



**GELENEKSEL YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN SİRKELERİN
BAZI MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ, MİKROBİYOTASINDA YER ALAN
ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI**

Hafsa BİLGİNER

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Prof. Dr. Bülent ÇETİN
2018
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GELENEKSEL YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN SİRKELERİN BAZI
MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ,
MİKROBİYOTASINDA YER ALAN ASETİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TANISI**

Hafsa BİLGİNER

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2018**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

GELENEKSEL YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN SİRKELERİN BAZI MİKROBİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, MİKROBİYOTASINDA YER ALAN ASETİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI

Prof. Dr. Bilel GETİN danışmanlığında, Hafsa BİLGİNER tarafından
hazırlanan bu çalışma, 08/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Bilim Dalı'nda
Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği / oy çokluğu (.3/.3) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mustafa GÜRSES

İmza :

Üye : Prof. Dr. Bilel GETİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28.06/2018 tarih ve ...26.../...26..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GELENEKSEL YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN SİRKELERİN BAZI MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, MİKROBİYOTASINDA YER ALAN ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI

Hafsa BİLGİNER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Sirke oluşumunda rol olabilecek mikrobiyota hakkında bilgi edinmek amacıyla, geleneksel yöntemlerle üretilmiş 41 adet sirke örneği üzerinde bazı mikrobiyolojik ve kimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Kimyasal analizlerden pH ve asitlik tayinleri yapılarak, flora üzerinde etkilerinin olup olmadığı gözlenmek istenmiştir. Mikrobiyolojik analiz olarak, toplam aerobik mezofilik bakteri, maya-küf, enterokok, koliform bakteri, muhtemel asetik asit bakterisi sayımları yapılmış ve farklı koloni özellikleri dikkate alınarak GYC besiyerinden 98 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. İzolatlar Real-Time PCR tekniği kullanılarak Tm ve HRM analizleri yardımıyla sınıflandırılmış ve grubu temsil eden izolatların 16S rDNA bölgesi hedef alınarak tanıları gerçekleştirilmiştir. Tanı sonuçlarına göre, sirke örnekleri mikrobiyotasında baskın olarak sırasıyla; *Bacillus* sp., *Brevibacillus parabrevis*, *Acetobacter okinawensis*, *Paenibacillus* sp., *Lactobacillus casei*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acinetobacter johnsonii* olmak üzere 7 farklı suşun bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, evde sirke yapımı prosedürünün başarılı bir şekilde uygulanamadığı kanaatine varılmıştır.

2018, 68 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sirke, asetik asit bakterisi, Real Time-PCR, Tm ve HRM analizleri, 16S rDNA

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF SOME MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF THE VINEGARS PRODUCED BY TRADITIONAL METHODS, THE ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF ACETIC ACID BACTERIA IN THE MICROBIOTA

Hafsa BİLGİNER

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

Supervisor: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Some microbiological and chemical analyses was carried out on 41 samples of vinegar produced by traditional methods in order to obtain information about the microbiota that may be played in role vinegar formation. Chemical analyzes which pH and acidity determinations were made and it was desired to observe whether there were effects on the flora. As microbiological analyzes, total aerobic mesophilic bacteria, yeast-mold, enterococcus, coliform bacteria, probable acetic acid bacterial counts were investigated and 98 bacterial isolates obtained from GYC medium considering different colony characteristics. Isolates were classified by means of Tm and HRM analysis using Real-Time PCR technique and identifications of isolates were performed by targeting the 16S rDNA region of the strains representing the group. According to the results of identifications, *Bacillus* sp., *Brevibacillus parabrevis*, *Acetobacter okinawensis*, *Paenibacillus* sp., *Lactobacillus casei*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acinetobacter johnsonii*, 7 different strains were found in the microbiota of vinegar samples, respectively. As a result, it was concluded that the home-made vinegar procedure haven't been able to applied successfully.

2018, 68 pages

Keywords: Vinegar, acetic acid bacteria, Real Time-PCR, Tm and HRM analyzes, 16S rDNA

TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi süresince desteğini hiçbir konuda esirgemeyip her türlü yardımda bulunan, bilimsel tecrübe ve bilgisinden her daim faydalandığım saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e...

Edindiği deneyimleri, bilgi ve tecrübelerini aktararak laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan değerli hocam Sayın Uzman Mehmet YÜKSEL'e...

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi, bu tez çalışması sırasında da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve ablalarım...

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hafsa BİLGİNER

Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Sirke Fermantasyonu.....	5
1.1.1. Alkol fermantasyonu	5
1.1.2. Asetik asit fermantasyonu	5
1.1.3. Asetik asit bakterileri	7
1.1.4. Sirke üretim yöntemleri.....	10
1.1.4.a. Yüzey kültür yöntemi (yavaş yöntem)	10
1.1.4.b. Hızlı yöntem (jeneratör metodu)	10
1.1.4.c. Derin kültür yöntemi (submers metodu)	11
1.1.5. Sirkenin kimyasal bileşimi	11
1.1.6. Asetik asit bakterilerinin tanısında Real Time-PCR	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Dilüsyonların hazırlanması	31
3.2.2. Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı	31
3.2.3. Koliform grubu bakteri sayımı	31
3.2.4. Maya ve küf sayımı	31
3.2.5. <i>Enterococcus</i> 'ların sayımı.....	32
3.2.6. Muhtemel asetik asit bakterilerinin sayımı ve izolasyonu	32
3.2.7. Gram boyama	33
3.2.8. İzolatların genetik analizi	34

3.2.8.a. DNA izolasyonu	34
3.2.8.b. Real-Time PCR ile genotiplendirme	35
3.2.8.c. 16S rDNA analizi ile tanı	36
3.2.9. Sirke örneklerinin bazı kimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	37
3.2.9.a. pH tayini	37
3.2.9.b. Asitlik tayini.....	37
3.3. İstatistiksel Analizler	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	39
4.1. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	39
4.2. Kimyasal Analiz Sonuçları	44
4.3. Mikroorganizmaların Tm ve HRM Analizleri ile Tanılanması	47
5. SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR	59
EKLER	66
EK 1.....	66
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ	Mikron
e	Elektron
g	Gram
α	Alfa
γ	Gama

Kısaltmalar

AAB	Asetik Asit Bakterileri
BLAST	Basic Local Alingment Search Tool
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Denatüre Gradient Jel Elektrofrez)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleosit Trifosfat
dsDNA	Çift iplikçikli DNA molekülü
ERIC	Çoklu Tekrar Eden Enterobakteriyel Gen Arası Bölgeler (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)
GC-MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (Gas Chromatography/ Mass Spectrometry)
GYC	Glukoz-Yeast extract-Calsium carbonat
HRM	Yüksek Sıcaklıkta Erime (High Resolution Melting)
LB Broth	Luria Bertani Sıvı Besiyeri
MAA	Muhtemel Asetik Asit Bakterisi
MAB	Modifiye Acetobacter Besiyeri
MALDI-TOF MS	Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)
MYP	Mannitol-Yeast extract-Pepton
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PFGE	Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
RAPD	Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
REP	Tekrar Eden Palindromik Element (Repetitive Extragenic Palindromic)
RFLP	Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms)
ssDNA	Tek iplikçikli DNA molekülü (Single-Stranded DNA)
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
TE	Tris-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı (Temperature melting)
TTGE	Geçici Sıcaklık Gradient Jel Elektroforezi (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
UHPLC-QTOF-MS	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/Dörtlü Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi (Ultra-High Performance Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Alkolün asetik aside dönüşüm reaksiyonları	6
Şekil 1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aşamaları	15
Şekil 1.3. PCR işlemi ile DNA'nın çoğaltılması	16
Şekil 1.4. Real time-PCR yöntemi ile yapılan bir analizden elde edilen amplifikasyon eğrisi	17
Şekil 4.1. 48 numaralı ve 53 numaralı izolatlara ait çizimler	44
Şekil 4.2. 21-62 numaralı izolatlara ait Tm değeri eğrileri.....	47
Şekil 4.3. 56-100 numaralı izolatlara ait PCA analizi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Asetik asit bakterilerinin cins ve türleri.....	9
Çizelge 1.2. Sirkenin kimyasal bileşimi	13
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan sirke örneklerine ait genel bilgiler	29
Çizelge 3.2. Muhtemel AAB'lerinin izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin bileşimi.....	33
Çizelge 3.3. İzolatların HRM değerlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler	36
Çizelge 4.1. Mikrobiyolojik ekim sonuçları	39
Çizelge 4.2. Sirke örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları	44
Çizelge 4.3. GYC agar izolatlarının tanı sonuçları	49
Çizelge 4.4. GYC agara ekimi yapılan sirke örneklerinden elde edilen izolatlar.....	51

1. GİRİŞ

Sirke kelimesi Divan-ü Lugat-it Türk’de de yer alan bir kelime olup dilimize Farsça’dan geçmiş ve aynı anlamıyla günümüze kadar kullanımı devam etmiştir. İngilizce karşılığı olan vinegar kelimesi ise Fransızca “vin aigre-ekşi şarap” anlamına gelmektedir. Sirke, içerisinde şeker bulunan sıvıların önce alkol, daha sonra da asetik asit fermantasyonuna tabi tutulmaları ile elde edilen bir gıda ürünüdür. Hemen hemen her ülkede, farklı türden hammaddelerden üretilbildiği için dünyadaki en yaygın ürünlerden birisidir (Akman ve Yazıcıoğlu 1955; Achaerandio *et al.* 2002; Öztürk vd 2009; Sürücüoğlu ve Özçelik 2012; Ordonez *et al.* 2013).

Sirke, ülkemiz mevzuatına göre (TSE 1880 EN 13188 Sirke Standardı) “Tarım kökenli sıvılar veya diğer maddelerden, iki aşamalı alkol ve asetik asit fermantasyonuyla, biyolojik yolla üretilen kendine özgü ürün” olarak tanımlanmaktadır. Bu standartta, sirke üretiminde kullanılan hammaddelere göre sirke çeşitleri; şarap sirkesi, meyve sirkesi, üzüksü meyve şarabı sirkesi, elma şarabı sirkesi, beyaz sirke, tahıl sirkesi, malt sirkesi, damıtılmış malt sirkesi, baharatlı sirke, aromalı sirke, peyniraltı suyu sirkesi, bira sirkesi, bal sirkesi şeklindedir (Anonim 2016).

FAO/WHO standartlarında ise sirke; şeker ve/veya nişasta içeren tarımsal kökenli hammaddelerden, iki aşamalı fermantasyon (alkol ve asetik asit fermantasyonu) prosesi kullanılarak elde edilen, insan tüketimi için uygun bir sıvı şeklinde tanımlanmaktadır (Anonim 2000).

Çok eski dönemlerde, sirke üretiminin yaygınlaştırılmadığı ülkelerde sirke pahalı ve lüks bir içecek olarak kabul edilirken, günümüzde sofralarda salatalarda, çeşitli sosların, mayonezlerin, ketçapların ve hardalların hazırlanmasında, hatta bazı hastalıkların tedavisinde ilaç olarak da kullanılır. Aynı zamanda sirke, et yumuşatma ve gevşeme sürecini hızlandırır, balık kemiklerini yumuşatır, meyve ve sebze endüstrisinde uygulanan turşu yapımının yanı sıra balık ve çeşitli deniz ürünlerinin hazırlanmasında

kullanılır. Bunlara ek olarak, hazır bir ürünün duyuşal özelliklerini geliştirir ve ortamı asitlendirerek gıdanın muhafaza edilmesini de sağlar (Türker 1974; Tan 2005; Stasiak and Błazejak 2009; Shishehbor *et al.* 2017).

Ayrıca sirke, düzenli olarak tüketildiğinde antimikrobiyal, antidiyabetik, antioksidatif, antiobezite ve antihipertansif gibi sağlığa yararlı etkiler de göstermektedir. Bu etkiler, farmasötik açıdan katkı sağlayan çeşitli polifenoller, mikro besin maddeleri ve diğer biyoaktif bileşikleri yapısında bulundurmasından kaynaklanmaktadır (Ho *et al.* 2016).

Sirke yapımı binlerce yıllık geçmişe dayanmasına rağmen sirkeleşme olayının anlaşılması oldukça yenidir (Akman ve Yazıcıoğlu 1955). 1653-1682 yıllarında Becher, sirkeleşmede havanın etkisinin olduğundan ilk bahseden kişi olmuş, ileriki yıllarda (1668-1738) Boerhave sirke çiçeği diye adlandırdığı bitkisel maddelerin sirkeleşme için önemli olduğunu söylemiştir. 1812 yılında Peerson, alkollü sıvıların yüzeyinde oluşan ve yapısında bazı canlıların (*Mycoderma* olarak isimlendirdiği) bulunduğu selülozik karakterdeki zarın sirkeleşme olayını meydana getirdiğini öne sürmüştür. 1837 senesinde ise Kützing, zarı inceleyerek tek hücreli bir organizmanın sirkeleşmede büyük etkisi olduğunu bir sirke fabrikasında yaptığı denemeler sonucunda ispat etmiş ve bu organizmaya da *Ulvino asidi* ismini vermiştir. 1868 yılına gelindiğinde, Pasteur şarap sirkesi zarındaki asetik asit bakterilerini mikroskopta incelemiş, bunların kısa çubuk şeklinde olduğunu tespit etmiş ve bu bakterileri *Mycoderma aceti* olarak isimlendirmiştir. Ayrıca sirkeleştirmek istediği şarabı, ısıtma işlemi tabii tutuktan sonra ortam şartları uygun olsa dahi sirke bakterisi olmadan sirkeleşmenin olmayacağını ispat etmiştir. Daha sonraları Buchner sirke bakterilerindeki enzimin (oksidaz), sirkeleşmede asıl rolü oynadığını belirtmiştir. 1878 yılında ise Hansen; *Mycoderma acetini*, *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter pasteurianum* olmak üzere iki türden oluştuğunu belirleyerek asetik asit fermentasyonunun daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Aktan ve Yıldırım 2011).

Asetik asit bakterileri (AAB) etanolün asetik asite dönüşümünden sorumlu olan mikroorganizmalardır. Ancak belli bir türün bütün suşları etanolü aynı oranda asetik

asite okside edemezler. Fermantasyona kaç suşun dâhil olduğu ve hangilerinin etanolü asetik asite dönüştürdüğüün bilinmesi için tanılama işleminin yapılması gerekmektedir (Perez *et al.* 2010). Bu nedenle, AAB'nin hızlı tür tanısı büyük önem taşımaktadır. Birçok çalışma, AAB'nin doğru tanılanmasının, zayıf yetiştirme kabiliyeti ve izolasyondan sonraki muhafazaları nedeniyle değil, aynı zamanda yüksek kaliteli DNA ekstraksiyonuyla karşılaşılan zorluklar nedeniyle de zor olduğunu göstermiştir. AAB'nin tanısı klasik olarak fenotipik testlerle yapılabilmektedir ancak bu testler hem güvenilir değildir hem de fazla zaman almaktadırlar. Bu nedenle son zamanlarda, AAB genotiplendirmesi için fenotipik testlerin yerine geçebilen, daha hızlı ve güvenilir olan DNA/RNA bazlı tanı metodları kullanılmaktadır. Bu tanı yöntemleri; klasik PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, RAPD-PCR, RFLP, DGGE, TTGE, PFGE ve Real time-PCR (Gerçek zamanlı PCR)'dır (Trcek *et al.* 1997; Gonzalez *et al.* 2004; Gonzalez *et al.* 2005; Gonzalez *et al.* 2006; Gullo *et al.* 2006; De Vero and Giudici 2008; Ilabaca *et al.* 2008; Jara *et al.* 2008; Papalexandratou *et al.* 2009; Perez *et al.* 2010; Vegas *et al.* 2013; Çetin vd 2017). Bunlar içerisinde en çok kullanılan yöntemlerden birisi Denatüre Gradient Jel Elektroforez (DGGE) tekniğidir. Bu teknik, aynı boyutta ancak farklı dizilimdeki ampikonların ayrılması esasına dayanır. Gıdadan izole edilen mikroorganizmaların tanısı, gıda fermentasyonu sırasında mikrobiyal çeşitliliğin değerlendirilmesi, mikrobiyolojik ve ticari açıdan gıda kalitesinin değerlendirmesi ve geliştirilmesi gibi gıda mikrobiyolojisinde farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Ercolini 2004).

Bu çalışmada, AAB'lerini tanılamak amacıyla Real time-PCR tekniği kullanılmıştır. Bu teknik, bir numunedeki DNA veya RNA oranını belirlemek için yaygın olarak kullanılan klasik PCR tekniğinin bir varyasyonudur. Çoğaltılmak istenen hedef bölgeye uygun primerler seçilerek ve gerekli çözeltiler tüp ortamına eklenerek Real-time PCR işlemi gerçekleştirilmektedir. Amplifiye edilen ürün floresan proboları, floresan karakterdeki DNA bağlayıcı boyalar ve termal döngü esnasında ışıma şiddeti ölçen gerçek zamanlı PCR cihazları kullanılarak görüntülenmekte ve sonuçlar grafik olarak alınmaktadır (Anonymous 2014).

AAB'lerinin fenotipik olarak sınıflandırmasında ise genellikle hücre ve koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz ve oksidaz aktivitesine bakılmaktadır. AAB'lerinin tanısında, hatta cins ve türlerin ayrımında yararlı olabilecek diğer fenotipik testler ise; etanolden asetik asit üretimi, laktat ve asetatın karbondioksit ve suya aşırı oksidasyonu, %0,35 asetik asit varlığında gelişim, %1 nitrik asit varlığında gelişim, glukozdan 2-ketoglukonik, 5-ketoglukonik ve 2,5-ketoglukonik asit oluşumu, gliserolün ketogenezi, farklı karbon kaynaklarında gelişim, suda çözünebilir kahverengi pigmentlerin oluşumu, glukoz veya fruktozdan γ -pironların oluşumu, şekerlerden asit üretimi, selüloz üretimi, %30 glukoz varlığında gelişim, hareketlilik, flagella varlığı ve hücredeki pozisyonu gibi testleri içermektedir. Testlerin birçoğu farklı türler arasında, hatta aynı türdeki farklı suşlar arasında değişken sonuçlar vermektedir. Bu durum, tanılama işlemini karmaşık hale getirmekte ve bir izolatın güvenilir tanısı için daha fazla sayıda testin kullanılmasını gerekli kılmaktadır (Guillamon and Mas 2011).

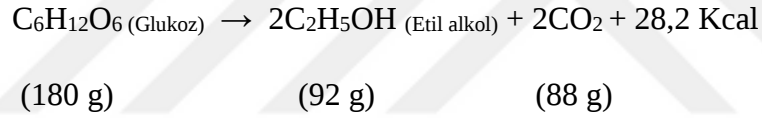
Son yıllarda, geleneksel yöntemlerle üretilen sirkelerin mikroflorasının ortaya konması ve bu floranın korunması, mikrobiyal açıdan üretimin standart hale getirilmesi ve tespit edilen mikroorganizmaların starter kültür olma potansiyelinin ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi için pek çok çalışma yapılmaktadır. Ülkemiz, tüketicilerin artan doğal ve geleneksel sirke talebini karşılayabilecek durumda olmasına rağmen, bu çalışmalar konusunda yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı, geleneksel yöntemlerle üretilen sirke mikroflorasının tanısının yapılması, sirkeye sağladıkları karakteristik özelliklerin belirlenmesi ve starter kültür olarak kullanılabilme durumlarının araştırılması gerekmektedir (Yetiman 2012).

1.1. Sirke Fermantasyonu

Sirke, değişik hammaddelerden farklı yöntemlerle elde edilen, alkol ve asetik asit fermantasyonu olmak üzere iki aşamalı fermantasyon sürecini içeren biyokimyasal bir olayın ürünüdür (Adams 1998; Aktan ve Yıldırım 2011).

