



**SİRKE ÜRETİMİNDE ETKİLİ OLAN
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU
VE DOĞAL PROBİYOTİK SİRKE ÜRETİMİNDE
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Hafsa KADİROĞLU

Doktora Tezi

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

2024

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**SİRKE ÜRETİMİNDE ETKİLİ OLAN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU
VE DOĞAL PROBİYOTİK SİRKE ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

(Isolation of Microorganisms Effective in Vinegar Production and Investigation of Their
Usability in The Production of Natural Probiotic Vinegar)

DOKTORA TEZİ

Hafsa KADİROĞLU

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Erzurum
Ocak, 2024

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

SİRKE ÜRETİMİNDE ETKİLİ OLAN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE
DOĞAL PROBİYOTİK SİRKE ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Prof. Dr. Bülent ÇETİN danışmanlığında, Hafsa KADİROĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 12/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Bülent ÇETİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Murat TOSUN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Zülal KESMEN <i>Erciyes Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Ebru ERDEMİR <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun / ... / tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından Lisans Üstü Tez Projeleri (LÜTP), YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ve Tübitak 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2022-10287 (BAP)

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.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Bülent ÇETİN danışmanlığında sunulan “Sirke üretiminde etkili olan mikroorganizmaların izolasyonu ve doğal probiyotik sirke üretiminde kullanılabilirliklerinin incelenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	7	30
Kuramsal Temeller	11	30
Materyal ve Metot	9	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	8	20
Sonuçlar	4	20
Tezin Geneli	10	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Hafsa KADIROĞLU	Prof. Dr. Bülent ÇETİN
12.1.2024	12.1.2024
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım, üzerimde emeği çok olan saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e,

Tezimin şekillenmesinde görüş ve önerilerinden faydalandığım Doktora Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN ve Sayın Prof. Dr. Murat TOSUN'a,

Çalışmalarım sırasında yardımlarıyla her anlamda yanımda olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Zeynep GÜRBÜZ'e,

Tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje no: FDK-2022-10287), YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ile maddi desteklerini sağlayan YÖK ve TÜBİTAK'a,

Tez sürecim boyunca göstermiş olduğu sabrı, fedakârlıkları ve özverileriyle her daim destekçim olan kıymetli eşim Öğr. Gör. Dr. Ahmet KADİROĞLU'na, zorlu ve yoğun süreçte desteklerini üzerimden hiç eksik etmeyen başta sevgili annem ve babam olmak üzere tüm aile fertlerime,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Hafsa KADİROĞLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SİRKE ÜRETİMİNDE ETKİLİ OLAN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU ve DOĞAL PROBİYOTİK SİRKE ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Hafsa KADİROĞLU

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Amaç: Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen 48 ev yapımı ve 13 ticari sirke örneğinden izole edilen asetik asit bakterileri ve mayaların, starter ve probiyotik kültür özelliklerinin tespit edilmesi, uygun starter ve probiyotik kültür özelliği gösteren izolatların seçilmesiyle doğal probiyotik sirke üretilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bölgeden temin edilen bal ve organik elmalarla sürdürülebilir tarım üretimine de katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Ev yapımı ve ticari sirke örneklerinden izole edilen asetik asit bakterilerinin starter kültür özellikleri (glukoz toleransı, etanol toleransı, asetik asit toleransı, asetik asit üretim hızları, farklı pH ve farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri); mayaların starter kültür özellikleri (farklı şeker konsantrasyonları, düşük pH değerleri ve farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri) incelenmiştir. Asetik asit bakterileri ve maya izolatlarının probiyotik kültür özellikleri (mide ortamına direnç, safra tuzuna tolerans, oto/ko-agregasyon kapasitesi, hidrofobisite, antibiyotik direnci, virülans faktör genlerin tespiti, safra tuzu hidrolaz aktivitesi, hemolitik aktivite, DNaz aktivitesi) tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre uygun starter ve probiyotik kültür özelliği gösteren izolatlar seçilerek doğal ürünlerle elmalı ballı probiyotik sirkeler üretilmiştir. Üretilen sirkelerin 120 günlük fermantasyon süresi boyunca belirli aralıklarla mikrobiyolojik özellikleri, pH, asitlik ve briks değerleri takip edilmiş, son ürünün antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir.

Bulgular: Temin edilen ev yapımı ve ticari sirke örneklerinin asitlik değerleri ve maya-küf sayılarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.01$). Sirke örneklerinden toplamda 176 adet muhtemel asetik asit bakterisi (AAB) izolatı elde edilmiş olup bu izolatların tanıları sonucunda 85 tanesinin AAB olduğu belirlenmiştir. Yine sirke örneklerinden toplamda 106 adet maya izolatı elde edilerek tanıları gerçekleştirilmiştir. Starter ve probiyotik kültür testleri gerçekleştirilen AAB ve maya izolatlarından; A49 kodlu AAB izolatı (*A. ghanensis*) ve B71 kodlu maya izolatının (*S. cerevisiae*) probiyotik sirke üretimi için uygun özelliklere sahip olduğu tespit edilerek elmalı ballı probiyotik sirkeler üretilmiştir. Üretimi tamamlanan elmalı ballı probiyotik sirkede 120. günde; asitlik düzeyinin %5 düzeyine ulaştığı, AAB sayısının %54'ünün korunabildiği ve maya-küf sayısının <2 log kob/ml seviyesine düştüğü belirlenmiştir.

Sonuç: Yapılan analizler sonucunda, asetik asit bakterilerinin de probiyotik kültür olmaya aday olabileceği ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerektiği görülmüştür. Ancak hedeflenen probiyotik sirke üretiminde, ürünün asitlik miktarı %5 düzeyine ulaştığında mikroorganizma sayısının düştüğü, dolayısıyla bir gıdanın probiyotik olması için gerekli olan probiyotik mikroorganizma sayılarının korunamadığı görülmüştür. Buna rağmen, %3,8 asitlik değerine ulaşan üründe probiyotik mikroorganizma sayısının 10^6 kob/ml değerini sağladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, ülkemiz standartları da dikkate alınarak probiyotik sirke üretiminin mümkün olabileceği ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerektiği mevcut çalışma ile ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sirke, asetik asit bakterisi, maya, starter kültür, probiyotik, izolasyon, tanılama, sirke üretimi, antimikrobiyal etki

Ocak 2024, 125 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

ISOLATION OF MICROORGANISMS EFFECTIVE IN VINEGAR PRODUCTION AND INVESTIGATION OF THEIR USABILITY IN THE PRODUCTION OF NATURAL PROBIOTIC VINEGAR

Hafsa KADİROĞLU

Supervisor: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Purpose: In this study, it was aimed to determine the starter and probiotic culture properties of acetic acid bacteria and yeasts isolated from 48 homemade and 13 commercial vinegar samples obtained from different provinces of Turkey, and to produce natural probiotic vinegar by selected isolates showing appropriate starter and probiotic culture properties. In addition, it is aimed to contribute to sustainable agricultural production with honey and organic apples supplied from the region.

Method: Starter culture properties of acetic acid bacteria (glucose tolerance, ethanol tolerance, acetic acid tolerance, acetic acid production rates, growth abilities at different pH and different temperature values) and starter culture properties of yeasts (growth abilities at different sugar concentrations, low pH values and different temperature values) isolated from traditional vinegar samples were examined. Probiotic culture characteristics of acetic acid bacteria and yeast isolates (resistance to gastric environment, bile salt tolerance, auto/co-aggregation capacity, hydrophobicity, antibiotic resistance, detection of virulence factor genes, bile salt hydrolase activity, hemolytic activity, DNase activity) were determined. According to the analysis results, isolates with suitable starter and probiotic culture properties were selected and probiotic vinegars (apple-honey) were produced with natural products. Microbiological properties, pH, acidity and brix values were monitored at regular intervals during the 120-day fermentation process of the vinegars, and the antimicrobial effect of the final product was determined.

Findings: Statistically significant differences were found in the acidity values and yeast-mold counts of homemade and commercial vinegar samples ($p < 0.01$). A total of 176 possible acetic acid bacteria (AAB) isolates were obtained from vinegar samples, and 85 of them were determined to be AAB. A total of 106 yeast isolates were obtained and identified from vinegar samples. By performing starter and probiotic culture tests, it was determined that A49 coded AAB isolate (*A. ghanensis*) and B71 coded yeast isolate (*S. cerevisiae*) had suitable properties for probiotic vinegar production. Then, apple-honey probiotic vinegars were produced with these isolates. It was determined that the acidity level in the apple-honey probiotic vinegars produced on the 120th day reached 5%, 54% of the AAB count could be preserved and the yeast-mold counts decreased to < 2 log cfu/ml.

Results: As a result of the analysis, it was seen that acetic acid bacteria may also be candidates for probiotic cultures and more studies should be done on this subject. However, in the targeted probiotic vinegar production, it was determined that the number of microorganisms decreased as the acidity of the product increased. Therefore, it was observed that the number of probiotic microorganisms required for a probiotic food could not be maintained. Despite this, it was determined that the number of probiotic microorganisms in the product reached 3.8% acidity and provided a value of 10^6 cfu/ml. Therefore, the current study has revealed that it is possible to produce probiotic vinegar by taking into account our country's standards and that more studies should be done on this subject.

Keywords: Vinegar, acetic acid bacteria, yeast, starter culture, probiotic, isolation, identification, vinegar production, antimicrobial effect

January 2024, 125 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	i
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	viii
GİRİŞ	1
KURAMSAL TEMELLER	4
Sirke Fermantasyonu.....	4
Alkol fermantasyonu	4
Asetik asit fermantasyonu	5
Mayalar	6
Mayaların fermantasyon ve solunum mekanizmaları	6
Asetik Asit Bakterileri	8
Asetik asit bakterilerinde metabolik yollar	11
Probiyotikler	12
MATERYAL ve METOT	15
Materyal	15
Metot	17
Sirke örneklerinin fizikokimyasal analizleri	17
Sirke örneklerinin mikrobiyolojik analizleri	18
Muhtemel asetik asit bakterisi ve maya izolatlarının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi	19
Muhtemel asetik asit bakterisi ve maya izolatlarının probiyotik kültür özelliklerinin belirlenmesi	23
Sirke örneklerinden elde edilen izolatların moleküler tanısı	28
Sirke üretimi.....	30
İstatistiksel analiz	33
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	34
Sirke Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları	34

Sirke Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	36
Mikrobiyolojik ekim sonuçları ve izolasyon	36
Gram boyama ve katalaz testi	39
Muhtemel Asetik Asit Bakterisi İzolatlarının Starter Kültür Özellikleri	41
Muhtemel Asetik Asit Bakterisi İzolatlarının Probiyotik Kültür Özellikleri	47
Safra tuzuna tolerans	47
Mide ortamına direnç	47
Asetik asit üretim hızı.....	49
Oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite kapasitesi	52
Antibiyotik direnci.....	56
Virülans faktör genlerin tespiti	58
Safra tuzu hidrolaz aktivitesi	59
Hemolitik aktivite	59
DNaz aktivitesi	60
Muhtemel Asetik Asit Bakterisi İzolatlarının Moleküler Tanısı	61
Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının (GTG) ₅ -Rep-PCR ile gruplandırılması	61
Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının 16S rRNA ile tanılanması	63
Maya İzolatlarının Starter Kültür Özellikleri	68
Maya İzolatlarının Probiyotik Kültür Özellikleri	72
Safra tuzuna tolerans	72
Mide ortamına direnç	72
Oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite kapasitesi	76
Antifungal direnci.....	83
Safra tuzu hidrolaz aktivitesi	85
Hemolitik aktivite	86
DNaz aktivitesi	87
Maya İzolatlarının Moleküler Tanısı	88
Maya izolatlarının M13-Rep-PCR ile gruplandırılması.....	88
Maya izolatlarının 26S rRNA ile tanılanması.....	90
Sirke Üretimi	95
Üretilen sirke örneklerinin fizikokimyasal özellikleri.....	98
Üretilen sirke örneklerinin mikrobiyolojik özellikleri	103
Üretilen sirke örneklerinin antimikrobiyal etkileri	108
SONUÇLAR.....	111
KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	126

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Asetik asit bakterilerinin sınıflandırılması	9
Tablo 2. Asetik asit bakterilerinin metabolizmasında üretilen bazı ürünler ve kullanım alanları	10
Tablo 3. Sirke örneklerinin çeşidi, temin edildiği il ve üretim tipi	15
Tablo 4. Virülans faktör genlerin tespitinde kullanılan primerler	27
Tablo 5. Üretimi gerçekleştirilen sirkeler, kodları, gıda ve mikroorganizma içerikleri	32
Tablo 6. Temin edilen sirke örneklerinin pH, asitlik (%) ve briks değerleri	35
Tablo 7. Mikrobiyolojik ekim sonuçları ve sirke örneklerinden elde edilen izolatlar	37
Tablo 8. Muhtemel AAB izolatlarının gram ve katalaz özellikleri	40
Tablo 9. Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının glukoz toleransı	42
Tablo 10. Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının etanol toleransı	43
Tablo 11. Muhtemel AAB izolatlarının farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri.....	44
Tablo 12. Muhtemel AAB izolatlarının asetik asit toleransı	45
Tablo 13. Muhtemel AAB izolatlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri	46
Tablo 14. Muhtemel AAB suşlarının 24 saatte %0.3 safra tuzuna toleransları.....	48
Tablo 15. Safra tolerans gösteren muhtemel AAB izolatlarının simüle mide ortamına (pH 3.0) dirençleri.....	49
Tablo 16. İzolatların asetik asit üretme hızı (% asetik asit) ve SM Broth besiyerinin 48. saatteki pH değeri	50
Tablo 17. Muhtemel AAB izolatlarının başlangıç sayıları (0.sa), simüle mide ortamında (pH 3) bekledikten sonraki sayıları (3.sa)	51
Tablo 18. Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri (%).....	53
Tablo 19. Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite değerlerine ait varyans analiz sonuçları	53
Tablo 20. Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	54
Tablo 21. Muhtemel AAB izolatlarının ko-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	54
Tablo 22. Muhtemel AAB izolatlarının hidrofobisite değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	55
Tablo 23. Muhtemel AAB izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç durumu	57

Tablo 24. Muhtemel AAB izolatlarının antibiyotik direnç hassasiyeti değerlerine ait varyans analiz sonuçları	57
Tablo 25. Muhtemel AAB izolatlarının antibiyotik direnç hassasiyeti değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	58
Tablo 26. Muhtemel AAB izolatlarının safra tuzu hidrolaz (BSH) aktiviteleri	59
Tablo 27. Muhtemel AAB izolatlarının hemolitik aktiviteleri	60
Tablo 28. Muhtemel AAB izolatlarının DNaz aktiviteleri	60
Tablo 29. Muhtemel AAB izolatlarının tanı sonuçları.....	65
Tablo 30. Maya izolatlarının farklı şeker konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri.....	69
Tablo 31. Maya izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişme yetenekleri	70
Tablo 32. Maya izolatlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri	71
Tablo 33. Maya izolatlarının 24 saatte %0.3 safra tuzuna toleransları	73
Tablo 34. Safraya tolerans gösteren maya izolatlarının simüle mide ortamına (pH 3) dirençleri	74
Tablo 35. Maya izolatlarının başlangıç sayıları (0.sa), simüle mide ortamında (pH 3) beklendikten sonraki sayıları (3.sa).....	75
Tablo 36. Maya izolatların oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri (%)	77
Tablo 37. Maya izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite değerlerine ait varyans analiz sonuçları	78
Tablo 38. Maya izolatlarının oto-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	79
Tablo 39. Maya izolatlarının ko-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	80
Tablo 40. Maya izolatlarının hidrofobisite değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	81
Tablo 41. Maya izolatlarının antifungal direnci	83
Tablo 42. Maya izolatlarının antifungal direnç hassasiyeti değerlerine ait varyans analiz sonuçları	84
Tablo 43. Maya izolatlarının antifungal direnç hassasiyeti değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	84
Tablo 44. Maya izolatlarının safra tuzu hidrolaz (BSH) aktiviteleri.....	86
Tablo 45. Maya izolatlarının hemolitik aktiviteleri.....	87
Tablo 46. Maya izolatlarının DNaz aktiviteleri	88
Tablo 47. Maya izolatlarının tanı sonuçları	92
Tablo 48. Sirke üretiminde kullanılan doğal balın özellikleri	97

Tablo 49. Üretimi tamamlanan sirke örnekleri	98
Tablo 50. Üretilen sirke örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	98
Tablo 51. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pH değerlerine ait varyans analiz sonuçları	99
Tablo 52. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pH değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	99
Tablo 53. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca asitlik değerlerine ait varyans analiz sonuçları	100
Tablo 54. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca asitlik değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	101
Tablo 55. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca briks değerlerine ait varyans analiz sonuçları	102
Tablo 56. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca briks değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	102
Tablo 57. Üretilen sirkelerin depolama süresi boyunca mikrobiyolojik özellikleri ($\log_{10}$ kob/ml)	103
Tablo 58. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca maya-küf sayısına ait varyans analiz sonuçları	104
Tablo 59. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca maya-küf değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	104
Tablo 60. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca AAB sayısına ait varyans analiz sonuçları	105
Tablo 61. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca AAB değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	106
Tablo 62. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca TAMB sayısına ait varyans analiz sonuçları	107
Tablo 63. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca TAMB değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	107
Tablo 64. Sirke örneklerinin patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zon çapı, mm)	110
Tablo 65. Sirke örneklerinin antimikrobiyal etkilerine ait varyans analiz sonuçları	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sirke oluşumunun şematik gösterimi.....	5
Şekil 2. Maya hücresinde alkolik fermantasyon	7
Şekil 3. Bir maya hücresinin oluşturduğu diğer biyosentez ürünleri.....	8
Şekil 4. Asetik asit bakterilerinin metabolik yolları	12
Şekil 5. Temin edilen sirke örneklerinin illere göre dağılımı	17
Şekil 6. 96 kuyucuklu plate örnekleri	20
Şekil 7. Sirke üretiminde kullanılan üretim akış şeması	31
Şekil 8. Sirke üretiminde kullanılan doğal elmalar (A) ve doğal bal (B).....	31
Şekil 9. A15 izolatının (A) ve A123 izolatının (B) petrideki görüntüleri	39
Şekil 10. A1 kodlu izolatın katalaz deneyi sırasındaki gaz çıkışı.....	41
Şekil 11. İzolatların 6., 12., 24. ve 48. saatte asetik asit üretme hızları (%)	50
Şekil 12. İzolatların SM Broth besiyerinde meydana getirdikleri pH düşüşü.....	51
Şekil 13. Simüle mide ortamında muhtemel AAB izolatlarının canlı kalma yüzdeleri	52
Şekil 14. Muhtemel AAB izolatlarının 2., 4. ve 24. saatlerdeki oto-agregasyon kapasiteleri .	55
Şekil 15. Muhtemel AAB izolatlarının ko-agregasyon kapasiteleri	56
Şekil 16. Muhtemel AAB izolatlarının hidrofobisite yetenekleri	56
Şekil 17. A49 izolatının antibiyotiklere karşı direnç durumu	58
Şekil 18. AAB izolatlarının sırasıyla ace ve agg virülans faktör genlerinin jel görüntüsü (M: Marker; K: Kontrol)	59
Şekil 19. α -hemolitik A132 (A), β -hemolitik <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (B), γ -hemolitik A49 (C)'un kanlı agardaki hemolitik aktivite durumları	60
Şekil 20. DNaz besiyerinde zon oluşturmayan <i>L. casei</i> ATCC 393 (A) ve zon oluşturan <i>S.</i> <i>aureus</i> ATCC 29213 (B) suşlarının DNaz aktivite durumları	61
Şekil 21. Temsili izolatların (GTG) ₅ -Rep-PCR ile elde edilen DNA fingerprint görüntüleri (M: marker, bp: baz çifti).....	62
Şekil 22. Temsili izolatların 8F/1541R primerleri ile elde edilen 16S rRNA ampikonlarının jeldeki görüntüsü (M: marker, bp: baz çifti).....	64
Şekil 23. Asetik asit bakterisi türlerinin, toplam asetik asit bakterisi izolatları içerisindeki yüzdesel dağılımı.....	67
Şekil 24. Simüle mide ortamında maya izolatlarının canlı kalma yüzdeleri.....	75
Şekil 25. B19 izolatının 4.saatteki oto-agregasyonu.....	76
Şekil 26. B41 izolatı (A) ve B30 izolatının (B) hidrofobisite yetenekleri.....	76
Şekil 27. Maya izolatlarının oto-agregasyon kapasiteleri	82

Şekil 28. Maya izolatlarının ko-agregasyon kapasiteleri	82
Şekil 29. Maya izolatlarının hidrofobisite yetenekleri	82
Şekil 30. B41 izolatının (A) ve B49 izolatının (B) antifungal direnç durumları	85
Şekil 31. B104 izolatının BSH aktivitesi.....	86
Şekil 32. Temsili izolatların M13-RAPD-PCR ile elde edilen DNA fingerprint görüntüleri (M: marker, bp: baz çifti).....	89
Şekil 33. Temsili izolatların NL-1/NL-4 primerleri ile elde edilen 26S rRNA amplikonlarının jeldeki görüntüsü (M: marker, bp: baz çifti).....	91
Şekil 34. Maya türlerinin toplam maya izolatları içerisindeki yüzdesel dağılımı	94
Şekil 35. Örneklere eklenecek olan mikroorganizma kültürlerinin hazırlanma aşaması	96
Şekil 36. Alkol fermantasyonu tamamlanan örneklerden süzme işlemi ile hammaddenin uzaklaştırılması (A), ardından asetik asit bakterisi kültürünün eklenmesi (B) ve şişelerin kapaklarının açılıp oksijen geçiren ince bir örtü ile kapatılmasıyla asetik asit fermantasyonu aşamasına geçilmesi (C).....	97
Şekil 37. Sirke örneklerinin pH değerleri üzerine fermantasyon süresinin etkisi	100
Şekil 38. Sirke örneklerinin asitlik değerleri üzerine fermantasyon süresinin etkisi.....	101
Şekil 39. Sirke örneklerinin briks değerleri üzerine fermantasyon süresinin etkisi	103
Şekil 40. Sirke örneklerinin maya-küf sayıları üzerine fermantasyon süresinin etkisi	105
Şekil 41. Sirke örneklerinin AAB sayıları üzerine fermantasyon süresinin etkisi	106
Şekil 42. Sirke örneklerinin TAMB sayıları üzerine fermantasyon süresinin etkisi	108

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

AAB	: Asetik Asit Bakterisi
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSH	: Safra Tuzu Hidrolazlar (Bile Salt Hydrolase)
CaCO₃	: Kalsiyum Karbonat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
FAO	: Food and Agriculture Organization
GYC	: Glucose-Yeast Extract-Calsium karbonat
Kob	: Koloni oluşturan birim
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinukleotid Hydrid
PDA	: Potato Dextrose Agar
VRBA	: Violet Red Bile Agar
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCBI	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (Nation Center for Biotechnology Information)
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PBS	: Fosfat buffer salin
PCA	: Plate Count Agar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RSHMB	: Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
rRNA	: Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
Rep-PCR	: Tekrarlayan element dizisine dayalı PCR (Repetitive Element Sequence-based PCR)
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
spp.	: Alt Türler (subspecies)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
a_w	: Su Aktivitesi
bp	: Baz Çifti
CO₂	: Karbondioksit
Dk	: Dakika
DS	: Diastaz sayısı
γ	: Gama
G	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
Log	: Logaritma
M	: Molarite
Meq	: Miliekivalan
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
N	: Normalite
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
O₂	: Oksijen
pH	: Asitlik Bazlık Birimi
ppm	: Milyonda Bir Birim (Parts Per Million)
Sa	: Saat
Sn	: Saniye
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta

GİRİŞ

Son zamanlarda insanların sadece tüketim amaçlı değil, aynı zamanda sağlık için de faydalı olan gıdalara ulaşma çabası fonksiyonel gıdalara olan talebi giderek artırmaktadır. Besinsel değerine ilave olarak sağlığı olumlu yönde etkileyen gıdalar, fonksiyonel gıdalar olarak tanımlanmaktadır (Gülbandılar vd 2017). Fonksiyonel gıda pazarının en büyük kısmını probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler içeren gıdalar oluşturmaktadır. Ayrıca, mikroorganizmalar fermentasyon sırasında biyoaktif metabolitleri üreterek de dolaylı olarak gıdaya sağlık için faydalı olan özellikler kazandırabilir. Fermente gıdalar bu kapsamda değerlendirildiğinde; probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik ve çeşitli biyoaktif metabolitleri içerebileceğinden fonksiyonel gıdalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Stanton *et al.* 2005).

