis and Dry Matter Partitioning of Seyval Grapevines. II. Seasonal Changes in Single Leaf and Whole Vine Photosynthesis. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(4): 469–477.
- Elmalı, Ö., 2008. Tokat ili merkez ilçede bağcılıkla uğraşan üretim ve pazarlama sorunları. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Etchells, J. L., Fleming, H. P., and Bell, T. A. 1975. Factors influencing the growth of lactic acid bacteria during the fermentation of brined cucumbers. *In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food* (eds. Carr, J. G., Cutting, C. V., and Whiting, G. C.). Academic Press, London. pp. 281–305.
- Fernández-Espinar, M. T., Martorell, P., de Llanos, R., Querol, A., 2006. Molecular methods to identify and characterize yeast in foods and beverages. In A. Querol G. H. Fleet (Eds.), *Yeast in food and beverages. The yeast handbook* (pp. 1–13). Berlin: Springer.
- Fleming, H. P., 1982 Fermented vegetables. In: *Economic Microbiology*, Vol. 7. Fermented Foods (ed. Rose, A. H.). Academic Press, London. pp. 227–258.
- Flórez, A.B., Martín, P.A., López-Díaz, T.M., Mayo, B., 2007. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. *International Dairy Journal* 17, 350–357.

- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M. A., Andrighetto, C., Schirone, M. & Tofalo, R., 2001. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Research*, 161–167.
- Göktürk, N., Artık, N., Yavaş, İ., Fidan, Y., 1997. Bazı üzüm çeşitleri ve asma anacı yapraklarının yaprak konservesi olarak değerlendirilme olanakları üzerine bir araştırma. *Gıda* 22 15:23
- Gülcü, M., 2009. Yemeklik asma yaprağı üretimi, TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü, Çiftçi Broşürü Yayın No: 22.
- Harrigan, W.F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*, Academic Press, San Diego, USA, 532 p
- Harris, L.J., 1998. *The Microbiology of Vegetable Fermentations*, (B.J.B. Wood, editor), *Microbiology of Fermented Foods*, Blackie Academic and Professional, London, p. 45-72.
- Harju, S., Fedosyuk, H., Peterson, F.K., 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab *BMC Biotechnology*, 4
- Hesham, A. L. and Hashem M. M., 2010., Molecular genetic identification of yeast strains isolated from Egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and Growth Promotion of Corn Plants, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21(1), 55–6.1
- Horwitz, W. and Latimer G. W., 2005. *Staphylococcus aureus* in Foods (AOAC official Method 987.09), *Official methods of analysis of AOAC International* (18th edition), Maryland, USA.
- İç E. ve Denli Y., 1997. Sultani asma yapraklarından salamura yaprak üretimi, *Gıda*, 22 105-108.
- Kara, Z., Akay, A. and Demirhan, Y., 2006. P-Value and Some Other Quality Characters of Grape Leaves and Leafy Vegetables Grown in Türkiye, *Von der Methode zum Ganzen: Potenziale zeitgemäßer Qualitätsforschung Symposium am 2./3. Februar 2006 Wien, Österreich, Tagungsband* p 47.
- Kara, Z., 2007. Sustainable Viticulture Activities In Turkey. *Agricultura – Știință și practică* nr. 1-2 (61-62)
- Karasu Yalçın, S., Şenses Ergül, Ş., Özbaş, Z.Y., 2010. Moleküler Esaslı Yöntemlerin Gıda Kaynaklı Mayaların Tanımlanmalarında Kullanılmaları *Gıda* 35 (5) 379-386
- Katsaboukakis, K., Zoidou, E.; Athanasopoulos, E.P.; Balatsoura, B., 1986. Preservation of "Sultania" leaf blades in brine *Agris* 10(1) p. 105-117
- Koşar, M., Küpeli, E., Malyer, H., Uylaşer, V., Türkben, C., Başer, H.C., 2007. Effect of Brining on Biological Activity of Leaves of *Vitis vinifera* L. (Cv. Sultani Cü ekirdeksiz) from Turkey *J. Agric. Food Chem.* 55, 4596-4603
- Litt, M. and Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397-401.
- Löoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A., 2012. Yeast genomic DNA extraction with LiOAc-SDS (Protocol for: Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications), *BioTechniques Protocol Guide*, 395.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., and Spencer-Martins, I. 1992. Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol.* 14:279–283.