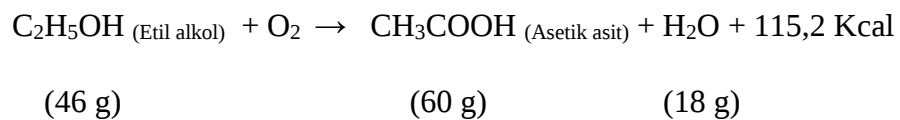
1.1.1. Alkol fermantasyonu

Alkol fermantasyonu, fermente olabilir şekerlerin, başta *Saccharomyces cerevisiae*'nin suşları olmak üzere bazı mayalar tarafından etanole dönüştürüldüğü anaerobik bir süreçtir. Fermantasyon ürünleri olarak etanol, CO₂ ve az miktarda gliserol, asetik asit ve bazı yüksek alkoller oluşmaktadır (Adams 1998; Waites *et al.* 2001; Aktan ve Yıldırım 2011).



1.1.2. Asetik asit fermantasyonu

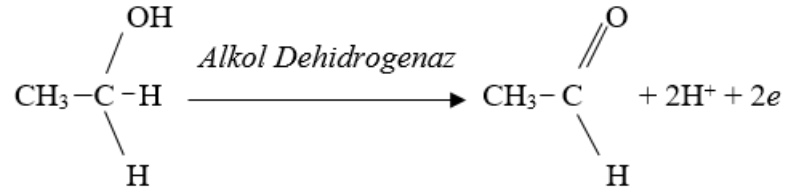
Asetik asit fermantasyonu, alkol fermantasyonu sonucu oluşan alkolün, *Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter* gibi asetik asit bakterileri tarafından aerobik koşullarda asetik aside oksidasyonunu içeren bir süreçtir. Şekerlerin ve alkollerin AAB'leri tarafından fermantasyonu sonucunda asetik, tartarik, laktik, malik ve sitrik asitler de dahil çeşitli organik asitler oluşmaktadır ancak bu asitler arasında asetik asit daha baskındır (Tan 2005; Aktan ve Yıldırım 2011; Budak vd 2014).



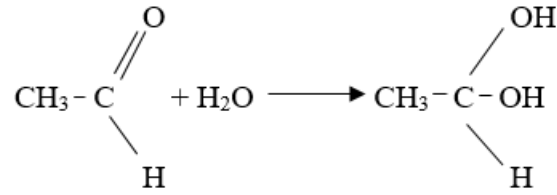
Aslında başlangıçta, alkolden asetaldehit oluşumu için alkol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla iki hidrojen iyonu ve iki elektron serbest bırakılır. İkinci aşamada, iki

hidrojen iyonu oksijen ile bağlanarak su oluşturur ve bu su aldehit oluşturmak için asetaldehiti hidrate eder. Üçüncü adımda, aldehit dehidrogenaz, asetaldehiti asetik asite çevirir ve iki hidrojen iyonu ve iki elektron salınır (Şekil 1.1) (Tan 2005).

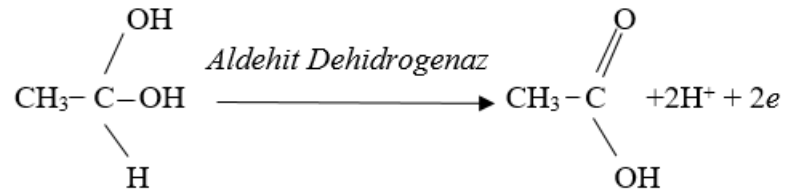
1. Asetaldehitin Oluşumu



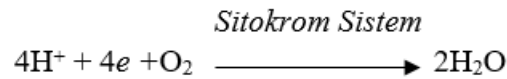
2. Asetaldehitin Hidratasyonu



3. Asetik Asitin Oluşumu



4. Elektron Transferi



Şekil 1.1. Alkolün asetik aside dönüşüm reaksiyonları (Tan 2005)

Asetik asit fermantasyonu üzerinde pH, sıcaklık, asit konsantrasyonu, etanol konsantrasyonu, oksijen, kükürt dioksit, diğer besin elementleri ve inhibitörler gibi faktörlerin etkisi bulunmaktadır (Gomez and Cantero 1998).

Sirkede verim, sirkeleştirme sonunda elde edilen sirkenin hacmi veya miktarı ile alakalı değil, direkt olarak asetik asit konsantrasyonu ile alakalıdır (Türker 1974). Çünkü FAO/WHO standartlarında ve TSE 1880 EN 13188 Sirke Standardı'nda sirkenin toplam asit içeriğinin (suda serbest asetik asit cinsinden) 40g/L'den az olmaması gerektiği belirtilmiştir (Anonim 2000; Anonim 2003).

Elverişli şartlar altında 100 kısım şekerden 50-55 kısım asetik asit veya 1 g etil alkolden 1,26 g asetik asit elde edilebilir. Ancak şekerin etil alkole fermentasyonu ve etil alkolün asetik asite oksidasyonu esnasında asetik asitin uğması, şekerin bir kısmının maya tarafından kullanılması gibi bazı kayıplardan dolayı kapalı sirke kaplarında verim %90, açık kaplarda ise %65-70 civarında olabilmektedir (Akman ve Yazıcıoğlu 1955).

1.1.3. Asetik asit bakterileri

Acetobacteriaceae familyasının bir üyesi olan asetik asit bakterileri, ortamda bulunan şeker ve/veya alkolleri asetik asite okside etmek gibi üstün bir metabolik yeteneğe sahip olan mikroorganizmalardır (Guillamon and Mas 2011).

AAB'leri gram negatif veya gram değişken, elipsoid veya silindirik şekilli, mikroskopta incelendiklerinde tek, çift, küme halinde veya zincir şeklinde gözükten bakterilerdir (Mas *et al.* 2014). Hücre uzunlukları 0,8 μm ve 4,5 μm ; genişlikleri ise 0,4 μm ve 1,2 μm arasında değişir. Polar ya da peritrik flagellaya sahiptirler ve mikroskopta incelendiklerinde hareketli oldukları açıkça görülür. Endospor oluşturmazlar. Aerobik karakterdedirler ve metabolizmalarında son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanırlar. Ancak, düşük konsantrasyonda oksijen ya da anaerobik koşullar gibi olumsuz durumlarda metabolik reaksiyonlarını yavaş da olsa gerçekleştirebilmek için alternatif elektron alıcıları kullanabilirler. Katalaz pozitif, oksidaz negatif özellik gösterirler. Gelişimleri için optimum sıcaklık değeri 25°C ile 30°C arasında değişir. Optimum pH değerleri 5 ile 6 arasında değişmekle birlikte, pH değeri 4'ün altındaki ortamlarda da gelişim gösterebilirler. Bazı türleri pigment ve farklı türlerde polisakkarit üretebilir (Guillamon and Mas 2011).

AAB'leri meyve suları, şarap, bira ve sirke gibi şeker ve/veya alkol içeren gıdalarda yaygın olarak bulunurlar. Çünkü pek çok substratı kullanabilme, nötral ve asidik ortamlarda gelişebilme ve bu ortamlarda hayatta kalabilme yeteneğine sahiptirler. Bu özellikleriyle bazı gıdalarda (sirke, kakao ürünleri vb.) arzulanan fermentasyona neden olurken bazılarında (şarap, bira vb.) ise bozulmaya neden olurlar (Gonzalez and Mas 2011; Mas *et al.* 2014).

Sirkeleşmesi istenen sıvılar, açık bir kapta bol hava alacak şekilde ve uygun sıcaklıkta bekletildikleri takdirde kısa bir süre sonra sıvı yüzeyinde bir zar meydana gelir. Sirke bakterilerinin oluşturduğu viskoz karakterdeki bu zara “sirke anası” denir. Ancak ortamdaki alkol konsantrasyonu AAB'lerinin iyi çalışabilmesi açısından önem arz eder. Bu bakteriler, en çok %13'lük alkole dayanırlar ve daha yüksek oranlarda alkol içeren ortamlarda çalışamazlar. Bu nedenle, sirkeleşmesi istenen sıvının alkol oranı yüksek ise alkol oranı %10 olacak şekilde su ilave edilir. Diğer taraftan ortamda alkol kalmayınca sirke bakterileri ihtiyaçları olan enerjiyi sağlayabilmek için asetik asidi parçalamaya başlarlar buna “üst oksidasyon” denir. Üst oksidasyonun önüne geçmek için sirkeleştirilen sıvıdaki alkol oranı %0,5'e düştüğünde sirkeleşmeye son verilir (Akman 1949; Türker 1974; Aktan ve Yıldırım 2011).

Şarap üretiminde ise ortamın hava alması durumunda, üzüm meyvesi ve çekirdeğinde bulunan AAB'lerinin fazla çoğalması alkol fermentasyonunun tamamlanamamasına neden olup bu durum bozulma olarak değerlendirilir (Gonzalez *et al.* 2005; Bartowsky and Henschke 2008).

Bunlardan farklı olarak, AAB'leri, C vitamini gibi yüksek ekonomik değere sahip bazı kimyasal ürünlerin üretiminde ve bakteriyel selülozların üretiminde de kullanılırlar. (Gonzalez and Mas 2011).

Çizelge 1.1. Asetik asit bakterilerinin cins ve türleri (Guillamon and Mas 2011)

Cins	Tür
<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter cibinongensis</i> <i>Acetobacter estuniensis</i> <i>Acetobacter fabarum</i> <i>Acetobacter ghanensi</i> <i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Acetobacter malorum</i> <i>Acetobacter nitrogenifigens</i> <i>Acetobacter oeni</i> <i>Acetobacter orientalis</i> <i>Acetobacter orleaniensis</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter peroxydans</i> <i>Acetobacter pomorum</i> <i>Acetobacter senegalensis</i> <i>Acetobacter syzygii</i> <i>Acetobacter tropicalis</i>
<i>Acidomonas</i>	<i>Acidomonas methanolica</i>
<i>Asaia</i>	<i>Asaia bogorensis</i> <i>Asaia lamnensis</i> <i>Asaia krugthepensis</i> <i>Asaia siamensis</i>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i> <i>Gluconacetobacter entanii</i> <i>Gluconacetobacter europaeus</i> <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> <i>Gluconacetobacter hansenii</i> <i>Gluconacetobacter intermedius</i> <i>Gluconacetobacter johannae</i> <i>Gluconacetobacter kombuchae</i> <i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> <i>Gluconacetobacter nataicola</i> <i>Gluconacetobacter oboediens</i> <i>Gluconacetobacter persimmonis</i> <i>Gluconacetobacter rhaeticus</i> <i>Gluconacetobacter sacchari</i> <i>Gluconacetobacter saccharivorans</i> <i>Gluconacetobacter swingsii</i> <i>Gluconacetobacter xylinus</i>
<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconobacter assai</i> <i>Gluconobacter albidus</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter japonicus</i> <i>Gluconobacter kanchanaburiensis</i> <i>Gluconobacter kondonii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Gluconobacter roseus</i> <i>Gluconobacter sphaericus</i> <i>Gluconobacter thailandicus</i> <i>Gluconobacter wancherniae</i>
<i>Granulibacter</i>	<i>Granulibacter thesedensis</i>
<i>Kozakia</i>	<i>Kozakia baliensis</i>
<i>Neoasaia</i>	<i>Neoasaia chiangmaiensis</i>
<i>Saccharibacter</i>	<i>Saccharibacter floricola</i>
<i>Swaminathania</i>	<i>Swaminathania salitolerans</i>
<i>Tanticharoenia</i>	<i>Tanticharoenia sakaeratensis</i>

1.1.4. Sirke üretim yöntemleri

Sirke üretim yöntemleri yüzey kültür yöntemi (yavaş yöntem), hızlı yöntem (jeneratör metodu) ve derin kültür yöntemi (submers metodu) olmak üzere üç ana grup altında incelenmektedir (Aktan ve Yıldırım 2011).

1.1.4.a. Yüzey kültür yöntemi (yavaş yöntem)

Yüzey kültür yönteminde; alkollü sıvı, bir fiçı içerisinde bir miktar sirke ile karıştırılıp geniş bir yüzey oluşturacak şekilde bekletildiğinde, sirke bakterileri üst kısımda kabuk şeklinde yoğunlaşmakta ve sirkeleşme meydana gelmektedir. Çok eskiden beri kullanılan bu yöntem ile en iyi cins ve hoş aromalı sirke elde edilse de sirkeleşme uzun sürmektedir. Randıman ise %70-85 arasında değişmektedir (Akman 1949; Akman ve Yazıcıoğlu 1955; Waites *et al.* 2001; Aktan ve Yıldırım 2011).

Bu yöntem ile sirke üretimi için, fiçinin yarısına kadar, 1/3-1/4 oranında pastörize edilmemiş keskin bir sirke karıştırılmış şarap konur. Ortam sıcaklığı 28-30°C olan bir yerde sirkeleşmeye bırakılır. Bir süre sonra sıvı yüzeyinde zar oluşumu gözlenir. Alkolden meydana gelen asetik asitin özgül ağırlığı, alkole göre daha büyük olduğu için tabana çöker. Özgül ağırlığı daha küçük olan alkol ise devamlı olarak zar ile temas halindedir. Böylece sirkeleşme yavaş ancak iyi bir şekilde sürer. Eğer sıcaklık uygunsa sirkeleşme 6-8 hafta sonra tamamlanır. Sirkeleşmenin bittiği, sirke anasının kendiliğinden sıvının dibine batmasıyla anlaşılır. Ancak, en doğrusu alkol ve asit miktarlarını saptamaktır. Sirkeleşme sonunda, üst oksidasyonun engellenmesi ve çeşitli aroma maddelerinin oluşabilmesi için sirkede %0.5-1.0 oranında alkol kalması gerekmektedir (Türker 1974; Nanda *et al.* 2001; Aktan ve Yıldırım 2011).

1.1.4.b. Hızlı yöntem (jeneratör metodu)

Alman usulü olarak da adlandırılan bu sirke yapımı sistemi, on dokuzuncu yüzyılın başlarında Alman kimyager Schutzenbach tarafından geliştirilmiştir. Bu sistemde, sirkeleştirme işleminin gerçekleştirildiği jeneratör tankları üç kısımdan oluşmaktadır.

Alkollü sıvı, üst kısımdan püskürtülerek tank içerisine gönderilmekte ve orta kısma geldiğinde asetik asit bakterilerinin yerleştirildiği mısır koçanları, cibre, çalı demetleri gibi geniş bir yüzeyden geçerken bu bakteriler tarafından sirkeleştirilmektedir. Sirke ise alt kısımda toplanmakta ve burada tekrar sirkülasyon için aynı jeneratörün tepesine veya serideki ikinci bir jeneratöre geri döndürülebilmektedir. Gerekli olan hava, sirke üretimi için kullanılan jeneratörün kenarlarından açılan hava kanallarından sağlanmaktadır (Waites *et al.* 2001; Tan 2005; Aktan ve Yıldırım 2011).

1.1.4.c. Derin kültür yöntemi (submers metodu)

Derin kültür yöntemi, havalandırma, karıştırma, ısıtma gibi genel fermantasyon koşullarının iyileştirildiği bir sirke üretim yöntemidir. Bu yöntemin diğer sirke üretim yöntemlerine göre daha hızlı olması, daha az yer işgal etmesi, yüksek oranda asitlik sağlaması ve elde edilen sirkenin daha kaliteli olmasından dolayı endüstriyel ölçeklerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Türker 1974; De Ory *et al.* 2004; Tan 2005; Mas *et al.* 2014).

Bu yöntemde, asetik asit bakterileri yüzeyde veya herhangi bir dolgu materyali üzerinde değil, mayşe içerisinde çoğalarak sirke üretimini gerçekleştirirler. Gerekli olan hava, ince zerrelere halinde ortama sürekli ve aralıksız olarak verilerek bu bakterilerin gelişmesi ve yüksek oranda asit üretmeleri sağlanır. Aynı miktardaki alkollü sıvının sirkeleşmesi, diğer yöntemlere göre bu yöntemde 30 kat daha çabuk olmaktadır (Türker 1974; Aktan ve Yıldırım 2011).

1.1.5. Sirkenin kimyasal bileşimi

Sirke berrak, sulu, renksiz veya hammaddenin rengine sahip bir sıvıdır. Sirkenin bileşimi; kullanılan hammaddeye, sirkeye katılan su veya bakterilerin gelişimi için eklenen besin maddelerine, sirke üretim metoduna ve olgunlaşma süresine göre değişiklik göstermektedir. Sirkedeki asetik asit konsantrasyonu yoğunluk, kaynama noktası, donma noktası, yüzey gerilimi ve viskoziteyi etkilemektedir. Sirkenin pH

değeri ise, asit oranına bağlı olarak 2,0-3,5 arasında değişmektedir (Garcia-Parrilla *et al.* 1997; Aktan ve Yıldırım 2011).

Sirkenin %80'lik kısmını su, %20'lik kısmını ise asetik asit yanında çok veya az miktardaki yan ürünler oluşturmaktadır. Sirkenin ana ürünü asetik asit olup, sirkeye has keskin ve ekşi tadın oluşumunda etkin rol almaktadır. Sirkedeki yan ürünler ise organik asitler, mineral maddeler, proteinler ve karbonhidratlardan oluşan ekstrakt ile esterler, aldehitler, metilglioksal, dihidroksiaseton, 2,3 bütülglikol, asetil metil karbinol, diasetil ve aroma maddeleri gibi uçucu unsurlardan meydana gelmektedir. Sirkenin kimyasal bileşimi Çizelge 2.2'de görülmektedir (Casale *et al.* 2006; Aktan ve Yıldırım 2011; Garcia-Parrilla *et al.* 2017).

Aromatik bileşikler, sirke kalitesinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Bu bileşiklerin oluşumunda karışık kültür kullanımı, olgunlaşma süreci boyunca sirkenin ahşap ile teması ve süresi aromatik çeşitlilikte önemli bir artış meydana getirmektedir. Bununla birlikte, ürünün aroması üzerinde bütün uçucu bileşikler etkili olmayabilmektedir (Mas *et al.* 2014).

Analitik olarak önemli bir madde L (+) Asetil metil karbinol'dür. Bu madde üzüm sirkesi, meyve sirkesi, malt sirkesi ve bal sirkesinde bulunurken, yapay sirke ve biyolojik yolla üretilen alkol sirkesinin damıtılması sonucu elde edilen asetik asitte bulunmaz. Genellikle sirkelerde bulunan asetil metil karbinol miktarı 100-250 mg/L arasında değişmektedir. Yapay sirke veya sentetik asetik asitten elde edilen sirke ile doğal sirkeyi birbirinden ayırt etmek için 2,3 bütülglikol, ekstrakt, kül ve gliserin tayinleri de yapılmaktadır (Aktan ve Yıldırım 2011).

Çizelge 1.2. Sirkenin kimyasal bileşimi (Aktan ve Yıldırım 2011)

Sirkenin bileşimi	Beyaz şarap sirkesi	Kırmızı şarap sirkesi	Çeşitli sirkeler	Diğer ülke sirkeleri	Meyve sirkeleri
Asetik asit (g/L)	41-71	44-50	43-95	36-112	41-99
Uçmayan asit (g/L) (tartarik asit olarak)	-	-	1,2-7,6	0,7-2,40	-
Genel tartarik asit (g/L)	0,1-3,3	0,7-2,5	0,28-1,23	0,97-2,40	-
Ekstrakt (g/L)	9,1-13,7	8,7-14,4	14,3-33,8	11,5-16,8	32,4-61,8
Şeker (g/L)	0,2-2,4	0,6-1,9	-	1,6-3,2	1,1-11,2
Şekersiz ekstrakt (g/L)	8,6-11,5	8,1-13,8	-	8,8-14,1	10-29
Kül (g/L)	0,84-2,76	0,81-2,39	1,54-8,77	1,22-2,25	2,0-5,7
Gliserin (g/L)	-	-	2,77-8,56	1,20-4,40	-
Alkol (%hacim)	0,0-0,9	0,1-1,9	0,5-50,0	0,1-1,5	0,1-0,9
Asetil metil karbinol (g/L)	-	-	53-240	49-159	-

Bitki ürünlerinde bulunan polifenolik bileşikler de sirkenin kalitesi üzerinde etkilidirler. Çünkü bu bileşikler antioksidan aktivitelerine ek olarak, sirkenin renginden ve buruk tadından sorumludurlar (Mas *et al.* 2014).