Sirke; ilk olarak alkol fermentasyonu, ardından asetik asit fermentasyonu olmak üzere iki aşama sonucunda oluşan fermente sıvı bir içecektir (Cavdaroglu and Ozen 2023). Alkol fermentasyonu anaerobik şartlarda mayalar tarafından gerçekleşmekte iken, asetik asit fermentasyonu aerobik şartlarda asetik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir. Divan-ü Lugat-it Türk'te de yer alan olan sirke kelimesi, dilimize Fransızca'dan geçmiştir. İngilizce karşılığı “vinegar” olarak bilinen kelime, Fransızca “vin aigre-ekşi şarap” manasına gelmektedir. Sirke, antibakteriyel, antifungal ve anti-enflamatuar bir ajan olarak işlev görerek insan sağlığı için faydalı olabilecek birçok farmakolojik özelliğe sahiptir. Ayrıca kan şekerinin kontrolü, kardiyovasküler sağlık, lipid metabolizması, kilo yönetimi, sindirim sistemi sorunlarını giderme ve böbrek sağlığına katkıda bulunabilmektedir. Bu faydalar, polifenoller, melanoidinler, ligustrazin ve organik asitler gibi sirke içinde bulunan biyoaktif bileşiklere atfedilmektedir. Sirke doğru üretildiği takdirde insan tüketimi için güvenli bir ürün olarak kabul edilir. Bununla birlikte, aşırı tüketimi gastrointestinal sistemde ve diş minesinde sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Ho *et al.* 2016; Perumpuli and Dilrukshi 2022).

FAO/WHO standartlarına göre sirkenin tanımı, nişasta ve/veya şeker içeren tarımsal kökenli hammaddeler kullanılarak, alkol ve asetik asit fermentasyonu sonucu üretilen tüketime uygun bir sıvı olarak geçmektedir (Anonymous 2000). Dünyada farklı hammaddeler sirke üretiminde kullanılmakta olup, sağlığa olan faydaları nedeniyle tüketicilerin sirkeye olan ilgisi giderek artmaktadır (Perumpuli and Dilrukshi 2022; Cavdaroglu and Ozen 2023). Bu sirke çeşitleri; meyve sirkeleri (elma sirkesi, üzüm sirkesi, çilek sirkesi, balsamik sirke, dut sirkesi, hindistan cevizi sirkesi, incir sirkesi, hurma sirkesi, vişne sirkesi) sebze sirkeleri (soğan sirkesi,

domates sirkesi), şarap sirkeleri (şarap sirkesi) hububat sirkeleri (pirinç sirkesi, siyah pirinç sirkesi, bira sirkesi, siyah sirke) ve diğer sirkeler (bal sirkesi, beyaz distile sirke, kombucha sirkesi, malt sirkesi, peynir altı suyu sirkesi) olarak gruplandırılabilir (Satıcı 2021).

Sirke, sahip olduğu kimyasal özelliklere göre yapay ve doğal sirke olarak gruplandırılabilir. Yapay sirke konsantre asetik asitin sulandırılması ile elde edilirken, doğal sirke alkol ve asetik asit fermentasyonları sonucu meydana gelmekte ve yapısında çeşitli fermentasyon yan ürünlerini bulundurmaktadır (Dıraman vd 2023).

Üretilen doğal bir sirkenin bileşimi; üretildiği bölgeye, kullanılan hammaddeye, ortama eklenen su ve çeşitli besin maddelerine, mikroflorada yer alan mikroorganizmalara, üretim metoduna, olgunlaşma süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sirke; yavaş yöntem (yüzey kültür yöntemi), hızlı yöntem (jeneratör metodu) ve derin kültür yöntemi (submers metodu) ile üretilmektedir. Yavaş yöntem ile sirke üretimi uzun sürse de, en iyi kalitede aromatik maddelerin oluşumu gerçekleşmektedir. (Bilginer 2018; Al-Dalali *et al.* 2023). Genel itibarıyla sirke kuru maddesinin büyük çoğunluğu; asetik asit, organik asitler, esterler, aldehytler, mineral maddeler, 2,3 bütillenglikol, metilglioksal, dihidroksiasetonasetil metil karbinol, diasetil ve aroma maddeleri; geri kalan kısmı sudan oluşmaktadır. Sirkenin pH değeri ise genel olarak 2.0-3.5 arasında yer almaktadır (Aktan ve Yıldırım 2011). Sirkenin yoğunluğu yaklaşık olarak 0.96 g/ml'dir. Ülkemizin Sirke Standardı (TS 1880 EN 13188)'na göre, üretimi yapılacak olan sirkelerin suda serbest asetik asit cinsinden toplam asit içeriği en az 40 g/L olmalıdır. Sirkede oluşan asetik asit, organik bir bileşik olup formülü CH_3COOH 'tır. Ayrıca, şarap sirkelerinde kalıntı alkol oranı hacimce %1.5; şarap sirkesi dışındaki sirkelerde hacimce %0.5 ve özel sirkelerde hacimce %3'ten yüksek olmaması gerekmektedir (Anonim 2016; Satıcı 2021).

Sirkenin faydaları yalnızca biyoaktif bileşikler nedeniyle değil, aynı zamanda mikroflorasında yer alan mikroorganizma gruplarından da kaynaklanabilmektedir. Sirkenin oluşum sürecinde temel olarak çeşitli mayalar ve asetik asit bakterileri (AAB) rol oynamakta olup farklı mikroorganizmaların da mikroflorada yer aldığı bilinmektedir (Şengün ve Kılıç 2019). Çeşitli çalışmalarda, sirke dışındaki farklı hammaddelerden izole edilen bazı maya ve AAB'nin potansiyel probiyotik özelliklerinin olduğu açıkça bildirilmektedir (Haghshenas *et al.* 2015; Alvarez *et al.* 2023). Ortamda yer alan diğer mikroorganizma grupları da probiyotik özelliğe sahip olabilir, ancak sirke oluşumunda temel olarak maya ve AAB rol oynadığından bu tez çalışmasında belirtilen iki mikroorganizma grubu üzerinde durulmuştur.

Probiyotik içeren ürünler, konakçıda gösterdiği olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıdalar olarak öne çıkmaktadır. Probiyotiklerin inflamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak

sendromu, ishal, alerjik hastalıklar, laktoz intoleransı, kanser, hiperkolesterolemi gibi birçok hastalığın önlenmesi ve azaltılmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Probiyotikler bu etkilerini; bağırsakta patojenlerle rekabet etme, bağırsak bariyer fonksiyonlarını iyileştirme, konakçının vücudunda immünomodülasyon ve nörotransmitter üretimi sağlayarak gerçekleştirmektedirler. Ayrıca, çeşitli organik asitler, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi maddeler üreterek de antimikrobiyal etkiler göstermektedirler (Latif *et al.* 2023).

Bu çalışmada; sirke üretiminde kullanılabilecek maya ve AAB'nin izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, substrat olarak bal ve elma kullanılarak, probiyotik ve starter özellikleri belirlenen suşların yardımıyla sirke üretilmeye çalışılmıştır. Özellikle bölgemizde üretimi gerçekleştirilen bal ve elma kullanımı ile sürdürülebilir tarım üretimine de katkı sağlanması amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, 48 adet ev yapımı ve 13 adet ticari sirke örneği temin edilmiş ve örnekler üzerinde bazı mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca örneklerin pH değerleri, titrasyon asitlikleri ve briks değerleri tespit edilmiştir. Örneklerden elde edilen maya ve asetik asit bakterilerinin tanımlanması, probiyotiklik ve starter kültür özellikleri araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, en uygun maya ve AAB izolatları kullanılarak doğal probiyotik sirke üretimi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Üretimi gerçekleştirilen sirkelerin depolama periyodu boyunca mikrobiyolojik ve fizikokimyasal analizleri takip edilerek ürün özellikleri de belirlenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Sirke Fermantasyonu

Sirke üretimi aşamasında meydana gelen reaksiyonlar; ilk aşamada alkol fermentasyonu, ikinci aşamada ise asetik asit fermentasyonudur (Aktan ve Yıldırım 2011).

Alkol fermentasyonu

Sirke üretiminin ilk aşaması olan alkol fermentasyonu esas olarak *Saccharomyces cerevisiae* suşları tarafından anaerobik şartlarda glikoliz yolu ile gerçekleştirilmekte olup; CO₂, etanol, düşük miktarda asetik asit, gliserol ve bazı yüksek alkoller meydana gelmektedir (Aktan ve Yıldırım 2011; Budak vd 2014).

İlk aşama olan alkol fermentasyonunun 20-30°C arasında, kontrollü bir sıcaklıkta gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Doğal spontan fermentasyon veya saf kültür inokülasyonu yapılabilmektedir. Küçük çaplı işletmelerde sirke üretiminde alkol fermentasyonu kendiliğinden gerçekleşmekte büyük işletmelerde ise fermentasyon için *S. cerevisiae* inokülasyonu yapılmaktadır. Bu aşamadan sonra, mayaların çoğu etkinliğini kaybetmekte ve otolize uğramaktadırlar (Li *et al.* 2015).

Alkol fermentasyonu, sirkenin lezzet kazanmasındaki ilk önemli adımdır. Alkol fermentasyonu sırasında pigmentler, lezzet ve koku bileşenleri, antibiyotik özelliklere sahip bileşikler gibi çok farklı ikincil metabolitler ve pek çok enzim açığa çıkmaktadır (Li *et al.* 2015).

Mayalar yalnızca heksozları fermente edebilmektedirler. Tüm fermentasyon mayaları glukoz ve fruktozu aynı oranda, mannozu ise daha yavaş olacak şekilde parçalamaktadırlar. Galaktoz bazı mayalar tarafından fermente edilebilmekte, fermentasyonun hızı ve yoğunluğu türe ve suşa bağlıdır. Disakkaritler, özellikle sukroz, maltoz, laktoz ve melibiyoz yalnızca spesifik hidrolitik enzime sahip olan mayalar tarafından fermente edilebilmektedir (Rainieri and Zambonelli 2009).

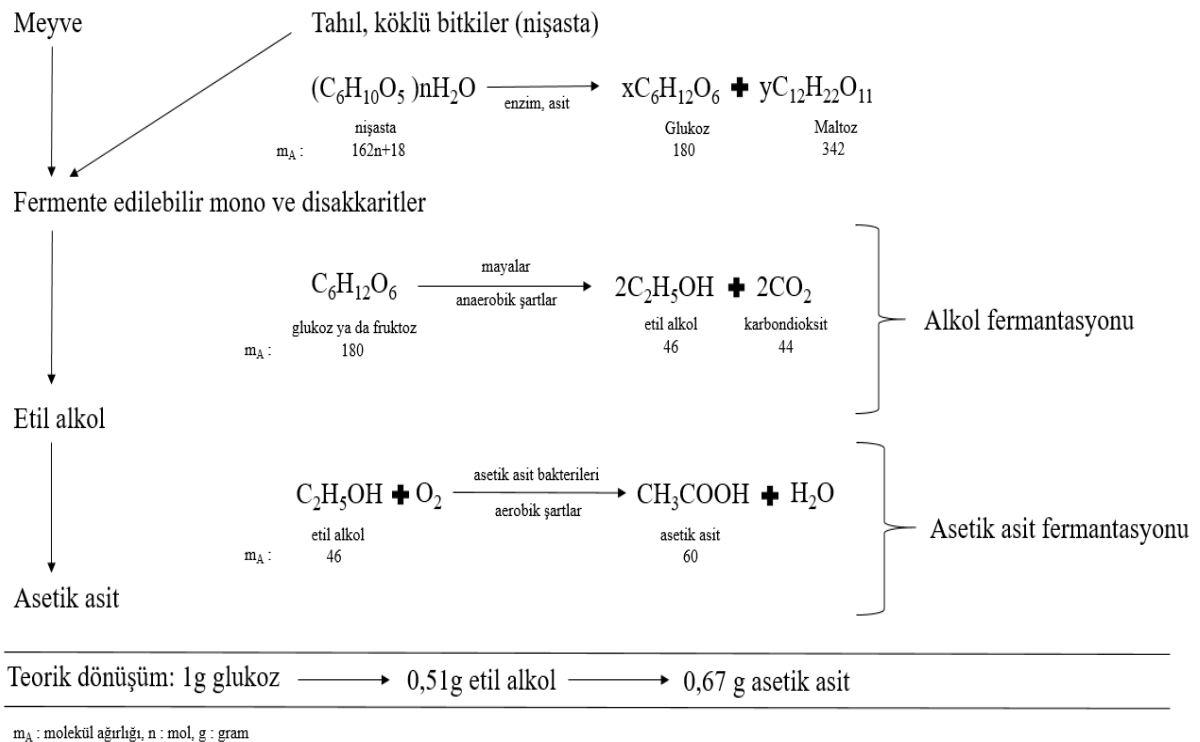
Alkol fermentasyonunun sonunda, mayaların gerçekleştirmiş olduğu metabolik aktivite ile, diğer birçok mikroorganizmanın büyümesini ve metabolizmasını da engelleyen alkolün derecesi önemli ölçüde artmaktadır. Mayalar, genelde %20'ye varan konsantrasyonlarda fermente şekerleri iyi kullanmakta, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda fermentasyon hızları yavaşlamaktadır. Şeker konsantrasyonu %50'nin üzerine çıktığında ise, ozmotik basıncın aşırı yüksek olması nedeniyle, çoğu maya türünün gelişimi ve metabolizma faaliyetleri engellenmektedir. *Saccharomyces* cinsinden olmayan mayalar, alkol fermentasyonunun

başlangıç ve orta aşamalarında özellikle çok miktarda bulunsu bile *Saccharomyces* cinsine ait birçok tür, fermantasyon koşulları büyümeleri için daha uygun olduğundan diğer mayalardan daha hızlı çoğalmakta ve baskın hale gelmektedirler (Rainieri and Zambonelli 2009).

Asetik asit fermantasyonu

İkinci aşama olan asetik asit fermantasyonu esas olarak *Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconoacetobacter* cinsi bakteriler tarafından aerobik şartlarda gerçekleştirilerek asetik, laktik tartarik, sitrik ve malik asitler de dahil olmak üzere farklı organik asitler oluşmaktadır. Bu organik asitler içerisinde asetik asit daha yüksek oranda meydana gelmektedir (Aktan ve Yıldırım 2011; Budak vd 2014).

AAB türleri mikroskopta tek, çift, küme halinde veya zincir şeklinde görülebilen, silindirik veya elipsoid şekilli, hareketli, gram negatif bakterilerdir. Katalaz pozitif, oksidaz negatif özellik göstermektedirler. Zorunlu aerobik metabolizmaya sahip olup son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanmaktadırlar (Fernandez-Perez *et al.* 2010; Mas *et al.* 2014). Sirke oluşumunun şematik gösterimi Şekil 1’de yer almaktadır.



Şekil 1. Sirke oluşumunun şematik gösterimi (Adams 1998’den modifiye edilmiştir)

Mayalar

Mayalar, fungi alemi içerisinde sınıflandırılan ökaryotik ve tek hücreli, Ascomycetes ve Basidiomycetes şubesine ait olan mikroorganizmalardır. Basidiomycetes mayalar hücre dışında, Ascomycetes mayalar ise hücre içinde askospor oluşturmaktadırlar (Jacques and Casaregola 2008). Maya hücreleri bakteri hücrelerine göre 2-10 kat daha büyüktürler. Ayrıca silindirik, yuvarlak veya oval bir hücre yapısı göstermektedirler. Hücrenin yaşı ve ürediği koşullara bağlı olarak farklı şekil ve ebatlarda görülebilmektedirler (Urçar Gelen 2017).

Üremeleri için optimum pH 4.5-7.0 aralığında olup, pH 2.0-9.0 aralığında gelişim gösterebilmektedirler. Bakterilere göre düşük su aktivitesi değerlerine daha dirençlidirler. Mayaların çoğu türü 0.90-0.95 su aktivitesi (a_w) değerlerinde, ozmotolerant maya türleri ise 0.65-0.85 a_w değerlerinde gelişebilmektedirler (Urçar Gelen 2017). Çoğu maya türü mezofilik karakterde olduğu için 20-25°C aralığında gelişim göstermektedirler. Psikrofilik mayalar 4-15°C aralığında, termofilik mayalar ise 30-37°C aralığında gelişebilmektedirler (Kurtzman *et al.* 2011).

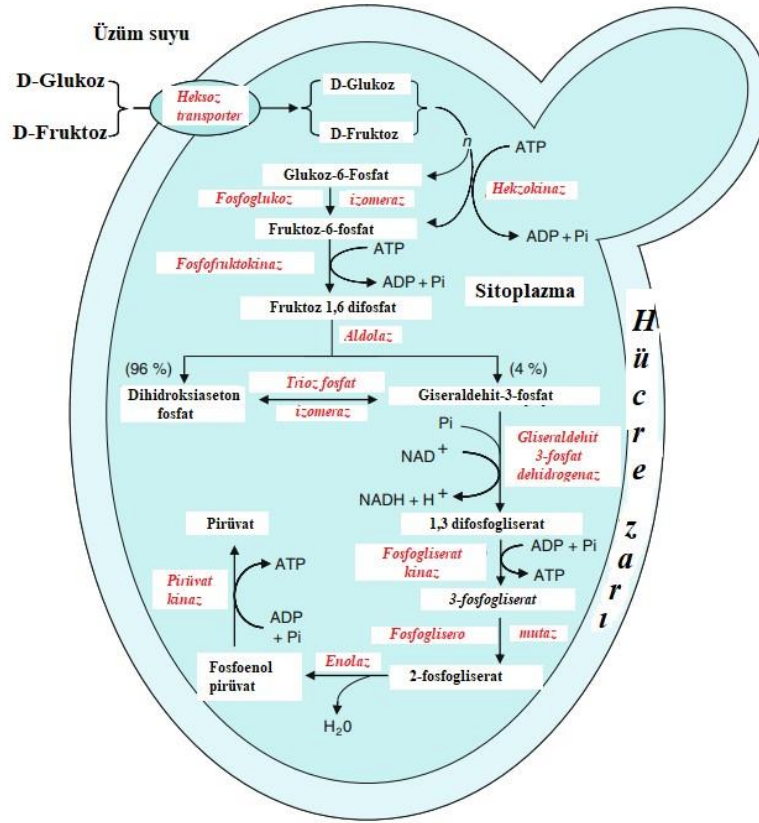
Mayalardan gıda endüstrisinde, çeşitli fermente gıda ve içeceklerin üretiminde; çeşitli enzim, protein, vitamin vb. üretiminde; bozucu bazı mikroorganizmaların kontrolünde, probiyotik ve biyoterapötik etkilerin sağlanmasında faydalanılmaktadır. Diğer taraftan mayalar, çeşitli gıda ve içeceklerin bozulmasına neden olabilmekte ve bazı maya türleri insanlar için patojen özellik gösterebilmektedir (Fleet 2006).

Mayaların fermentasyon ve solunum mekanizmaları

Fermentasyon olgusuna ışık tutan Pasteur, ortamda substrat olarak aynı miktarda şekerin bulunması durumunda aerobik solunum yapan mayaların, fermentasyon yapan mayalardan 20 kat daha fazla hücre materyali meydana getirdiğini ve fermentasyon sırasında ortamda aniden O_2 artmasıyla fermentasyonun yavaşladığını, hatta durduğunu tespit etmiştir. Mayalar aerobik şartlarda şekerleri parçalayarak karbondioksit ve suya dönüştürmekte, bunun sonucunda 1 mol heksozdan 38 ATP meydana gelmektedir. Mayalar anaerobik şartlarda, şekerleri parçalayarak 2 mol etil alkol ve 2 mol karbondioksit oluşturmakta, bunun sonucunda ise 1 mol heksozdan 2 mol ATP kazanmaktadırlar (Tunail 2009; Urçar Gelen 2017; Koutsokali and Valahas 2020).

Mayalar, şeker katabolizması için ana yol olarak glikolizi kullanmaktadırlar. Şeker katabolizması için ana yol olarak AAB gibi bazı organizmalar tarafından kullanılan pentoz yolu, maya tarafından sadece bir riboz ve NADPH kaynağı olarak kullanılmaktadır. Çünkü mayalar, nükleotitlerin ve nükleik asitlerin sentezlenmesi için riboza, lipid sentezi gibi bazı metabolik süreçler için ise NADPH'a gerek duymaktadırlar. Bu nedenle mayalar, enerji elde

etmek için değil, hücre çoğalması için elzem olan bazı maddeleri sağlamak için pentoz yolunu tercih etmektedirler (Zamora 2009).



Şekil 2. Maya hücresinde glikoliz (Zamora 2009)

Şekil 2’de görüldüğü üzere başlangıçta, heksozlar kolaylaştırılmış difüzyon ile hücre içine taşınmaktadır. İç şeker konsantrasyonu dış şeker konsantrasyonundan daha düşük olduğundan dolayı, bu geçiş sırasında enerji harcanmamaktadır. Heksozların glikoliz yolu ile parçalanmasının sonucu olarak, her heksoz molekülünden 2 mol pirüvat, 4 mol ATP ve 1 mol NADH oluşmaktadır. Heksozların fosforilasyonu sırasında daha önce 2 mol ATP tüketildiğinden, hücre içi net enerji kazancı heksoz başına 2 mol ATP olmaktadır. Pirüvat önce tiamin-pirofosfat (TPP) koenzimi ile beraber çalışan pirüvat dekarboksilaz enzimi ile asetaldehite (etanal) dekarboksile olmakta ve CO₂ açığa çıkmaktadır. Asetaldehit ise alkol dehidrogenaz enzimi aracılığıyla NAD⁺’nın rejenerasyonuna katılmakta, yenilenen NAD⁺ tekrar glikoliz yolunda gliseraldehit-3-fosfatın (GAP) 1,3-bifosfogliserata (1,3-PGA) çevriminde görev yapmaktadır. İndirgenen asetaldehit ise etanol olarak ortamda birikmektedir. Oluşan etanol ve CO₂ basit difüzyonla hücre dışına taşınmaktadır (Moreno-Arribas and Polo 2009; Tunail 2009). Şekil 3’de bir maya hücresinin oluşturduğu diğer biyosentez ürünleri görülmektedir.

Tablo 1. Asetik asit bakterilerinin sınıflandırılması (Guillamon and Mas 2011; Qiu *et al.* 2021)

Cins	Tür		
Acetobacter	<i>A. aceti</i>	<i>A. lovaniensis</i>	<i>A. papayae</i>
	<i>A. cerevisiae</i>	<i>A. malorum</i>	<i>A. peroxydans</i>
	<i>A. cibirongensis</i>	<i>A. orientalis</i>	<i>A. persicus</i>
	<i>A. estuniensis</i>	<i>A. orleaniensis</i>	<i>A. pomorum</i>
	<i>A. fabarum</i>	<i>A. oryzoeni</i>	<i>A. senegalensis</i>
	<i>A. ghanensis</i>	<i>A. oryzifermentans</i>	<i>A. syzygii</i>
	<i>A. indonesiensis</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. tropicalis</i>
Acidomonas	<i>Ac. methanolica</i>		
Ameyamaea	<i>Am. chiangmaiensis</i>		
Asaia	<i>As. astilbes</i>	<i>As. lannaensis</i>	<i>As. siamensis</i>
	<i>As. bogorensis</i>	<i>As. platycodi</i>	<i>As. spathodeae</i>
	<i>As. krugthepensis</i>	<i>As. prunellae</i>	
Bombella	<i>B. apis</i>		
Commensalibacter	<i>C. intestini</i>		
	<i>C. papalotli</i>		
Endobacter	<i>E. medicaginis</i>		
Gluconacetobacter	<i>Ga. aggeris</i>	<i>Ga. johannae</i>	<i>Ga. saccharivorans</i>
	<i>Ga. asukensis</i>	<i>Ga. kombuchae</i>	<i>Ga. swingsii</i>
	<i>Ga. azotocaptans</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>Ga. takamatsuzukensis</i>
	<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>Ga. nataicola</i>	<i>Ga. tumulicola</i>
	<i>Ga. entanii</i>	<i>Ga. oboediens</i>	<i>Ga. tumulisoli</i>
	<i>Ga. europaeus</i>	<i>Ga. persimmonis</i>	<i>Ga. xylinus</i>
	<i>Ga. hansenii</i>	<i>Ga. rhaeticus</i>	
	<i>Ga. intermedius</i>	<i>Ga. sacchari</i>	
Gluconobacter	<i>G. albidusf</i>	<i>G. kanchanaburiensis</i>	<i>G. sphaericus</i>
	<i>G. assai</i>	<i>G. kondonii</i>	<i>G. thailandicus</i>
	<i>G. cerinus</i>	<i>G. nephelii</i>	<i>G. wancherniae</i>
	<i>G. frateurii</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. uchimurae</i>
	<i>G. japonicus</i>	<i>G. roseus</i>	
Granulibacter	<i>Gr. bethensis</i>		
Komagataeibacter	<i>K. europaeus</i>	<i>K. medellinensis</i>	<i>K. sucrofermentans</i>
	<i>K. hansenii</i>	<i>K. nataicola</i>	<i>K. saccharivorans</i>
	<i>K. intermedius</i>	<i>K. oboediens</i>	<i>K. xylinus</i>
	<i>K. kakiaceti</i>	<i>K. pomaceti</i>	
	<i>K. kombuchae</i>	<i>K. rhaeticus</i>	
	<i>K. maltaceti</i>	<i>K. swingsii</i>	
Kozakia	<i>Kz. baliensis</i>		
Neosaia	<i>Ns. chiangmaiensisg</i>		
Neokomagataea	<i>Nk. tanensis</i>		
	<i>Nk. thailandica</i>		
Nguyenibacter	<i>Ng. vanlangensis</i>		
Saccharibacter	<i>Sc. floricola</i>		
Swaminathania	<i>Sw. salitolerans</i>		
Swingsia	<i>Sg. samuiensis</i>		
Tanticharoenia	<i>T. sakaeratensis</i>		

Tablo 2’de ise asetik asit bakterilerinin metabolizmasında üretilen bazı ürünler ve kullanım alanları verilmiştir.