- Maturin L.J. and Peeler J.T., 1998. Aerobic plate count, (Chapter 3), Bacteriological Analytical Manual (BAM, 8th edition), Food and Drug Administration, Gaithersburg, MD, USA. P. 17-26
- Nazlı, C., 2007. Üzüm <http://www.tepge.gov.tr/Dosyalar/Yayinlar/ba0281b3e9004c6cb589b3af6f84cee3.pdf> 29.06.2012
- Nel S., Lues J.F.R., Buys E.M., Venter P., 2004. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir, Meat Science 66: 667–674.
- N'úñez, F., Rodríguez, M. M., Córdoba, J. J., Bermúdez, M. E., Asensio, M. A. 1996. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. International Journal of Food Microbiology, 29, 271–280.
- Oliveira, E.S., Rosa, C.A., Morgano M. A., and Gil Eduardo Serra G.E., 2004. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast World Journal of Microbiology Biotechnology 20: 19–24
- Oraman, M. N., 1972. Bağcılık Tekniği. 2. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 470. Ankara.
- Ozaki S, Fukuda S, Fujita T, Kishimoto N., 2008. RAPD analysis of salt-tolerant yeasts from contaminated seasoned pickled plums and their growth inhibition using food additives, Biocontrol Sci., 13(4):125-30.
- Pederson, C. S. 1971. Microbiology of Food Fermentations. AVI Publ. Co., Westport, CT.
- Pichhardt, K., 2004. Gıda mikrobiyolojisi (Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar) (çevirenler: Y. Sekin, N. Karagözlü), Literatür Yayıncılık, İstanbul, Türkiye.
- Praphailong W., Fleet G.H., 1997 The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts Food Microbiology 14 459-468
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., Bräuer, M. 1992. Diversity of yeasts in selected dairy products. J. Appl. Bacteriol. 72:370–376.
- Ross, P.R., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future International Journal of Food Microbiology 79 3 – 16
- Sanjeev, K., Satyanarayana, T., 2001. Medium optimization for glucoamylase production by a yeast, *Pichia subpelliculosa* ABWF-64, in submerged cultivation- World Journal of Microbiology Biotechnology 17: 83-87
- Sat, I.G., Sengül, M., Keleş, F., 2002. Use of grape leaves in canned foods. Pakistan journal of food and nutrition. 1(6): 256-262.
- Savard, T., Beaulieu, C., Gardner, N. J., and Champagne, C. P., 2002. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. Food Microbiology 19:363–373.
- Sert, S., 2000. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Notları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No: 138, Erzurum.
- Speck, M. L., 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Americam Public Health Association, Washington.
- Togan, I., Soysal, M.J., Attunok. V., Özkan, E., Koban, E., 2003. Populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan yeni istatistik yöntemler, GAP 3. Tarım Kongresi, 2-3 Ekim, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Şanlıurfa

- Silva-Filho E. A., Brito dos Santos S. K., Resende A., Morais J.O.F., Morais M. A. and Simoes D. A., 2005. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting, *Antonie van Leeuwenhoek*, 88 13–23.
- Sönmezoğlu A. Ö., 2006. Mikrosatelit DNA belirleyicileri kullanılarak yerel makarnalık buğday çeşitlerinin tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Tautz, D., Trick, M., and Dover, G. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652–656.
- Tournas V., Stack M. E., Mislivec P. B., Koch H. A. and Bandler L., 1998. Yeasts, molds and mycotoxins (Chapter 18), *Bacteriological Analytical Manual (BAM, 8th edition)*, Food and Drug Administration, Gaithersburg, MD, USA. 227-234.
- Ün, C., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Schellander, K., 2000. Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları. *Hayvansal Üretim*, 41, 9-14.
- Ünver, A., Özcan, M., Arslan, D., Akın, A.; 2006. The lactic acid fermentation of three different grape leaves grown in Turkey. *Journal of Food Processing and Preservation* 31 (2007) 73–82
- Vasdinyei, R. and Dea'k T., 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques, *International Journal of Food Microbiology* 86:123–130.
- Viljoen, B. C., 2006. Yeast Ecological Interactions. Yeast–Yeast, Yeast–Bacteria, Yeast–Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents. *Yeasts in Food and Beverages*, Ed: Amparo Querol, Graham Fleet. Springer, Germany, 83-110.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E. B., De vuyst, L., Laulund, S., Lahteenmaki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., Wright, A. V., 2004. The lactic acid bacteria, the food chain and their regulation. *Trends in food science Technology*, 25 498-505
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Wood, B.J.B., 1997. *Microbiology of Fermented Foods*. Glaskow UK 20-420
- Wyder, M.T., Puhan, Z., 1999 Investigation of the yeast flora in smear ripened cheeses *Milk Science International* 54 330-333
- Yıldız, H., 2011. Turşu ve Zeytinlerden Laktik Asit Bakterileri ile Mayaların İzolasyonu-İdentifikasyonu ve Elde Edilen İzolatların Bazı Özelliklerinin Belirlemesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Konya’da doğdu. İlköğrenimini Aydın’da, orta öğrenimimi Konya’da tamamladı. 2002’de Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nü kazandı. 2006’da mezun olup yedek subay olarak askerlik görevini icra etti. 2 yıl özel sektörde çalıştıktan sonra 2009’da Erzincan Üniversitesi’ne Öğretim Görevlisi olarak atandı. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisansa başladı. Evlidir.

Ağustos 2012