TS 1880 EN 13188 Sirke Standardı'na göre, ülkemizde üretilen sirkelerin toplam asit içeriği (suda serbest asetik asit cinsinden) 40 g/L'den az olmamalıdır. Kalıntı alkol oranı

şarap sirkesi dışındaki sirkelerde hacimce %0,5 şarap sirkelerinde ise hacimce %1,5 ve özel sirkelerde hacimce %3'ten fazla olmamalıdır (Anonim 2016).

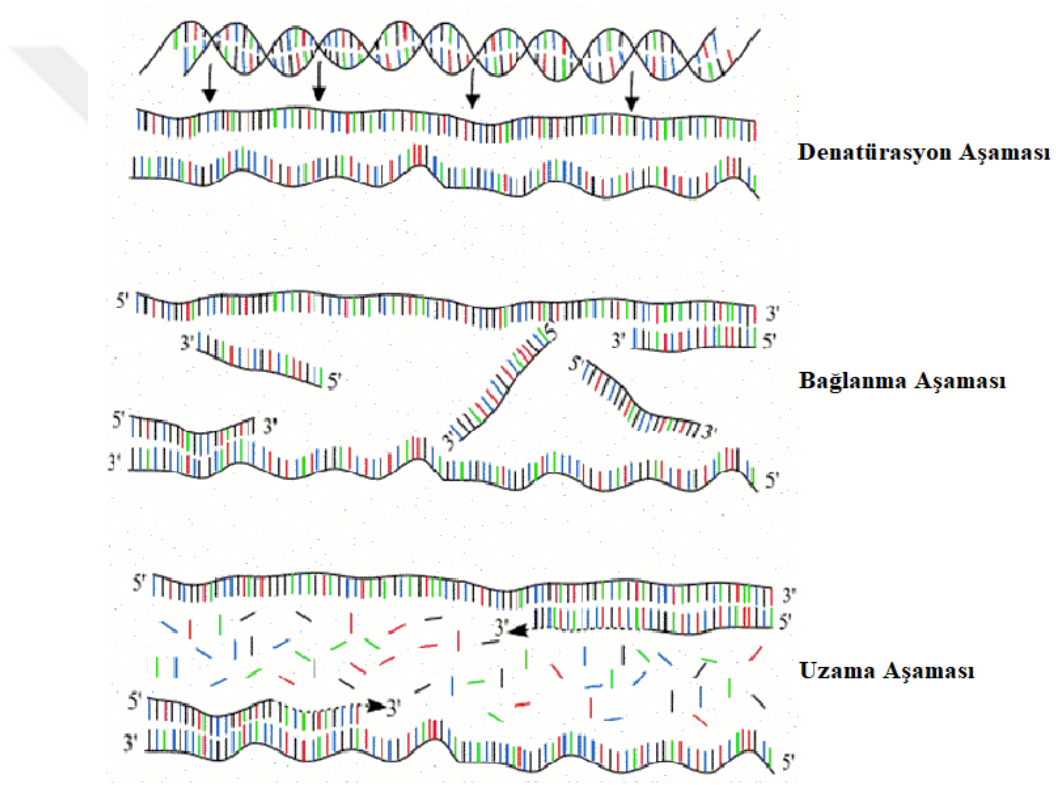
1.1.6. Asetik asit bakterilerinin tanısında Real Time-PCR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin keşfi, 1993 yılında Kimya Nobel Ödülü sahibi Saiki ve Mullis'in ortak bir çalışması sonucu gerçekleşmiştir. O zamandan beri PCR, basit, çok yönlü, hassas, spesifik ve tekrarlanabilir olmasından dolayı çeşitli bilimsel çalışmalarda kullanılmıştır. Gıda alanında da tahıllar, sebzeler, farklı hayvan ve balık türlerinde bulunan mikroorganizmaların tanısı ve gıda ürünlerinin içeriklerinin tespitinde yer almıştır (Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013).

PCR işleminin ilkesi, *in vitro* şartlarda, DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) fragmentinin kopyalanması esasına dayanmaktadır. Bu kopyalama işlemi 20-40 döngü olup, her döngü denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır (Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013; Anonymous 2007).

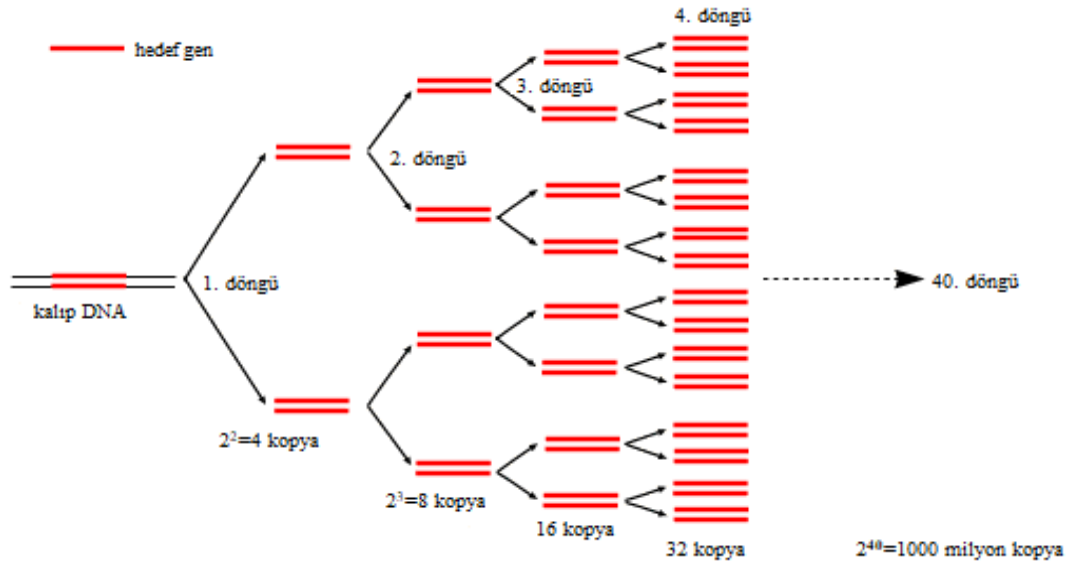
PCR işlemi ile DNA'nın çoğaltılması için ortamda bazı komponentlerin bulunması gerekmektedir. Bunlar; istenen hedef bölgeyi içeren kalıp DNA, çoğalma işlemi için hedef bölgeye tutunan spesifik primerler, uzama işlemini gerçekleştiren ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, enzimin özelliğine uygun tampon çözelti, DNA sentezi için gerekli dNTP'ler ve reaksiyonda katalizör görevi gören $MgCl_2$ 'dür. Denatürasyon aşamasında, 94-96°C'de, çift iplikçikli DNA (dsDNA) zincirini birbirine bağlayan kuvvetli hidrojen bağları kopar ve eşleşmemiş bazların sayısı artar. Ortamdaki tüm çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) formuna dönüştüğünde denatürasyon işlemi tamamlanır. Mevcut dsDNA'nın yarısının ssDNA'ya dönüştüğü sıcaklık, erime sıcaklığı (T_m değeri) olarak tanımlanır. Kullanılan çözücü, tuz derişimleri, ortam pH'sı, G/C ve A/T oranları T_m değerini etkiler. Bağlanma aşamasında, 45-60°C'de, ortamda bulunan primerler tekli DNA iplikçiklerindeki (ssDNA) hedef bölgeye tutunurlar. Bu safhanın sıcaklığı erime sıcaklığına (T_m değeri) bağlı olup, T_m değerinin 5°C altında tutulmalıdır. Bu aşamada sıcaklığın iyi ayarlanamaması, primerlerin DNA'ya

bağlanamamasına veya rastgele bağlanmasına neden olabilir. Uzama aşamasında ise, 72°C’de, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi dNTP’lerin ve $MgCl_2$ ’ün mevcudiyetinde, primerlerin bağlandığı hedef bölgelerden başlayarak DNA ipliği boyunca kopyalama işlemini gerçekleştirir. Bu enzim, 5’→3’ DNA polimeraz aktivitesine sahiptir. 5’ den 3’ e kadar dNTP’ler ekleyerek hedef bölgeyi kopyalar (Şekil 1.2) (Somma and Querci 2006; Anonymous 2007; Pestana *et al.* 2010; Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013; Anonymous 2014).



Şekil 1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aşamaları (Anonymous 2007)

Her çevrimden sonra, yeni sentezlenen DNA iplikçikleri bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır. Böylece, hedef bölgenin nihai bir kopyası olarak, amplifikasyon, 2^n (n:döngü sayısı) şeklindeki denklemle ifade edilir (Şekil 1.3) (Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013).



Şekil 1.3. PCR işlemi ile DNA'nın çoğaltılması (Anonymous 2007)

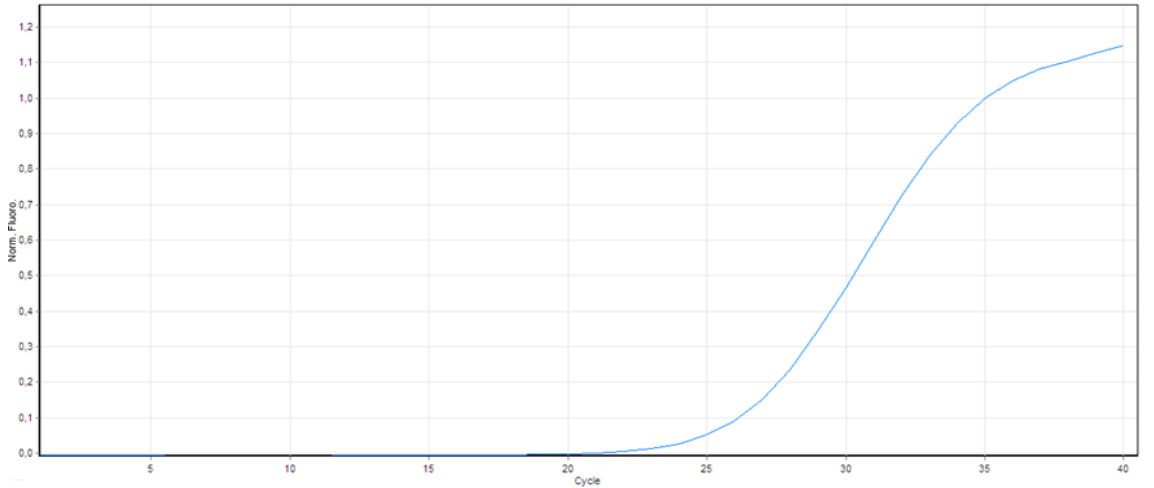
PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocyclers), tüp içerisindeki reaksiyonun gözlenebildiği hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi sonucunda, Real Time-PCR cihazı ve yöntemi geliştirilmiştir. Böylece, kalıtsal materyalin (DNA, mRNA) klasik PCR yöntemi ile çoğaltılması sırasında oluşan ürünlerin, eş zamanlı ve kantitatif olarak ölçülmesi sağlanmaktadır (Bekçi 2016).

Klasik PCR işleminde, amplifikasyondan sonraki ürün agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra ultraviyole ışığı altında görüntülenmektedir. Real Time-PCR işleminde ise, ortamda bulunan fluoresan karakterli boyalar veya probalar sayesinde amplifikasyonun erken safhalarından itibaren sonuç alınmakta ve değerlendirme yapılabilmektedir (Mackay *et al.* 2007; Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013; Bekçi 2016).

Real Time-PCR cihazı ile erime analizleri yapılarak, T_m ve HRM gibi sekansa özgü sonuçlar da elde edilmektedir. T_m değeri ve T_m grafik sonuçları ile farklı mikroorganizmalara ait farklı erime değerleri ve erime eğrileri alınarak, mikrobiyal çeşitlilik hakkında bir fikir edinilebilmektedir. HRM analizi ise, nükleik asit dizilimindeki çeşitlendirmeleri tanılamak için kullanılan PCR sonrası özel boyaların

kullanıldığı analiz yöntemi olup sonuçlar yine grafik olarak alınmaktadır (Druml and Cichna-Markl 2014; Anonymous 2017).

Real Time-PCR (Quantitative PCR) yöntemi, DNA ve RNA örneklerini kalitatif ve kantitatif olarak ölçmekte ve çok kısa sürede doğru sonuçların alınmasını sağlamaktadır. Ayrıca, çoğaltma ve görüntüleme işlemi için ayrı işlemlerin yapılmaması da kontaminasyon riskini düşürmektedir (Pestana *et al.* 2010; Bekçi 2016). Aşağıda ön denemelerimizde elde ettiğimiz bir Real Time-PCR amplifikasyon eğrisi görülmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Real Time-PCR yöntemi ile yapılan bir analizden elde edilen amplifikasyon eğrisi

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sirke, yüzyıllardan beri insanoğlunun dikkatini çekmiş ve çeşitli hammaddelerden üretilip farklı amaçlarla kullanılmıştır. Sirkeye olan bu ilgi günümüzde de yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bundan dolayı, son yıllarda sirkenin üretimi ve özelliklerini konu alan yurtiçi ve yurtdışı orjinli birçok çalışma yapılmıştır.

Ülkemizde üzüm sirkeleri üzerinde yapılan analiz ve mevzuata uygunluğun konu edildiği bir çalışmada 12 farklı sirke örneği yoğunluk, alkol, kuru madde, indirgen şeker, toplam asit, uçar asit, pH, kül, toplam SO₂, asetil metil karbinol testi, kalıntı metal-metaloit gibi analizlere tabi tutulmuştur. İki örnek haricinde, diğerlerinin hem doğal yollarla üretildiği hem de mevzuata uygun olduğu bildirilmiştir (Akbaş 2008; Akbaş ve Cabaroğlu 2010). Yurdugül vd (2010) Bolu, Zonguldak ve Düzce'den toplanan böğürtlenlerden elde edilen böğürtlen sirkesinde mikrobiyal sayım, inhibitör bileşik aranması, pH tayini, elektriksel iletkenlik, şeker tayini ve Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) analizlerini yapmışlardır. Bu analizler sonucunda, asetik asit bakterileri tarafından üretilen herhangi bir inhibitör bileşiğe rastlanmadığını ve böğürtlen sirkelerinin mevzuata uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Sirkenin araştırılan özelliklerinden bir tanesi de biyoaktif bileşen ve antioksidan özelliklerinin incelenmesidir. Bu amaçla dut, kavun, karpuz, vişne gibi farklı kaynaklardan elde edilen sirke örnekleri kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarında genel olarak hammadde çeşitliliğine bağlı olarak antioksidan özelliğin değişebildiği ve işleme şeklinin de bunda önemli olduğu görülmektedir (Aykın vd 2012; Budak vd 2012a; Budak vd 2012b; Budak vd 2012c; Ertekin-Filiz vd 2012). Uluğbey Karasi üzümlerinden elde edilen sirkelerin antioksidan aktivitesi ve fenolik madde seviyesi üzerinde geleneksel yöntem ve endüstriyel derin kültür yönteminin etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada, sirke üretim yönteminin sirkenin fonksiyonel bileşenlerini etkilediği gözlenmiştir. Bulunan sonuçlara göre geleneksel yöntemle elde edilen sirkelerin antioksidan aktivitesi ve fenolik madde seviyesi endüstriyel yöntemle elde edilenlere göre daha yüksek çıkmıştır. Ayrıca her iki yöntemle elde edilen sirkelerde de galik asit,

kateşin, epikateşin, klorojenik asit, kafeik asit, sirinik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit tespit edilmiştir. Ancak geleneksel yöntemle elde edilen sirkelerde klorojenik ve sirinik asit içeriğinin daha yüksek, endüstriyel yöntemle elde edilen sirkelerde ise kateşin içeriğinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Budak and Guzel-Seydim 2010; Budak ve Güzel-Seydim 2010).

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 20 adet ev yapımı sirke antioksidan, antimikrobiyal, mineral madde ve uçucu profilleri ile mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özellikleri açısından 5 adet endüstriyel sirke ile karşılaştırılmıştır. Endüstriyel sirkelerin yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği, geleneksel sirkelerden ise sadece üç tanesinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Geleneksel sirkelerin genellikle mikrobiyal florasının çeşitli olduğu, endüstriyel sirkelerin ise zayıf bir floraya sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca geleneksel sirke örneklerinde en zengin uçucu bileşik olarak α -terpineol ve etil asetat bulunmuş, fenetil alkol ise tüm sirkelerde ortak uçucu bileşik olarak tespit edilmiştir. Sirkede en çok bulunan mineraller ise Na, K ve Ca olarak bildirilmiştir (Ozturk *et al.* 2015).

Alak (2015) ülkemizin çeşitli yerlerinden (İstanbul, Muğla) ve yurtdışından (İtalya) aldığı bal sirkelerine renk, kuru madde, kül, serbest asitlik, pH, alkol, yoğunluk, antioksidant içeriği, toplam fenol içeriği ve organik asit analizleri yaparak fiziksel ve kimyasal özelliklerini karşılaştırmıştır. Bu sirkelerin renk değerleri L 0,58-33,00, a 0,17-15,76, b 2,91-28,35; kül miktarı 0,11-2,72 g/L; kuru madde 1,23-5,92 g/L; toplam asitlik değerleri (asetik asit cinsinden) 7,80-46,20 g/L; pH değerleri 2,19-3,35; yoğunluk 1,00-1,16 g/cm³; toplam fenol içerikleri 105,18-890,27 mg GAE/kg kuru ağırlık; antioksidant miktarı 233,01-1431,01 mg trolox/kg kuru ağırlık (DPPH); organik asit içeriği, tartarik asit, malik asit, sitrik asit, süksinik asit, asetik asit için sırasıyla; 183,80-603,55, 106,32-534,81, 305,25-1852,02, 1248,91-48624,69 ve 11010,34-39199,39 mg/kg değerleri tespit edilmiştir.

Sirkelerde biyojen amin miktarı ve çeşitliliği bir diğer araştırma konusudur. Ordóñez *et al.* (2013) balzamik, farklı şarap ve meyve sirkeleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında

23,35-1445,20 µg/L seviyelerinde değişen miktarda biyojen amin tespit etmişlerdir. Putresinin, örneklerin genelinde en yüksek seviyede belirlenen biyojen amin olduğunu bildirmişlerdir.

Sirkelerde bulunan uçucu bileşiklerin gaz kromatografisi ile belirlenmesinde, sirkenin asit içeriğinin kolona zarar vermesinden dolayı sirkeler analiz öncesinde nötralizasyon işlemine tabi tutulmaktadırlar. Yapılan bu nötralizasyon işlemi ile sirkede bulunan uçucu bileşiklerde kayıp olup olmadığı belirlenmek istenmiş, bu amaçla belli oranlarda uçucu bileşikler içeren bir adet sentetik sirke çözeltisi ve iki adet şeri sirkesi nötrale edilmeden önce gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, nötrale edilen sentetik sirke çözeltisi ve şeri sirkelerinde asetaldehit, metil asetat, etil asetat ile izoamil asetatta %50'den fazla kayıplar tespit edilmiştir (Morales and Troncoso 2003).

Brezilya sirkelerinde kadmiyum içeriğinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, elektrotermal atomik absorpsiyon spektrometresi kullanılarak sirke içerisindeki kadmiyum tayini için iki örnek hazırlama yöntemi karşılaştırılmıştır. Brezilya'nın Salvador şehrinden alınan 6 sirke örneğinde, direk yöntem ve soğuk parmak yöntemi uygulanmış ve elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Junior *et al.* 2014).

Sirkelerde varlığı araştırılan bir başka bileşik ise, oda sıcaklığında, etanol ve azot içeren bileşikler arasında meydana gelen reaksiyon sonucunda oluşan, genotoksik ve kanserojenik karakterdeki etil karbamattır. Bu bileşiğin belirlenmesi amacıyla 5 farklı çeşitteki 14 adet sirkede, bir katı faz ekstraksiyon yöntemi olan Isolute ENV kullanılmıştır. Analiz edilen numunelerden sadece 5 tanesinin etil karbamat miktarı 6,73 g/L ve 56,40 g/L arasında değiştiği, diğer örneklerde ise etil karbamat seviyelerinin kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Ubeda *et al.* 2012).