Tablo 2. Asetik asit bakterilerinin metabolizmasında üretilen bazı ürünler ve kullanım alanları (Mamlouk and Gullo 2013; Saichana *et al.* 2015; La China *et al.* 2018)

Mikrobiyal ürün	Mikroorganizma	Uygulama alanları
Asetik asit	<i>Acetobacter</i> spp. <i>Gluconacetobacter</i> spp. <i>Komagataeibacter</i> spp.	-Gıda sanayinde asitlendirici -Çoğu kimyasalın üretiminde hammadde -Temizleme ajanı -Pet plastik üretimi
Glukonik asit	<i>Gluconobacter oxydans</i>	-Farmakolojide çelat -İnşaat sektöründe renk değişimlerini önleme -Gıda alanında koruyucu, asitlendirici ve antioksidan -Tekstil endüstrisinde indirgeme ajanı
Dihidroksiaseton	<i>Gluconobacter oxydans</i>	-Kozmetik sektöründe sprej solaryum
2-keto-L-gulonik asit	<i>Gluconobacter oxydans</i>	-C vitamini
Selüloz	<i>Komagataeibacter</i> spp. <i>Gluconacetobacter</i> spp.	-Gıda sanayinde ise özellikle çerez, cips, düşük kalorili tatlı ve şekerlemelerin üretimi; dolgunluk verici olarak tatlı, salata sosları ve dondurma bileşiminde yer alma, et ve sosların kaplanması (GRAS) -Yüksek kalitede, dayanıklı kâğıt üretimi -Kozmetik sektörü -Yanık tedavisi -Tekstil sanayinde suni deri ve diğer tekstil ürünlerinde adsorban
Fruktanlar	<i>Gluconobacter</i> spp. <i>Neosassa</i> spp. <i>Kozakia</i> spp. <i>Gluconacetobacter</i> spp.	-Gıda sektöründe prebiyotik gıda -Kozmetik sektöründe nemlendirici

Gluconobacter’ler ise glikozu etanolden daha iyi bir şekilde asetik asite okside etmekte ve glikozun glukonik aside oksidasyonunda temel rol almaktadırlar. Bu nedenle, *Gluconobacter* cinsleri hem alkol hem de asetik asit fermantasyonuna katılarak, yüksek alkol ve asitlik koşulları altında, glikozu glukonik asit ve etanole dönüştürmeye devam edebilmektedirler (Li *et al.* 2015).

Komagataeibacter cinsleri ise etanolü asetik asite dönüştürebilmekte, asetik asit varlığında çoğalma ve metabolizma faaliyetleri gösterebilmektedir. Organik asitler üretmek

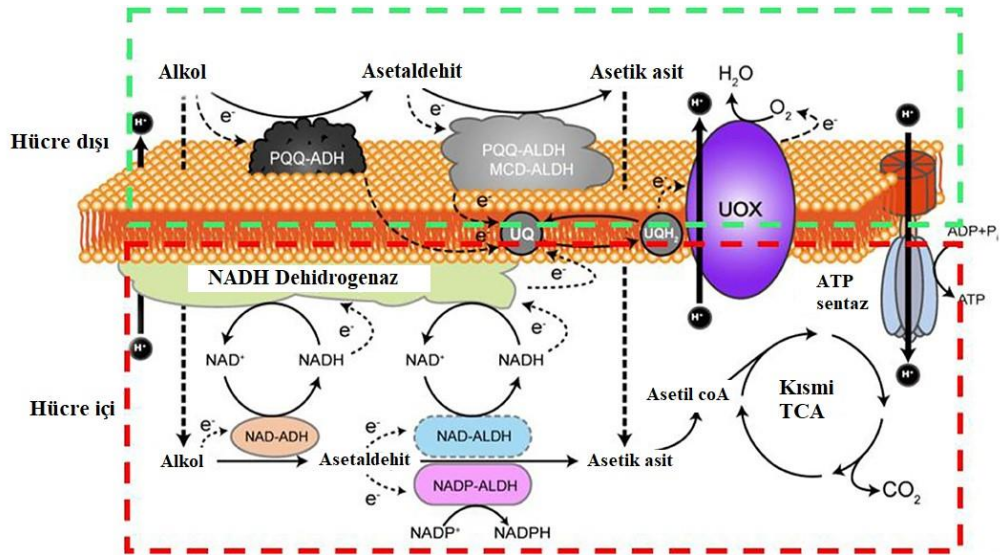
için glikoz, galaktoz, ksiloz, arabinosid ve etanolü oksitleyebilmektedir. *Komagataeibacter* tarafından kullanılan solunum zinciri CoQ'su Q₁₀'dur (Qiu *et al.* 2021)

Acetobacter, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter* ve *Komagataeibacter* cinsleri içerisindeki AAB türlerinin bazıları selüloz üretebilmektedirler. Ancak *K. xylinus* ve *K. hansenii* türleri ticari düzeyde selülozik materyaller üretebilmeleri ile dikkat çekmektedirler (Li *et al.* 2015; Lynch *et al.* 2019).

Asetik asit bakterilerinde metabolik yolaklar

AAB membranına bağlı enzimler (PQQ-ADH, ALDH vs.), birincil enerji sağlamak için çeşitli alkollerin, şekerlerin, şeker alkollerinin ve şeker asitlerinin oksidasyonlarını katalize ederken; sitozolik enzimler (NAD-ADH, NAD-ALDH vs.), biyokütle oluşumuyla ilgili olan oksidasyon ürünlerinin asimilasyonunda rol oynamaktadırlar. Asetik asit bakterilerinin membran bağlı dehidrogenazları; quinoprotein-sitokromkompleks, molibdoprotein-sitokromkompleks, flavoprotein-sitokromkompleks, membrana bağlı quinoprotein ve diğer proteinler olmak üzere beş gruba ayrılmaktadır. Bunlar, ilk önce elektronları substratlardan almakta, daha sonra bunları ATP retimi için proton itici güç oluşturan ubikinon yoluyla terminal oksidaza aktarmaktadırlar (La China *et al.* 2018).

Asetik asit oluşumu hem periplazmik boşlukta hem de sitozolde gerçekleşmektedir. Periplazmik tarafta, etanol ilk önce zara bağlı pirolokinolin kinine bağımlı alkol dehidrogenaz (PQQ-ADH) ile asetaldehite ve daha sonra molibdoprotein-sitokromkomplekse ait olan asetaldehit aldehit dehidrogenaz (AADH) ile asetik asite okside edilmektedir (Mamlouk and Gullo 2013). Bu olay ekzotermik bir reaksiyon olup 1 mol etanolün asetik aside oksidasyonu 493 kJ ısıyı açığa çıkarmaktadır (Matsutani *et al.* 2013). Sitozolde de yol aynı olup, biyolojik dönüşüm NAD'ye bağlı bir alkol dehidrogenaz (ADH) ve aldehit dehidrogenaz (ALDH) tarafından gerçekleştirilmektedir. Etanolün tükenmesinden sonra, biriken asetik aside karşı hücreler direnmekte, oluşan asetik asit asetil CoA sentaz ve TCA döngüsü yoluyla hücreler tarafından kullanılarak CO₂'ye okside edilmektedir. Bu olaya, st oksidasyon ya da aşırı oksidasyon olayı denilmektedir (Raspor and Goranovi 2008; Kanchanarach *et al.* 2010). şekil 4'de asetik asit bakterilerinin oksidatif fermentasyonunun şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 4. Asetik asit bakterilerinin metabolik yolları (He *et al.* 2022)

AAB'deki çoğu metabolik yol oksijen gerektirmekte ve oksijen tüketimi asetik asit üretimi ile doğru orantılı olmaktadır. Bu nedenle fermentasyon sırasında yeterli oksijen sağlanmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Aksi durumda hipoksi meydana gelebilmekte ve üretim kapasitelerinin hızla azalmasına neden olup bakteriler ölebilmektedir (Qiu *et al.* 2021).

Asetik asit, çoğu mikroorganizmanın gelişimini %0.5 (v/v) kadar düşük konsantrasyonlarda engelleyen bir gıda koruyucusudur. Bu etkisi, membran proton gradyanını bozan ve bakteriyel sitoplazmanın asitleşmesine neden olan disosiasyonundan kaynaklanmaktadır (Trček *et al.* 2007). Alkol oksidasyonundaki en önemli enzimlerden biri olan membrana bağlı ADH, AAB'de asetik asit direncine büyük oranda katkı sağlamaktadır (Wang *et al.* 2015). Trček *et al.* (2006), *K. europaeus*'un bazı suşlarının asetik aside karşı *A. pasteurianus*'tan daha yüksek oranda direnç gösterdiğini, *K. europaeus*'un *A. pasteurianus*'a kıyasla hücrelerindeki ADH aktivitesinin daha yüksek olduğunu ve *K. europaeus*'tan saflaştırılmış olan ADH enziminin daha yüksek stabiliteye sahip olduğunu ifade etmiştir.

Probiyotikler

Probiyotik terimi, “yaşam için” anlamına gelen “pro” ve “biyotik” kelimelerinin birleşiminden oluşan Yunanca kökenli bir kelimedir (Soccol *et al.* 2010). Terim, antibiyotiklerin ve diğer mikrobiyal maddelerin bağırsak mikrobiyomuna olumsuz etkileri üzerine çalışan Vergin tarafından yaptığı bir çalışma esnasında ilk kez ortaya atılmıştır. “Bir mikroorganizma tarafından üretilen ve başka bir mikroorganizmanın büyümesini uyarıcı ürünler” olarak Lilly ve Stillwell tarafından yeniden tanımlanmıştır. Daha sonra ise Fuller tarafından “tüketildiği zaman konakçı sağlığı veya fizyolojisi üzerinde olumlu bir etki gösteren patojenik olmayan mikroorganizmalar” olarak ifade edilmiştir (Pandey *et al.* 2015). FAO ve

WHO (2002) probiyotikleri “yeterli miktarda alındığında konakçı sağlığı üzerinde olumlu etki yapan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamışlardır.

Probiyotiklerin kullanıldıkları ürünlerde en az 10^6 - 10^7 kob/g-ml düzeyinde bulunması ve probiyotiklerin etkilerini gösterebilmesi için günlük olarak yaklaşık 10^6 - 10^9 kob/g düzeyinde vücuda alınması gerektiği bildirilmektedir (Zârate *et al.* 2000). Bununla birlikte, spesifik fonksiyonel sağlık yararlarına göre etkili probiyotik dozlar, insanlarda spesifik suşlar üzerindeki klinik çalışmalar yoluyla oluşturulması gerekmektedir (Patra and Duary 2022).

Probiyotik ürünler, tek bir suş veya iki veya daha fazla suşun karışımını içerebilmektedir. Probiyotik etki suşa özgü olup, tek veya farklı suşlarla birlikte kullanıldığında farklı etkiler gösterebilmektedir. Ayrıca probiyotik suşun gösterdiği etki konakçıya göre de değişiklik gösterebilmektedir (Patra and Duary 2022).

İdeal probiyotik bir suşun bazı özellikleri göstermesi beklenmektedir. Bunlar; toksin üretmemesi, sağlık üzerinde olumsuz etki göstermemesi, patojenite göstermemesi (GRAS), tercihen insan orijinli olması, kısa jenerasyon süresi göstermesi, mide asidi ve safra tuzlarına dirençli olması, mukozal ve epitel yüzeylere yapışabilmesi, patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterebilmesi, antibiyotik direncinin olmaması ve proses şartlarına dayanıklı olması gibi özelliklerdir (Kechagia *et al.* 2013; Taşdemir 2017).

Probiyotikler; toksik maddelerin vücuttan atılmasında, kabızlık ve diyarenin giderilmesinde, bağışıklık sisteminin güçlenmesinde, B grubu ve K vitamini üretimi ve emiliminde, alerjik reaksiyonların hafiflemesinde, laktoz ve protein sindiriminin kolaylaşmasında, huzursuz bağırsak sendromunun iyileştirilmesinde, iltihabi bağırsak hastalıklarının önlenmesinde, kolon kanseri tedavisinde, obezitenin kontrolünde vb. olumlu etkiler göstermektedirler (Altunatmaz vd 2010; Kechagia *et al.* 2013; Taşdemir 2017)

Boza, kefir, kımız, turşu, probiyotik katkılı yoğurt, dondurma ve peynir çeşitleri, kimchi, kombucha, fermente soslar bazı probiyotik gıdalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Altunatmaz vd 2010; Şanlıbaba 2023).

Bu tez çalışması ile sirkede bulunan AAB ve mayaların ve starter ve probiyotik kültür özellikleri incelenerek, doğal probiyotik sirke üretilmeye çalışılmıştır. Literatür incelendiğinde, AAB ve mayaların probiyotik özelliklerinin araştırıldığı ve probiyotik özelliklere sahip olan çeşitli suşların var olduğu görülmüştür. Fakat bu araştırma, ev yapımı ve ticari sirke numunelerinden izole edilen AAB ve mayaların probiyotik özelliklerinin incelendiği, sonrasında da probiyotik ve starter özellikleri tespit edilen suşların doğal sirke üretmek

amacıyla kullanıldığı ilk çalışma olacaktır. Ayrıca, bölgeden temin edilen bal ve organik elmaların kullanılması ile sürdürülebilir tarım üretimine de katkı sağlanması amaçlanmıştır.



MATERYAL ve METOT

Materyal

Türkiye'nin 17 farklı ilinden 48 adet ev yapımı ve 13 adet ticari olmak üzere 61 sirke örneği temin edilmiş ve analizleri gerçekleştirilinceye kadar örnekler 4°C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerin çeşidi, temin edildiği iller ve üretim tipleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Sirke örneklerinin çeşidi, temin edildiği il ve üretim tipi

Örnek	Sirke çeşidi	Temin edildiği il	Üretim tipi
1	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
2	Elma sirkesi	İzmir	Ev yapımı
3	Nar sirkesi	İzmir	Ev yapımı
4	Leylak sirkesi	İzmir	Ev yapımı
5	Biberiye sirkesi	İzmir	Ev yapımı
6	Muşmula sirkesi	İzmir	Ev yapımı
7	Armut sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
8	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
9	Dağ çileği sirkesi	İzmir	Ev yapımı
10	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
11	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
12	Kiraz sirkesi	Isparta	Ev yapımı
13	Ahlat sirkesi	Isparta	Ev yapımı
14	Alıç sirkesi	Isparta	Ev yapımı
15	Kırmızı pancar sirkesi	Isparta	Ev yapımı
16	Elma sirkesi	Isparta	Ev yapımı
17	Kayısı sirkesi	Isparta	Ev yapımı
18	Gül sirkesi	Isparta	Ev yapımı
19	İhlamur sirkesi	Isparta	Ev yapımı
20	Elma sirkesi	Diyarbakır	Ev yapımı
21	Balı elma sirkesi	Diyarbakır	Ev yapımı
22	Elma sirkesi	Diyarbakır	Ev yapımı
23	Elma sirkesi	Diyarbakır	Ev yapımı
24	Beyaz sirke	İstanbul	Ticari
25	Üzüm sirkesi	İstanbul	Ticari
26	Elma sirkesi	Bingöl	Ev yapımı
27	Alıç sirkesi	Bingöl	Ev yapımı

Tablo 3. (Devamı)

28	Ballı alıç-elma sirkesi	Bingöl	Ev yapımı
29	Üzüm sirkesi	Bingöl	Ev yapımı
30	Organik elma sirkesi	İstanbul	Ticari
31	Bal sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
32	Nar sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
33	Dağ elması sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
34	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
35	Organik elma sirkesi	İstanbul	Ticari
36	Organik ceviz sirkesi	Niğde	Ticari
37	Organik elma sirkesi	Niğde	Ticari
38	Organik zencefilli sarımsaklı limon sirkesi	Ankara	Ticari
39	Organik sarımsaklı maydanozlu limon sirkesi	İstanbul	Ticari
40	Organik elma sirkesi	İstanbul	Ticari
41	Organik elma sirkesi	Kocaeli	Ticari
42	Organik alıç sirkesi	Kocaeli	Ticari
43	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
44	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
45	Elma sirkesi	Erzurum	Ev yapımı
46	Elma sirkesi	Sinop	Ev yapımı
47	Elma sirkesi	Sinop	Ev yapımı
48	Elma sirkesi	Sinop	Ev yapımı
49	Elma sirkesi	Sinop	Ev yapımı
50	Elma sirkesi	Sinop	Ev yapımı
51	Elma sirkesi	Sinop	Ev yapımı
52	Üzüm sirkesi	Tokat	Ev yapımı
53	Elma sirkesi	Adıyaman	Ev yapımı
54	Elma sirkesi	Rize	Ev yapımı
55	Elma sirkesi	Malatya	Ev yapımı
56	Üzüm sirkesi	Antalya	Ev yapımı
57	Elma sirkesi	Adana	Ev yapımı
58	Elma sirkesi	Aydın	Ev yapımı
59	İncir sirkesi	Ankara	Ev yapımı
60	Organik elma sirkesi	Niğde	Ticari
61	Organik elma sirkesi	Niğde	Ticari

Tablo 3'te verilen 24 ve 25 numaralı sirke örnekleri, doğal sirke örnekleri olmayıp konsantre asetik asitin sulandırılması ile elde edilen yapay ticari sirke örnekleridir. Şekil 5'te, bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden temin edilen sirke örneklerinin illere göre dağılımı görülmektedir.

* Sirke örneklerinin temin edildiği iller sarı renk ile gösterilmiştir.

Metot

pH tayini

Asitlik tayini

V: Harcanan 0.1 N NaOH miktarı, ml

Briks derecesinin belirlenmesi

Briks derecesi ($^{\circ}\text{Bx}$), sulu bir çözeltideki çözünmüş şekerin derecesidir. Bu amaçla, el refraktometresi (Soif VBR20-T) kullanılarak sirke numunelerinin $^{\circ}\text{Bx}$ tespit edilmiştir (Güzel ve Bahçeci 2020).

Sirke örneklerinin mikrobiyolojik analizleri

Her bir sirke örneği için %0.85'lik steril fizyolojik tuzlu su kullanılarak uygun dilüsyonlardan ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda 30-300 arası koloni içeren petri plakları sayılarak sonuçlar log kob (koloni oluşturan birim)/ml olarak verilmiştir (McLandsborough 2005; Megep 2011).

Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı

Yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak örneklerde bulunan TAMB sayıları belirlenmiştir. Bu amaçla, Plate Count Agar (PCA, Merck) içeren petri plakları kullanılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra petri plakları $30-32^{\circ}\text{C}$ 'de 48 sa aerobik ortamda bekletilmiştir. (Halkman 1995; Pichhardt 2004; TS EN ISO 4833-1 2014).

Koliform grubu bakterilerin sayımı

Violet Red Bile Agar (VRBA, Merck) kullanılarak örneklerde bulunabilecek koliform grubu bakterilerin sayımı için, dökme yöntemi ile mikrobiyolojik ekim gerçekleştirilmiştir. Petri plaklarına çift kat dökme yapılarak, petri plakları $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örneklerde bulunan koliform grubu bakterilerin sayısı tespit edilmiştir (Mercuri and Cox 1979; TS ISO 4832 2010).

Muhtemel asetik asit bakterilerinin sayımı ve izolasyonu

Muhtemel AAB sayım ve izolasyonunun gerçekleştirilmesinde Glukoz-Yeast extract-Calsium carbonat agar (%5 D-glukoz, %1 maya ekstraktı, %0,005 Bromcresol purple, %1 CaCO_3 , %1.5 agar agar; GYC) besiyeri kullanılarak örneklerden ekimler yapılmıştır. Küf ve maya gelişiminin önlenmesi amacıyla, besiyeri steril edildikten sonra Cycloheximide (100 ppm) katılmıştır. Ardından, petri plaklarına ekim yapılarak 30°C 'de 48 sa inkübe edilmiştir. Makroskobik ve mikroskobik incelemeler eşliğinde muhtemel AAB sayım ve izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir (Sharafi *et al.* 2010; Kadiroğlu and Çetin 2023).

Çalışma boyunca elde edilen genç kültürler, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %40 gliserol eşliğinde -80°C 'de muhafaza edilmiştir (Bilginer 2018).

Maya-küf sayımı ve mayaların izolasyonu

Örneklerde bulunan maya ve küflerin sayımında, steril Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) besiyeri %10'luk steril laktik asit çözeltisi eklenerek kullanılmıştır. Yayma yöntemi ile ekim yapılarak petri plakları 5 gün kadar oda sıcaklığında (25°C) inkübe edilmiştir. (TS ISO 21527-1 2014)

Seçilen ve elde edilen genç maya kültürleri, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %40 gliserol eşliğinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir (Bilginer 2018).

Gram boyama

İzolasyonu gerçekleştirilen bakteri suşlarının gram özelliklerinin belirlenmesi amacı ile gram boyama işlemi yapılmıştır. İlk olarak, bir damla distile su temiz bir lam üzerine damlatılarak genç kültür su içerisinde dağıtılmıştır. Hazırlanan preparat, ateşten geçirildikten sonra kristal viyole ile boyanıp 1 dk bekletilmiştir. Daha sonra, distile su kullanılarak kristal viyole boyası akıtılmış ve lam üzerine lugol çözeltisi yayılıp 1 dk bekletilmiştir. Lugol lam üzerinden aktıktan sonra, etil alkol ile 10-15 sn ve daha sonra da su ile yıkama yapılmıştır. Ardından, sulu karbol füksin kullanılarak 30 sn süreyle boyanmıştır. Su kullanılarak boya akıtılmış ve preparat kuruması için bekletilmiştir. Kuruyan preparat, mikroskopta incelenmiştir. Pembe renkli olan bakteriler gram-negatif, mor renkli olanlar ise gram-pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sert 2011).

Katalaz testi

Bakteri izolatlarının üzerine birkaç damla %3'lük H₂O₂ (Merck) çözeltisinden damlatıldıktan sonra gaz çıkışı olan örnekler katalaz pozitif, gaz çıkışı olmayan örnekler ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Pichhardt 2004).

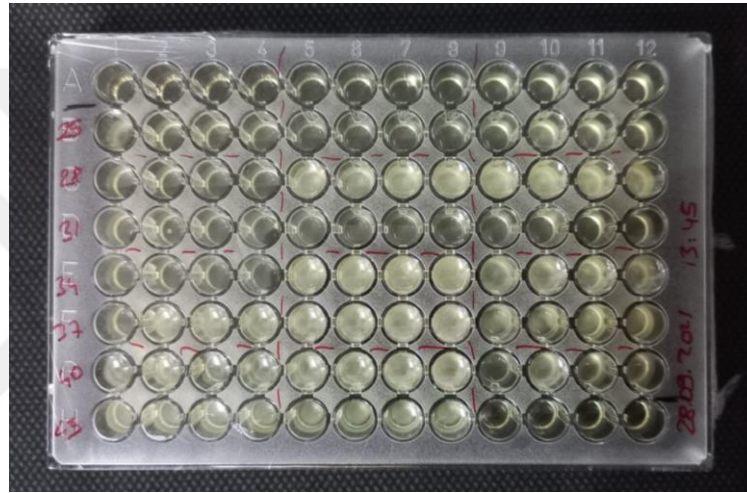
Muhtemel asetik asit bakterisi ve maya izolatlarının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi

Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi

AAB starter kültür kullanım olanaklarının tespit edilmesi amacıyla; suşların glukoz toleransı, etanol toleransı, farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri, asetik asit toleransı, farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri ve asetik asit üretim hızı gibi bazı temel ve spesifik özellikleri araştırılmıştır.