Ananas meyvesinin işlenmesi veya tüketilmesi sırasında atılan ananas kabukları ve çekirdeklerinin değerlendirilmesi amacıyla ananas şarabı ve sirke üretimi yapılmış ve bu

örneklerde metabolit profili ile uçucu bileşikler araştırılmıştır. Fiziksel ve enzimatik muamelelerle ananas atıkları sakkarize edildikten sonra, elde edilen substrat *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak 25°C’de aerobik şartlarda 7-10 gün fermentasyona bırakılmış ve fermentasyon %7’lik alkol verimi ile sonuçlanmıştır. Daha sonra, *Acetobacter aceti* kullanılarak, alkollü sıvıdan 32°C’de 30 gün sonunda %5 düzeyinde asetik asit elde edilmiştir. Asetifikasyonun başlangıcında ve bitiminde GC-MS ve UHPLC-QTOF-MS ile yapılan analizler sonucunda L-lisin, mellein ve gallik asitin sirkede şaraba göre daha konsantre olduğu, daha yüksek alkoller, aldehitler ve ketonların sirkenin nihai aromasını karakterize ettiği, istenmeyen tatların da başlangıçtaki şaraba göre belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Roda *et al.* 2017).

Sirke üretim kalıntılarını değerlendirmek isteyen Wang *et al.* (2010), sorgum ve mısır sirkesi kalıntıları üzerinde çalışmışlar ve *Aspergillus ficuum*’u kullanarak bu kalıntılardan fitaz enzimini üretmek istemişlerdir. Test edilen fermentasyon koşulları aralığında, sorgum sirke kalıntıları ile maksimum fitaz üretiminin, mısır sirke kalıntıları ile maksimum fitaz üretimine göre 0,34 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca $1,2 \times 10^7$ kob/ml’lik inokulum, %55 başlangıç nemi ve 48 saatlik bir inkübasyon süresi ile ortama herhangi bir substrat eklenmeden mısır sirke kalıntıları kullanılarak optimum düzeyde fitaz üretimi sağlanabildiğini de bildirilmişlerdir.

Kefir taneleri kullanılarak elma sirkesinin üretildiği bir çalışmada, kefir taneleri elma sırası içerisine inoküle edilmiş ve fermentasyon süreci Bio Speckle Lazer ile takip edilmiştir. Sirke ve kefirden gelen mikroflora, MALDI-TOF MS tekniği kullanılarak araştırılmış olup, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter pasteurianus* ve *Acetobacter syzygii* türlerinin bu teknikle tanıları gerçekleştirilmiştir. Kefir tanelerinin etanol ve asetik asit üretmek için elmayı substrat olarak kullanabildiği, ayrıca asetat, uçucu alkoller ile aldehitlerin de üretilbildiği gözlenmiştir. Kefir sirkesinin asetik asit veriminin %79, asetik asit konsantrasyonunun 41g/L^{-1} olduğu ve Brezilya sirke standartlarına uyduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan duyusal analizlerde kefir sirkesinin kabul gördüğü de rapor edilmiştir (Viana *et al.* 2017). Özdemir (2012) kefir tanesi mikroflorasında AAB’lerini

geliştirerek, bu bakterilerin tane biyokütle artışına ve ekzopolisakkarit (EPS) üretimine katkısını belirlemek istemiştir. AAB'lerini bulunduran kefir tanelerinden elde edilen kefirin mikrobiyal, kimyasal, fiziksel ve duyuşsal özellikleri üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla, *Gluconacetobacter* cinsi asetik asit bakterilerini kullanılmış ve tanenin doğal mikroflorasını olumsuz etkilemeksizin bu bakterilerin taneye yerleştirilmesi sağlanmıştır. Yapılan bu çalışma ile EPS üretiminde ve biyokütlede artış olduğu, üretilen ürünün görünüş-tekstür, koku ve tat bakımından normal kefirde daha çok beğenildiği rapor edilmiştir. AAB'leri ile üretilen kefir örneğinin pH değeri 4,68; laktik asit değeri 1,53; %kuru madde değeri %12,18; %kül miktarı %1,26 olarak bulunmuştur. EPS içeriği ile viskozite değerleri ise sırasıyla normal kefirde 59,07 mg/L ve 195,4 mPas; AAB'leri ile üretilen kefirde ise sırasıyla 98,62 mg/L ve 330,9 mPas olarak bildirilmiştir.

Sirkenin fermentasyon kalitesini artırmak amacıyla asetik asit bakterileri için elverişli besin maddeleri ortama eklenerek asetik asit verimi ölçülmüştür. Yapılan denemede, *Acetobacter pasteurianus* için temel besin gereksinimi araştırılmış, sirke kompozisyonunu optimize etmek için aspartat, glutamat, prolin ve triptofanın ayrıntılı olarak ele alınması gerektiği görülmüştür. Nihai konsantrasyon 0,02 g/L, 0,03 g/L, 0,01 g/L ve 0,005 g/L olacak şekilde prolin, glutamat, aspartat ve triptofan eş zamanlı besleme stratejisiyle elma şirasına eklenmiştir. Sonuçlar normal fermentasyon ile kıyaslandığında, asetik asit veriminin %93,3'e ulaştığı ve çoğu uçucu aroma bileşiklerinin konsantrasyonunun da arttığı tespit edilmiştir (Qi *et al.* 2017).

Casale *et al.* (2006) sirkenin olgunlaşma sürecinde ve depolama sırasında meydana gelen değişiklikleri takip etmek amacıyla 6 farklı çeşitteki 95 adet sirke üzerinde yaptıkları denemede, bazı kimyasal metotlarda kombine edilen yakın kızıl ötesi spektrometreyi kullanmışlardır. Yapılan denemede, her sirke örneğinin spektrumu iki kez ölçülmüştür. İlk ölçüm taze sirke şişesinin kapağı açılır açılmaz yapılmış ve ardından sirkeler depolanmıştır. İkinci ölçüm ise 8-20 ay gibi değişen sürelerde 4°C'de gerçekleştirilen depolama işleminden sonra yapılmıştır. Ölçüm yapılan her iki sirke grubu birbiriyle kıyaslandığında, örneklerde ciddi bir değişim olmadığı rapor edilmiştir.

Sirkenin salata bileşenlerinin dezenfeksiyonunda kullanım imkanlarının araştırıldığı bir çalışmada Erzurum piyasasından temin edilen havuç, salatalık ve marul örnekleri *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* ile kontamine edilmiş, ardından da %3 sirke çözeltisinde 0, 5, 15 ve 30 dakika bekletilerek dekontaminasyon etkinliği tespit edilmiştir. Yapılan bu denemede, iki mikroorganizma sayısında da en az 1 log birimlik düşüş gözlenmiş, dekontaminasyonun sirke konsantrasyonu ve muamele süresine bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmayla, %3 gibi düşük bir sirke konsantrasyonunun salata dezenfeksiyonunda etkili olduğu ortaya konmuştur (Elhan 2014). Bir başka çalışmada, çiğ tüketilen farklı sebze ürünlerine, önemli bir patojen olan *Salmonella* Typhimurium inokule edilmiş, daha sonra bu sebzeler doğal inhibitör etki gösteren limon suyu, sirke ve limon suyu-sirke karışımları (1:1) ile yıkanmıştır. Denemeler sonucunda bu doğal inhibitör maddelerin *Salmonella* Typhimurium üzerinde sıfırıncı dakikadan itibaren antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu etkinin kullanılan sebzenin tipine, inokulum dozuna ve antimikrobiyal ajan içerisinde bekletme süresine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca roka ve havuç örneklerinde en etkili ajanın limon suyu-sirke karışımı, taze soğan örneklerinde ise en etkili ajanın sirke olduğu ortaya konmuştur (Şengün 2002). Bir diğer araştırmada ise, Kars ilinde 10 farklı marketten alınan 50 adet maydanoz demeti kekik suyu, sirke ve musluk suyu ile muamele edilerek maydanozlarda koliformların ve *Escherichia coli*'nin dekontaminasyonunu sağlayıp sağlamadıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda örnekleri musluk suyu ile yıkamanın yeterince güvenli olmadığı, sirke içerisinde 1 dakika bekletmenin koliformların ve *E. coli* popülasyonunun tamamını yok ettiği, kekik suyunda 1 dakika bekletmenin ise *E. coli* popülasyonunun tamamını yıkımlarken koliformların sayısının mevzuatta bildirilen değerlerin altına düştüğünü tespit etmişlerdir (Gülmez vd 2006).

Sirke üretim yönteminin sirke bileşimi üzerine etkisini araştıran Ünal (2007), Dimrit üzümünden elde edilen şarabı, geleneksel ve derin kültür yöntemlerini kullanarak sirkeye dönüştürmüş ve bu sirkelerin özelliklerini kimyasal ve duyuşsal analizler yaparak incelemiştir. Yapılan analizler sonucunda sirkelerin genel bileşimleri, aroma maddesi içerikleri ve duyuşsal özelliklerinin farklı olduklarını tespit etmiştir. Ayrıca, yavaş

yöntemle elde edilen sirkelerin asitlik ve aroma maddeleri içeriklerinin daha yüksek ve duyuşsal özelliklerinin de daha iyi olduğunu bildirmiştir.

Tesfaye *et al.* (2004) ahşap varillerde geleneksel olgunlaştırmaya bir alternatif olarak, iki aşamalı meşe fıçısı muamelesi ile farklı alkol konsantrasyonlarındaki (%0,1-%1-%2) şarap sirkelerine farklı olgunlaştırma deneyleri uygulamış; 90 gün boyunca toplam fenol içeriğı, kuru ekstrakt, ana uçucu bileşikler, uçucu olmayan bileşikler ve meşeden geçen uçucu bileşikleri ölçmüşlerdir. Çalışmalar sonucunda, 15 günlük yaşlanma sonrasında toplam fenol içeriğinin önemli derecede arttığını ve kuru ekstrenin sabit kaldığını gözlemlemiştir; iki aşamalı meşe fıçısı muamelesinin viski laktonlarını artırdığı, alkol içeriğı %1'den yüksek olan şaraplarda etil asetatın daha çok oluştuğunu ortaya koymuşlardır.

Asetik asit fermantasyonu geleneksel sirkenin lezzet kalitesi açısından önem arz etmektedir. Sirkenin lezzetinden sorumlu olan metabolitleri belirlemek amacıyla, eşsiz aroması ile Çin'in en ünlü sirkelerinden biri olan Zhenjiang sirkesi üzerinde yapılan bir çalışmada, sirke bileşiminde 3 organik asit, 7 amino asit ve 20 uçucu madde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, sirkede lezzet oluşumunda etkin mikroorganizmaların farklı metabolik rollerinin aydınlatılmasına yönelik olarak bir metabolik yolak belirlenmeye çalışılmıştır (Wu *et al.* 2017).

Kim *et al.* (2005), Kore'ye ait geleneksel hurma sirkesinden izole ettikleri *Acetobacter* sp. RKY4 suşunun asetik asit üretim yeteneğini tespit etmek amacıyla, bu bakterinin bulunduğu besiyeri ortamını optimize etmişlerdir. Bu mikroorganizma kullanılarak asetik asit üretimi için optimize edilen kültür ortamı; 40 g/L etanol, 10 g/L gliserol, 10 g/L mısır maserasyon sıvısı, 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 1,0 g/L $(NH_4) H_2PO_4$ içermektedir. 48 saatlik bir fermantasyon süresinden sonra bu bakterinin 47,1 g/L düzeyinde asetik asit ürettiğı belirlenmiştir.

Herhangi bir besiyeri ortamı ve mikroskoba ihtiyaç duyulmaksızın daha güvenilir, daha hassas, daha hızlı sonuçlar veren Real-Time PCR ve Nested-PCR yöntemleri

kullanılarak, asetik asit bakterilerinin varlığı ve sayılarının belirlenmek istendiği bir çalışmada, bu yöntemlerde kullanılmak üzere asetik asit bakterilerine spesifik primerler tercih edilmiş ve sonuçlar normal sayım yöntemleriyle kıyaslanmıştır. Her iki yöntemde de elde edilen sonuçların, normal sayım metotlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür (Gonzalez *et al.* 2005).

PCR temelli metodların hassasiyetini etkileyen en önemli etkenlerden birisi de elde edilecek kalıp DNA/genomik materyalin kalitesidir. Asetik asit bakterilerinden yüksek kaliteli DNA ekstraksiyonu için beş farklı yöntem (Wizard, CTAB, NucleoSpin, Thermal Shock, Mo-Bio) birbiriyle karşılaştırılmak istenmiş, bu amaçla *Acetobacter pasteurianus* ve *Gluconacetobacter hansenii* ile kontamine edilen iki farklı şarap ve iki farklı sirke örneği kullanılmıştır. Ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen DNA'nın kalitesi, klasik PCR yöntemi kullanılarak 16S rDNA geninin amplifiye edilmesi ile belirlenmiştir. DNA verimi ise Real-Time PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, DNA ekstraksiyonu için en iyi yöntemlerin CTAB (Setil metil amonyum bromid) ve NucleoSpin yöntemleri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, CTAB yönteminin, ticari kitlerden daha ucuz olduğu ancak daha çok zaman ve daha çok emek gerektirdiği de bildirilmiştir (Jara *et al.* 2008).

Asetifikasyonda rol oynayan sirke bakterilerini karakterize etmek, jeneratör yöntemi ile derin kültür yöntemini kalite ve mikrobiyal farklılıklar açısından kıyaslamak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Yapılan denemelerde, jeneratör yöntemi ile sirke üretiminde 5 günde %9,78 asit gücü ile sirke üretimi gerçekleştiği, geniş yüzey alanından dolayı sirkede asetik asit ve alkol kayıpları meydana geldiği, yeterince etkili bir yöntem olmadığı rapor edilmiştir. Derin kültür yönteminin ise çok etkili bir yöntem olduğu, 5 günde %12 ya da daha fazla oranda asit gücü ile sirke üretimi gerçekleştiği, kapalı bir sistem olduğu için asetik asit ve alkol kayıplarının daha az düzeyde meydana geldiği, jeneratör yönteminden daha kolay ve daha hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, yapılan gram boyama testlerinde, her iki yöntemde de sirke florasına hâkim bakterilerin gram negatif karakterde oldukları görülmüştür. Derin kültür yöntemi asetifikasyon bakterileri *Acetobacter* sp. ve *Acetobacter pasteurianus* olarak klasik PCR yöntemi ile

tanılanmış, jeneratör yöntemi asetifikasyon bakterileri için ise tanı yapılamamıştır (Tan 2003).

Geleneksel balzamik sirkede bulunan asetik asit bakterilerinin glikoza olan toleranslarını tespit etmek amacıyla, 14 farklı balzamik sirke örneğinden izole edilen 35 asetik asit bakterisi, değişik oranlardaki glikoz ortamlarında gelişmeye bırakılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda, ortamda %25 veya daha fazla oranlarda glikoz bulunmasının asetik asit bakterilerinin gelişimi üzerinde olumsuz etkiye neden olduğu görülmüştür. 16S-23S-5S rDNA PCR/RFLP yöntemi kullanılarak yapılan tanılama sonucunda balzamik sirke florasından izole edilen 35 suştan 32 tanesinin *Gluconacetobacter xylinus*, 2 tanesinin *Acetobacter pasteurianus*, 1 tanesinin ise *Acetobacter aceti* olduğu da tespit edilmiştir (Gullo *et al.* 2006).

Çin'in Zhenjiang sirkesi üzerinde yapılan farklı bir çalışmada, bu sirkeden asetik asit bakterileri izole edilmiş ve en yüksek asetik asit üretim kapasitesine sahip olanlar belirlenmiştir. İlk olarak yüksek oranda asetik asit üreten 6 adet bakteri tespit edilmiştir. Bu bakterilerin kahverengi çökelti meydana getirmedikleri ve asetat ayrıştırma kapasitesine sahip oldukları için asetik asit bakterisi oldukları bildirilmiş, ardından 16S rDNA sekans analizi ile tanıları yapılmıştır. Ayrıca, fizyolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda en yüksek asit verimine *Acetobacter aceti* ve *A. pasteurianus*'un sahip olduğu da rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2015). Çin'in başka bir ünlü sirkesi olan Shanxi tahıl sirkesinin mikroflorasını tespit etmek amacıyla, bu sirkeden 47 maya, 28 laktik asit bakterisi ve 58 asetik asit bakterisi izolasyonu yapılmıştır. Tanılama işlemi için fenotipik testler ve inter-delta/PCR, RFLP-PCR, ERIC/PCR analizi ile 16S rDNA ve 26S rDNA sekans analizleri gibi genotipik testlerden faydalanılmıştır. Alkolik fermantasyonda baskın maya türünün *S. cerevisiae*; baskın bakteri türlerinin ise *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Weissella confusa* olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *A. pasteurianus* baskın tür olmakla birlikte, *Acetobacter senegalensis*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter orientalis*, *Gluconobacter oxydans*'ın alkol fermantasyonun

başlangıcında ve asetik asit fermantasyonunda rol aldığı tespit edilmiştir (Wu *et al.* 2012). Bir başka çalışmada, Çin'in farklı bölgelerinde katı hal fermantasyonu ile üretilen tahıl sirkesi örneklerinden izole edilen 21 asetik asit bakterisi ERIC-PCR yöntemi kullanılarak karakterize edilmiş, katı hal fermantasyonu için en uygun suşun seçimi ile ilgili araştırma yapılmıştır. Katı hal fermantasyonu ile sirke üretiminde, seçilen suşların fenotipik ve genotipik değişkenliğe sahip olmaları gerektiği bilinmektedir. Yapılan analizler sonucunda, katı hal fermantasyonu için *A. pasteurianus* suşlarının tahıl sirkesi ile yakın ilişkili olduğu, *Gluconacetobacter europaeus* suşlarının ise aranan özelliklere sahip olmadığı görülmüştür (Wu *et al.* 2010).

Ülkemizde sirke bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu üzerine yapılan en detaylı çalışma 3 farklı yerel üreticiden temin edilen elma ve üzüm sirkeleri ile sirke analarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada toplam 87 tane izolasyon yapılmış olup; PCR-DGGE, (GTG)₅ rep-PCR, Tm/HRM analizi ve 16S rDNA ile ITS bölgesi dizi analizi yapılarak 14 farklı asetik asit bakterisi türü tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan kültür bağımsız metotlarla *Gluconoacetobacter hansenii*, *Gluconoacetobacter europaeus*, *Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter intermedius*/*Gluconoacetobacter rhaeticus*/*Gluconoacetobacter oboediens*, *Gluconacetobacter sp.*, *Acetobacter tropicalis*/*Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter nitrogenifigens*/*Acetobacter aceti*, *Acetobacter ghanensis*/*Acetobacter syzygii* türleri belirlenmiştir. Kültür bağımlı metotlarla ise sırasıyla *Acetobacter okinawensis*, *Gluconacetobacter europaeus* ve *Acetobacter indonesiensis* türleri baskın olmakla birlikte bunların dışında *Gluconacetobacter oboediens*, *Acetobacter krungethensis*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter persicus*, *Gluconacetobacter saccharivorans*, *Gluconacetobacter intermedius*, *Gluconacetobacter nataicola*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter okinawensis*, *Acetobacter ghanaensis* türlerinin varlığı gösterilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar tespit edilen bakterilerin sirke kalitesi ve teknolojisi üzerine etkilerinin ve starter kültür olarak kullanılma potansiyellerinin belirlenebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadırlar (Yetiman 2012; Yetiman and Kesmen 2015).

Bu alışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde geleneksel olarak üretimi yapılan 41 ev sirkesinin karışık mikroflorasında asit oluşumunda rol alan bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiş, Tm ve HRM analizleri yardımıyla n değerlendirilmeleri yapılarak çeşitlilikleri belirlenmiş ve sirkede asit oluşumunda etkili bakterilerin tanılanması amaçlanmıştır.



3. MATERYAL YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılmak üzere 41 adet geleneksel yöntemlerle üretilmiş sirke örnekleri temin edilmiştir. Çizelge 3.1’de bu sirke örneklerine ait genel bilgiler görülmektedir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan sirke örneklerine ait genel bilgiler

Örnek No	Sirke Çeşidi	Üretildiği Şehir
1	Elma Sirkesi	Adana
2	Elma Sirkesi	Adıyaman
3	Üzüm Sirkesi	Aydın
4	Şalgam Sirkesi	Adana
5	Elma Sirkesi	Malatya
6	Elma Sirkesi	Adana
7	Üzüm Sirkesi	Aydın
8	Üzüm Sirkesi	Aydın
9	Üzüm Sirkesi	Antalya
10	Elma Sirkesi	Erzurum
11	Üzüm Sirkesi	Antalya
12	Üzüm Pekmezi Sirkesi	Antalya
13	Üzüm Sirkesi	Tokat
14	Elma-Nar Sirkesi	Erzurum
15	Kırmızı Lahana Sirkesi	Erzurum
16	Üzüm Sirkesi	Antalya
17	Bal Sirkesi	Erzurum
18	İncir Sirkesi	Ankara
19	Siyah Üzüm Sirkesi	Ankara
20	Kayısı Sirkesi	Ankara
21	Limon Sirkesi	Ankara

Çizelge 3.1. (devam)

22	Kuşburnu Sirkesi	Erzurum
23	Üzüm Sirkesi	Rize
24	Elma Sirkesi	Antalya
25	Elma Sirkesi	Rize
26	Hurma Sirkesi	Niğde
27	Enginar Sirkesi	Niğde
28	Alıç Sirkesi	Niğde
29	Üzüm Sirkesi	Rize
30	Elma Sirkesi	İstanbul
31	Elma Sirkesi	İstanbul
32	Dut Sirkesi	İstanbul
33	Dut Sirkesi	İstanbul
34	Elma Sirkesi	Erzurum
35	Üzüm Sirkesi	Ankara
36	Elma Sirkesi	Ankara
37	Elma Sirkesi	Erzurum
38	Elma Sirkesi	Ankara
39	Üzüm Sirkesi	Erzurum
40	Armut sirkesi	Rize
41	Elma Sirkesi	Ankara

3.2. Yöntem

Bu çalışmayla, temin edilen sirke örneklerinin mikrobiyolojik karakterizasyonu amaçlanmıştır. Örneklerde toplam aerobik mezofilik bakteri, koliform bakteri, enterokok, maya ve küf sayımları, gram boyama işlemlerine ilaveten, kimyasal analizlerden pH ve titrasyon asitliği tayinleri de yapılmıştır.

3.2.1. Dilüsyonların hazırlanması

Sirke örneklerindeki hedef mikroorganizmaların sayımı ve izolasyon işlemlerinin gerçekleştirilebilmesi için seyreltme sıvısı olarak %0,85 NaCl ve %0,1 pepton içeren steril fizyolojik çözelti kullanılmış, desimal dilüsyon ardından ilgili petrilere mikrobiyolojik ekimler yapılmıştır (McLandsborough 2005).

3.2.2. Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı

Sirke örneklerindeki TAMB sayılarının belirlenmesi için yayma kültürel sayım yöntemi kullanılmış olup, Plate Count Agar (PCA, Merck) bulunan petri plaklarına uygun dilüsyonlardan 0,1'er ml aktarılmış ve petri plakları 30-32°C'de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra petri plaklarında tespit edilen sayı, dilüsyon faktörü ile çarpılarak örneklerin 1 mL'sinde taşıdıkları TAMB değerleri belirlenmiş ve sonuçlar log₁₀ kob (koloni oluşturan birim)/ml cinsinden ifade edilmiştir (Harrigan and McCance 1966; Halkman 1995; Anonim 2014a).

3.2.3. Koliform grubu bakteri sayımı

Uygun dilüsyonlardan petri plaklarına 1'er ml alındıktan sonra, üzerine 45°C sıcaklıktaki Violet Red Bile (VRB, Merck) agardan 15 ml dökülmüş ve homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Agar katılaştıktan sonra üzerine 5 ml daha VRB agar dökülmüş ve petri plakları 35-37°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda tipik koloniler sayılmış ve örneklerin mL'sinde yer alan koliform grubu bakteri sayısı tespit edilmiştir (Hartman and Hartman 1976; Mercuri and Cox 1979; Anonim 2014b;).

3.2.4. Maya ve küf sayımı

Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) sterilize edildikten sonra, bu besiyerine %10'luk steril laktik asit çözeltisi eklenip homojen olacak şekilde karıştırılarak asitlendirilmiş (pH 3,5) ve petri plaklarına dökülmüştür. Agar katılaştıktan sonra, uygun dilüsyonlardan ekim yapılmış ve petri plakları oda sıcaklığında (25°C) 5 gün

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerin mikroskopik ve makroskopik incelemeleri yapılmış ve dilüsyon faktörü dikkate alınarak sonuçlar belirlenmiştir (Harrigan and McCance 1966; McLandsborough 2005).

3.2.5. *Enterococcus*'ların sayımı

Bu amaçla, Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA, Merck) kullanılmış olup, uygun dilüsyonlardan petri plaklarına ekim yapıldıktan sonra 35-37°C'de 24 saatlik inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda gözlenen siyah ve haleli koloniler dikkate alınarak sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (Corry *et al.* 1995).

3.2.6. Muhtemel asetik asit bakterilerinin sayımı ve izolasyonu

Muhtemel asetik asit bakterilerinin sayım ve izolasyonu için en uygun besiyerini tespit etmek amacıyla; Glukoz-Yeast extract-Calsium carbonat (GYC) agar, Mannitol-Yeast extract-Pepton (MYP) agar ve Modifiye Acetobacter Besiyeri (MAB) olmak üzere üç farklı besiyerine, aynı çevre şartları sağlanarak aynı sirke örneklerinden mikrobiyolojik ekimler yapılmıştır. MAB, mevcut literatürler ışığında tarafımızca hazırlanmıştır. Ayrıca, maya ve küf gelişiminin engellenmesi amacıyla, kullanılan besiyerleri sterilize edildikten sonra Cycloheximide (100 ppm) homojen bir karışım olacak şekilde ortama eklenmiştir (Anonymous 2016; Yetiman 2012; Yetiman and Kesmen 2015; Zahoor *et al.* 2006). Yapılan denemeler sonucunda, daha kısa inkübasyon süresi sonunda, daha farklı koloni tiplerinin görülmesi nedeniyle muhtemel asetik asit bakterilerin sayım ve izolasyonu için en uygun besiyerinin GYC agar olduğuna karar verilmiştir.

Bu amaçla, GYC agar yukarıda belirtilen bileşime uygun olarak hazırlandıktan sonra petri plaklarına dökülmüştür. Agar katılaştıktan sonra, uygun dilüsyonlardan ekim yapılmış ve petri plakları 30°C'de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra, muhtemel asetik asit bakterilerinin kalsiyum karbonatı kullanarak besiyerinde sarı veya yeşil renkli koloniler meydana getirdikleri gözlenmiştir. Makroskopik incelemelere ilaveten, mikroskopik incelemeler de yapılarak muhtemel asetik asit

bakterileri ile birlikte mevcut diğer suşların da sayım ve izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir (Bartowsky *et al.* 2003; Zahoor *et al.* 2006; Sharafi *et al.* 2010).

Çizelge 1.2. Muhtemel AAB'lerinin izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin bileşimi

GYC Agar	MYP Agar	MAB
%5 D-Glukoz	%2,5 D-Mannitol	%0,5 Maya ekstraktı
%1 Maya ekstraktı (Yeast extract)	%0,5 Maya ekstraktı	%2 Glukoz
%1,5 CaCO ₃	%0,3 Pepton	%2 Etil alkol
%0,005 Bromcresol purple	%1,5 Agar agar	%0,025 MgSO ₄ .7H ₂ O
%1,5 Agar agar		%0,1 KH ₂ PO ₄
		%0,33 (NH ₄) ₂ SO ₄
		%1,5 Agar agar

Çalışma boyunca elde edilen izolatlar, izolasyon işlemi ardından daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda saklanmıştır. Bu amaçla, elde edilen genç kültürler %20 gliserol eşliğinde LB Broth (Luria Bertani) besiyeri içerisinde -80 °C'de depolanmıştır (Çetin 2006).

3.2.7. Gram boyama

Genellikle bir bakteri suşunun tanısında ilk adım, genç kültürün (16-24 saat) gram boyamasıdır. Gram boyama, gram-negatif ve gram-pozitif türler arasında ayırım yapılmasının yanı sıra, hücrelerin morfolojik özellikleri hakkında da bilgi veren bir metottur. Bu amaçla, -80°C'de depolanan izolatlar tekrar canlandırılarak boyama işlemi için kullanılmıştır (Gegersen 1978).

Gram boyama işlemi için; temiz bir lam üzerine bir damla distile su damlatılmış, öze yardımı ile genç kültürden az miktarda alınarak distile su içerisine süspansiyon edilmiş ve tüm lam yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Hazırlanan preparat, usulüne uygun bir şekilde ateşten geçirilerek fikse edilmiş, ardından kristal viyole ile boyanarak 1 dakika bekletilmiştir. Preparat yüzeyindeki boya, distile su yardımıyla giderildikten sonra lam

yüzeyine lugol çözeltisi yayılmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Lugol lam üzerinden akıtılarak, 10-15 saniye etil alkol ile ve ardından da su ile yıkanmıştır. Daha sonra preparat, sulu karbol füksin ile 30 saniye süreyle boyanmıştır. Su ile yıkama yapılarak boya giderilmiş ve preparat kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan bu preparat, ışık mikroskopunda (Olympus BX51T Scientific) incelenmiş ve oluşan renge göre değerlendirme yapılmıştır. Boyama sonucunda, mor renkli görülen bakteriler gram-pozitif, pembe renkli görülenler ise gram-negatif olarak değerlendirilmiştir (Sert 2011).

3.2.8. İzolatların genetik analizi

Öncelikle, sirke örneklerinden elde edilen ve -80°C 'de depolanan izolatlar tekrar canlandırılmıştır. Besiyerinde gelişim özellikleri kontrol edildikten sonra taze kültürlerde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatların tür ve suş seviyesinde farklılıkların belirlenmesi amacıyla, elde edilen bakteri DNA'ları GTG₅ fingerprinting ve V1-V3 bölgeleri için HRM analizlerine tabi tutulmuştur. Tür ve suş farklılıklarına göre gruplandırılan izolatlardan, birer tane temsili örnek sekans işlemi için değerlendirilmiştir.

3.2.8.a. DNA izolasyonu

-80°C 'deki depolama ortamında muhafaza edilen izolatların, moleküler analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla, ilgili besiyerine (GYC Agar) çizimleri yapılarak tekrar canlandırılmıştır. Canlandırılan bu kültürler steril saf suya alınmış ve McFarland Densitometre (DEN1, Biosan) kullanılarak McFarland 5 yoğunluğuna ayarlanmıştır.

Bakteri süspansiyonu 5000 g'de 3 dakika santrifüj işlemi ardından son yıkama ultra saf su ile olmak üzere fosfat tamponu ile 2 ve toplamda 3 defa yıkanmıştır. Hücre süspansiyonu içerisine 0,5 ml 6 M üre ve 0,1 ml %10 SDS ilave edilerek 37°C 'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler kaynama sıcaklığında 5 dakika tutulduktan sonra 8000 g'de 25°C 'de 10 dakika santrifüj edilmiş, işlem sonunda süpernatant atılmıştır. Pellet ise 0,1 ml 0,2 N NaOH eşliğinde 37°C 'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Nükleik asit harici hücresel parçaların ayrılması amacı ile 3000 g'de 25°C 'de 3 dakika santrifüj

işlemi gerçekleştirilmiştir. DNA saflaştırılması için 2,5 hacim absolute (mutlak) alkol ilave edilmiş ve -20°C’de 2 saat bekletilmiştir. Dondurucudan çıkarılan örnekler 13200 g’de, 4°C’de, 15 dakika santrifüj edilmiş ve %70’lik etanol ile yıkanmıştır. DNA pelleti kurutulduktan sonra 20 µl TE tamponunda tekrar süspanse edilerek PCR işleminde kullanılmak üzere saklanmıştır (Singh and Ramesh 2009).

DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, süspansiyonun µL’inde bulunan DNA konsantrasyonu ve PCR işlemi için gerekli olan süspansiyonun miktarını tespit etmek amacıyla nanodrop spektrofotometreden yararlanılmıştır (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek).

3.2.8.b. Real-Time PCR ile genotiplendirme

DNA izolasyonu yapılan bakterilerin Real-Time PCR ile genotiplendirmesinde, birbiriyle benzerlik gösteren suşların belirlenmesi için Tm değerinin tespiti ve HRM analizlerine başvurulmuştur.

Tm değerinin tespit edilmesinde, GTG₅ (5’-GTGGTGGTGGTGGTG-3’) primerinden faydalanılmıştır. GTG₅ primerine ilave olarak (1 µL), SYBR Green PCR Master Mix (12,5 µL) (RT2 SYBR Green qPCR Mastermix, Qiagen), Template DNA (2,5 µL), deiyonize su (9 µL) ortama eklenerek toplam hacim 25 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan örnekler, protokolde bazı modifikasyonlar yapılarak 95°C’de 10 dakika ilk denatürasyon; bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 95°C’de 20 saniye denatürasyon, 50°C’de 1 dakika bağlanma, 72°C’de 1 dakika 30 saniye uzama; 72°C’de 10 dakika son uzama olacak şekilde PCR işlemine tabi tutulmuştur. Bağlanma sıcaklığı olan 50°C, GTG₅ primerinin erime sıcaklığına uygun olacak şekilde seçilmiştir. PCR işlemi tamamlandıktan sonra her bakteriye ait Tm değeri verileri elde edilmiştir (Fukushima *et al.* 2003; Pornprasert *et al.* 2008; Pang *et al.* 2011; Şekerci 2012).

Elde edilen suşların HRM analizlerinde V1 ve V3 olmak üzere iki farklı bölge hedeflenmiş ve ilgili primerlere ait özellikler Çizelge 3.3’de gösterilmiştir. V1

(V1F+V1R) ve V3 (V3F+V3R) bölgeleri ayrı ayrı olarak analizlere tabi tutulmuş olup, her bir primerden 0,5'er µL alınmıştır. Ayrıca, ortama Eva Green PCR Master Mix (12,5 µL) (Type-it HRM PCR Kit, Qiagen), Template DNA (2,5 µL), deiyonize su (9 µL) eklenerek toplam hacim 25 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan örnekler, protokolde bazı modifikasyonlar yapılarak 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyon; bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 95°C'de 20 saniye denatürasyon, Tm sıcaklığında (V1 için 58°C, V3 için 57°C) 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika 30 saniye uzama; 72°C'de 10 dakika son uzama; 70-95°C'de HRM işlemi gerçekleştirilmek üzere PCR işlemine tabi tutulmuştur. Bağlanma sıcaklıkları, V1 ve V3 primerlerinin erime sıcaklıklarına uygun olacak şekilde seçilmiş ve birbirinden ayrı PCR işlemleri uygulanmıştır. HRM PCR işlemi tamamlanan örneklerle ait verilerle ilgili PCA (Principal Component Analysis) analizi ScreenClust software package programı kullanılarak yapılmıştır (Rotor-Gene ScreenClust HRM Software, QIAGEN, Hilden, Germany). Böylece elde edilen izolatlara ait 16S bölgelerinde (V1 ve V3) tek nükleotid farklılıklarını da (SNP; Single Nucleotide Polymorphisms) değerlendirilebilecek hassasiyete ulaşılmaya çalışılmıştır (Fukushima *et al.* 2003; Pornprasert *et al.* 2008; Pang *et al.* 2011; Şekerci 2012; Erdem *et al.* 2016).

Çizelge 3.3. İzolatların HRM değerlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Bölge	Primer Adı	Baz Sırası
V1	V1F	5'-GCCGCGTGCCTAATACATGC-3'
	V1R	5'-TTCCCCACGCGTTACTCACC-3'
V3	V3F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
	V3R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

3.2.8.c. 16S rDNA analizi ile tanı

İzolatların Real-Time PCR ile genotiplendirmesi tamamlandıktan sonra, tür ve suş farklılıklarına göre gruplandırılıp birer tane temsili örnek seçilmiştir. Her bir bakteri için spesifik özellikteki 16S rDNA gen bölgesine uygun bir primer seti (F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler, protokolde bazı modifikasyonlar yapılarak 95°C’de 2 dakika ilk denatürasyon; bunu takiben 35 döngü olacak şekilde 95°C’de 30 saniye denatürasyon, 58°C’de 20 saniye bağlanma, 72°C’de 30 saniye uzama; 72°C’de 5 dakika son uzama olacak şekilde PCR işlemine tabi tutulmuştur. Bağlanma sıcaklığı olan 58°C, 16SF-16SR primerlerinin erime sıcaklığına uygun olacak şekilde seçilmiştir (Fukushima *et al.* 2003; Pornprasert *et al.* 2008; Şekerci 2012; Yetiman 2012). Amplifikasyonu tamamlanan örnekler, Sentegen Biyoteknoloji’ye DNA dizi analizi için gönderilmiştir. Dizi analizi sonuçları ise NCBI (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması kullanılarak, analiz edilmiştir.

3.2.9. Sirke örneklerinin bazı kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Farklı şehirlerden temin edilen sirke örneklerinin mikrobiyal floraları üzerindeki etkiyi gözlemlemek amacıyla, sirkelerde pH ve asitlik tayini gibi bazı kimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.a. pH tayini

pH metrenin ilgili tampon çözeltilerle kalibrasyonu gerçekleştirildikten sonra, probun homojenize edilmiş örneklerle daldırılması ile sirke örneklerinin pH değerleri tespit edilmiştir (Cemeroğlu 2010).