Glukoz toleransı

Gullo and Giudici (2006) tarafından önerilen glukoz tolerans metodu bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Taze kültürler uygun şekilde (10^5 kob/ml) seyreltilerek 10 µl alınmış ve farklı şeker konsantrasyonlarına sahip (%20-25-30) SM Broth içerisine inoküle edilmiştir. Kültürler 5-10 gün boyunca 28°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon amacıyla 96 kuyucuklu plateler (Şekil 6) kullanılarak okumalar Plate Reader cihazında (Epoch, BioTek) yapılmıştır. Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 6. 96 kuyucuklu plate örnekleri

Etanol toleransı

Gullo and Giudici (2006) tarafından önerilen metot, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Taze kültürler uygun şekilde (10^5 kob/ml) seyreltilerek 10 µl alınmış ve farklı etanol konsantrasyonlarına sahip (%2-5-10) SM Broth (%0.5 maya ekstraktı, %5 glukoz) içerisine inoküle edilmişlerdir. Bu işlemin ardından, kültürler 5-10 gün boyunca 28°C'de inkübe edilmiştir. Analiz, kuyucuk hacmi 150 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plateler (Şekil 6) kullanılarak minyatürize edilmiştir. Sonuçlar ise, bulanıklık durumu 600 nm dalga boyunda çalışılan microplate readerde (Epoch, Biotek) okunarak kaydedilmiştir. Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.

Farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri

AAB kültürlerinin farklı pH değerlerinde gelişimlerinin belirlenmesi amacıyla 0.1 N HCl (Merck) çözeltisi ve 0.1 N NaOH (Merck) çözeltisi kullanılarak, pH değerleri 2.5; 3.9; 5; ve 8.5 olarak ayarlanmış SM Broth besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerisine yoğunluğu Mc Farland 1 olan bakteri süspansiyonundan 10 µl oranında eklenerek 28°C'de 48 sa inkübe edilmişlerdir. Okumalar Plate Reader'da (Epoch, BioTek) 600 nm'de yapılarak absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.

Asetik asit toleransı

Taze kültürler uygun şekilde (10^5 kob/ml) seyreltildikten sonra, 10 µl alınarak farklı asetik asit konsantrasyonlarına sahip (%1-2-4-6) SM Broth içerisine inoküle edilmiştir. Kültürler 5-10 gün boyunca 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon amacıyla 96'lık plateler (Şekil 6) kullanılarak okumalar Plate Reader cihazında (Epoch, BioTek) gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir (Gullo and Giudici 2006).

Farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri

Farklı sıcaklıklarda gelişimin tespit edilmesi için, yoğunluğu Mc Farland 1 olan bakteri süspansiyonlarından SM Broth besiyerine inokülasyon yapılmıştır. 4, 10, 20 ve 40°C sıcaklıklarda 3 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiş ve inkübasyondan sonra gözlenen bulanıklık pozitif olarak değerlendirilmiştir. Denemede 96'lık plateler (Şekil 6) kullanılarak sonuçlar microplate readerde (Epoch, Biotek) 600 nm'de okunmuştur. Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.

Asetik asit üretim hızı

İzolatların asit oluşturma yeteneklerinin ve hızlarının belirlenmesi amacı ile Wu *et al.* (2018)'in metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Kültürler SM Broth (%0,5 maya ekstraktı, %5 glukoz, %5 etanol) içerisine alınarak, 30°C'de 48 sa süre aktiveleştirilmişlerdir. Hazırlanan ön kültürler 10 ml steril %5 SM Broth sıvı besiyerine %10 oranında inokule edilmiş ve 28°C'de

150 rpm’de 48 sa süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 12, 24, 48. saatlerinde 0.5 ml örnek alınarak üzerine 20 ml saf su ilave edilerek karışım birkaç damla %3'lük fenolftalein damlatılmış ve 0.01 N NaOH (Merck) çözeltisiyle hafif pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan miktar değerlendirilerek toplam asitlik, %asetik asit cinsinden belirlenmiştir (Arslankoz 2011).

Titrasyona ek olarak, %5 etanol içeren SM Broth besiyerinin başlangıç ve inkübasyon sonrası pH değerleri de takip edilmiştir. Tampon çözeltilerle kalibre edildikten sonra pH metre probu homojenize örneklerle daldırılarak sirke örneklerinin pH değerleri belirlenmiştir (Kou *et al.* 2022).

Maya izolatlarının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi

Mayaların starter kültür kullanım olanaklarının tespit edilmesi amacıyla; farklı şeker konsantrasyonlarında, düşük pH değerlerinde ve farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yeteneklerinin tespit edilmesi gibi bazı özellikler belirlenmeye çalışılacaktır.

Farklı şeker konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri

Farklı şeker konsantrasyonlarında gelişimin belirlenmesi amacıyla, Senses-Ergul and Ozbas (2016) tarafından önerilen metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Mc Farland 1 yoğunluğundaki maya süspansiyonlarından Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD; glukoz 20 g/l, maya ekstraktı 10 g/l, pepton 20 g/l) broth besiyerine inokülasyon yapılmıştır. Broth besiyerinin şeker konsantrasyonu glukoz ile %20, 25 ve 30 şeker düzeyine ayarlanarak inkübasyonda 96’lık plateler (Şekil 6) kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda gözlenen bulanıklık 600nm dalga boylu ışık ile microplate readerde (Epoch, Biotek) okunarak değerlendirilmiştir. Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.

Düşük pH değerlerinde gelişme yetenekleri

Maya izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla, Senses-Ergul and Ozbas (2016) tarafından önerilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için, Mc Farland 1 yoğunluğundaki bakteri süspansiyonlarından 0,1 N HCl (Merck) kullanılarak pH değerleri 3 ve 4’e ayarlanmış olan YEPD broth besiyerlerine inokülasyon yapılmıştır. Denemede 96’lık plateler kullanılmış olup (Şekil 6) ilgili plateler inkübasyonun ardından microplate readerde (Epoch, Biotek) 600nm dalga boylu ışıktaki

okunarak değerlendirilmiştir. Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.

Farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri

Farklı sıcaklıklarda gelişimin belirlenmesi amacıyla, Nikolaou *et al.* (2006) tarafından önerilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla, Mc Farland 1 yoğunluğundaki maya süspansiyonlarından YEPD broth besiyerine inokülasyon yapıldıktan sonra 10, 20 ve 37°C sıcaklıklarda 5 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 96'lık platelerde (Şekil 6) gerçekleştirilen inkübasyon sonucunda, meydana gelen bulanıklık 600nm dalga boylu ışık ile microplate readerde (Epoch, Biotek) okunarak kaydedilmiştir. Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.

Muhtemel asetik asit bakterisi ve maya izolatlarının probiyotik kültür özelliklerinin belirlenmesi

Bir mikroorganizmanın probiyotik olup olmadığını anlamak için bazı *in vitro* ve *in vivo* testlerin yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada AAB ve maya izolatları için; safra tuzuna tolerans, mide ortamına direnç, hidrofobisite, oto-agregasyon ve ko-agregasyon, safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesi, virülans faktör genlerin tespiti, hemolitik aktivite, DNaz aktivitesi, antibiyotik direnci testleri gerçekleştirilmiştir.

Safra tuzuna tolerans

Gıda ile alınan mikroorganizmalar ağız ile başlayıp alt bağırsak kanalına doğru bir yolculuğa çıkmakta ve gastrointestinal kanaldan geçişleri sırasında hayatta kalmalarını etkileyen ardışık stres faktörlerine maruz kalmaktadırlar. Bu faktörlerden biri olan safra, ince bağırsakta salgılanıp bakterilerin hücre zarı yapısında bulunan lipidleri ve yağ asitlerini tahrip ederek antimikrobiyal etkisini göstermektedir. Bu nedenle, muhtemel probiyotik bir mikroorganizmanın bağırsaklarda etkisini gösterebilmesi için safraya karşı dirençli olması gerekmektedir (Succi *et al.* 2005).

Bu amaçla, mikroorganizmaların safra tuzlarına toleransının incelenmesi için; izolatların %0.3 safra tuzu (Merck) konsantrasyonlu uygun broth (SM ve YEPD) besiyerinde gelişimleri takip edilmiştir. 96'lık plateler (Şekil 6) kullanılarak 37°C'de 48 sa inkübasyon

boyunca ölçümler gerçekleştirilmiş ve 600 nm dalga boyunda okuma (Epoch, BioTek) yapılarak izolatların safra direnci belirlenmiştir (Zago *et al.* 2011; Elcioglu ve Kunduhoglu, 2014; Çetin ve Çırpıcı 2023). Absorbans değerlerine göre, kör numune ile aynı absorbansı veren suşlar -; <0.50 absorbans gösteren suşlar z; 0.50-0.75 absorbans gösteren suşlar +; 0.75-1.00 absorbans gösterenler ++; 1.0-1.5 absorbans gösteren suşlar +++; >1.5 absorbans gösteren suşlar y olarak değerlendirilmiştir.

Mide ortamına direnç

Mikroorganizmalar gıdalarla vücuda alındıktan sonra maruz kaldıkları bir diğer stres faktörü de mide ortamıdır. Gıdaların, pH değeri 2.0'ye kadar düşebilen mideye girişten çıkışına kadarki geçen süreleri birkaç saat olup diğer sindirim süreçleri daha uzun zaman almaktadır. Bu nedenle, muhtemel probiyotik mikroorganizmaların insan mide ortamına direnç gösterip bağırsaklara kadar ulaşabilmesi beklenmektedir (Succi *et al.* 2005; Fuochi *et al.* 2015).

İzolatların mide ortamını geçerek ince bağırsağa ulaşabilme yeteneklerini belirlemek için mide sıvısı simülasyonu kullanılmıştır. Bunun için; %0.5 (w/v) NaCl ve %0.3 (w/v) pepsin içeren bir karışım hazırlanarak HCl (Merck) ile pH 3'e ayarlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan çözeltiye 10^6 kob/ml bakteri inokülasyonu yapılarak 37°C'de 3 sa bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından, uygun broth (SM ve YEPD) besiyerine ekim yapıp 30°C'de 24 sa inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyonda 96'lık plateler (Şekil 6) kullanılmış olup 600nm'de okuma (Epoch, BioTek) gerçekleştirilmiştir. Platelerde mideyi geçtiği tespit edilen izolatların, mideyi ne düzeyde geçtiğini belirlemek amacıyla PDA ve GYC agara ekimleri yapılmıştır. Ekim sonucunda elde edilen sayılar formülde yerine konularak, izolatların simüle mide ortamına toleransları tespit edilmiştir (Elcioglu ve Kunduhoglu 2014; Talebi *et al.* 2018; Shaheen *et al.* 2019).

$$P = \log NT / \log N0 \times 100$$

P : Simüle mide ortamında canlılık

NT : Simüle mide ortamında bekletilen izolatın 3. saatteki canlılığı

N0 : Simüle mide ortamında bekletilen izolatın 0. saatteki canlılığı

Oto-agregasyon ve ko-agregasyon kapasitesinin belirlenmesi

Probiyotikler safra tuzları ve mide asidine direnç gösterdikten sonra ince bağırsağa ulaşmakta ve ilk olarak mukus tabakası ile temas etmektedirler. Probiyotiklerin bağırsak lümenini kaplayan mukus tabakasına ve epitel hücrelerine tutunması ince bağırsaktan dışarı

kaymamalarını sağlamaktadır. Bu tutunma sayesinde, patojenlerin bağırsak yüzeyine tutunmasının engellenmesi ve probiyotiklerin faydalı etkilerini gösterebilmesi sağlanmaktadır. Bir mikroorganizmanın mukus tabakasına tutunabilmesi o mikroorganizmanın agregasyon ve hidrofobisite kapasitesi ile ilişkilidir (Bilginer and Çetin 2019; Krausova *et al.* 2019).

Hücre yüzeyinin agregasyon (oto-agregasyon ve ko-agregasyon) kapasitesinin belirlenmesi amacıyla kültürler; 15 dakika (4°C) 5000×g’de santrifüj edildikten sonra elde edilen pelet PBS (Fosfat buffer salin-pH 7.2) ile 2 kez yıkanmış olup ilk ölçüm 600 nm’de aynı tamponda gerçekleştirilmiştir (0.saat-A₀). 37°C’de 4 sa inkübasyonun ardından 600 nm’de ikinci ölçüm yapıp, bekletilen süre sonundaki (A_t) absorbans değerleri oto-agregasyon formülünde yerine konularak oto-agregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır. İzolatların ko-agregasyon kapasitelerinin belirlenmesinde *Escherichia coli* BC12, *Salmonella* Typhimurium RSHMB 95091, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 patojenleri kullanılmıştır. Probiyotik kültür (A_{pro}), patojen kültür (A_{pat}) ve probiyotik-patojen içeren karışık kültür (A_{mix}) için ayrı ayrı yukarıda belirtilen işlemler gerçekleştirilip ko-agregasyon formülünde yerine konularak ko-agregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır (Tomičić *et al.* 2022; Zawistowska-Rojek *et al.* 2022).

$$\text{Otoagregasyon (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

$$\text{Koagregasyon (\%)} = (A_{\text{pro}} + A_{\text{pat}}) / 2 - A_{\text{mix}} / ((A_{\text{pro}} + A_{\text{pat}}) / 2) \times 100$$

Hidrofobisite

Hücre yüzeyi hidrofobikliği testinde, ilk olarak taze kültürler 8000×g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pelet PBS ile yıkandıktan sonra tekrar PBS ile hücre yoğunluğu 10⁸ kob/ml olacak şekilde ayarlanmış olup 600 nm’de absorbans değeri (A₀) ölçülmüştür. Bu süspansiyondan 3 ml alınıp üzerine ksilen eklenerek vorteks yardımı ile 2 dakika karıştırılmıştır. Süspansiyon, fazların ayrılması gerçekleşinceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Beklemeden sonraki sıvı fazın absorbans değeri (A_t) ölçülmüş olup hidrofobisite formülü kullanılarak hidrofobisite yüzdesi tespit edilmiştir (Seddik *et al.* 2017; Diguță *et al.* 2022).

$$\text{Hidrofobisite (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Antibiyotik ve antifungal direnci

Bir bakterideki antibiyotik direnç geni diğer bir bakteriye çeşitli mekanizmalarla aktarılabilirdiğinden dolayı probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmanın antibiyotik direncinin olması arzu edilmemektedir. Çünkü antibiyotik direnç geninin patojenlere geçmesi

halinde tedavisi zor veya mümkün olmayan hastalıklara neden olabileceğinden dolayı, bu durum küresel bir sağlık tehdidi haline gelmektedir (Fraqueza *et al.* 2015).

AAB izolatlarının antibiyotik dirençleri, EFSA (European Food Safety Authority) tarafından önerilen 9 farklı antibiyotik disk (ampisilin, gentamisin, vankomisin, kanamisin, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin, klindamisin ve kloramfenikol) kullanılarak disk difüzyon metodu (DD) ile yapılmıştır (Bilginer ve Çetin 2019).

Maya izolatlarının antifungal dirençleri ise 7 farklı antifungal disk (amfoterisin B, nistatin, mikonazol, flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, vorikonazol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Boranbayeva *et al.* 2020; Fernández-Pacheco *et al.* 2021).

Hücre yoğunluğu 10^6 kob/ml olan genç kültürler uygun agar (GYC ve YEPD) besiyerine homojen bir şekilde yayıldıktan sonra, antibiyotik diskler uygun aralıklarla besiyerine yerleştirilmiştir. Petri kutuları AAB ve mayalar için uygun olan sıcaklıklarda 18 sa inkübe edildikten sonra, zon çapları mm olarak ölçülerek izolatların antibiyotik ve antifungal dirençleri belirlenmiştir. Hiç zon oluşturmamayanlar ise dirençli olarak olarak D harfi ile gösterilmiştir (Liasi *et al.* 2009; Haghshenas *et al.* 2015).

Virülans faktör genlerin tespiti

Virülans bir patojenin konakçıya zarar verme yeteneğini ifade etmektedir. Bazı bakteri türleri konakçıda hastalığa neden olma ve konakçı savunma bariyerlerinden aşarak çoğalabilme gibi bazı virülans faktör genlerine sahiptirler (Cui *et al.* 2020). Starter veya probiyotik olarak kullanılacak olan bir mikroorganizmada virülans genlerinin bulunması tercih edilmemektedir (Dlamini *et al.* 2019).

AAB izolatlarında *esp*, *hyl*, *gelE*, *cylA*, *asa1*, *ace*, *efaAfs*, *agg* virülans faktör genlerinin varlığı PCR işlemi gerçekleştirilerek tespit edilmiştir. Bu amaçla, PCR tüpüne primer (1 µl), master mix (7.5 µl) (2x PCR Master Mix, EcoTaq), template DNA (1 µl) ve deiyonize su (5.5 µl) kullanılarak toplam hacim 15 µl'ye ayarlanmıştır. Örnekler 98°C'de 30 sn ilk denatürasyon; ardından 30 döngü olacak şekilde 94°C'de 10 sn denatürasyon, bağlanma sıcaklığında (T_m) 15 sn bağlanma, 72°C'de 15 sn uzama; 72°C'de 1 dk son uzama olacak şekilde PCR işlemine tabi tutulmuşlardır. PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra ürünler, agaroz jelde (Sigma Aldrich) 30V elektrik akımında 6 sa yürütülerek AAB izolatlarında virülans genlerin varlığı belirlenmiştir. Tablo 4'de virülans faktör genlerin tespitinde kullanılan primerler ve primerlere ait bazı bilgiler yer almaktadır.

Tablo 4. Virölans faktör genlerin tespitinde kullanılan primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Hedef gen	Amplikon uzunluğu (bp)	Kaynak
esp-F esp-R	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCAATTGCCGAA	<i>esp</i>	933	Leavis <i>et al.</i> (2004)
HYLn1 HYLn2	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	<i>hyl</i>	276	Kiruthiga <i>et al.</i> (2020)
gelE-F gelE-R	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	<i>gelE</i>	419	Vankerckhoven <i>et al.</i> (2004)
cylA F cylA R	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	<i>cylA</i>	517	Kiruthiga <i>et al.</i> (2020)
asa11 asa12	GCACGCTATTACGAACTATGA AAGAAAGAACATCACCACGA	<i>asa1</i>	375	Kiruthiga <i>et al.</i> (2020)
ace F ace R	GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	<i>ace</i>	1008	Łysakowska <i>et al.</i> (2012)
efaAfs F efaAfs R	GACAGACCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGTAGTA	<i>efaAfs</i>	705	Nowakiewicz <i>et al.</i> (2017)
agg F agg R	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	<i>agg</i>	1553	Soares <i>et al.</i> (2014)

Safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesi

BSH aktivitesi, bakterilerin bağırsakta hayatta kalmasını ve kolonileşmesini sağlamaktadır. BSH aktivitesine sahip probiyotik suşlar safra asitlerinin miktarını düşürerek kan serumu kolesterolünü de düşürmekte ve insan sağlığı açısından potansiyel bir öneme sahip olmaktadır (Corzo and Gilliland 1999; Jones *et al.* 2004; Ertürkmen *et al.* 2023).

BSH aktivitesinin belirlenmesinde, Mc Farland 1 yoğunluğundaki bakteri ve maya süspansiyonlarından 10 µl alınarak Bile Esculine Agar (BEA, Condalab) üzerine damlatılmış ve 37°C'de 24 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra siyah zon oluşturmeyenler BSH negatif olarak değerlendirilirken, siyah zon oluşturan izolatların zon çapı ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Franz *et al.* 2001).

Hemolitik aktivite

Kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasına neden olan maddeye hemolizin denilmekte ve bir mikroorganizmanın hemolize neden olup olmadığı hemolitik aktivite testi ile belirlenmektedir (Lad *et al.* 2022). İzolatın potansiyel virölansını gösteren hemolitik aktivite, probiyotik seçiminde önemli güvenlik testlerinden biridir. Dolayısıyla probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmanın hemolitik aktivitesinin olması arzu edilmemektedir (Gebre *et al.* 2023).

Hemolitik aktivitenin belirlenmesi için, izolatların üreyebileceği uygun besiyerlerine (GYC ve YEPD agar) %5 defibrile koyun kanı eklendikten sonra izolatlar bu besiyerlerine

izilmiştir. 37°C’de 24 sa inkübasyondan sonra berrak zon oluşturanlar ̢-hemolitik, parlak yeşil zon oluşturanlar ̡-hemolitik ve zon oluşturmayanlar ise ̣-hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Adetoye *et al.* 2018).

DNaz aktivitesinin belirlenmesi

DNazlar DNA’yı hidrolize eden enzimlerdir ve probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda DNaz aktivitesinin belirlenmesi bir güvenlik değerlendirmesi olarak görülmektedir (Evans and Aguilera 2003; Fernndez-Pacheco *et al.* 2021).

DNaz aktivitesinin belirlenmesinde, izolatlar DNaz besiyerine (Merck) izildikten sonra 37°C’de 48 sa inkübe edilmişlerdir. Inkbasyonun ardından petri kutusu yüzeyine 1N HCl (Merck) damlatılıp 5 dak kadar beklenilmiştir. Beklenen süre sonunda berrak zon oluşturan suşlar DNaz pozitif, zon oluşturmayan suşlar ise DNaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Akay *et al.* 1985; Lavilla-Lerma *et al.* 2013).

Sirke örneklerinden elde edilen izolatların moleküler tanısı

Örneklerden izole edilen muhtemel AAB ve maya suşlarının moleküler tanıları gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonu

-80°C’de depolanan izolatlar tekrar canlandırıldıktan sonra moleküler analizleri gerçekleştirilmiştir. Canlandırılan kültürlerin DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi için, izolatlar steril saf su içerisine aktarılmış ve McFarland Densitometre (DEN1, Biosan) ile yoğunlukları McFarland 5’e ayarlanmıştır.

Muhtemel AAB suşlarının DNA izolasyonu için; bakteri süspansiyonu 12000 g’de 5 dak santrifüj edildikten sonra steril damıtılmış saf su ile yıkanmıştır. Peletler EDTA tamponunda (0.15 M NaCl ve 1M EDTA, pH 8.0) süspanse edilmiş ve 10 mg/ml lizozim enzimi eklenerek hücrelerde lizis gerçekleştirilmiştir. 10 mg/ml RNase ilave edildikten sonra tüpler 37°C’de 30 dak inkübe edilmiştir. Süspansiyon içerisine 20 mg/ml Proteinaz K eklendikten sonra rnekler 37°C’de 60 dak inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 40 l %25 sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu eklenmiş ve 65°C’de 10 dak daha inkübe edilmiştir. 180 l 5 M sodyum asetat solüsyonu ilave edildikten sonra, hücre polisakkaritleri 100 l %2 setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) solüsyonu ilave edilerek elimine edilmiştir. Ardından rnekler 10000 g’de 10 dak santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Kromozomal DNA, kloroform/izoamilik alkol (25:1 v/v) ile ekstrakte edilerek iki kez daha saflaştırılıp st sulu fazlar yeni tüplere aktarılmış ve iki kez soğuk mutlak etanol eklenerek çöktürme sağlanmıştır.

Son olarak, kromozomal DNA 100 µl ultra saf su içinde yeniden süspanse edilmiştir (Gullo *et al.* 2006).

Sirke örneklerinden elde edilecek maya izolatlarının DNA izolasyonu için, maya hücresi 100 uL 200 mM LiOAc ve %1 SDS çözeltisi içinde süspanse edildikten sonra 70°C'de 15 dak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, süspansiyona 300 uL %96'lık etanol eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Ardından, 15000 g'de 3 dak santrifüj işlemi yapılarak DNA çöktürülmüştür. Çöken DNA, 100 uL TE içinde çözüldükten sonra 15000 g'de 1 dak santrifüj edilerek elde edilen süpernatant PCR işlemi için kullanılmıştır (Löoke *et al.* 2011).

DNA izolasyon aşamasından sonra, süspansiyonun µl'indeki DNA konsantrasyonu ve PCR işleminde kullanılmak üzere gerekli olan süspansiyonun miktarını belirlemek için, 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapan nanodrop spektrofotometre kullanılmıştır (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek).

DNA amplifikasyonu

DNA izolasyonu gerçekleştirilen muhtemel AAB izolatlarının tanısında Rep-PCR (Repetitive Element Sequence-based PCR) tekniği kullanılmış olup, GTG₅ primeri ile çalışılmıştır. Bu amaçla tüp ortamına, GTG₅ (5'-GAGGAGGGTGGCGGTTCT-3') primeri (1 µl), master mix (7.5 µl) (2x PCR Master Mix, EcoTaq), Template DNA (1 µl), deiyonize su (5.5 µl) hazırlanarak toplam hacim 15 µl'ye ayarlanmıştır. Örnekler 98°C'de 30 sn ilk denatürasyon; ardından 35 döngü 94°C'de 10 sn denatürasyon, 55°C'de 15 sn bağlanma, 72°C'de 15 sn uzama; 72°C'de 1 dak son uzama olacak şekilde PCR işlemine tabi tutulmuşlardır. PCR işlemi ile amplifiye olan ürünler, agaroz jelde (Sigma Aldrich) 30V elektrik akımında 6 sa süre ile yürütülmüştür. Yürütme işleminin ardından, UV ışık altında her bakteriye ait fingerprintler elde edilerek benzerlikler tespit edilmiştir. Oluşturulan her benzer gruptan bir adet temsili örnek seçilerek 16S rRNA sekans analizi için kullanılmıştır (Gullo *et al.* 2006).

DNA izolasyonu yapılan maya izolatlarının tanısında ise, M13 (5'-GAGGAGGGTGGCGGTTCT-3') primeri kullanılarak fingerprintler elde edilmiştir. Bu amaçla; M13 primeri (1 µl), master mix (7.5 µl) (2x PCR Master Mix, EcoTaq), template DNA (1 µl) ve deiyonize su (5.5 µl) kullanılarak toplam hacim 15 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. Örnekler 98°C'de 30 sn ilk denatürasyon; ardından 30 döngü 94°C'de 10 sn denatürasyon, 61°C'de 15 sn bağlanma, 72°C'de 15 sn uzama; 72°C'de 1 dak son uzama olacak şekilde PCR işlemine tabi tutulmuşlardır. PCR işlemi ile amplifikasyonu gerçekleştirilen ürün, agaroz jelde (Sigma Aldrich) 30V elektrik akımında 6 sa yürütüldükten sonra görüntüleme

cihazı ile fingerprint görüntüleri elde edilmiştir. Oluşturulan her benzer gruptan bir adet temsili örnek seçilmiş ve 26S rRNA sekans analizi için kullanılmıştır (Esen and Çetin 2021).

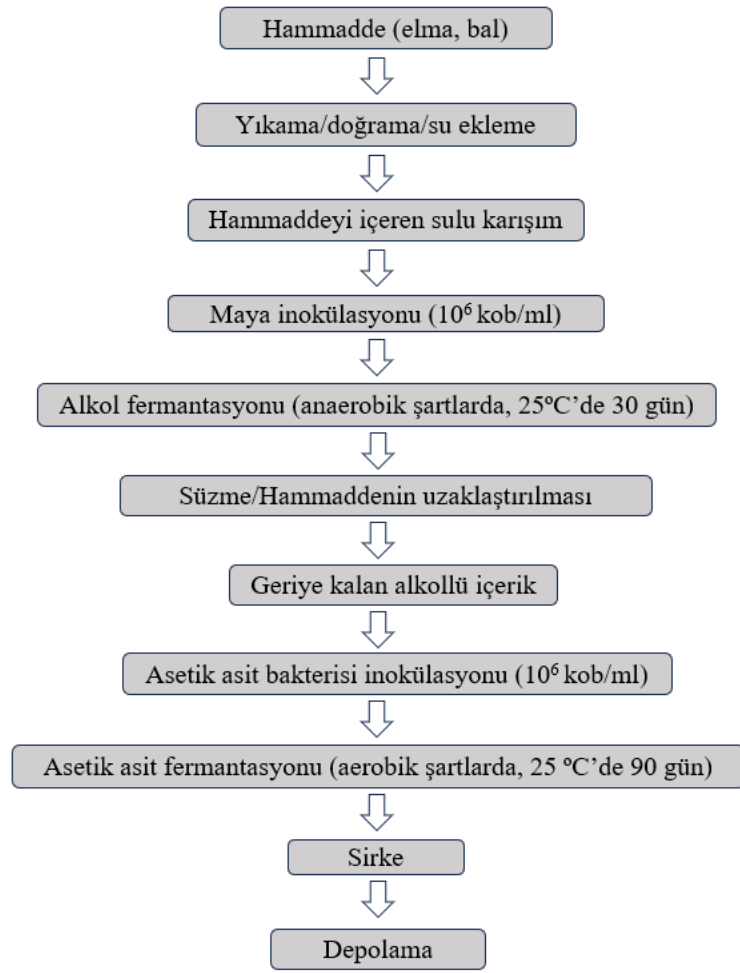
16S ve 26S rRNA analizleri ile tanılama

Rep-PCR ile muhtemel AAB izolatlarının genotiplendirmesi gerçekleştirildikten sonra, izolatlar farklılıklarına göre gruplandırılıp temsili örnekler seçilmiştir. Seçilen örnekler için 16S rRNA gen bölgesine spesifik bir primer seti 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1541 R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') kullanılmıştır. PCR işlemi tamamlanan örnekler agaroz jelde yürütüldükten sonra DNA dizi analizinin gerçekleştirilmesi için hizmet alımı yapılmıştır. Dizi analizi sonuçları ise NCBI (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veritabanındaki BLAST programı ile değerlendirilmiştir (Demirok *et al.* 2023; Kadiroğlu and Çetin 2023).

RAPD-PCR ile maya izolatlarının genotiplendirmesi gerçekleştirildikten sonra, farklılıklarına göre gruplandırılıp seçilen temsili örnekler için, yaklaşık 600 bp (baz çifti) büyüklüğündeki 26S rRNA D1-D2 bölgesine uygun primer seti NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') ve NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerin PCR işlemi sonucu elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve ardından DNA dizi analizinin gerçekleştirilmesi için hizmet alımı yapılmıştır. Sonuçlar NCBI veri tabanında bulunan BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiştir (Gerard *et al.* 2023; Günay and Genç 2023).

Sirke üretimi

Bölgemiz sürdürülebilir tarım üretimine katkı sağlamak amacıyla, özellikle ilimiz ve çevre iller dikkate alınarak elmalı ballı sirkeler üretilmeye çalışılmıştır. Elmalar Erzurum ilinin Tortum ilçesi Şenyurt köyünden; bal ise Bingöl Üniversitesi Satış Ofisi'nden temin edilmiştir. Temin edilen elmaların ve balın tamamen doğal şartlarda yetiştirilen ürünler olmasına dikkat edilmiştir. Bu çalışmada sirke üretirken kullanılan üretim akış şeması Şekil 7'de görülmektedir. Üretim, Özdemir and Budak (2022)'den modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.



Şekil 7. Sirke üretiminde kullanılan üretim akış şeması

Sirke üretiminde kullanılan doğal elmalar ve doğal bal Şekil 8’de görülmektedir. Çalışma kapsamında üretilmiş olan sirkeler, Tablo 5’de belirtilen özellikleri içermektedir. Tabloya bakıldığında, ELBL1 kodlu olan örneğin maya ve AAB içerdiği, ELBL2 kodlu olan örneğin maya ve AAB içermediği görülmektedir.



Şekil 8. Sirke üretiminde kullanılan doğal elmalar (A) ve doğal bal (B)

Tablo 5. Üretimi gerçekleştirilen sirkeler, kodları, gıda ve mikroorganizma içerikleri

Örnek	Kodu	Gıda içeriği		Mikroorganizma içeriği	
		Elma	Bal	Maya	AAB
Elmalı ballı probiyotik sirke	ELBL1	+	+	+	+
Elmalı ballı sirke	ELBL2	+	+	-	-

Üretilen sirke örneklerinin fizikokimyasal analizleri

Üretilen sirke örneklerinin pH, asitlik ve briks analizleri yukarıda sunulan “pH tayini”, “Asitlik tayini” ve “Briks derecesinin belirlenmesi” başlıklar çerçevesinde belirtilen metodlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Üretilen sirke örneklerinin mikrobiyolojik analizleri

Üretilen sirke örneklerinin fermantasyon boyunca mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiş olup yapılan işlemler yukarıda verilen “Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı”, “Koliform grubu bakterilerin sayımı”, “Muhtemel asetik asit bakterilerinin sayımı” ve “Maya-küf sayımı ve mayaların izolasyonu” adlı başlıklarda sunulan metodlar dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

Üretilen sirke örneklerinin antimikrobiyal etkileri

Sirkenin antimikrobiyal etkilerinin bulunduğunu bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Saqib 2017; Gökırmaklı vd 2019). Bu çalışmada, üretilen sirkelerin; *S. Typhimurium* RSHMB 95091, *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* BC12, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Candida albicans* ATCC 1223, *Aspergillus niger* ATCC 16888 patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amacıyla agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

Sirke örneklerinin antimikrobiyal etkisinin pH değerlerinden kaynaklı olup olmadığını görmek amacıyla, sirke örneklerinin pH değerleri nötrlenerek (pH 7.0) ve nötrlenmeden olmak üzere iki farklı parametre kullanılarak birbirleriyle kıyaslanmıştır. Daha sonra, steril fizyolojik tuzlu su içerisinde patojenlerin 0.5 McFarland aktif kültürü hazırlanarak BHI agar ve SDA (Sabouraud Dextrose Agar) içeren petri kutularına yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından her bir petri kabında 5 mm çapında kesilmiş olan kuyucuklar hazırlanmıştır. Açılan kuyucuklara 100 µL sirke örneklerinden konularak patojen bakteriler içeren petri kutuları 37°C’de 18 sa, patojen maya ve küfler 25°C’de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucuk

etrafında oluşan zon çapları mm olarak ölçülerek sirke örneklerinin antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir (Ousaaaid *et al.* 2021)

İstatistiksel analiz

Çalışma kapsamında elde edilen verilerin istatistiki olarak değerlendirilmesinde SPSS for Windows Release ver. 20.00 paket programından faydalanılmıştır. Temin edilen sirke örneklerinin pH, asitlik ve briks değerleri arasındaki farklılığın tespitinde Paired Samples T-Test uygulanmıştır. İzolatların oto-agregasyon, ko-agregasyon, hidrofobisite ve antibiyotik dirençleri arasındaki farklılıkların ve üretim sonrası ürünler arasındaki farklılıkların ortaya çıkarılmasında tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılmış, anlamlı bulunan test sonuçları $p < 0.05$ önem düzeyinde Duncan oklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.



ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Sirke Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

Sirke, fermente olabilir şekerlerin mayalar tarafından kullanılmasıyla etanol oluşması, oluşan etanolün de AAB'ler tarafından asetik asite dönüştürülmesi sonucu elde edilen fermente bir üründür. Bu nedenle sirkenin asetik asit içeriği, ürünün temel duyuşsal özelliği ve kalitesi üzerinde önemli rol almaktadır. Sirkede toplam asitlik, asetik asit cinsinden ifade edilmekte ve ülkemiz TS 1880 EN 13188 Sirke Standardı'nda sirkenin toplam asit içeriğinin en az %4 düzeyinde olması gerektiği bildirilmektedir. Sirkenin pH değerinin ise 2.0-3.5 arasında olması beklenmektedir (Aktan ve Yıldırım 2011; Anonim 2016; Şengün ve Kılıç 2018).

Şengün ve Kılıç (2018), ev yapımı dut sirkelerinin pH değerini 2.87; toplam asitliği %4.07; briks değerini 5.60 olarak tespit etmişlerdir. Ticari sirkelerde ise pH değerini 3.30; toplam asitliği 4,64; briks değerini 3.50 olarak bildirmişlerdir. Sengun *et al.* (2020), çeşitli hammaddelerden üretilen sirkelerin (elma, üzüm, trabzon hurması, mandalina, kayısı, incir vd.) fizikokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. Tespit ettikleri sonuçlara göre elma sirkesinin pH değerinin 3.85; toplam asitliğinin 1.11; briks değerinin 1.00 olduğunu bildirmişlerdir. Üzüm sirkesinin pH değerinin 3.22; toplam asitliğinin 43.2; briks değerinin 3.00 olduğunu rapor etmişlerdir.

Sirke örneklerinde pH tayini, asitlik tayini ve briks derecesinin tespiti gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir. Belirlenen sonuçlara göre; ev yapımı ve ticari sirke örneklerinin pH ve briks değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Ev yapımı ve ticari sirke örneklerinin asitlik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Tablo 6. Temin edilen sirke örneklerinin pH, asitlik (%) ve briks değerleri

Örnek	Fizikokimyasal özellikler (Ort±Ss)			Örnek	Fizikokimyasal özellikler (Ort±Ss)		
	pH	Toplam asitlik (%)	Briks		pH	Toplam asitlik (%)	Briks
1	2.88±0.02	1.86±0.00	1.50±0.00	29	3.53±0.02	2.40±0.03	8.55±0.07
2	3.17±0.01	1.53±0.02	0.50±0.00	30*	3.13±0.00	4.80±0.05	3.45±0.07
3	3.10±0.00	3.60±0.03	3.45±0.07	31	2.12±0.00	1.68±0.02	5.85±0.07
4	3.53±0.00	0.78±0.11	0.00±0.00	32	2.94±0.00	1.14±0.01	0.50±0.00
5	2.78±0.01	1.86±0.12	2.05±0.07	33	3.28±0.00	0.72±0.04	1.50±0.00
6	3.09±0.02	1.80±0.03	1.00±0.00	34	3.37±0.00	0.45±0.07	0.00±0.00
7	3.23±0.00	1.26±0.03	1.00±0.00	35*	3.26±0.01	1.92±0.03	2.00±0.00
8	2.90±0.00	1.26±0.01	1.00±0.00	36*	3.23±0.00	3.66±0.00	5.55±0.07
9	3.30±0.01	1.26±0.03	2.10±0.14	37*	3.15±0.01	2.57±0.02	1.95±0.07
10	2.70±0.01	1.02±0.01	1.00±0.00	38*	3.57±0.01	1.08±0.01	0.50±0.00
11	3.35±0.00	1.98±0.17	4.45±0.07	39*	3.24±0.00	3.60±0.00	5.80±0.00
12	3.04±0.01	2.10±0.14	2.00±0.00	40*	3.08±0.01	3.06±0.03	1.85±0.07
13	3.27±0.01	2.16±0.00	2.95±0.07	41*	3.18±0.00	2.85±0.00	1.70±0.00
14	3.29±0.00	1.02±0.00	1.50±0.00	42*	3.24±0.00	2.82±0.01	1.50±0.00
15	3.09±0.00	1.02±0.06	2.00±0.00	43	3.51±0.00	0.60±0.00	0.50±0.00
16	3.11±0.02	1.50±0.05	1.00±0.00	44	3.44±0.01	0.80±0.01	1.95±0.07
17	3.52±0.00	1.92±0.04	1.95±0.07	45	3.62±0.00	0.54±0.05	1.15±0.07
18	3.35±0.00	0.96±0.07	1.00±0.00	46	3.10±0.01	1.50±0.06	1.00±0.00
19	3.06±0.00	2.46±0.06	1.50±0.00	47	3.06±0.00	0.78±0.00	2.00±0.00
20	3.21±0.00	1.80±0.00	1.50±0.00	48	3.02±0.00	0.84±0.06	1.50±0.00
21	3.19±0.01	1.68±0.01	1.85±0.07	49	3.38±0.01	0.54±0.00	5.05±0.07
22	3.21±0.00	1.71±0.06	2.05±0.07	50	3.56±0.00	0.60±0.01	3.85±0.07
23	3.31±0.01	1.26±0.03	1.70±0.00	51	3.51±0.00	0.84±0.01	0.95±0.07
24*	2.55±0.00	4.44±0.00	1.50±0.00	52	3.28±0.00	1.49±0.01	1.85±0.00
25*	2.46±0.00	4.44±0.00	1.50±0.00	53	3.40±0.01	1.57±0.00	2.19±0.01
26	3.00±0.02	3.90±0.00	4.40±0.14	54	3.07±0.00	1.42±0.00	2.54±0.00
27	3.25±0.00	0.78±0.01	2.95±0.07	55	3.21±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
28	3.42±0.01	0.90±0.01	0.00±0.00	56	3.12±0.00	1.21±0.00	1.84±0.01

Tablo 6. (Devamı)

57	3.19±0.01	1.48±0.03	1.50±0.00	60*	3.00±0.01	3.06±0.01	3.01±0.00
58	3.00±0.01	2.12±0.00	2.20±0.00	61*	3.20±0.00	3.25±0.00	1.95±0.01
59	3.33±0.00	1.35±0.01	2.04±0.00				
Ev yapımı sirke örnekleri (n=48)				Ticari sirke örnekleri (n=13)			
	pH	Asitlik (%)	Briks		pH	Asitlik (%)	Briks
Min.	2.12	0.40	0.00	Min.	2.46	1.07	0.50
Mak.	3.62	3.91	8.60	Mak.	3.58	4.84	5.80
Ort.	3.20	1.45	2.02	Ort.	3.10	3.20	2.48
Ss.	0.26	0.71	1.56	Ss.	0.29	1.01	1.56

*: Ticari sirke örnekleri; n: Örnek sayısı; Min: Minimum değer; Mak: Maksimum değer; Ort: Ortalama değer; Ss: Standart sapma

Sirke Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Mikrobiyolojik ekim sonuçları ve izolasyon

Bir sirkenin bileşimini; üretildiği bölge, kullanılan hammadde, ortama eklenen su ve çeşitli besin maddeleri, mikroflorada yer alan mikroorganizmalar, üretim metodu, olgunlaşma süresi gibi faktörler etkilemektedir (Bilginer 2018; Al-Dalali *et al.* 2023). Sirke, alkol fermentasyonu ve asetik asit fermentasyonundan kaynaklanan kendine has tat ve aromaya sahiptir (Ozturk *et al.* 2015).

Ev yapımı ve ticari dut sirkelerinin mikrobiyolojik özelliklerini inceleyen Şengün ve Kılıç (2018), ev sirkelerinde AAB sayısını 2.84 log kob/mL, maya-küf sayısını 1.32 log kob/mL; ticari sirkelerde AAB sayısını 1.65 log kob/mL, maya-küf sayısını 1.47 log kob/mL olarak tespit etmiştir. Sengun *et al.* (2020) elma, incir, erik ve üzüm sirkelerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, AAB sayısını 3.34–6.32 log kob/ml aralığında ve maya-küf sayısını 2.53–3.97 log kob/mL aralığında olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, sirke örneklerinde gerçekleştirilen TAMB sayımı, koliform grubu bakterilerin sayımı, maya-küf sayımı ve maya izolatlarının kodları, muhtemel asetik asit bakterilerinin sayımı ve izolatların kodları Tablo 7’de verilmiştir. Belirlenen sonuçlara göre; ev yapımı ve ticari sirke örneklerinin TAMB ve AAB sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ev yapımı ve ticari sirke örneklerinin maya-küf sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 7. Mikrobiyolojik ekim sonuçları ve sirke örneklerinden elde edilen izolatlar

Örnek	Mikrobiyolojik ekim sonuçları (log kob/ml) (Ort±Ss)				İzolatlar	
	TAMB	Maya-küf	Koliform	Muhtemel AAB	Muhtemel AAB izolatları	Maya izolatları
1	2.64±0.62	5.39±0.12	<1	2.44±0.37	A1, A2, A3	B1, B2, B3
2	<1	6.34±0.06	<1	7.48±0.03	A4, A5	B4, B5
3	1.00±0.00	<1	<1	<1	-	-
4	4.78±0.01	4.48±0.04	<1	5.30±0.04	A6, A7, A8, A9	B6, B7
5	<1	<1	<1	<1	-	-
6	4.78±0.01	<1	<1	3.11±0.06	A10, A11, A12, A13	B8, B9
7	4.00±0.03	4.85±0.06	<1	6.00±0.03	A63, A64, A65	B10, B11, B12, B13
8	2.90±0.01	2.48±0.04	<1	3.04±0.06	A14, A15, A16, A17	B14, B15
9	<1	2.00±0.00	<1	<1	-	B16
10	<1	3.23±0.03	<1	6.70±0.07	A18, A19, A20, A21, A22	B17, B18
11	7.80±0.04	2.00±0.00	<1	6.70±0.01	A23, A24, A25, A26	B19
12	6.87±0.25	<1	<1	7.04±0.06	A27, A28, A29	-
13	7.38±0.04	4.78±0.01	<1	7.28±0.06	A30, A31, A32	-
14	4.84±0.01	5.82±1.10	<1	4.16±0.01	A33, A34	B20, B21
15	6.90±0.28	3.38±0.11	<1	7.04±0.06	A35, A36, A37	B22, B23
16	4.42±0.08	2.00±0.11	<1	4.48±0.10	A38, A39, A40	B24
17	6.12±0.16	3.63±0.08	<1	6.53±0.24	A41, A42, A43, A44, A45	B25, B26
18	4.30±0.13	5.51±0.02	<1	<1	-	B27, B28
19	<1	<1	<1	3.97±0.00	A46, A47, A48	-
20	<1	<1	<1	<1	-	-
21	<1	<1	<1	2.12±0.01	A78	-
22	<1	<1	<1	<1	-	-
23	2.86±0.00	<1	<1	3.04±0.00	A66, A67, A77	-
24*	<1	<1	<1	<1	-	-
25*	<1	<1	<1	<1	-	-
26	2.68±0.13	<1	<1	3.14±0.20	A49, A50, A51	-
27	<1	5.72±0.17	<1	<1	-	B31, B32, B33, B34
28	7.11±0.03	1.84±0.03	<1	7.11±0.07	A52, A53, A54, A55	B29, B30
29	5.08±0.31	<1	<1	5.20±0.11	A56, A57, A58	-
30*	2.84±0.37	<1	<1	2.82±0.21	A59, A60, A61, A62	-
31	<1	4.04±0.20	<1	<1	-	B35, B36, B37
32	5.47±0.12	4.11±0.13	<1	5.34±0.08	A68, A69, A70	B38, B39

Tablo 7. (Devamı)

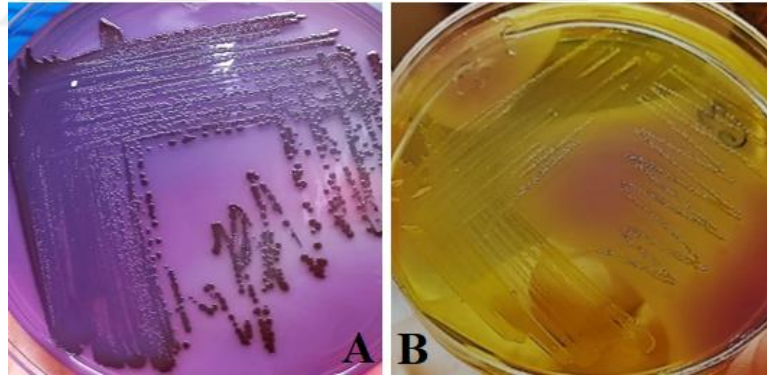
Örnek	Mikrobiyolojik ekim sonuçları (log kob/ml) (Ort±Ss)				İzolatlar	
	TAMB	Maya-küf	Koliform	Muhtemel AAB	Muhtemel AAB izolatları	Maya izolatları
33	4.41±0.57	4.90±0.08	<1	4.81±0.27	A71, A72	B40, B41
34	7.67±0.04	5.08±0.55	<1	7.67±0.17	A73, A74, A75, A76	-
35*	8.30±0.14	4.26±0.62	<1	7.86±0.06	A79, A80	B42
36*	4.30±0.14	<1	<1	4.20±0.21	A81, A82, A83, A84, A85, A86	-
37*	1.65±0.92	<1	<1	2.70±0.11	A87, A88	-
38*	4.30±0.17	<1	<1	<1	-	-
39*	3.70±0.13	<1	<1	3.60±0.20	A89, A90, A91, A92, A93	-
40*	4.54±1.51	<1	<1	3.04±0.06	A94, A95, A96, A97	-
41*	4.65±0.49	<1	<1	4.74±0.37	A98, A99	-
42*	3.01±0.01	<1	<1	5.30±0.54	A100, A101, A102, A103, A104, A105	-
43	<1	4.57±0.28	<1	<1	-	B43, B44
44	5.59±0.16	<1	<1	5.39±0.13	A106, A107, A108	B45
45	3.17±0.20	2.40±0.01	<1	3.27±0.30	A109, A110, A111	B46, B47
46	3.60±0.27	1.84±0.06	<1	3.39±0.12	A112, A113, A114	B48
47	3.48±0.10	4.38±0.54	<1	3.47±0.12	A115, A116	B49
48	4.40±0.52	4.70±0.52	<1	3.84±0.64	A117, A118	B50, B51
49	3.00±0.13	4.58±0.37	<1	<1	-	B52
50	<1	5.75±0.07	<1	<1	-	B53, B54, B55
51	4.45±0.07	2.11±0.11	<1	5.29±0.05	A119, A120, A121, A122, A123, A124	B56, B57, B58, B59, B60
52	1.90±0.02	2.70±0.09	<1	2.85±0.16	A125, A126, A127, A128, A129	B61, B62, B63, B64,
53	4.68±0.11	2.00±0.08	<1	3.48±0.18	A130, A131, A132, A133, A134	B65, B66, B67, B68, B69
54	3.33±0.04	2.72±0.12	<1	3.42±0.10	A135, A136, A137, A138, A139, A140	B70, B71, B72, B73, B74, B75,
55	3.30±0.08	2.90±0.13	<1	3.38±0.04	A141, A142, A143, A144, A145	B76, B77, B78, B79
56	2.54±0.14	2.88±0.31	<1	3.80±0.20	A146, A147, A148, A149, A150, A151, A152,	B80, B81, B82, B83, B84, B85
57	3.25±0.21	2.54±0.20	<1	3.38±0.13	A153, A154, A155, A156, A157	B86, B87, B88, B89, B90,
58	4.04±0.00	3.60±0.25	<1	4.37±0.25	A158, A159, A160, A161, A162, A163	B91, B92, B93, B94, B95
59	3.28±0.13	3.06±0.02	<1	3.74±0.06	A164, A165, A166, A167, A168, A169, A170	B96, B97, B98, B99
60*	3.78±0.28	4.02±0.18	<1	3.70±0.10	A171, A172, A173, A174, A175, A176	B100, B101, B102, B103
61*	3.00±0.03	3.23±0.10	<1	2.52±0.12	A177, A178, A179, A180	B104, B105, B106, B107, B108

Tablo 7. (Devamı)

Ev yapımı sirke örnekleri (n=48)					Ticari sirke örnekleri (n=13)				
	TAMB	Maya-küf	Koliform	Muhtemel AAB		TAMB	Maya-küf	Koliform	Muhtemel AAB
Min.	<1	<1	<1	<1	Min.	<1	<1	<1	<1
Mak.	7.83	6.60	<1	7.79	Mak.	8.40	4.70	<1	7.90
Ort.	3.29	2.80	-	3.60	Ort.	3.39	0.88	-	3.11
Ss.	2.40	2.01	-	2.43	Ss.	2.14	1.67	-	2.22

TAMB: Toplam aerobik mezofilik bakteri; **AAB:** Asetik asit bakterisi; **A:** AAB izolatlarına verilen harf kodu; **B:** Maya izolatlarına verilen harf kodu; - : İzolat yok; *: Ticari sirke örnekleri; n: Örnek sayısı; Min: Minimum değer; Mak: Maksimum değer; Ort: Ortalama değer; Ss: Standart sapma

Çalışmada izole edilen AAB izolatlarına A ile başlayan kodlar, maya izolatlarına ise B ile başlayan kodlar verilmiştir. İzolasyon çalışmaları sırasında, muhtemel AAB izolatlarından 4 tanesi (A27, A36, A37, A44 numaralı izolatlar); maya izolatlarından 2 tanesi (B53, B54 numaralı izolatlar) birkaç kez zenginleştirilmesine rağmen gelişme göstermedikleri için stok kültür alınamamış ve ilgili izolatlar iptal edilmek zorunda kalınmıştır. Böylece, toplamda 282 adet izolat elde edilmiş olup, bu izolatların 176 tanesi muhtemel AAB ve 106 tanesi maya izolatlarıdır. Burada, muhtemel AAB izolatlarının sayısı (176 izolat) gram ve katalaz özellikleri incelenmemiş hali ile verilmiş olup GYC agardan elde edilen tüm izolatlardır. Şekil 9’da A15 ve A123 izolatlarının petrideki görüntüleri yer almaktadır.