3.2.9.b. Asitlik tayini

Bu amaçla, bir erlenmayere sirke örneğinden 10 ml aktarıldıktan sonra, üzerine birkaç damla %3’lük fenolftalein damlatılarak 0,1 N NaOH ile pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarı aşağıdaki formülle hesaplanarak sonuç %asit miktarı olarak (asetik asit cinsinden) belirlenmiştir (Cemeroğlu 2010).

$$\%Asitlik = \frac{(V).(f).(E).(100)}{M}$$

V: Harcanan 0,1 N NaOH miktarı, ml

f: Titrasyonda kullanılan 0,1 N NaOH'ın faktörü

E: 1 ml 0,1 N NaOH'ın eşdeğeri asit miktarı, g (asetik asit için 0.006)

M: Titre edilen örneğin gerçek miktarı, ml veya g (10 ml)

3.3. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler SPSS for Windows Release ver. 16.00 paket programı kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur (SPSS Inc. Chicago, IL. USA). İzolatların genetik verilerinin PCA (Principal Component Analysis) analizi ScreenClust software package programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Rotor-Gene ScreenClust HRM Software, QIAGEN, Hilden, Germany).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Farklı şehirlerden temin edilen 41 adet geleneksel sirke örneği üzerinde yukarıda belirtilen analizler gerçekleştirilmiştir. Mikrobiyal sayım işlemleri gerçekleştirilen örneklere ait TAMB, koliform, maya ve küf, enterokok, muhtemel asetik asit bakterileri için belirlenen değerler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Mikrobiyolojik ekim sonuçları (log kob/ml)

Numune	Tekerrür	TAMB	Maya-Küf	Koliform	Enterokok	M.A.A
1	1	5,20	5,33	<1	<1	1,95
	2	5,32	5,17	<1	<1	1,78
2	1	6,54	4,66	<1	<1	6,44
	2	6,48	4,54	<1	<1	6,30
3	1	2,22	2,64	<1	<1	2,18
	2	2,18	2,60	<1	<1	2,15
4	1	3,36	<1	<1	2,89	2,00
	2	3,41	<1	<1	2,91	2,74
5	1	2,94	5,11	<1	<1	2,60
	2	2,86	5,05	<1	<1	2,54
6	1	5,66	5,39	<1	<1	<1
	2	5,58	5,37	<1	<1	<1
7	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
8	1	1,00	<1	<1	<1	1,00
	2	1,00	<1	<1	<1	1,00
9	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1

Çizelge 4.1. (devam)

Numune	Tekerrür	TAMB	Maya-Küf	Koliform	Enterokok	M.A.A
10	1	<1	7,99	<1	<1	<1
	2	<1	7,95	<1	<1	<1
11	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
12	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
13	1	<1	<1	<1	<1	1,00
	2	<1	<1	<1	<1	1,00
14	1	6,00	7,12	<1	<1	1,00
	2	6,00	7,10	<1	<1	1,00
15	1	7,10	3,98	<1	3,46	5,99
	2	7,06	4,00	<1	3,78	5,91
16	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
17	1	6,00	6,13	<1	<1	4,00
	2	6,25	6,23	<1	<1	3,98
18	1	4,01	3,48	<1	<1	4,60
	2	4,00	2,48	<1	<1	4,52
19	1	4,48	2,48	<1	<1	4,85
	2	4,70	4,48	<1	<1	6,00
20	1	6,14	3,89	<1	3,50	6,17
	2	6,00	4,48	<1	3,46	6,13
21	1	6,32	6,90	<1	<1	<1
	2	6,28	6,78	<1	<1	<1
22	1	1,75	<1	<1	<1	1,80
	2	1,65	<1	<1	<1	1,76
23	1	3,23	3,70	<1	<1	<1
	2	3,72	3,64	<1	<1	<1

Çizelge 4.1. (devam)

Numune	Tekerrür	TAMB	Maya-Küf	Koliform	Enterokok	M.A.A
24	1	2,48	<1	<1	<1	3,25
	2	3,30	<1	<1	<1	3,18
25	1	7,45	5,60	<1	2,31	6,85
	2	7,39	5,68	<1	2,29	6,73
26	1	<1	<1	<1	<1	2,48
	2	<1	<1	<1	<1	2,23
27	1	<1	<1	<1	<1	2,41
	2	<1	<1	<1	<1	2,30
28	1	2,25	<1	<1	<1	4,73
	2	2,30	<1	<1	<1	4,67
29	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
30	1	4,59	5,18	<1	2,28	4,25
	2	4,30	6,00	<1	2,18	4,38
31	1	5,60	5,41	<1	<1	4,78
	2	6,00	5,45	<1	<1	4,64
32	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1	<1	<1
33	1	7,82	<1	2,15	3,56	7,78
	2	7,72	<1	2,25	3,52	7,70
34	1	<1	3,75	<1	<1	<1
	2	<1	3,81	<1	<1	<1
35	1	5,52	1,83	<1	3,44	4,50
	2	6,00	1,85	<1	3,38	4,58
36	1	7,38	3,36	<1	3,50	6,51
	2	7,30	3,24	<1	3,46	6,45
37	1	6,60	4,54	1,00	3,55	6,59
	2	6,30	4,95	1,00	3,47	6,47

Çizelge 4.1. (devam)

Numune	Tekerrür	TAMB	Maya-Küf	Koliform	Enterokok	M.A.A
38	1	6,89	5,56	2,40	3,48	5,80
	2	6,67	5,60	2,30	3,42	5,74
39	1	4,53	4,10	1,48	<1	<1
	2	4,48	3,90	1,42	<1	<1
40	1	6,58	5,78	<1	3,34	6,34
	2	7,46	5,64	<1	3,44	6,70
41	1	4,21	2,89	<1	3,48	2,04
	2	4,30	2,79	<1	3,46	1,96
Min.		<1	<1	<1	<1	<1
Max.		7,82	7,99	2,40	3,78	7,78
Ort.		3,53	2,87	0,17	0,95	2,79

TAMB: Toplam aerobik mezofilik bakteri, **MAA:** Muhtemel asetik asit bakterisi

Sonuçlar incelendiğinde, sirke örneklerine ait en yüksek TAMB değerinin 7,82 log kob/ml, en düşük değerin <1 log kob/ml olduğu tespit edilmiştir. Numune ortalamaları ise 3,53 log kob/ml seviyesinde gözlenmiştir. En yüksek TAMB değerine sahip olan 33 numaralı örneğin pH ve asitlik değerleri de incelendiğinde, ilgili örnekte asetik asit fermentasyonu gerçekleşse bile uzun depolama süresinden dolayı bazik karakterdeki moleküllerin oluşabildiği düşünülmektedir. 33 numaralı örnek iki yıllık dut sirkesi olup, yapılan moleküler analizde numuneden izole edilen suşların *Brevibacillus parabrevis* ve *Acinetobacter johnsonii* olduğu belirlenmiştir. Özellikle *Brevibacillus* cinsinin aminoasit ve organik asitlerden alkali moleküller ürettiği bilgisi, iki yıl gibi uzun bir süre depolanmış sirke örneğinde araştırma bulgularını desteklemektedir (Vos *et al.* 2009).

Maya ve küf sayılarının <1-7,99 log kob/ml arasında değiştiği, ortalama değerin ise 2,87 log kob/ml olduğu görülmektedir. En yüksek maya ve küf değerine sahip olan 10 numaralı örneğe ait verilere bakıldığında, mikroskopik incelemeler sırasında PCA ve GYC besiyerlerinde dahi maya gelişiminin olduğu yapılan ekim işlemleri sırasında

kaydedilmiştir. Ayrıca 3 ve 34 numaralı sirke örneklerinde maya ve küf sayıları ile ilgili kayıtlar incelendiğinde, 3 numaralı örnekte mayadan ziyade küf gelişimin olduğu; 34 numaralı örnekte ise sadece küf gelişiminin olduğu görülmüştür.

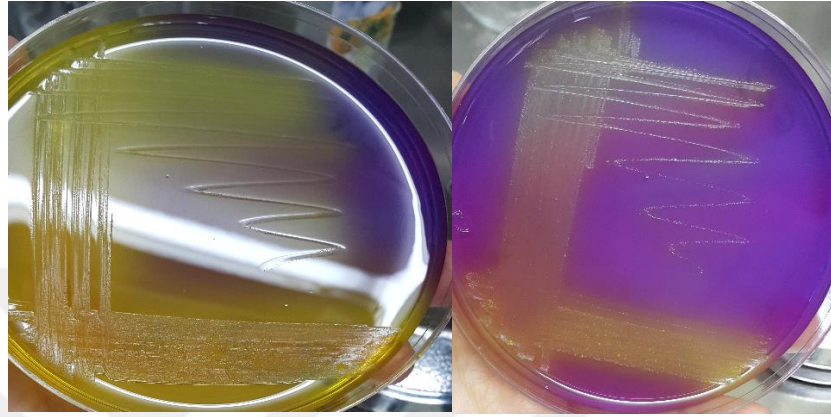
Örneklere ait koliform sayılarının $<1-2,40$ log kob/ml arasında, ortalama değerin ise 0,17 log kob/ml olduğu tespit edilmiştir. Koliform grubu bakteri ise dört örnekte tespit edilmiş olup diğer numunelerde belirlenememiştir. Bu durum, örneklerin genel olarak özellikle düşük pH'dan dolayı mikrobiyolojik açıdan güvenilir olduğu kanaatini oluşturmaktadır.

Sirke örneklerindeki enterokok sayılarına ait değerlerin en düşük <1 log kob/ml, en yüksek 3,78 log kob/ml, ortalama 0,95 log kob/ml olduğu tespit edilmiştir. Enterokoklar on iki sirke örneğinde gözlenmiş olup, en yüksek sayı 15 numaralı örnekte belirlenmiştir.

Muhtemel asetik asit bakterilerine ait değerlerin ise, $<1-7,78$ log kob/ml arasında ve ortalama değerin 2,79 log kob/ml olduğu görülmüştür. Ancak, en yüksek değerin görüldüğü 33 numaralı örneğe bakıldığı zaman, yukarıda da belirtildiği üzere asetik asit fermantasyonu gerçekleşse bile uzun süre depolama şartlarında bazik ortam oluşmasından dolayı, GYC besiyerinde çok farklı bakteri türlerinin geliştiği, izolatların tanımlanması sonucunda tespit edilmiştir. Ayrıca, GYC besiyerine ekimleri yapılan çoğu sirke örneğinden elde edilen izolatların, genel olarak sirke bakterilerinden farklı tipte bakteri cinslerini içermiş olduğu, bununla beraber ürünlerin asitlik değerleri de hesaba katıldığında, esasında geleneksel sirke üretiminde problemler olduğu görülmektedir. Fakat, geleneksel olarak üretilip ticari olarak satılan sirkelerde de *Brevibacillus* ve *Paenibacillus* cinslerine ait farklı bakteri suşlarının görülmesi sirke üretiminde bu bakterilerin floranın bir parçası olduğunu düşündürmektedir.

Geleneksel yöntemlerle üretilen 41 adet sirke örneği için mikrobiyolojik sayım işlemleri gerçekleştirildikten sonra, her örnekte mümkün olduğunca farklı koloni özellikleri dikkate alınarak izolasyon yapılmıştır. Toplamda 98 adet izolat elde edilmiş olup, bu

izolatlar -80°C’de muhafaza edilmiş ve gerekli analizler için tekrar canlandırılmışlardır. Şekil 4.1’de sirke örneklerinden elde edilen iki adet izolatın GYC besiyerindeki gelişimleri görülmektedir.



Şekil 4.1. 48 numaralı (*Acetobacter okinawensis*) ve 53 numaralı (*Bacillus* sp.) izolatlara ait çizimler

4.2. Kimyasal Analiz Sonuçları

Çalışmada, geleneksel yöntemlerle üretilen sirke örneklerinde pH ve asitlik tayinleri yapılarak sirkelere ait bu özellikler de tespit edilmeye çalışılmıştır. Örneklere ait veriler Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Sirke örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları

Numune	Tekerrür	pH	Asitlik (g/L)	Numune	Tekerrür	pH	Asitlik (g/L)
1	1	2,46	3,76	4	1	2,57	7,04
	2	2,47	3,76		2	2,57	7,06
2	1	2,57	4,70	5	1	2,41	7,05
	2	2,57	4,72		2	2,41	7,05
3	1	2,46	30,57	6	1	2,73	3,82
	2	2,46	30,60		2	2,72	3,84

Çizelge 4.2. (devam)

Numune	Tekerrür	pH	Asitlik (g/L)	Numune	Tekerrür	pH	Asitlik (g/L)
7	1	2,52	74,08	20	1	3,07	7,64
	2	2,53	74,10		2	3,06	7,66
8	1	2,57	55,86	21	1	2,31	7,06
	2	2,57	55,86		2	2,29	7,06
9	1	2,19	76,44	22	1	2,84	38,81
	2	2,19	76,45		2	2,84	38,80
10	1	3,02	11,76	23	1	2,99	3,52
	2	3,01	11,75		2	2,98	3,53
11	1	2,88	70,56	24	1	2,74	20,00
	2	2,89	70,58		2	2,74	20,00
12	1	2,69	82,32	25	1	2,73	5,30
	2	2,69	82,32		2	2,73	5,29
13	1	2,55	88,20	26	1	2,77	42,34
	2	2,57	88,22		2	2,77	42,33
14	1	2,90	14,70	27	1	2,81	42,34
	2	2,90	14,68		2	2,82	42,34
15	1	3,54	11,76	28	1	2,75	41,75
	2	3,55	11,75		2	2,75	41,76
16	1	2,71	70,56	29	1	2,74	20,00
	2	2,70	70,55		2	2,74	20,00
17	1	2,47	4,12	30	1	2,88	9,41
	2	2,45	4,10		2	2,89	9,40
18	1	2,96	15,58	31	1	2,56	10,00
	2	2,96	15,60		2	2,56	10,01
19	1	2,70	13,52	32	1	3,16	50,57
	2	2,71	13,52		2	3,15	50,57

Çizelge 4.2. (devam)

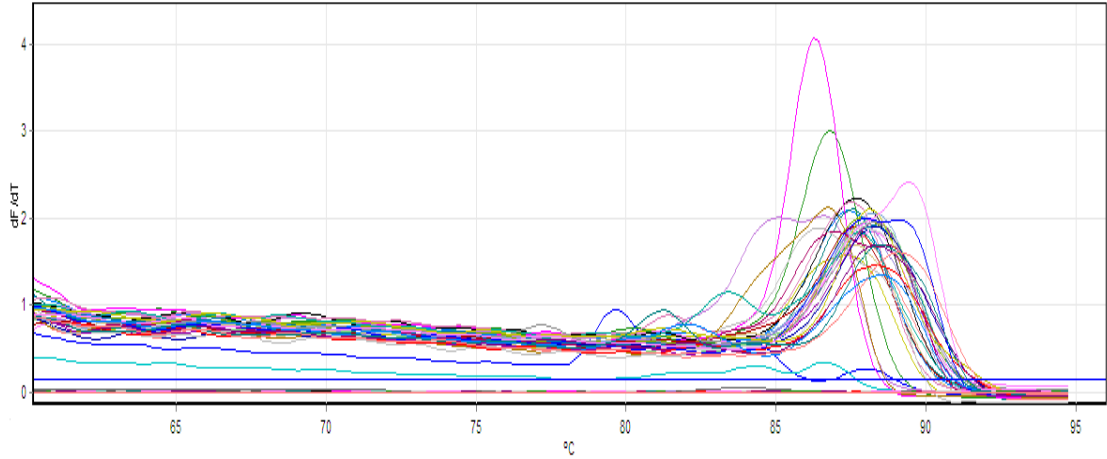
Numune	Tekerrür	pH	Asitlik (g/L)	Numune	Tekerrür	pH	Asitlik (g/L)
33	1	9,55	0,59	38	1	2,80	4,12
	2	9,57	0,60		2	2,79	4,13
34	1	4,12	2,35	39	1	2,26	9,41
	2	4,12	2,33		2	2,26	9,43
35	1	2,75	11,76	40	1	3,56	1,18
	2	2,74	11,78		2	3,57	1,18
36	1	2,87	5,29	41	1	2,83	11,17
	2	2,87	5,28		2	2,83	11,18
37	1	3,40	1,76	Min.	2,19		0,59
	2	3,40	1,75	Max.	9,57		88,22
				Ort.	2,96		24,22

Çizelge 4.2 incelendiğinde, sirke örneklerine ait en düşük pH değerinin 2,19, en yüksek pH değerinin 9,57 ve ortalama pH değerinin 2,96 düzeyinde olduğu görülmektedir. Asitlik düzeyi ise en düşük 0,59 g/L, en yüksek 88,22 g/L ve ortalama 24,22 g/L seviyesindedir. Aktan ve Yıldırım (2011), sirkenin pH değerinin içerdiği asit oranına bağlı olarak 2,0 ile 3,5 arasında değiştiğini ve meyve sirkelerinde asetik asit miktarının 41-99 g/L olduğunu bildirmiştir. Buna bağlı olarak, sirke örneklerinin pH değerlerinin genel olarak beklenen düzeyde olduğu görülse de, asitlik düzeylerinin genel olarak düşük olduğu ve sadece on bir örnekte istenen seviyede olduğu gözlenmektedir. pH düzeylerinin istenen seviyede olmasında, sirke yapımında kullanılan meyvelerin etkisinin olduğu düşünülmektedir. Asitlik düzeyinin düşük olması ise ürünlerde asetik asit fermentasyonun çok az gerçekleştiği veya gerçekleşmediği kanaatini güçlendirmektedir. Düşük asitlik düzeyinin olması ve buna bağlı olarak sirke örneklerinden elde edilen izolatların da farklı cinsteki bakterileri içermesi geleneksel sirke üretimi ile ilgili problemlerin olduğunu düşündürmektedir.

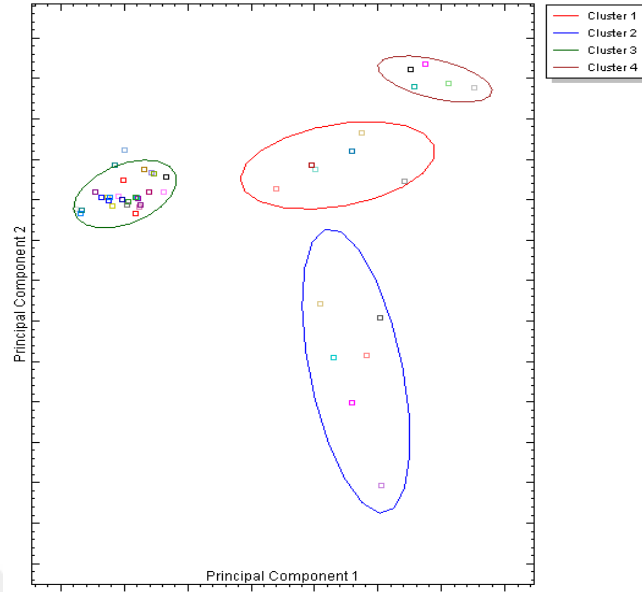
4.3. Mikroorganizmaların Tm ve HRM Analizleri ile Tanılanması

Sirke örneklerinden izole edilen 98 adet izolat için Tm ve HRM analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, izolatların Tm değeri eğrileri, PCA analizleri (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2), koloni ve gram boyama özellikleri dikkate alınarak tür ve suş farklılıklarına göre 10 grup oluşturulmuş ve her gruptan birer tane temsili örnek seçilmiştir. Çizelge 4.3’de her bir grup için, tanı sonucu ile beraber genetik benzerlik oranı, sekans ID numarası ve temsil ettiği toplam suş sayısı ilgili suş numaraları da verilerek gösterilmiştir.

Şekil 4.1 incelendiğinde ampikonlara ait erime aralığının 75-90°C arasında değiştiği gözlenmektedir. Farklı suşlara ait erime değerlerinin sayısal karşılığı ise ilgili program kullanıldığında detaylı olarak görülebilmektedir. Denemede kullanılan Rotor-Gene Q cihazının bir seferde yapabildiği maksimum numune sayısı 72 olduğundan, örnekler gruplara bölünerek çalışılmıştır. Çalışma sonunda 98 izolatın tümüne ait veriler değerlendirilmek üzere birleştirilmiş ve gruplandırılma çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.2. 21-62 numaralı izolatlara ait Tm değeri eğrileri



Şekil 4.3. 56-100 numaralı izolatlar a ait PCA analizi

Erime analizlerinde (melting), ampikonun erime sıcaklığı farklılıklarından yararlanılarak izolat farklılıkları da anlaşılmaktadır. Real-Time PCR kullanılarak yapılan bu analizler, cihazın numunelere ait floerasan ölçümü ile elde ettiği farklı verileri değerlendirme esasına dayanır. Ancak cihaz oldukça fazla sayıda veri ürettiğinden, bunların değerlendirilmesi özel programlar yardımıyla yapılmaktadır. Benzer şekilde burada da, farklı erime tabloları ve bunlara ait oldukça fazla Excel dosyaları var olmakla beraber, tüm bu verilerin detaylı olarak çalışmalarda verilmesi anlaşılabilirlik ve sadeliğin sağlanması açısından olanaksızdır. Şekil 4.2’de 56-100 numaralı izolatlar için elde edilen tüm veriler kullanılarak (Rotor-Gene ScreenClust HRM Software, QIAGEN, Hilden, Germany) oluşturulmuş PCA analizi görülmektedir.