**Şekil 9.** A15 izolatının (A) ve A123 izolatının (B) petrideki görüntüleri

Gram boyama ve katalaz testi

GYC agardan izole edilen muhtemel AAB izolatlarının gram ve katalaz özellikleri Tablo 8’de verilmiştir. GYC agardan elde edilen toplam 176 izolatın gram ve katalaz özellikleri incelenmiş olup, gram negatif ve katalaz pozitif izolat sayısının 95 olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda, yüksek muhtemel AAB izolat sayısının 95 olabileceği kanısına varılarak gerekli analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 10’da katalaz pozitif bir izolatın katalaz deneyi sırasındaki gaz çıkışı görülmektedir.

Tablo 8. Muhtemel AAB izolatlarının gram ve katalaz özellikleri

İzolat numarası	Gram özellik	Katalaz özellik	İzolat numarası	Gram özellik	Katalaz özellik	İzolat numarası	Gram özellik	Katalaz özellik	İzolat numarası	Gram özellik	Katalaz özellik
A1	-	+	A51	-	+	A97	+	+	A143	+	-
A2	-	+	A52	-	+	A98	+	-	A144	-	+
A3	-	+	A53	-	+	A99	+	+	A145	-	+
A4	+	+	A54	-	+	A100	+	+	A146	-	+
A5	+	+	A55	-	+	A101	-	+	A147	+	+
A6	-	-	A56	-	+	A102	+	+	A148	-	+
A7	-	-	A57	-	+	A103	+	+	A149	-	+
A8	-	-	A58	-	+	A104	+	+	A150	-	+
A9	-	-	A59	+	+	A105	+	+	A151	-	+
A10	+	-	A60	+	+	A106	+	+	A152	-	+
A11	+	-	A61	+	+	A107	-	+	A153	-	+
A12	+	-	A62	+	+	A108	+	+	A154	-	+
A13	+	-	A63	-	+	A109	+	-	A155	-	+
A14	-	+	A64	+	-	A110	-	+	A156	-	+
A15	-	+	A65	+	-	A111	+	+	A157	+	-
A16	-	+	A66	+	-	A112	+	+	A158	+	-
A17	-	+	A67	-	+	A113	+	+	A159	-	+
A18	-	+	A68	-	+	A114	+	+	A160	-	+
A19	-	+	A69	-	+	A115	-	+	A161	-	+
A20	+	+	A70	-	+	A116	-	+	A162	-	+
A21	-	+	A71	-	+	A117	-	-	A163	-	+
A22	+	+	A72	-	+	A118	+	-	A164	-	+
A23	-	+	A73	+	+	A119	-	+	A165	-	+
A24	-	+	A74	+	-	A120	+	+	A166	-	+
A25	-	+	A75	+	+	A121	+	+	A167	+	-
A26	-	+	A76	+	-	A122	-	+	A168	-	+
A28	+	-	A77	-	+	A123	-	+	A169	-	+
A29	+	-	A78	+	+	A124	-	+	A170	-	+
A30	+	-	A79	+	+	A125	-	+	A171	+	+
A31	+	-	A80	+	+	A126	-	+	A172	+	+
A32	+	-	A81	+	+	A127	-	+	A173	-	+
A33	-	+	A82	+	+	A128	-	+	A174	-	+
A34	-	+	A83	+	+	A129	-	+	A175	-	+
A35	+	-	A84	+	+	A130	+	+	A176	-	+
A38	-	+	A85	+	+	A131	-	+	A177	-	+
A39	-	+	A86	+	+	A132	-	+	A178	-	+
A40	-	+	A87	+	+	A133	-	+	A179	-	+
A41	-	+	A88	+	+	A134	-	+	A180	-	+
A42	+	+	A89	+	+	A135	+	-			
A43	-	+	A90	+	+	A136	+	+			
A45	+	+	A91	+	+	A137	-	+			
A46	-	+	A92	+	+	A138	-	+			
A47	+	+	A93	+	+	A139	-	+			
A48	+	+	A94	+	+	A140	-	+			
A49	-	+	A95	+	+	A141	-	+			
A50	-	+	A96	+	+	A142	-	+			



Şekil 10. A1 kodlu izolatın katalaz deneyi sırasındaki gaz çıkışı

Muhtemel Asetik Asit Bakterisi İzolatlarının Starter Kültür Özellikleri

Muhtemel AAB suşlarının ilk olarak; starter kültür analizlerinden glukoz toleransı, etanol toleransı, farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri, asetik asit toleransı ve farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri belirlenmiştir. İzolatların glukoz toleransı Tablo 9’da, etanol toleransı Tablo 10’da, farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri Tablo 11’de, asetik asit toleransı Tablo 12’de ve farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri Tablo 13’de verilmiştir. Burada, starter kültür testlerinden izolatların asetik asit üretim hızı sonuçları verilmemiş olup, ilgili analiz sonuçları izolatların probiyotik testleri ile birlikte verilmiştir.

El-Askri *et al.* (2022), *A. fabarum* ve *A. pasteurianus* olarak tanıladıkları 6 adet suştan çoğunun pH 5’te geliştiğini ancak pH 3 ve pH 9’da gelişemediğini bildirmişlerdir. İzolatların tamamı %16 etanol konsantrasyonunu tolere etmiştir. İzolatların asetik asit direnci AAB türleri arasında farklılık göstermiştir. İzolatlar optimum gelişim ve asetik asit üretimini 30°C’de gerçekleştirmiş olup 37°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda asetik asit üretiminde azalma görülmüştür.

Tablo 9. Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının glukoz toleransı

İzolat numarası	%20 şeker	%25 şeker	%30 şeker	İzolat numarası	%20 şeker	%25 şeker	%30 şeker	İzolat numarası	%20 şeker	%25 şeker	%30 şeker
A1	-	-	-	A63	-	-	-	A144	+	+	z
A2	-	-	-	A67	+	-	-	A145	+	+	z
A3	-	-	-	A68	+	+	+	A146	+	+	+
A14	-	-	-	A69	+	+	+	A148	z	z	z
A15	-	-	-	A70	+	+	+	A149	+	+	z
A16	-	-	-	A71	z	-	-	A150	+	z	-
A17	-	-	-	A72	+	z	-	A151	z	z	z
A18	-	-	-	A77	z	-	-	A152	+	z	-
A19	-	-	-	A101	z	-	-	A153	+	+	-
A21	-	-	-	A107	z	z	z	A154	+	+	-
A23	z	-	-	A110	+	+	z	A155	+	+	+
A24	+	-	-	A115	z	-	-	A156	+	+	z
A25	++	+	+	A116	z	-	-	A159	z	-	-
A26	z	-	-	A119	z	-	-	A160	z	z	-
A33	+	-	-	A122	z	z	z	A161	z	z	-
A34	+	-	-	A123	z	z	z	A162	z	-	-
A38	z	-	-	A124	+	+	-	A163	z	-	-
A39	-	-	-	A125	+	+	-	A164	z	-	-
A40	-	-	-	A126	+	+	z	A165	z	z	z
A41	-	-	-	A127	z	z	z	A166	z	z	z
A43	z	-	-	A128	z	z	-	A168	+	+	z
A46	z	-	-	A129	z	-	-	A169	+	+	+
A49	+	+	z	A131	+	+	+	A170	-	-	-
A50	+	+	-	A132	z	z	z	A173	+	+	+
A51	+	z	-	A133	+	-	-	A174	+	+	+
A52	z	-	-	A134	+	z	z	A175	z	-	-
A53	z	-	-	A137	+	+	+	A176	+	z	z
A54	z	-	-	A138	z	-	-	A177	+	+	z
A55	z	-	-	A139	z	-	-	A178	+	+	z
A56	+	+	-	A140	+	+	-	A179	++	++	++
A57	+	+	-	A141	++	+	-	A180	++	++	++
A58	+	+	-	A142	++	++	-				

-: üreme yok, z: zayıf düzeyde üreme var, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var

Tablo 10. Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının etanol toleransı

İzolat numarası	%2 etanol	%5 etanol	%10 etanol	İzolat numarası	%2 etanol	%5 etanol	%10 etanol	İzolat numarası	%2 etanol	%5 etanol	%10 etanol
A1	-	-	-	A63	z	z	-	A144	+	+	-
A2	-	-	-	A67	+	+	-	A145	+	+	-
A3	-	-	-	A68	+	z	-	A146	+	+	-
A14	-	-	-	A69	+	z	-	A148	+	+	-
A15	-	-	-	A70	++	+	-	A149	+	z	z
A16	-	-	-	A71	+	+	-	A150	+	+	z
A17	-	-	-	A72	+	+	-	A151	+	z	z
A18	-	-	-	A77	+	+	-	A152	+	+	-
A19	-	-	-	A101	z	z	-	A153	+	z	z
A21	-	-	-	A107	+	+	-	A154	+	z	-
A23	+	+	z	A110	+	+	-	A155	+	z	z
A24	z	z	z	A115	+	+	-	A156	+	z	z
A25	+	z	-	A116	+	+	-	A159	z	z	-
A26	+	+	+	A119	+	+	-	A160	z	z	-
A33	+	+	+	A122	+	+	+	A161	z	z	-
A34	+	+	+	A123	+	+	+	A162	z	z	-
A38	z	z	-	A124	+	+	-	A163	z	z	-
A39	z	z	-	A125	+	+	-	A164	+	+	-
A40	z	z	-	A126	+	+	-	A165	z	z	-
A41	z	z	-	A127	+	+	z	A166	z	z	-
A43	z	-	-	A128	z	-	-	A168	z	z	z
A46	z	-	-	A129	+	+	-	A169	+	+	-
A49	+	+	-	A131	+	+	z	A170	-	-	-
A50	+	+	-	A132	z	z	-	A173	+	+	-
A51	+	+	-	A133	++	-	-	A174	+	z	-
A52	+	+	-	A134	+	+	z	A175	z	z	-
A53	+	+	-	A137	+	+	z	A176	+	+	-
A54	+	+	+	A138	z	z	-	A177	+	+	z
A55	+	+	-	A139	z	z	-	A178	+	+	-
A56	+	+	-	A140	+	-	-	A179	+	+	-
A57	+	+	-	A141	+	z	-	A180	++	++	-
A58	+	+	-	A142	++	z	-				

-: üreme yok, z: zayıf düzeyde üreme var, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var

Tablo 11. Muhtemel AAB izolatlarının farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri

İzolat numarası	pH 2.5	pH 3.9	pH 5.0	pH 8.5	İzolat numarası	pH 2.5	pH 3.9	pH 5.0	pH 8.5	İzolat numarası	pH 2.5	pH 3.9	pH 5.0	pH 8.5
A1	-	-	+	+	A63	-	-	z	z	A144	-	+	++	++
A2	-	-	+	+	A67	-	+	++	++	A145	-	++	++	++
A3	-	-	+	+	A68	-	+	++	++	A146	-	+	+	++
A14	-	-	+	+	A69	-	+	++	++	A148	-	+	+	++
A15	-	-	+	+	A70	-	+	++	++	A149	-	++	++	++
A16	-	-	+	+	A71	-	+	+	+	A150	-	++	++	++
A17	-	-	+	+	A72	-	+	+	+	A151	-	+	+	+
A18	-	-	-	-	A77	-	+	++	++	A152	-	+	+	+
A19	-	-	-	+	A101	-	+	+	+	A153	-	+	+	+
A21	-	-	-	+	A107	z	+	++	++	A154	-	+	+	+
A23	-	-	+	+	A110	-	+	+	+	A155	-	z	+	+
A24	-	-	z	+	A115	-	+	+	+	A156	-	+	+	+
A25	-	++	++	++	A116	-	+	+	+	A159	-	+	+	+
A26	-	z	+	+	A119	-	+	++	++	A160	-	+	+	+
A33	-	z	+	+	A122	-	+	+	++	A161	-	+	+	+
A34	-	z	+	+	A123	-	+	+	++	A162	-	+	+	++
A38	-	z	z	z	A124	-	+	+	+	A163	-	++	+	+
A39	-	z	z	+	A125	-	+	+	+	A164	-	+	+	++
A40	-	z	z	+	A126	+	+	+	+	A165	-	+	++	++
A41	-	z	z	z	A127	-	+	+	+	A166	-	+	++	++
A43	+	+	+	+	A128	-	+	+	+	A168	-	+	+	+
A46	+	+	+	+	A129	-	+	+	+	A169	-	++	++	++
A49	-	+	+	+	A131	-	++	++	+++	A170	-	-	-	+
A50	-	+	+	+	A132	-	+	+	++	A173	-	+	+	++
A51	-	+	+	+	A133	-	-	++	++	A174	-	+	+	+
A52	-	+	++	++	A134	-	+	++	++	A175	-	z	z	z
A53	-	+	++	++	A137	-	+	+	+	A176	-	+	++	++
A54	-	+	++	++	A138	-	++	+	+	A177	-	+	+	++
A55	z	++	++	++	A139	-	+	+	+	A178	-	+	+	++
A56	-	+	++	++	A140	z	+	++	++	A179	-	-	++	+++
A57	-	+	++	++	A141	-	+	++	++	A180	-	-	++	+++
A58	-	++	++	++	A142	-	+	++	++					

-: üreme yok, z: zayıf düzeyde üreme var, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var, +++: çok iyi düzeyde üreme var

Tablo 12. Muhtemel AAB izolatlarının asetik asit toleransı

İzolat numarası	%1 asetik asit	%2 asetik asit	%4 asetik asit	%6 asetik asit	İzolat numarası	%1 asetik asit	%2 asetik asit	%4 asetik asit	%6 asetik asit	İzolat numarası	%1 asetik asit	%2 asetik asit	%4 asetik asit	%6 asetik asit
A1	-	-	-	-	A63	-	-	-	-	A144	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	A67	-	-	-	-	A145	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	A68	+	-	-	-	A146	-	-	-	-
A14	-	-	-	-	A69	+	-	-	-	A148	-	-	-	-
A15	-	-	-	-	A70	+	-	-	-	A149	++	-	-	-
A16	-	-	-	-	A71	-	-	-	-	A150	-	-	-	-
A17	-	-	-	-	A72	++	-	-	-	A151	-	-	-	-
A18	-	-	-	-	A77	-	-	-	-	A152	z	-	-	-
A19	-	-	-	-	A101	-	-	-	-	A153	-	-	-	-
A21	-	-	-	-	A107	-	-	-	-	A154	-	-	-	-
A23	-	-	-	-	A110	-	-	-	-	A155	-	-	-	-
A24	-	-	-	-	A115	-	-	-	-	A156	-	-	-	-
A25	+	+	-	-	A116	-	-	-	-	A159	-	-	-	-
A26	-	-	-	-	A119	-	-	-	-	A160	-	-	-	-
A33	-	-	-	-	A122	-	-	-	-	A161	-	-	-	-
A34	-	-	-	-	A123	-	-	-	-	A162	-	-	-	-
A38	-	-	-	-	A124	-	-	-	-	A163	-	-	-	-
A39	-	-	-	-	A125	-	-	-	-	A164	-	-	-	-
A40	-	-	-	-	A126	-	-	-	-	A165	-	-	-	-
A41	-	-	-	-	A127	-	-	-	-	A166	-	-	-	-
A43	-	-	-	-	A128	-	-	-	-	A168	-	-	-	-
A46	+	-	-	-	A129	-	-	-	-	A169	-	-	-	-
A49	+	-	-	-	A131	-	-	-	-	A170	-	-	-	-
A50	-	-	-	-	A132	z	-	-	-	A173	-	-	-	-
A51	+	-	-	-	A133	-	-	-	-	A174	-	-	-	-
A52	+	-	-	-	A134	-	-	-	-	A175	-	-	-	-
A53	+	-	-	-	A137	-	-	-	-	A176	-	-	-	-
A54	z	-	-	-	A138	-	-	-	-	A177	-	-	-	-
A55	++	-	-	-	A139	+	-	-	-	A178	-	-	-	-
A56	+	-	-	-	A140	+	-	-	-	A179	-	-	-	-
A57	-	-	-	-	A141	++	-	-	-	A180	-	-	-	-
A58	z	-	-	-	A142	++	-	-	-					

-: üreme yok, z: zayıf düzeyde üreme var, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var

Tablo 13. Muhtemel AAB izolatlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri

İzolat numarası	4°C	10°C	20°C	40°C	İzolat numarası	4°C	10°C	20°C	40°C	İzolat numarası	4°C	10°C	20°C	40°C
A1	-	-	-	-	A63	-	-	-	-	A144	-	z	+	-
A2	-	-	-	-	A67	-	-	+	-	A145	-	z	+	-
A3	-	-	-	-	A68	-	-	+	-	A146	-	z	+	-
A14	-	-	-	-	A69	-	-	+	-	A148	-	z	++	-
A15	-	-	-	-	A70	-	-	+	-	A149	-	-	+	-
A16	-	-	-	-	A71	-	-	+	-	A150	-	-	+	-
A17	-	-	-	-	A72	-	-	+	-	A151	-	-	+	-
A18	-	+	+	-	A77	-	-	+	-	A152	-	-	+	-
A19	-	-	-	-	A101	-	-	+	-	A153	-	-	+	+
A21	-	-	+	-	A107	-	+	+	-	A154	-	-	+	+
A23	-	-	+	z	A110	-	+	++	-	A155	-	-	+	+
A24	-	-	+	z	A115	-	-	+	-	A156	-	-	+	+
A25	-	z	++	-	A116	-	-	+	-	A159	-	+	+	-
A26	-	-	++	z	A119	-	-	+	-	A160	-	-	+	-
A33	-	-	+	+	A122	-	-	+	-	A161	-	-	+	-
A34	-	-	+	+	A123	-	-	+	-	A162	-	-	+	-
A38	-	+	+	-	A124	-	+	++	-	A163	-	-	+	-
A39	-	+	+	-	A125	-	+	++	-	A164	-	-	z	-
A40	-	+	+	-	A126	-	-	+	+	A165	-	+	+	-
A41	-	+	+	-	A127	-	-	+	-	A166	-	-	+	-
A43	-	+	+	-	A128	-	-	+	-	A168	-	+	++	+
A46	-	-	+	-	A129	-	-	+	-	A169	-	+	+	-
A49	-	-	+	+	A131	-	-	+	-	A170	-	-	-	-
A50	-	-	+	+	A132	-	-	+	z	A173	-	z	+	-
A51	-	-	+	+	A133	+	+	++	-	A174	-	+	++	-
A52	-	z	+	-	A134	-	-	+	z	A175	-	-	++	-
A53	-	z	+	-	A137	-	z	+	-	A176	-	-	+	-
A54	-	z	+	-	A138	-	z	z	-	A177	-	-	+	-
A55	-	z	+	-	A139	-	z	+	-	A178	-	z	+	z
A56	-	-	+	-	A140	-	-	+	-	A179	-	+	++	++
A57	-	-	+	-	A141	-	-	+	-	A180	-	+	++	+
A58	-	-	+	-	A142	-	-	+	-					

-: üreme yok, z: zayıf düzeyde üreme var, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var

Muhtemel Asetik Asit Bakterisi İzolatlarının Probiyotik Kültür Özellikleri

Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının safra tuzuna tolerans, mide ortamına direnç, oto-agregasyon ve ko-agregasyon kapasitesi, hidrofobisite, antibiyotik direnci, virülans faktör genlerin tespiti, BSH aktivitesi, hemolitik aktivite ve DNaz aktivitesi özellikleri belirlenmiştir. Fakat starter kültür özelliklerinden olan asetik asit üretim hızı deney sonuçları, ilgili başlık altında yapılan açıklamalardan dolayı “probiyotik kültür özellikleri” başlığı altında sunulmuştur.

Safra tuzuna tolerans

İzolatların 24 saatte %0.3 safra tuzuna toleransları belirlenmiş olup sonuçlar Tablo 14’de gösterilmiştir. Tablo 14’de yer alan sonuçlara bakıldığında, toplamda 95 AAB izolatından; A23, A24, A26, A33, A34, A49, A50, A51, A52, A53, A54, A55, A56, A57, A58, A107, A110, A124, A125, A126, A131, A132, A134, A137, A138, A139, A140, A141, A142, A148, A152, A153, A154, A155, A156, A162, A164, A165, A166, A168, A173 olmak üzere 41 tanesinin %0.3 safra tuzuna tolerans gösterdiği görülmektedir. Haghshenas *et al.* (2015), yaptıkları çalışmada *Acetobacter indonesiensis* ve *Acetobacter syzygii*’nin %0.3 safrada 3 saatte >%89 canlı kalma oranları olduğunu tespit etmiştir. Demirok *et al.* (2023), süt kaynaklı *Acetobacter* izolatlarının 24 saatte %0.3 safraya dirençli olduklarını bildirmiştir.

Mide ortamına direnç

%0.3 safra ortamına tolerans gösteren izolatların, simüle mide ortamına dirençleri belirlenmek amacıyla bazı ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Monteagudo-Mera *et al.* (2012)’nin çalışmalarının ışığında, *Lactobacillus casei* ATCC 393 suşu kullanılarak bu suşun pH 2.5 ve pH 3.0 simüle mide ortamına toleransı tespit edilerek, elde edilen sonuçlara göre çalışmalar devam ettirilmiştir. *L. casei* ATCC 393 suşunun pH 2.5 olduğundaki simüle mide ortamında 3 saatte canlı kalamadığı, pH 3.0 olduğundaki simüle mide ortamında 3 saatte canlı kalabildiği gözlenmiştir. Safra tuzuna tolerans gösteren suşlar belirlendikten sonra simüle mide ortamına dirençleri tespit edilerek sonuçlar Tablo 15’de sunulmuştur. Tespit edilen sonuçlara göre, 18 izolatın mide ortamına direnç gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Tablo 17’de belirlenen bazı analizlerin sonuçlarına göre seçilen izolatların simüle mide ortamını ne düzeyde geçtiği görülmektedir.

Tablo 14. Muhtemel AAB suşlarının 24 saatte %0.3 safra tuzuna toleransları

İzolat numarası	%0.3 safra tuzu	İzolat numarası	%0.3 safra tuzu	İzolat numarası	%0.3 safra tuzu	İzolat numarası	%0.3 safra tuzu
A1	-	A51	+	A124	+	A153	+
A2	-	A52	+	A125	+	A154	+
A3	-	A53	+	A126	+	A155	+
A14	-	A54	+	A127	-	A156	+
A15	-	A55	++	A128	-	A159	-
A16	-	A56	+	A129	-	A160	-
A17	-	A57	+	A131	+	A161	-
A18	-	A58	+	A132	+	A162	+
A19	-	A63	-	A133	-	A163	-
A21	-	A67	-	A134	+	A164	+
A23	+	A68	-	A137	z	A165	+
A24	+	A69	-	A138	z	A166	+
A25	-	A70	-	A139	z	A168	+
A26	++	A71	-	A140	z	A169	-
A33	+++	A72	-	A141	z	A170	-
A34	+++	A77	-	A142	+	A173	z
A38	-	A101	-	A144	-	A174	-
A39	-	A107	+	A145	-	A175	-
A40	-	A110	+	A146	-	A176	-
A41	-	A115	-	A148	z	A177	-
A43	-	A116	-	A149	-	A178	-
A46	-	A119	-	A150	-	A179	-
A49	+	A122	-	A151	-	A180	-
A50	+	A123	-	A152	z		

-: üreme yok, z: zayıf düzeyde üreme var, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var, +++: çok iyi düzeyde üreme var

Tablo 15. Safraya tolerans gösteren muhtemel AAB izolatlarının simüle mide ortamına (pH 3.0) dirençleri

İzolat numarası	Mide ortamı	İzolat numarası	Mide ortamı	İzolat numarası	Mide ortamı	İzolat numarası	Mide ortamı
A23	-	A55	-	A134	-	A155	+
A24	-	A56	+	A137	+	A156	+
A26	+	A57	+	A138	+	A162	+
A33	-	A58	+	A139	+	A164	+
A34	-	A107	-	A140	-	A165	-
A49	+	A110	-	A141	-	A166	-
A50	+	A124	-	A142	-	A168	-
A51	+	A125	-	A148	-	A173	-
A52	-	A126	-	A152	+		
A53	-	A131	-	A153	+		
A54	-	A132	+	A154	+		

-: canlılık yok, +: canlılık var

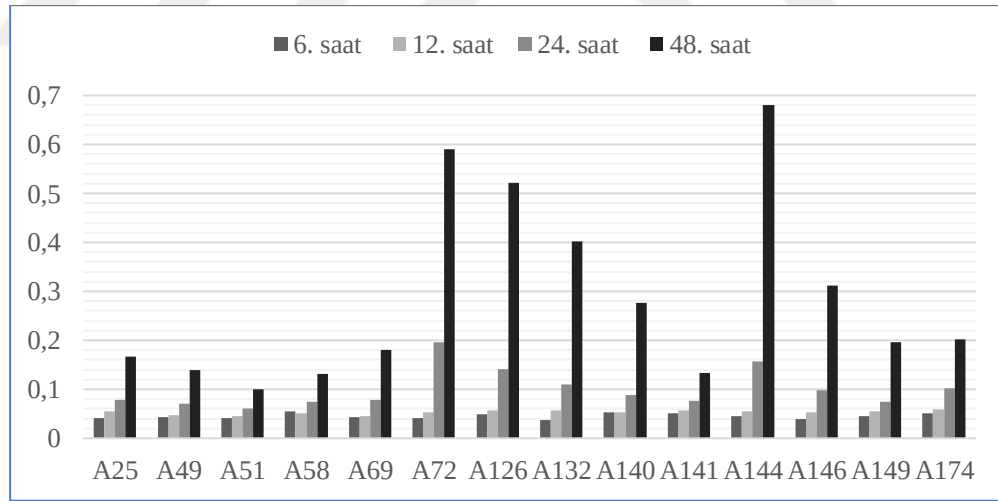
Asetik asit üretim hızı

Geleneksel sirke üretiminde, sirke üretimi yavaş fakat ortaya çıkan ürün kaliteli olmaktadır. Yaklaşık 3 ay kadar bir sürede asetik asit miktarı yüksek seviyelere ulaşabilmektedir. Sirkelerde arzu edilen sirkeleşmenin gerçekleşmesinde, asetik asit bakterilerinin sayısı ve etanolü asetik asite çevirme hızı önem arz etmektedir (Yucel-Sengun 2016). Normalde izolatların asetik asit üretim hızı bir starter kültür özelliğidir. Ancak, bu analiz deney yükünün azaltılması amacıyla Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13, Tablo 14 ve Tablo 15’de sonuçları verilmiş olan analizler değerlendirilip detaylı incelemeler yapıldıktan sonra seçilen izolatlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kaliteli bir sirke üretimi için iyi starter kültür özelliği gösteren ve/veya probiyotik potansiyeli taşıyan suşlar seçilmeye çalışılarak asetik asit üretim hızı belirlenmiştir. Belirtilen şartlara göre seçilmiş olan izolatlar A25, A49, A51, A58, A69, A72, A126, A132, A140, A141, A144, A146, A149, A174 şeklinde olup 14 tanedir.

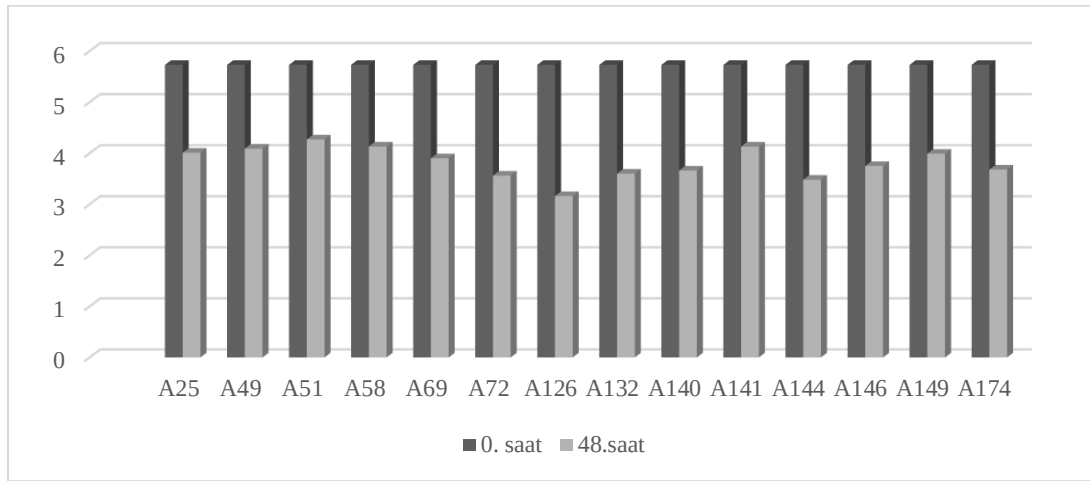
Asetik asit üretim hızı tespit edilen suşların 12., 24. ve 48. sa sonunda oluşturdıkları asit düzeyi %asetik asit olarak Tablo 16’da ve sütun grafiği olarak Şekil 11’de verilmiştir. Ayrıca, suşlar eklenmeden önceki SM Broth besiyeri ortamının başlangıç pH değeri 5.73 olarak ölçülmüştür. Suşlar eklendikten 48. sa süre sonundaki SM Broth besiyerinin pH değeri de Tablo 16’da görülmektedir. İzolatların SM Broth besiyerinde 48 saatte meydana getirdikleri pH düşüşü sütun grafik ile Şekil 12’de görülmektedir.

Tablo 16. İzolatların asetik asit üretme hızı (% asetik asit) ve SM Broth besiyerinin 48. saatteki pH değeri

İzolat	6. saat (%asetik asit)	12. saat (%asetik asit)	24. saat (%asetik asit)	48. saat (%asetik asit)	48. saat (pH)
A25	0.042±0.000	0.054±0.005	0.078±0.000	0.167±0.006	4.01±0.01
A49	0.043±0.001	0.048±0.000	0.070±0.005	0.140±0.000	4.09±0.05
A51	0.041±0.001	0.045±0.001	0.060±0.001	0.100±0.000	4.27±0.05
A58	0.055±0.021	0.051±0.002	0.074±0.003	0.132±0.017	4.13±0.04
A69	0.043±0.000	0.046±0.001	0.078±0.002	0.181±0.025	3.90±0.10
A72	0.042±0.003	0.053±0.000	0.196±0.130	0.590±0.184	3.56±0.24
A126	0.049±0.002	0.056±0.001	0.141±0.030	0.521±0.210	3.16±0.20
A132	0.038±0.004	0.057±0.008	0.109±0.030	0.402±0.308	3.60±0.44
A140	0.052±0.007	0.053±0.000	0.088±0.026	0.277±0.174	3.66±0.42
A141	0.051±0.006	0.056±0.002	0.077±0.001	0.133±0.019	4.13±0.84
A144	0.045±0.002	0.055±0.003	0.157±0.086	0.681±0.170	3.48±0.11
A146	0.040±0.000	0.052±0.000	0.098±0.002	0.311±0.068	3.75±0.11
A149	0.046±0.001	0.055±0.000	0.075±0.005	0.197±0.017	3.99±0.049
A174	0.051±0.000	0.059±0.001	0.101±0.005	0.201±0.016	3.68±0.10



Şekil 11. İzolatların 6., 12., 24. ve 48. saatte asetik asit üretme hızları (%)



Şekil 12. İzolatların SM Broth besiyerinde meydana getirdikleri pH düşüşü

Asetik asit üretim hızları belirlenen 14 izolat içerisinde; probiyotik potansiyeli olan (Tablo 14, Tablo 15) ve hızlı asetik asit üretebilen (Tablo 16) suşlar dikkate alınarak yeniden bir seçim yapılmıştır. Çünkü probiyotik potansiyeli taşımayan suşlar için diğer probiyotik testlerini (oto-agregasyon ve ko-agregasyon kapasitesi, hidrofobisite, antibiyotik direnci, BSH aktivitesi, hemolitik aktivite, DNaz aktivitesi) yapmak anlamsız olacaktır. Belirtilen durumlar göz önüne alındığında seçilen izolatlar A49, A51, A58, A132 şeklinde olup toplamda 4 tanedir.

Seçilmiş olan 4 izolatın (A49, A51, A58, A132) 96 kuyucuklu platelerde yapılan denemelerde simüle mide ortamını geçtiği görülmektedir (Tablo 15). Bu izolatların simüle mide ortamını ne düzeyde geçtiğinin belirlenmesi amacıyla ekim işlemi yapılmış ve pozitif kontrol olarak *L. casei* ATCC 393 suşu ile kıyaslama yapılarak sonuçlar Tablo 17’de verilmiştir.

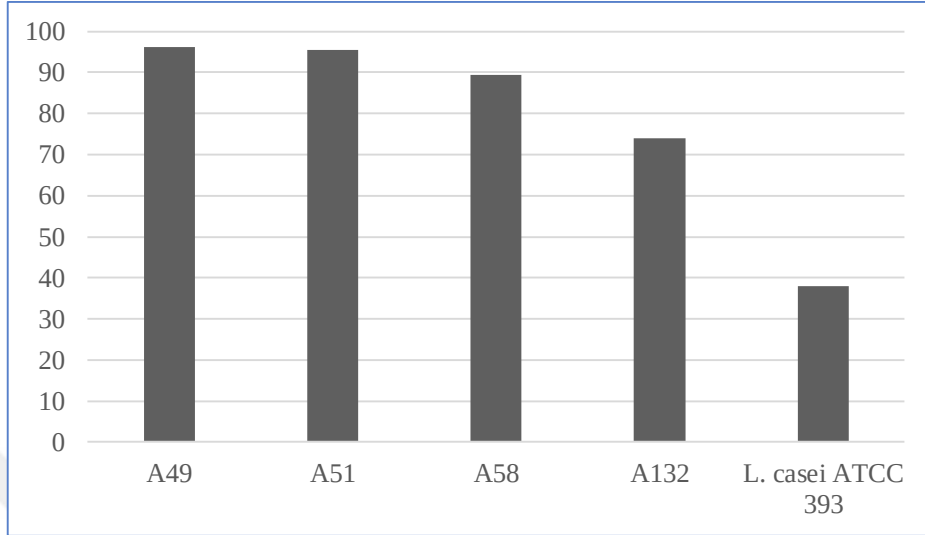
Tablo 17. Muhtemel AAB izolatlarının başlangıç sayıları (0.sa), simüle mide ortamında (pH 3) bekledikten sonraki sayıları (3.sa)

İzolat	Başlangıç sayısı (kob/ml)	Mide ortamında bekledikten sonraki sayısı (kob/ml)
	0.sa	3.sa
A49	5.47×10^6	3.02×10^6
A51	6.00×10^6	3.00×10^6
A58	1.53×10^6	3.41×10^5
A132	1.90×10^6	4.35×10^4
<i>L. casei</i> ATCC 393	3.00×10^8	1.6×10^3

Sonuçlar ortalama değerler hesaplanarak verilmiştir.

Tablo 17’de verilen değerlere bakıldığında, sirke örneklerinden elde edilen AAB izolatlarının, probiyotik *L. casei* ATCC 393 suşuna göre simüle mide ortamında daha fazla

canlılık gösterdiği görülmektedir. Şekil 13’de izolatların canlılık yüzdeleri sütun grafiği ile gösterilmiştir. Grafiğe göre, seçilen izolatlar içerisinde en yüksek canlılık oranının %96.1 ile A49 izolatına ait olduğu, en düşük canlılık oranının ise %74 ile A132 izolatına ait olduğu görülmektedir.



Şekil 13. Simüle mide ortamında muhtemel AAB izolatlarının canlı kalma yüzdeleri

Oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite kapasitesi

Seçilen 4 izolatın (A49, A51, A58, A132) oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri tespit edilerek sonuçlar Tablo 18’de verilmiştir. Tablo 18 incelendiğinde, izolatların oto-agregasyon kapasitelerinin 2. ve 4. saatlerde çok düşük olduğu ve 24. saatte ise %19.44 ile %24.64 arasında değiştiği görülmektedir. İzolatların ko-agregasyon kapasitelerine bakıldığında; *E. coli* BC12 için %8.41-9.90 arasında olduğu, *S. Typhimurium* RSHMB 95091 için %7.68-10.08 arasında olduğu, *S. aureus* ATCC 29213 için %14.47-17.84 arasında olduğu, *L. monocytogenes* ATCC 7644 için %0-27.68 arasında olduğu tespit edilmiştir. A49, A51, A58 izolatlarının en iyi ko-agregasyon yeteneğini *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde gösterdiği ancak A132 izolatının *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde ko-agregasyon yeteneği gösteremediği bulunmuştur. Hidrofobisite yeteneklerinin ise %1.21-54.35 arasında olduğu ve en düşük hidrofobisite yeteneğinin A132 izolatına ait olduğu görülmüştür.

Tablo 18. Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri (%)

İzolat	Oto-agregasyon			Ko-agregasyon				Hidrofobisite
	2.sa	4.sa	24.sa	<i>E. coli</i> BC12	<i>S. Typhimurium</i> RSHMB 95091	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	
A49	4.95±0.00	1.62±1.13	21.05±0.21	9.90±0.22	7.68±2.79	17.84±0.25	27.68±1.81	52.02±3.45
A51	7.01±0.21	7.41±1.47	20.50±0.22	9.48±0.52	10.08±3.02	15.19±0.20	20.67±0.28	52.29±2.10
A58	5.38±0.41	1.26±0.44	19.44±0.37	9.05±0.89	8.33±0.76	16.05±1.18	19.37±1.38	54.35±3.75
A132	5.38±0.61	4.90±0.07	24.64±0.88	8.41±0.43	8.09±0.13	14.47±0.11	0.00±0.00	1.21±1.71

Tablo 19. Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	Oto-agregasyon			Varyasyon kaynakları	Ko-agregasyon			Varyasyon kaynakları	Hidrofobisite		
	SD	KO	F		SD	KO	F		SD	KO	F
İzolat türü (A)	3	14.746	33.840**	İzolat türü (A)	3	94.946	59.461**	İzolat türü	3	1337,487	160,703**
Oto-agregasyon süresi (B)	2	748.032	1716.606**	Patojen türü (B)	3	153.268	95.985**	Hata	4	8,323	
A×B	6	7.020	16.110**	A×B	9	64.590	40.450**	Genel	8		
Hata	12	0.436		Hata	16	1.597					
Genel	24			Genel	32						

*önemli (p<0.05); **çok önemli (p<0.01); SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yeteneklerinin sonuçları üzerine gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 19’da verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, izolatların oto-agregasyon değerleri üzerine izolat türü, oto-agregasyon süresi ve izolat türü×oto-agregasyon süresi interaksyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu; izolatların ko-agregasyon değerleri üzerine izolat türü, patojen türü ve izolat türü×patojen türü interaksyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu; izolatların hidrofobisite değerleri üzerinde izolat türünün $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon değerlerinin Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 20’de görülmektedir. Sonuçlar izolat türünün oto-agregasyon değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 20. Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

İzolat	N	Oto-agregasyon
A49	6	9.2083 ^b
A51	6	11.6417 ^a
A58	6	8.6933 ^b
A132	6	11.6417 ^a

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Muhtemel AAB izolatlarının ko-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 21’de verilmiştir. Sonuçlar izolat türünün ko-agregasyon değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 21. Muhtemel AAB izolatlarının ko-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

İzolat	N	Ko-agregasyon
A49	8	15.7763 ^a
A51	8	13.8563 ^b
A58	8	13.2025 ^b
A132	8	7.7438 ^c

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

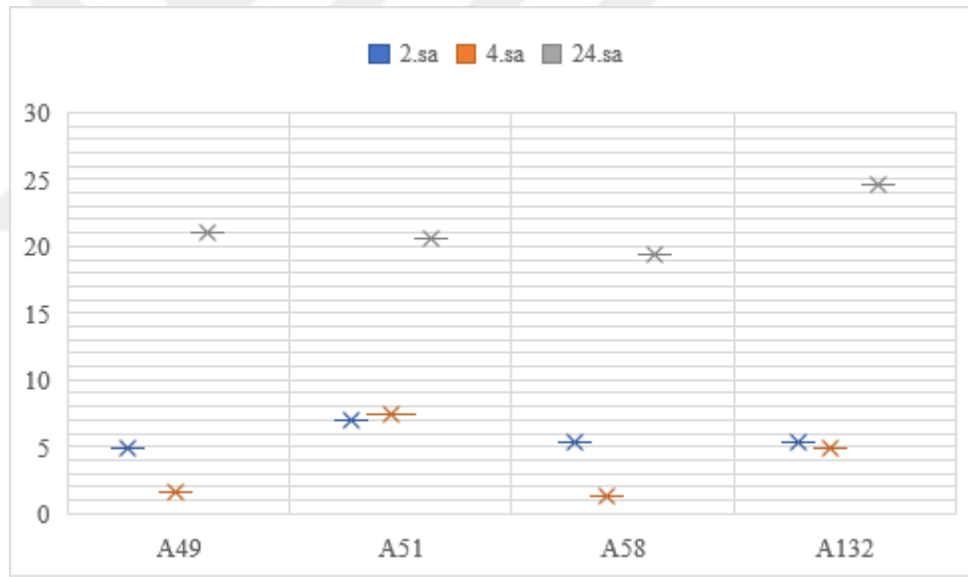
Muhtemel AAB izolatlarının hidrofobisite değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 22’de verilmiştir. Sonuçlar izolat türünün hidrofobisite değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 22. Muhtemel AAB izolatlarının hidrofobisite değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

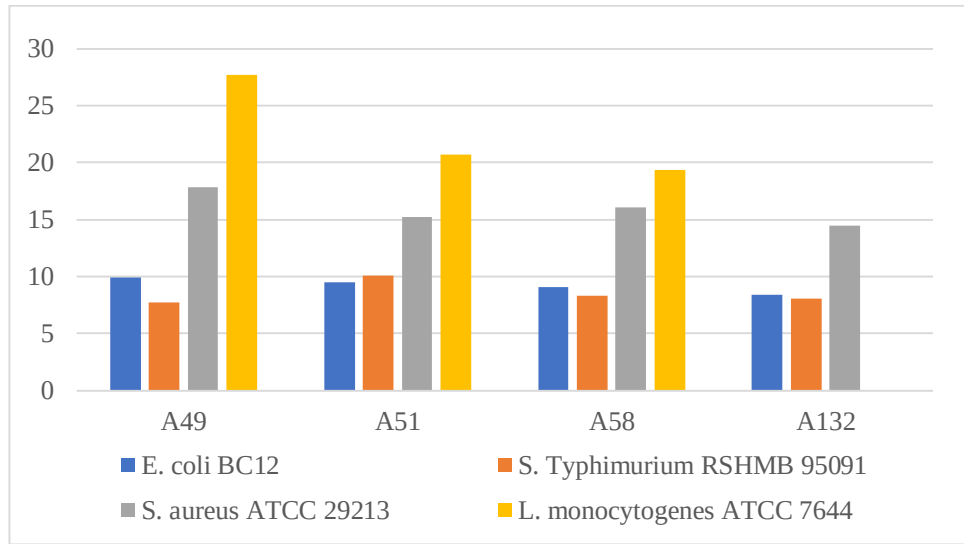
İzolat	N	Hidrofobisite
A49	2	52.0200 ^a
A51	2	52.2950 ^a
A58	2	54.3500 ^a
A132	2	1.2100 ^b

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

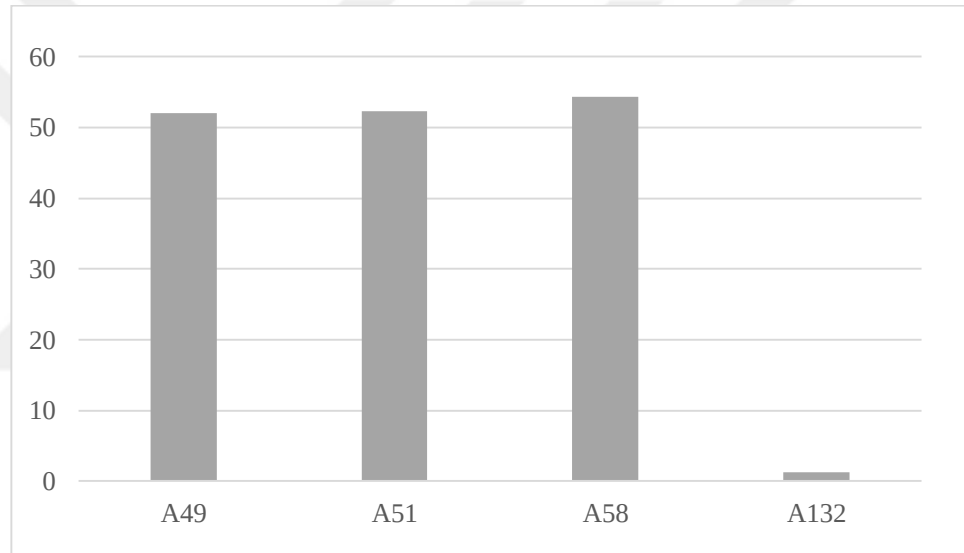
Muhtemel AAB izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri ile ilgili grafikler Şekil 14, Şekil 15 ve Şekil 16’da görülmektedir.



Şekil 14. Muhtemel AAB izolatlarının 2., 4. ve 24. saatlerdeki oto-agregasyon kapasiteleri



Şekil 15. Muhtemel AAB izolatlarının ko-agregasyon kapasiteleri



Şekil 16. Muhtemel AAB izolatlarının hidrofobisite yetenekleri

Antibiyotik direnci

Çalışmada, seçilmiş olan 4 izolatın (A49, A51, A58, A132) EFSA tarafından önerilen 9 farklı antibiyotiğe karşı dirençleri tespit edilmiş ve sonuçları Tablo 23’de verilmiştir. Tablo 23’e bakıldığında; 4 izolatın da klindamisine dirençli olduğu görülmektedir. Ayrıca A49, A51, A58 izolatları antibiyotiklere karşı benzer hassasiyetler göstermekte iken, A132 izolatı antibiyotiklere karşı en yüksek hassasiyeti göstermiştir.