Çizelge 4.3. GYC agar izolatlarının tanı sonuçları

Sıra	Genetik tanı sonucu	Genetik benzerlik oranı	Sekans ID	Temsil ettiği izolat sayısı	Temsil ettiği izolatların numaraları
1	<i>Bacillus</i> sp.	%100	JN819585.1	2	<u>8</u> ,9
2	<i>Bacillus</i> sp.	%99	HM566796.1	36	2,3,4,5,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26, <u>27</u> ,28,32,33,34,35,38,39,43,50,51,53,54
3	<i>Acetobacter okinawensis</i>	%99	AB665065.1	15	1, <u>29</u> ,30,31,36,40,41,42,45,46, 47,48,49,52,55
4	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	%98	KX832701.1	35	56,57,58,59,60,61,62,64,65,66,67,71,72,73, <u>74</u> ,76,77,79,80,81,82,83,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,99,100
5	<i>Paenibacillus</i> sp.	%99	KX025137.1	3	63, <u>68</u> ,75
6	<i>Paenibacillus</i> sp.	%99	FJ666319.1	2	69, <u>78</u>
7	<i>Lactobacillus casei</i>	%99	KF029502.1	2	97, <u>98</u>
8	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	%97	MF179553.1	1	<u>70</u>
9	<i>Bacillus</i> sp.	%99	KY243896.1	1	<u>84</u>
10	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	%99	KY606925.1	1	<u>85</u>

Altı çizili suşlar aynı fingerprint özelliği gösteren grubu temsilen tanıda kullanılan suşları göstermektedir.

Tanı sonuçları elde edilen mikroorganizmaların nükleik asit dizilimleri ve kromotogram görüntülerinin belli bir kısmı sekans ID numarası ile birlikte EK 1’de verilmiştir.

Real-Time PCR ile yapılan tanılama sonucunda 98 suşun DNA parmakizi değerlendirilmiş ve 7 farklı suş olduğu görülmüştür. Sirke örneklerinde hakim florayı *Bacillus* sp. (%39,8) ve *Brevibacillus parabrevis* (%35,7) suşlarının oluşturduğu; ikinci hakim floranın *Acetobacter okinawensis* (%15,3) asetik asit bakterilerinden olduğu tespit edilmiştir. Asetik asit bakterileri izolatlarının sekiz örnekten (%19,5) izole edildiği yapılan kayıtlarda gözlenmiştir. Tanıda tespit edilen *Lactobacillus casei* suşunun 37 numaralı sirke örneğinden izole edildiği belirlenmiştir. Ayrıca tanı sonucunda, *Paenibacillus* sp. ve sadece 33 numaralı sirke örneğinde bulunmak üzere *Acinetobacter johnsonii* suşları da tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında, tanısı yapılan izolatların büyük çoğunluğunun asetik asit bakterisi olması beklenirken, 98 izolattan 15 tanesinin *Acetobacter okinawensis* ve 1 tanesinin de 26 numaralı örnekten izole edilen *Acetobacter pasteurianus* olduğu görülmüştür. İzolasyonda gram pozitif bakterilere de yer verilmesi, ürünün mikrobiyotasının ortaya çıkarılması açısından da önemli olmuştur. Böylece iki önemli veri elde edilmiştir. Bunlardan birincisi, GYC gibi sadece renk değişimine göre sayımın yapıldığı besiyerlerinde direk olarak renkli kolonilerin (sarı ve yeşil) asetik asit bakterisi olarak değerlendirilmesinin yanlış olduğudur. İkincisi, özellikle ev tipi geleneksel ürünlerde fermantasyon şartlarının tümüyle kontrol edilememesinden dolayı meyve ve çevreden gelen farklı mikroorganizmaların da mikrobiyotanın bir parçası olduğu ve belki de asetik asit bakterilerinin gelişmelerini sınırlandırdığı gerçeğidir. Çizelge 4.4’de GYC agara ekimi yapılan sirke örneklerinden elde edilen izolatlar görülmektedir.

Çizelge 4.4. GYC agara ekimi yapılan sirke örneklerinden elde edilen izolatlar

Örnek No	Sirke Çeşidi	Bakteri İzolatı
1	Elma Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp.
2	Elma Sirkesi	<i>Acetobacter okinawensis</i> <i>Bacillus</i> sp.
3	Üzüm Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp.
4	Şalgam Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp.
5	Elma Sirkesi	<i>Acetobacter okinawensis</i> <i>Bacillus</i> sp.
6	Elma Sirkesi	-
7	Üzüm Sirkesi	-
8	Üzüm Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp.
9	Üzüm Sirkesi	-
10	Elma Sirkesi	-
11	Üzüm Sirkesi	-
12	Üzüm Pekmezi Sirkesi	-
13	Üzüm Sirkesi	<i>Acetobacter okinawensis</i> <i>Bacillus</i> sp.
14	Elma-Nar Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp.
15	Kırmızı Lahana Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp.
16	Üzüm Sirkesi	-
17	Bal Sirkesi	<i>Acetobacter okinawensis</i> <i>Bacillus</i> sp.
18	İncir Sirkesi	<i>Acetobacter okinawensis</i>
19	Siyah Üzüm Sirkesi	<i>Acetobacter okinawensis</i> <i>Bacillus</i> sp.
20	Kayısı Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp.
21	Limon Sirkesi	-
22	Kuşburnu Sirkesi	<i>Acetobacter okinawensis</i> <i>Brevibacillus parabrevis</i>

Çizelge 4.4. (devam)

23	Üzüm Sirkesi	-
24	Elma Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
25	Elma Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i> <i>Paenibacillus</i> sp.
26	Hurma Sirkesi	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Brevibacillus parabrevis</i> <i>Paenibacillus</i> sp.
27	Enginar Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i> <i>Paenibacillus</i> sp.
28	Alıç Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
29	Üzüm Sirkesi	-
30	Elma Sirkesi	<i>Bacillus</i> sp. <i>Brevibacillus parabrevis</i>
31	Elma Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
32	Dut Sirkesi	-
33	Dut Sirkesi	<i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Brevibacillus parabrevis</i>
34	Elma Sirkesi	-
35	Üzüm Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
36	Elma Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
37	Elma Sirkesi	<i>Lactobacillus casei</i>
38	Elma Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
39	Üzüm Sirkesi	-
40	Armut sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>
41	Elma Sirkesi	<i>Brevibacillus parabrevis</i>

- : izolat elde edilemedi

Örneklerden elde edilen izolatlarla bakıldığında sekiz adet örnekten (2, 5, 13, 17, 18, 19, 22, 26 numaralı örnekler) asetik asit bakterisinin izole edildiği görülmektedir. Bu örneklerin asitlik değerleri ve örneklerden izole edilen asetik asit bakterileri dikkate

alındığında; örneğin asitlik değerinin yüksek çıkması ile örnekte asetik asit bakterisinin bulunması arasında paralel bir ilişki kurulamamıştır. Çünkü düşük asit değerlerinin olduğu örneklerde bile asetik asit bakterilerinin izole edildiği (2, 5, 17, 18, 19); buna karşılık bazı yüksek asit değerlerinin olduğu örneklerde asetik asit bakterilerinin izole edilmediği (7, 8, 9, 11, 12, 16, 27, 28, 32) tespit edilmiştir. Yüksek oranda asit içeriğine sahip olan 7, 9, 11, 12, 16, 32 numaralı sirke örneklerinin mikrobiyolojik ekim sonuçlarına bakıldığında tüm besiyerlerinde <1 log kob/ml olması, sirke örneklerine fermantasyondan sonra ısıtma işlemi uygulandığı veya pH'yı düşürmek amacı ile dışarıdan sirke vb asit ilavesi yapıldığı ihtimalini güçlendirmektedir. Yüksek asetik asit içeriğine sahip olan 8, 27, 28 numaralı örneklerde ise *Bacillus* sp., *Brevibacillus parabrevis*, *Paenibacillus* sp. suşlarının baskın olması bu bakterilerin sporlu oluşları nedeni ile canlı kaldıklarını düşündürmektedir.

Bacillus cinsi bakteriler, *Bacillaceae* familyasına dahil olup, gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de vardır. Endospor oluşturlar. *Bacillus* cinsi içerisinde insanlar ve hayvanlar için patojen olan *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. cereus* türleri ve saprofit türler bulunur. (Anonim 2012; Anonim 2018a). *Brevibacillus* ve *Paenibacillus* cinslerinin aynı familya (*Paenibacillaceae*) içerisinde oldukları, toprak kökenli oldukları ve spor oluşturdıkları bildirilmektedir. *Brevibacillus* cinsi bakteriler çevrede çok yaygın olarak bulunan gram pozitif hücre duvarına sahip bakterilerdir. *Paenibacillus* cinsi bakteriler, çubuk şeklinde, gram pozitif veya gram değişken, aerobik veya fakültatif anaerobik bakterilerdir. (Vos *et al.* 2009; Panda *et al.* 2014; Grady *et al.* 2016; Saez-Nieto *et al.* 2017). *Acinetobacter* cinsi bakteriler ise topraklarda ve sulara yaygındırlar. Gram-negatif, kokobasil ve hareketsiz bakterilerdir (Anonim 2018b). *L. casei* gram pozitif, fakültatif heterofermantatif, fakültatif anaerob, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde bir bakteridir. Aside toleranslıdır. Çiğ ve fermente süt ürünlerinden, taze sebzelerden, bitkisel fermente ürünlerden, insanların ve diğer sıcakkanlıkların sindirim sisteminden, anne sütünden, hatta toprak ve göl gibi çeşitli habitatlardan yaygın olarak izole edilmiştir (Sömer vd 2012).

Ayrıca denemeler sırasında, sirke mikrobiyotasında yer alan ve PDA besiyerinden izole edilen 54 adet mayanın mikroskopik incelemeleri yapılmış ancak tanımlama işlemleri gerçekleştirilmemiştir. Maya izolatları ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere, %80 gliserol eşliğinde LB Broth (Luria Bertani) içerisinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.



5. SONUÇ

✓ Araştırmada, geleneksel yöntemlerle üretilmiş 41 adet sirke örneği temin edilmiş olup, örneklerle ait kimyasal ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Kimyasal analizlerden pH ve asitlik tayinleri yapılmıştır. Mikrobiyolojik analiz olarak, örneklerde toplam aerobik mezofilik bakteri, maya-küf, enterokok, koliform bakteri, muhtemel asetik asit bakterisi sayımları yapılmış ve farklı koloni özellikleri dikkate alınarak GYC besiyerinden (Glukoz-Yeast extract-Calsium karbonat) 98 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Elde edilen saf kültürler %20 gliserol eşliğinde LB Broth (Luria Bertani) besiyeri içerisinde -80°C’de depolanmıştır. İzolatlar Real-Time PCR tekniği kullanılarak Tm ve HRM analizleri yardımıyla sınıflandırılmış ve grubu temsil eden izolatların 16S rDNA bölgesi hedef alınarak tanıları gerçekleştirilmiştir.

✓ Yapılan denemeler sonucunda, sirke örneklerinin mikrobiyotasında bulunan mikroorganizma ortalamaları şu şekildedir: Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı 3,53 log kob/ml; maya-küf sayısı 2,87 log kob/ml; koliform bakteri sayısı 0,17 log kob/ml; enterokok sayısı 0,95 log kob/ml; muhtemel asetik asit bakterisi sayısı 2,79 log kob/ml’dir.

✓ Aktan ve Yıldırım (2011), sirkenin pH değerinin içerdiği asit oranına bağlı olarak 2,0 ile 3,5 arasında değiştiğini ve meyve sirkelerinde asetik asit miktarının 41-99 g/L olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla, sirke örneklerinin pH değerlerinin genel olarak beklenen düzeyde olduğu gözlenmiş, asitlik düzeylerinin ise sadece on bir örnekte istenen seviyede olduğu belirlenmiştir. pH düzeylerinin istenen seviyede olmasında, sirke yapımında kullanılan meyvelerin etkisinin olduğu düşünülmektedir. Asitlik düzeyinin düşük olması ise ürünlerde asetik asit fermentasyonunun çok az gerçekleştiği veya gerçekleşmediği kanaatini güçlendirmektedir.

✓ İzolasyonu yapılan 98 adet bakterinin koloni özellikleri, Tm ve HRM analizleri dikkate alınarak 10 grup oluşturulmuş ve elde edilen tanı sonuçlarına göre bu 10 grubun

baskın olarak sırasıyla; *Bacillus* sp., *Brevibacillus parabrevis*, *Acetobacter okinawensis*, *Paenibacillus* sp., *Lactobacillus casei*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acinetobacter johnsonii* olmak üzere 7 farklı suştan meydana geldiği gözlenmiştir. Vos *et al.* (2009), *Brevibacillus* ve *Paenibacillus* cinslerinin aynı familya (*Paenibacillaceae*) içerisinde olduklarını bildirmiştir. Ayrıca *Paenibacillus* ve *Brevibacillus* cinslerinin toprak kökenli oldukları ve spor oluşturdıkları da literatürde geçmektedir (Vos *et al.* 2009; Grady *et al.* 2016). Dolayısıyla, araştırdığımız sirke örneklerinde bu iki cinsin bulunması, sirke yapımında kullanılan meyve örneklerinden sirkeye bulaştıklarını ve spor oluşturarak asetik asit fermantasyonundan sonra da yaşamlarını devam ettirdikleri kanısını güçlendirmektedir. Grady *et al.* (2016), *Paenibacillus* cinsinin çeşitli antimikrobiyal peptidler ile bakteriyosinler ürettiğini ve böcek larvalarını öldürücü etkiye sahip olduğunu bildirmesi sirke florasında bu bakterilerin bulunmasının fayda sağladığını göstermektedir. Ancak, 33 numaralı örneğimizde görüldüğü gibi, iki yıl gibi uzun bir depolama sonucunda *Brevibacillus* cinsi bakterilerin ortamda bulunması durumunda, bu bakterinin aminoasit ve organik asitlerden alkali moleküller üretilip sirkenin pH değerinde yükselmeye neden olabilmesi de söz konusudur (Vos *et al.* 2009).

✓ Araştırmada kullandığımız sirke örneklerinde, hakim florayı *Bacillus* sp. (%39,8) ve *Brevibacillus parabrevis* (%35,7) suşlarının oluşturduğu; ikinci hakim floranın *Acetobacter okinawensis* (%15,3) asetik asit bakterisinden oluştuğu tespit edilmiştir. Asetik asit bakterilerinden *Acetobacter pasteurianus* ise, sadece 26 numaralı örnekte tespit edilmiştir. Sirke örneklerinden izole edilen asetik asit bakterisi sayısının daha yüksek sayılarda olması beklenirken, düşük sayılarda elde edilmesi ve sirkelerde asetik asit miktarlarının genel olarak düşük düzeylerde olması, ev tipi sirke yapımında bazı sorunlar olduğunu düşündürmektedir.

✓ İzolasyonda gram pozitif bakterilere de yer verilmiş, böylece ürünün mikrobiyotasının ortaya çıkarılmasında iki önemli veri elde edilmiştir. Bunlardan birincisi, GYC gibi sadece renk değişimine göre sayımın yapıldığı besiyerlerinde direk olarak renkli kolonilerin (sarı ve yeşil) asetik asit bakterisi olarak değerlendirilmesinin yanlış olduğudur. İkincisi, özellikle ev tipi geleneksel ürünlerde fermantasyon

şartlarının tümüyle kontrol edilememesinden dolayı meyve ve çevreden gelen farklı mikroorganizmaların da mikrobiyotanın bir parçası olduğu ve belki de asetik asit bakterilerinin gelişmelerini sınırlandırdığı gerçeğidir. Özellikle ev tipi geleneksel sirkelerde problemlerin görülmesinde, medyanın gerçek sirke yapımı ile ilgili yanlış bilgilendirmelerinin etkisinin olduğu düşünülmektedir. Çünkü, araştırma süresince sirke yapan bazı kişilerle temasa geçilmiş, bu kişiler sirke yapımını televizyon programlarından öğrendiklerini ve sirkeyi nasıl yaptıklarını anlatmışlardır. Sirke, düzenli olarak tüketildiğinde antimikrobiyal, antidiyabetik, antioksidatif, antiobezite ve antihipertansif gibi sağlığa yararlı etkiler göstermesi (Ho *et al.* 2016) sirkeye olan ilginin her geçen gün artmasına neden olmaktadır. Artan bu ilgiye karşılık verebilmek için, doğru bir sirke yapımı sağlanmalı, sirke üretimi üzerinde daha fazla çalışma yapılmalı ve geleneksel sirke üretimi standart bir seviyeye getirilerek endüstriyel boyuta taşınmalıdır.

✓ Sirke örneklerinden izole edilen bakterilerin tanısında kullanılan Real-Time PCR tekniği, klasik PCR yöntemi ile kıyaslandığında sağlık, malzeme ve zaman açısından da faydalar sağlamaktadır. Klasik PCR yönteminde, amplifikasyondan sonraki ürün agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra ultraviyole ışığı altında görüntülenmektedir. Agaroz jel içine eklenen Ethidium Bromide'in toksik karakterde olduğu bilinmektedir. Real Time-PCR tekniğinde ise, ortamda bulunan fluoresan karakterli boyalar veya probalar sayesinde amplifikasyonun erken safhalarından itibaren sonuç alınmakta ve değerlendirme yapılabilmektedir (Anonymous 2006; Mackay *et al.* 2007; Rodriguez-Lazaro and Hernandez 2013; Bekçi 2016). Bu kıyaslamalar yapıldığında, Real-Time PCR tekniğinin klasik PCR tekniğinden daha avantajlı olduğu görülmektedir.

✓ Geleneksel olarak sirke üretimini gerçekleştiren kişilere, sirke oluşumunun alkol ve asetik asit fermentasyonu olmak üzere iki aşamalı süreç sonucunda meydana geldiğini bilerek üretimlerini bu prosese göre gerçekleştirmeleri önerilmelidir. Kapalı ortamda alkol fermentasyonu gerçekleştikten sonra, asetik asit fermentasyonu için açıkta bekletilen alkollü sıvının yüzeyinde oluşan zarın dibe çökmesi ile sirke oluşumunun tamamlandığı anlaşılabılır. Ayrıca üretim sırasında dışarıdan herhangi bir

asit veya endüstriyel sirke müdahalesi yapılmaması sirke florasının korunması açısından önemli faydalar sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Achaerandio I., Güell C., Medina F., Raventos R.L., Lopez F., 2002. Vinegar Decolourization by Re-Activated Carbon. Food Science and Technology International, 8 (4), 239–242.
- Adams M.R. 1998. Vinegar. Microbiology of Fermented Foods, 2nd ed., Ed: B.J.B. Wood. Department of Bioscience and Biotechnology University of Strathclyde, Glasgow, UK, 1-45p.
- Akbaş M., 2008. Ülkemizde Üretilen Üzüm Sirkelerinin Bileşimleri ve Gıda Mevzuatına Uygunlukları Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, Türkiye.
- Akbaş M., Cabaroğlu T., 2010. Ülkemizde Üretilen Bazı Üzüm Sirkelerinin Bileşimleri ve Gıda Mevzuatına Uygunlukları Üzerine Bir Araştırma. Gıda, 35 (3), 183-188.
- Akman A., 1949. Şarap, Sirke ve Dayanıklı Şıra. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Sayı:11, 137s.
- Akman A., Yazıcıoğlu T., 1955. İhtimar Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 64 (29), 137s.
- Aktan N., Yıldırım H. (2011). Sirke Teknolojisi, Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye.
- Alak G.D., 2015. Bal ve Bal Sirkesinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye.
- Anonim, 2000. Proposed Draft Revised Regional Standard for Vinegar. CL 2000/18-EURO. Joint FAO/WHO Food Standards Programme-FAO Viale delle Terme di Caracalla 00100 Rome, Italy.
- Anonim, 2003. Sirke-Tarım Kökenli Sıvılardan Elde Edilen Ürün-Tarifler, Özellikler ve İşaretleme, Türk Standardı TS 1880 EN 13188, Türk Standartları Enstitüsü Ankara.
- Anonim, 2012. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri. Gıda Gündemi, <http://forum.gidagundemi.com/bacillus-cinsi-bakterilerin-genel-ozellikleri-t29565.html> (07.06.2018).
- Anonim, 2014a. Genel Kullanım. Merck Mikrobiyoloji El Kitabı (Hızlı Erişim), 3. Baskı, Ed: A.K. Halkman, Ö.E. Sağdaş. Ankara, Türkiye, 1-32, www.mikrobiyoloji.org (12.12.2017).
- Anonim, 2014b. Koliform Grup, *E. coli*, *E. coli* O157, Diğer *Enterobacteriaceae* Besiyerleri. Merck Mikrobiyoloji El Kitabı (Hızlı Erişim), 3. Baskı, Ed: A.K. Halkman, Ö.E. Sağdaş. Ankara, Türkiye, 33-76, www.mikrobiyoloji.org (12.12.2017).
- Anonim, 2018a. *Bacillus*. www.mikrobiyoloji.org (07.06.2018).
- Anonim, 2018b. Description of *Acinetobacter*. Encyclopedia of Life, http://eol.org/pages/97490/hierarchy_entries/53144275/details (07.06.2018).
- Anonymous, 2006. A Toxic Death for Ethidium Bromide. Laboratory News, <https://www.labnews.co.uk/features/a-toxic-death-for-ethidium-bromide-08-10-2006/> (23.01.2018).

- Anonymous, 2007. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR). Sequences, <https://genotyping.wordpress.com/2007/03/07/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-cok-guclu-bir-teknik/> (22.09.2017).
- Anonymous, 2014. Basics of Real-time PCR. Real-time PCR Handbook, 3rd ed., Thermo Fisher, Turkey.
- Anonymous, 2016. Acetobacter Medium Recipe. <http://www.thelabrat.com/protocols/AcetobacterMediumRecipe.shtml> (09.06.2016).
- Anonymous, 2017. High Resolution Melting (HRM). Thermo Fisher Scientific, Turkey, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-applications/genetic-variation-analysis-using-real-time/high-resolution-melting-hrm.html> (27.09.2017).
- Aykın E., Budak N.H., Güzel-Seydim Z.B., 2012. Sirke Anasının Biyoaktif Bileşen Özellikleri. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, P719, 542s.
- Bartowsky E.J., Henschke P.A., 2008. Acetic Acid Bacteria Spoilage of bottled Red Wine-A Review. International Journal of Food Microbiology, 125, 60-70.
- Bartowsky E.J., Xia D., Gibson R.L., Fleet G.H., Henschke P.A., 2003. Spoilage of Bottled Red Wine by Acetic Acid Bacteria. Letters in Applied Microbiology, 36, 307-314.
- Bekçi B., 2016. Quantitative Real-Time PCR (q-RT-PCR). Bilim Deryası, <http://bilimderyasi.com/fen-bilimleri/quantitative-real-time-pcr-q-rt-pcr/> (22.09.2017).
- Budak N.H., Aktaş T., Demir S., Seydim A.C., 2012b. Karpuz Sirkesinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, P269, 245s.
- Budak N.H., Aktaş T., Demir S., Seydim A.C., 2012c. Kavun Sirkesinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, P273, 249s.
- Budak N.H., Aykın E., Seydim A.C., Greene A.K., Guzel-Seydim Z.B., 2014. Functional Properties of Vinegar. Journal of Food Science, 79-5.
- Budak N.H., Ertekin-Filiz B., Seydim A.C., 2012a. Dut Sirkesinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, P254, 234s.
- Budak N.H., Guzel-Seydim Z.B., 2010. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Wine Vinegars Produced by Two Different Techniques. Journal of the Science of Food and Agriculture, Society of Chemical Industry, 90, 2021-2026.
- Budak N.H., Güzel-Seydim Z.B., 2010. Elma ve Üzümünden Üretilen Sirkelerin Bileşenleri ve Fonksiyonel Özellikleri Üzerine Araştırma. Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.
- Casale M., Saiz-Abajo M.J., Gonzalez-Saiz J.M., Pizarro C., Forina M., 2006. Study of the Aging and Oxidation Processes of Vinegar Samples from Different Origins During Storage by Near-Infrared Spectroscopy. Analytica Chimica Acta, 557, 360-366.
- Cemeroğlu B., 2010. Gıda Analizleri, 2. Baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 34.
- Corry J.E.L., Curtis G.D.W., Baird R.M., 1995. Culture Media for Food Microbiology, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 335p.

- Çetin B., 2006. Koruyucu Kültür ve Laktik Asit Uygulamalarının Tavuk etinde Raf Ömrü ve *Salmonella* Typhimurium Gelişimi ve Önemli Bazı Mikroorganizmaların İnhibisyonu Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.
- Çetin B., Çakmakçı S., Yıldız H., Bilginer H., Tarakçıoğlu F., 2017. Turşu Fermantasyonunda Kullanılabilecek Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi ve Probiyotik Turşu Üretimi için Uygun Suşların Seçimi, Proje Sonuç Raporu. Tübitak, Ankara.
- De Ory I., Romero L.E., Cantero D., 2004. Operation in Semi-Continuous with A Closed Pilot Plant Scale Acetifier for Vinegar Production. Journal of Food Engineering, 63 (1), 39-45.
- De Vero L., Giudici P., 2008. Genus-Specific Profile of Acetic Acid Bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. International Journal of Food Microbiology, 125, 96-101.
- Druml B., Cichna-Markl M., 2014. High Resolution Melting (HRM) Analysis of DNA- Its Role and Potential in Food Analysis. Food Chemistry, 158, 245-254.
- Elhan S., 2014. Farklı Sirke Çeşitleri ve Konsantrasyonlarının Salata Bileşenlerinin Dezenfeksiyonunda Kullanım İmkanlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.
- Ercolini D., 2004. PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies for Detection of Microbes in Food. Journal of Microbiological Methods, 56, 297-314.
- Erdem M., Kesmen Z., Özbekar E., Çetin B., Yetim H., 2016. Application of High-Resolution Melting Analysis for Differentiation of Spoilage Yeasts. Journal of Microbiology, 54(9), 618-625.
- Ertekin-Filiz B., Budak N.H., Seydim A.C., 2012. Vişne Sirkesi Üretim Aşamalarında Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, P293, 264s.
- Fukushima H., Tsunomori Y., Seki R., 2003. Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food-or Waterborne Pathogens in Stools. Journal of Clinical Microbiology, 41(11), 5134-5146.
- Garcia-Parrilla M.C., Gonzalez G.A., Heredia F.J., Troncoso A.M., 1997. Differentiation of Wine Vinegars Based on Phenolic Composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3487-3492.
- Garcia-Parrilla M.C., Torija M.J., Mas A., Cerezo A.B., Troncoso A.M., 2017. Vinegars and Other Fermented Condiments. Fermented Foods in Health and Disease Prevention, J. Frias, C.M. Villaluenga, E. Penas. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 577-592p.
- Gomez J. M., Cantero D., 1998. Kinetics of Substrate Consumption and Formation in Closed Acetic Fermentation Systems. Bioprocess Engineering, 18, 439-444.
- Gonzalez A., Guillamon J.M., Mas A., Poblet M., 2006. Application of Molecular Methods for Routine Identification of Acetic Acid Bacteria. International Journal of Food Microbiology, 108, 141-146.
- Gonzalez A., Hierro N., Poblet M., Mas A., Guillamon J.M., 2005. Enumeration and Detection of Acetic Acid Bacteria by Real-Time PCR and Nested PCR. Federation of European Microbiological Societies, 254, 123-128.
- Gonzalez A., Hierro N., Poblet M., Rozes N., Mas A., Guillamon J.M., 2004. Application of Molecular Methods for the Differentiation of Acetic Acid

- Bacteria in A Red Wine Fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 853-860.
- Gonzalez A., Mas A., 2011. Differentiation of Acetic Acid Bacteria Based on Sequence Analysis of 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 217-222.
- Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z.C., 2016. Current Knowledge and Perspectives of *Paenibacillus*: A Review. *Microbial Cell Factories*, 15, 203.
- Gregersen T., 1978. Rapid Method for Distinction of Gram-Negative from Gram-Positive Bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5, 123-127.
- Guillamon J.M., Mas A., 2011. Acetic Acid Bacteria. *Molecular Wine Microbiology*, A.V. Carrascosa, R. Munoz, R. Gonzalez, Academic Press, San Diego, USA, 227-256p.
- Gullo M., Caggia C., De Vero L., Giudici P., 2006. Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Balsamic Vinegar. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 209-212.
- Gülmez M., Oral N., Sezer Ç., Duman B., Vatansever L., 2006. Satış Yerlerinden Alınan Maydanoz Örneklerinin Kekik Suyu ve Sirke ile Dekontaminasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12 (1), 41-47.
- Halkman K., 1995. Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye.
- Harrigan W.F., McCance M.E., 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, London and New York.
- Hartman P.A., Hartman P.S., 1976. Coliform Analyses at 30°C. *Journal of Milk and Food Technology*, 39(11), 763-767.
- Ho C.W., Lazim A.M., Fazry S., Hussein Zaki U.K., Lim S.J., 2016. Varieties, Production, Composition and Health Benefits of Vinegars: A Review. *Food Chemistry*, 221, 1621-1630.
- Ilabaca C., Navarrete P., Mardones P., Romero J., Mas A., 2008. Application of Culture Culture-Independent Molecular Biology Based Methods to Evaluate Acetic Acid Bacteria Diversity During Vinegar Processing. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 245-249.
- Jara C., Mateo E., Guillamon J.M., Torija M.J., Mas A., 2008. Analysis Several of Methods for the Extraction of High Quality DNA From Acetic Acid Bacteria in Wine and Vinegar for Characterization by PCR-Based Methods. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 336-341.
- Junior M.M.S., Silva L.O.B., Leao D.J., Ferreira S.L.C., 2014. Analytical Strategies for Determination of Cadmium in Brazilian Vinegar Samples Using ET AAS. *Food Chemistry*, 160, 209-213.
- Kim J.N., Choo J.S., Wee Y.J., Yun J.S., Ryu H.W., 2005. Medium Optimization for Acetic Acid Production by a Persimmon Vinegar-Derived Bacterium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124.
- Mackay I.M., Mackay J.F., Nissen M.D., Sloots T.P., 2007. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries. *Real-Time PCR in Microbiology*, I.M. Mackay, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 1-40p.

- Mas A., Torija M.J., Garcia-Parrilla M.C., Troncoso A.M., 2014. Acetic Acid Bacteria and the Production and Quality of Wine Vinegar. *The Scientific World Journal*, 394671, 6p.
- McLandsborough L., 2005. *Food Microbiology Laboratory*. CRC Press, USA.
- Mercuri A.J., Cox N.A., 1979. Coliforms and Enterobacteriaceae Isolates from Selected Foods. *Journal of Food Protection*, 42(9), 712-714.
- Morales M.L., Troncoso A.M., 2003. Evaluation of Aroma Compounds in Wine Vinegars: Effect of Previous Neutralisation of Samples. *Food Science Technology International*, 9 (6), 0397-6.
- Nanda K., Taniguchi M., Ujike S., Ishihara N., Mori H., Ono H., Murooka Y., 2001. Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Acetic Acid Fermentation of Rice Vinegar (Komesu) and Unpolished Rice Vinegar (Kurosu) Produced in Japan. *Applied And Environmental Microbiology*, 67 (2), 986-990.
- Ordóñez J.L., Callejon R.M., Morales M.L., Garcia-Parrilla M.C., 2013. A Survey of Biogenic Amines in Vinegars. *Food Chemistry*, 141, 2713-2719.
- Ozturk I., Caliskan O., Tornuk F., Ozcan N., Yalcin H., Baslar M., Sagdic O., 2015. Antioxidant, Antimicrobial, Mineral, Volatile, Physicochemical and Microbiological Characteristics of Traditional Home-Made Turkish Vinegars. *Food Science and Technology*, 63, 144-151.
- Özdemir N., 2012. Asetik Asit Bakterilerinin Kefir Danesinde Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.
- Öztürk A., Özdemir Y., Göksel Z., 2009. Elma Sirkesi ve Teröpatik Etkileri. Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Gıda Teknolojisi Bölümü, Yalova, Türkiye.
- Panda A.K., Bisht S.S., DeMondal S., Kumar N.S., Gurusubramanian G., Panigrahi A.K., 2014. *Brevibacillus* as a Biological Tool: A Short Review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 623-639.
- Pang Y., Zhou Y., Wang S., Lu J., Lu B., He G., Wang L., Zhao Y., 2011. A novel Method Based on High Resolution Melting (HRM) Analysis for MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods* 86, 291-297.
- Papalexandratou Z., Cleenwerck I., Vos P., Vuyst L., 2009. (GTG)₅-PCR Reference Framework for Acetic Acid Bacteria. *Federation of European Microbiological Societies*, 301, 44-49.
- Perez R.F., Torres C., Sanz S., Larrea F.R., 2010. Strain Typing of Bacteria Responsible for Vinegar Production by the Submerged Elaboration Method. *Food Microbiology*, 27, 973-978.
- Pestana E.A., Belak S., Diallo A., Crowther J.R., Viljoen G.J., 2010. Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics-Real Time PCR Applications. Springer, Dordrecht, Holland.
- Pornprasert S., Phusua A., Suanta S., Saetung R., Sanguansermisri T., 2008. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian Type Using Real-Time Gap-PCR with SYBR Green1 and High Resolution Melting Analysis. *European Journal of Haematology*, 80, 510-514.
- Qi Z., Dong D., Yang H., Xia X., 2017. Improving Fermented Quality of Cider Vinegar Via Rational Nutrient Feeding Strategy. *Food Chemistry*, 224, 312-319.

- Roda A., Lucini L., Torchio F., Dordoni R., De Faveri D.M., Lambri M., 2017. Metabolite Profiling and Volatiles of Pineapple Wine and Vinegar Obtained from Pineapple Waste. *Food Chemistry*, 229, 734-742.
- Rodriguez-Lazaro D., Hernández M., 2010. Introduction to the Real-time Polymerase Chain Reaction. *Real-time PCR in Food Science*, D. Rodriguez-Lazaro, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 3-34.
- Saez-Nieto J.A., Medina-Pascual M.J., Carrasco G., Garrido N., Fernandez-Torres M.A., Villalon P., Valdezate S., 2017. *Paenibacillus* spp. Isolated from Human and Environmental Samples in Spain: Detection of 11 New Species. *f European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19, 19-27.
- Sert S., 2011. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Notları (Üçüncü Baskı). Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Yayınları No:138.
- Sharafi S.M., Rasooli I., Beheshti-Maal K., 2010. Isolation, Characterization and Optimization of Indigenous Acetic Acid Bacteria and Evaluation of Their Preservation Methods. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 38-45.
- Shishehbor F., Mansoori A., Shirani F., 2017. Vinegar Consumption Can Attenuate Postprandial Glucose and Insulin Responses; A Systematic Review And Meta-Analysis of Clinical Trials. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 127, I-9.
- Singh A.K., Ramesh A., 2009. Evaluation of A Facile Method of Template DNA Preparation for PCR-Based Detection and Typing of Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 26, 504-513.
- Somma M., Querci M., 2006. Polimeraz zincir Reaksiyonu (PCR). Genetically Modified Organisms, M.Querci, Jermini M., Eede G.V., European Commission, Luksemburg, 3-30.
- Sömer V.F., Akpınar D., Başığit-Kılıç G., 2012. *Lactobacillus casei*'nin Sağlık Üzerine Etkileri ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı. *Gıda*, 37(3), 165-172.
- Stasiak L., Błazejak S., 2009. Acetic Acid Bacteria-Perspectives of Application in Biotechnology-A Review. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*, 59 (1), 17-23.
- Sürücüoğlu M.S., Özçelik A.Ö., 2012. Divan-ü Lugat-it Türk'te Adı Geçen Yiyecek ve İçecekler. Türkiye 11. Gıda Kongresi (10-12 Ekim 2012), Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay.
- Şengün İ.Y., 2002. Bazı Sebzelere İnokule Edilen *Salmonella* Typhimurium' un Limon Suyu ve Sirke ile İnaktivasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.
- Tan S.C., 2005. Vinegar Fermentation. MS Thesis, University of Lousiana, Department of Food Science, Lafayette, USA.
- Tesfaye W., Morales M.L., Benitez B., Garcia-Parrilla M.C., Troncoso A.M., 2004. Evolution of Wine Vinegar Composition During Accelerated Aging with Oak Chips. *Analytica Chimica Acta*, 513, 239-245.
- Trcek J., Ramus J., Raspor P., 1997. Phenotypic Characterization and RAPD-PCR Profilling of *Acetobacter* sp. Isolated from Spirit Vinegar Production. *Food Technology and Biotechnology*, 5, 63-67.
- Türker İ., 1974. Fermantasyon Teknolojisi-Cilt I. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 553 (185), 156s.

- Ubeda C., Balsera C., Troncoso A.M., Callejon R.M., Morales M.L., 2012. Validation of An Analytical Method for the Determination of Ethyl Carbamate in Vinegars. *Talanta*, 89, 178-182.
- Ünal E., 2007. Dimrit Üzümünden Değişik Yöntemlerle Sirke Üretimi Üzerinde Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, Türkiye.
- Vegas C., Gonzalez A., Mateo E., Mas A., Poblet M., Torija M.J., 2013. Evaluation of Representativity of The Acetic Acid Bacteria Species Identified by Culture-Dependent Method During A Traditional Wine Vinegar Production. *Food Research International*, 51, 404-411.
- Viana R.O., Magalhaes-Guedesa K.T., Junior R.A.B., Diasc D.R., Schwan R.F., 2017. Fermentation Process for Production of Apple-Based Kefir Vinegar: Microbiological, Chemical and Sensory Analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 592-601.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W., 2009. Genus IV *Brevibacillus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Volume 3: The Firmicutes), Springer, Dordrecht, Holland.
- Waites M.J., Morgan N.L., Rockey J.S., Higon G., 2001. Industrial Processes and Products. *Industrial Microbiology: An Introduction.*, Blackwell Science Ltd., School of Applied Science, South Bank University, London, UK, 179-209p.
- Wang C.Y., Zhang J., Gui Z.Z., 2015. *Acetobacter* Bacteria are Found in Zhenjiang Vinegar Grains. *Genetics and Molecular Research*, 14 (2), 5054-5064.
- Wang Z., Dong X., Tong J., Wu Y., Zhang Q., 2010. Vinegar Production Residue as Substrates for Phytase Production by *Aspergillus Ficum*. *Sage*, 28, 165-168.
- Wu J.J., Gullo M., Chen F., Giudici P., 2010. Diversity of *Acetobacter pasteurianus* Strains Isolated from Solid-State Fermentation of Cereal Vinegars. *Current Microbiology*, 60, 280-286.
- Wu J.J., Ma Y.K., Zhang F.F., Chen F.S., 2012. Biodiversity of Yeasts, Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in the Fermentation of “Shanxi Aged Vinegar”, A Traditional Chinese Vinegar. *Food Microbiology*, 30, 289-297.
- Wu L.H., Lu Z.M., Zhang X.J., Wang Z.M., Yu Y.J., Shi J.S., Xu Z.H., 2017. Metagenomics Reveals Flavour Metabolic Network of Cereal Vinegar Microbiota. *Food Microbiology*, 62, 23-31.
- Yetiman A., 2012. Sirke Mikroflorasındaki Asetik Asit Bakterilerinin Moleküler Teknikler ile Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.
- Yetiman A., Kesmen Z., 2015. Identification of Acetic Acid Bacteria in Traditionally Produced Vinegar and Mother of Vinegar by Using Different Molecular Techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 9-16.
- Yurdugül S., Alpas H., Bozoğlu F., 2010. Bolu, Düzce Ve Zonguldak Ormanlarında Yetiştirilen Böğürtlenlerden Üretilen Böğürtlen Sirkesinin Bazı Rutin Gıda Analiz Yöntemleri İle İncelenmesi. III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 20-22 Mayıs 2010, Cilt:III, 1197-1200s.
- Zahoor T., Siddique F., Farooq U., 2006. Isolation and Characterization of Vinegar Culture (*Acetobacter Aceti*) from Indigenous Sources. *British Food Journal*, 108(6), 429-439.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Erzurum’da doğdu. İlköğrenimini tamamladıktan sonra orta öğrenimine Mecidiye Anadolu Lisesi’nde devam etmiştir. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’ne başlamış ve 2014 yılında dereceyle mezun olmuştur. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başlamıştır. Bir yıl boyunca İngilizce Hazırlık Eğitimi aldıktan sonra, 2015 yılında Gıda Mikrobiyolojisi alanında yüksek lisans eğitime devam etmiş ve 2018 yılında tamamlamıştır.