Tablo 23. Muhtemel AAB izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç durumu

İzolat	Antibiyotikler (zon çapı, mm)								
	AM 10 µg	VA 30 µg	CN 10 µg	K 30 µg	S 10 µg	E 15 µg	DA 10 µg	TE 30 µg	C 30 µg
A49	D	D	25.0±0.1	34.0±0.1	15.1±0.1	D	D	23.0±0.3	D
A51	D	D	24.5±0.4	35.3±0.3	29.9±0.2	D	D	23.0±0.1	D
A58	D	D	28.2±0.3	35.9±0.1	30.0±0.1	D	D	26.0±0.4	D
A132	24.1±0.1	23.0±0.1	21.1±0.2	24.4±0.5	20.5±1.1	30.0±0.1	D	30.0±0.1	20.9±0.1

AM:Ampisilin, VA:Vankomisin, CN:Gentamisin, K:Kanamisin, S:Streptomisin, E: Eritromisin, DA:Klindamisin, TE:Tetrasiklin, C:Kloramfenikol; D: dirençli (zon yok)

İzolatların antibiyotik direnç hassasiyeti değerleri üzerine gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 24’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, izolatların antibiyotik direnç değerleri üzerine izolat türü, antibiyotik çeşidi ve izolat türü×antibiyotik çeşidi interaksiyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 24. Muhtemel AAB izolatlarının antibiyotik direnç hassasiyeti değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	Antibiyotik direnç hassasiyeti		
	SD	KO	F
İzolat türü (A)	3	414.387	6241.813**
Antibiyotik çeşidi (B)	8	1128.490	16998.176**
A×B	24	127.252	1916.767**
Hata	36	0.066	
Genel	72		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

İzolatların antibiyotik direnç hassasiyeti değerlerinin Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 25’de verilmiştir. Sonuçlara göre izolat türünün antibiyotik direnç hassasiyeti değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

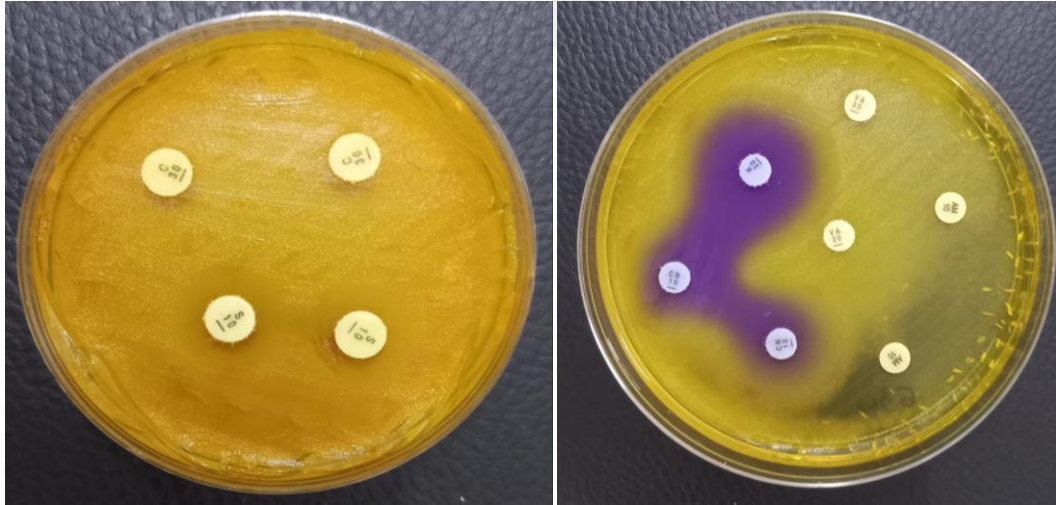
Tablo 25. Muhtemel AAB izolatlarının antibiyotik direnç hassasiyeti değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

İzolat	N	Antibiyotik direnç hassasiyeti
A49	18	10.7944 ^d
A51	18	12.5333 ^c
A58	18	13.3556 ^b
A132	18	21.5833 ^a

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p < 0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Ahmad *et al.* (2004), şeker kamışından izole edilen *Acetobacter diazotrophicus* suşlarının 14 tanesinden 12'sinin çeşitli antibiyotiklere dirençlerinin olduklarını bildirmiştir. Haghshenas *et al.* (2015), antibiyotik direnci ile ilgili yaptıkları bir çalışmada *A. indonesiensis*'in sülfametoksazol ve vankomisine; *A. syzygii*'nin ise eritromisin ve vankomisine dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

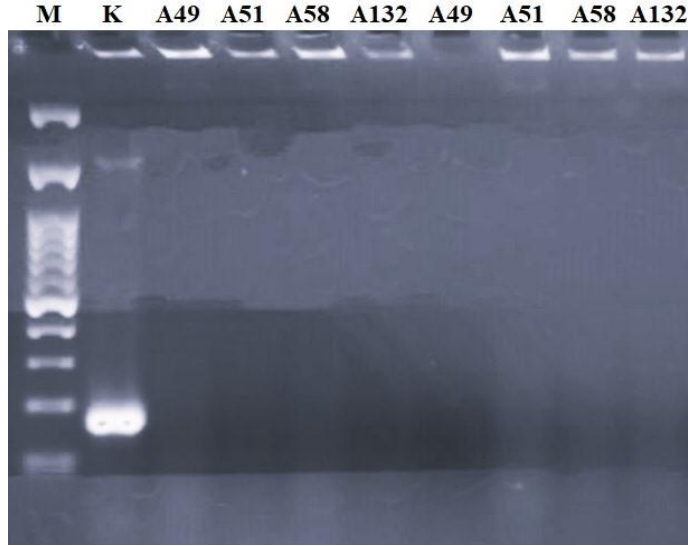
Şekil 17'de, A49 suşunun antibiyotiklere karşı direnç durumu ile ilgili görsel yer almaktadır.



Şekil 17. A49 izolatının antibiyotiklere karşı direnç durumu

Virülans faktör genlerin tespiti

Bu çalışmada, seçilmiş olan 4 izolatın (A49, A51, A58, A132) *esp*, *efa Afs*, *gelE*, *cylA*, *hyl*, *asa*, *ace*, *agg* virülans faktör genlerinin varlığı analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, izolatların hiçbirinde analizi gerçekleştirilen virülans faktör genlerine rastlanmamıştır. Şekil 18'de PCR işlemi ile analiz edilen izolatların sırasıyla *ace* ve *agg* virülans faktör genlerinin jel görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 18. AAB izolatlarının sırasıyla *ace* ve *agg* virülans faktör genlerinin jel görüntüsü (M: Marker; K: Kontrol)

Safra tuzu hidrolaz aktivitesi

A49, A51, A58, A132 izolatlarının BSH aktivitesi belirlenmiş ve A132 haricindeki izolatlardan hiçbirinin BSH aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Tablo 26’de izolatların BEA besiyeri üzerinde oluşturdıkları zon çapı ve BSH aktivite sonuçları yer almaktadır.

Tablo 26. Muhtemel AAB izolatlarının safra tuzu hidrolaz (BSH) aktiviteleri

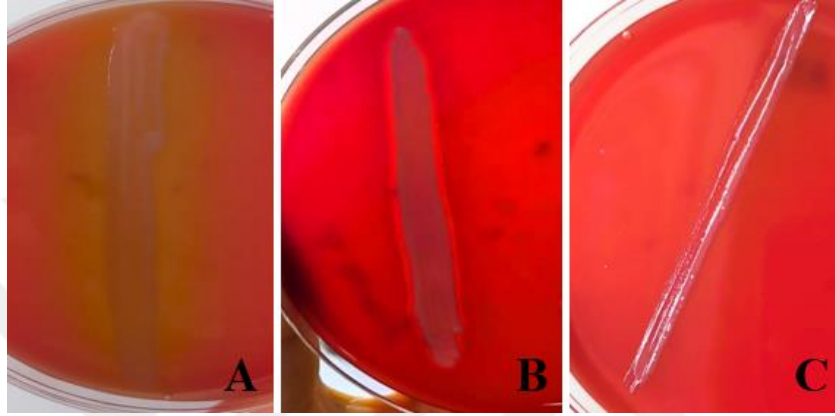
İzolat	BEA besiyerindeki zon çapı (mm)	BSH aktivitesi
A49	0	-
A51	0	-
A58	0	-
A132	16	+

Hemolitik aktivite

Söz konusu izolatların hemolitik aktiviteleri incelenmiş olup A49, A51, A58 izolatlarının γ -hemolitik aktiviteye; A132 izolatının ise α -hemolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Tablo 27’de kanlı agar besiyerlerinde izolatların gösterdikleri hemolitik aktivite sonuçları görülmektedir. Şekil 19’da ise A49 ve A132 izolatı ile *S. aureus* ATCC 29213 suşunun kanlı agarda α -hemolitik, β -hemolitik ve γ -hemolitik aktivite durumları yer almaktadır.

Tablo 27. Muhtemel AAB izolatlarının hemolitik aktiviteleri

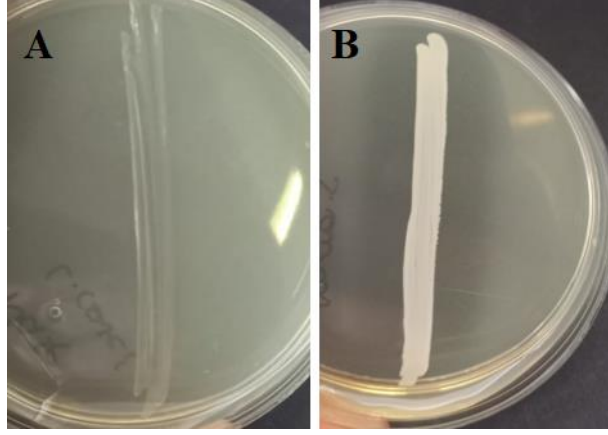
İzolat	Kanlı agar	Hemolitik aktivite
A49	γ -hemolitik	-
A51	γ -hemolitik	-
A58	γ -hemolitik	-
A132	α -hemolitik	+
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	β -hemolitik	+

**Şekil 19.** α -hemolitik A132 (A), β -hemolitik *S. aureus* ATCC 29213 (B), γ -hemolitik A49 (C)'un kanlı agardaki hemolitik aktivite durumları**DNaz aktivitesi**

Bu nedenle, ilgili izolatların DNaz aktiviteleri incelenmiş olup sonuçlar Tablo 28'de sunulmuştur. İzolatların hiçbirisi DNaz aktivitesi göstermemiştir. Kontrol suşları olarak DNaz aktivitesine sahip olmayan *L. casei* ATCC 393 ile DNaz aktivitesine sahip olan *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmış ve ilgili görsel Şekil 20'de verilmiştir.

Tablo 28. Muhtemel AAB izolatlarının DNaz aktiviteleri

İzolat	DNaz besiyerinde şeffaf	DNaz aktivitesi
A49	-	-
A51	-	-
A58	-	-
A132	-	-
<i>L. casei</i> ATCC 393	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+



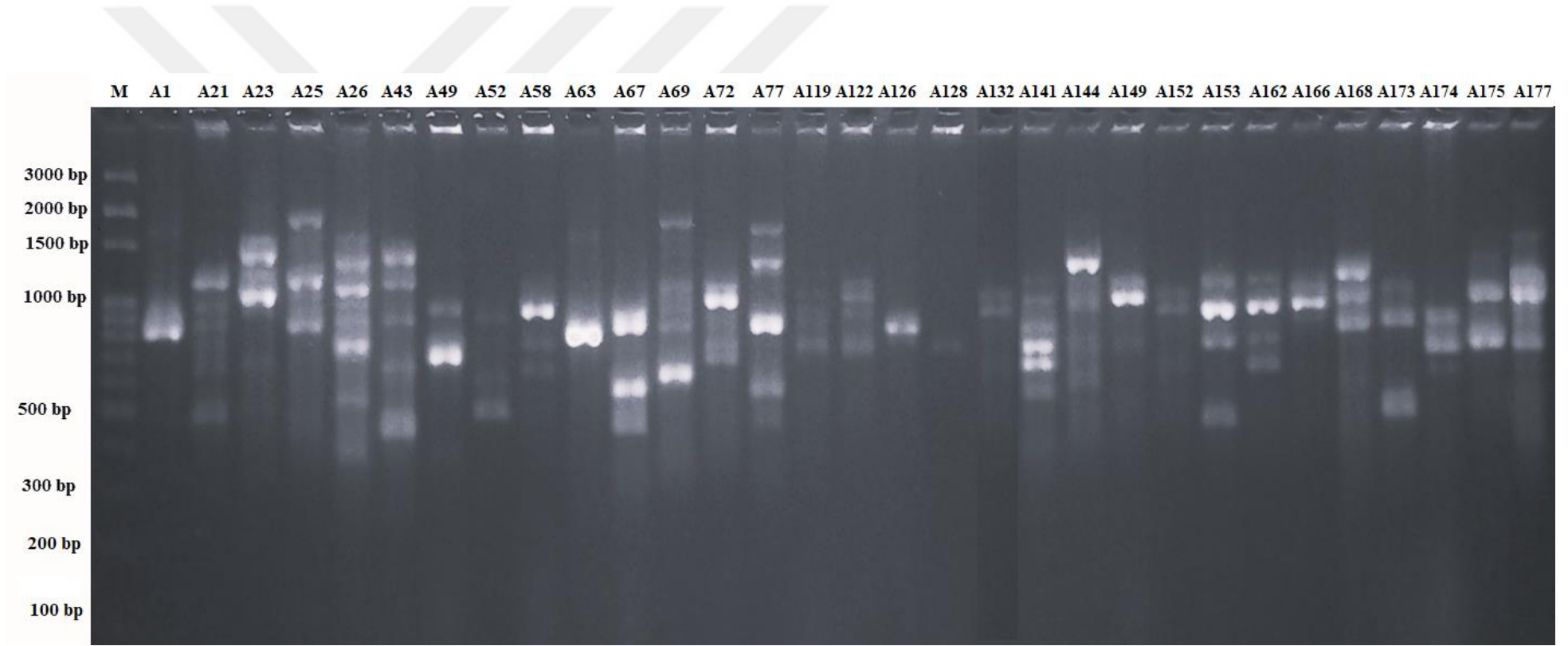
Şekil 20. DNaz besiyerinde zon oluşturmayan *L. casei* ATCC 393 (A) ve zon oluşturan *S. aureus* ATCC 29213 (B) suşlarının DNaz aktivite durumları

Muhtemel Asetik Asit Bakterisi İzolatlarının Moleküler Tanısı

Çalışmada, muhtemel asetik asit bakterilerinin tanısı için klasik PCR yöntemi kullanılmış olup, izolatlar (GTG)₅-Rep-PCR ile DNA fingerprintlerine göre gruplandırılmıştır. Daha sonra, her gruptan temsili bir izolat seçilerek 16S rRNA PCR yöntemi ile tanılanmıştır.

Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının (GTG)₅-Rep-PCR ile gruplandırılması

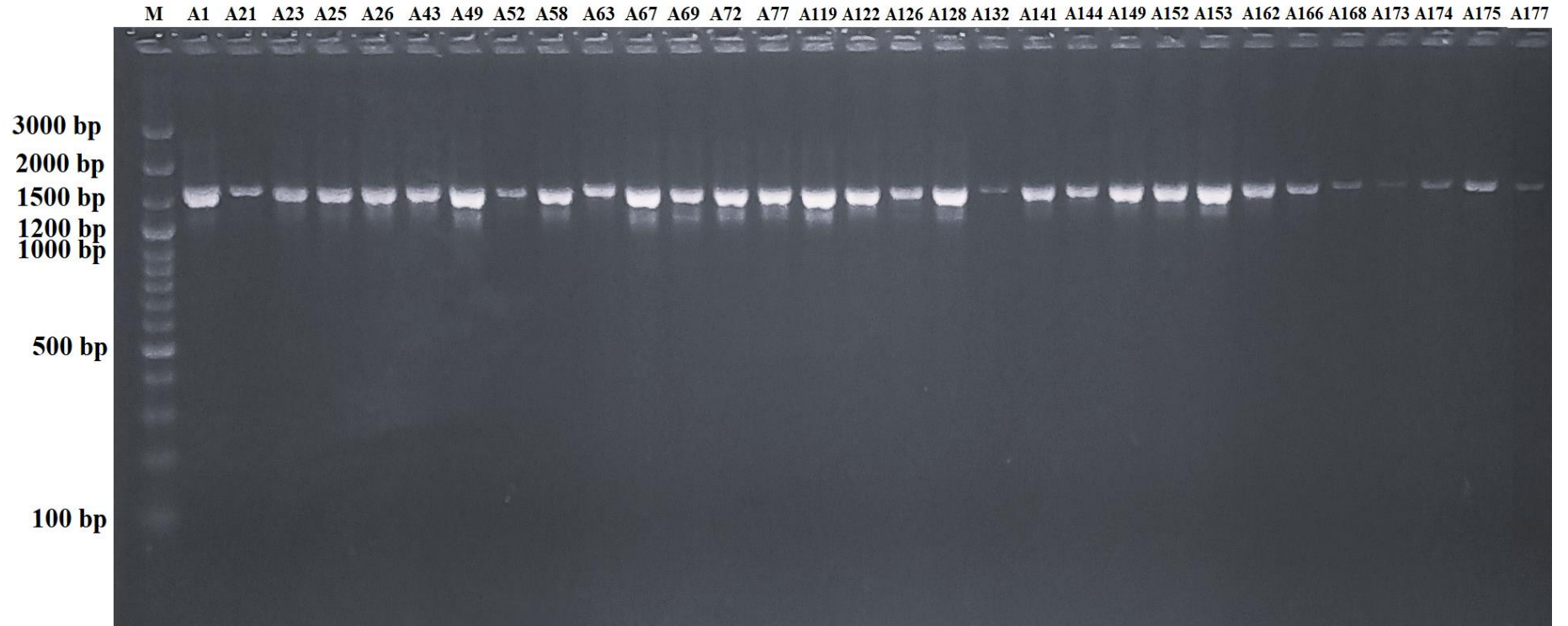
İlk olarak muhtemel AAB izolatlarının (GTG)₅-Rep-PCR ile DNA fingerprintleri elde edilmiş ve ardından elde edilen sonuçlara göre izolatlar arasında bir gruplandırma yapılmıştır. Toplamda 95 muhtemel AAB izolatından (gram ve katalaz özellikleri incelenmiş) 31 farklı grup oluşturulmuştur. Gruplandırıldıktan sonra seçilen temsili izolatların DNA fingerprint jel görüntüleri Şekil 21’de verilmiştir.



Şekil 21. Temsili izolatların (GTG)₅-Rep-PCR ile elde edilen DNA fingerprint görüntüleri (M: marker, bp: baz çifti)

Muhtemel asetik asit bakterisi izolatlarının 16S rRNA ile tanılanması

Temsili izolatlara ait 16S rRNA amplikonlarının jel görüntüsü Şekil 22’de görülmektedir. GYC agardan elde edilen tüm muhtemel AAB izolatlarının gruplandırılması ve seçilen temsili izolatlara ait 16S rRNA tanı sonuçları ise Tablo 29’da verilmiştir. Mevcut sonuçlara göre, 95 muhtemel AAB izolatı olarak görülen izolatların %96.17-100 arasında değişen benzerlik oranları ile 85 tanesinin AAB izolatı olduğu, 10 tanesinin ise AAB izolatı olmadığı (*Brevibacillus laterosporus* ve *Agrococcus jejuensis* türleri) tespit edilmiştir. Oluşturulan 31 farklı gruptan, temsili izolatların 16S rRNA tanısının yapılması sonucunda, temin edilen sirke örneklerinde 16 farklı AAB türü olduğu görülmüştür. Bu 16 farklı AAB türleri; *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter lambici*, *Acetobacter sicerae*, *Acetobacter oryzoeni*, *Acetobacter suratthaniensis*, *Acetobacter persici*, *Acetobacter tropicalis*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter melaceti*, *Komagataeibacter melomenusus*, *Komagataeibacter swingsii*, *Komagataeibacter diospyri*, *Gluconobacter vitians*, *Gluconobacter potus* şeklindedir. Şekil 23’de ise sirke örneklerinde tespit edilen 16 farklı AAB türünün, toplam AAB izolatları içerisindeki yüzdesel dağılımı daire grafik ile gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde, sirke örneklerinde en yüksek sayıda *A. ghanensis* (%26) ve *A. fabarum* (%19) olduğu, en düşük sayıda ise *A. persici* (%1), *A. tropicalis* (%1) ve *G. potus* (%1) olduğu görülmektedir.



Şekil 22. Temsili izolatların 8F/1541R primerleri ile elde edilen 16S rRNA ampliconlarının jeldeki görüntüsü (M: marker, bp: baz çifti)

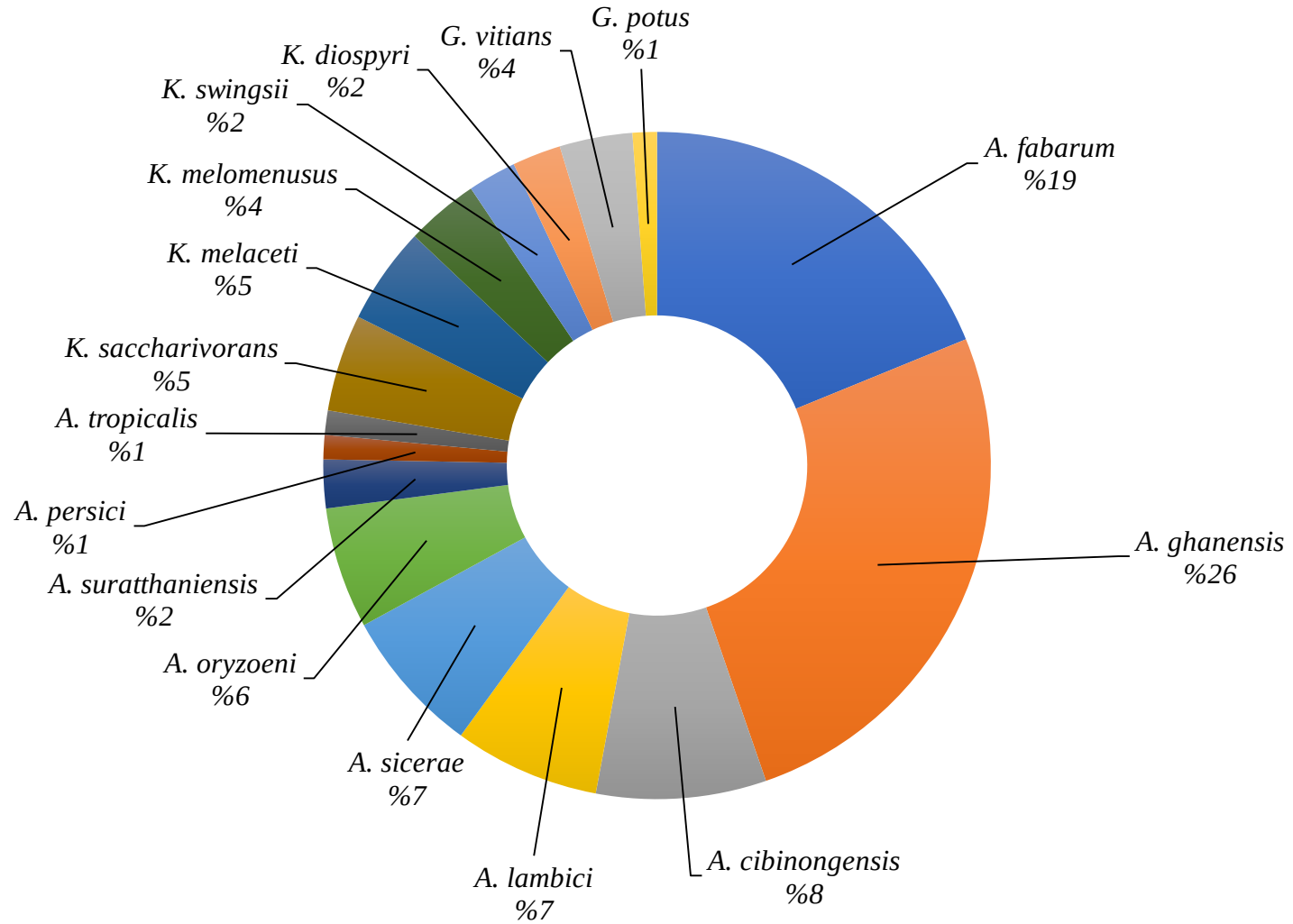
Tablo 29. Muhtemel AAB izolatlarının tanı sonuçları

Grup	İzolatlar	16S rRNA tanı sonucu	Benzerlik oranı (%)	İzolat sayısı	Sekans ID
1	A1*, A2, A3, A14, A15, A16, A17, A19	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.47	8	NR_112212.1
2	A21*	<i>Agrococcus jejuensis</i>	98.41	1	NR_042551.1
3	A23*, A24, A33, A34, A134	<i>Acetobacter oryzoeni</i>	100	5	NR_180390.1
4	A25*	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	100	1	NR_108135.1
5	A26*	<i>Acetobacter ghanensis</i>	100	1	NR_113555.1
6	A38, A39, A40, A41, A43*, A46	<i>Acetobacter lambici</i>	100	6	NR_117714.1
7	A18, A49*, A50, A51	<i>Acetobacter ghanensis</i>	100	4	NR_113555.1
8	A52*, A53, A54, A55, A107, A110	<i>Acetobacter sicerae</i>	99.64	6	NR_133949.1
9	A56, A57, A58*	<i>Acetobacter ghanensis</i>	100	3	NR_113555.1
10	A63*	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	99.75	1	NR_112212.1
11	A67*	<i>Acetobacter ghanensis</i>	100	1	NR_113556.1
12	A68, A69*, A70	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	100	3	NR_179977.1
13	A71, A72*	<i>Acetobacter fabarum</i>	100	2	NR_113556.1
14	A77*	<i>Acetobacter ghanensis</i>	99.82	1	NR_113556.1
15	A115, A116, A119*, A131	<i>Acetobacter fabarum</i>	99.03	4	NR_113556.1
16	A122*, A123, A127, A129	<i>Acetobacter fabarum</i>	100	4	NR_113556.1

Tablo 29. (Devamı)

Grup	İzolatlar	16S rRNA tanı sonucu	Benzerlik oranı (%)	İzolat sayısı	Sekans ID
17	A124, A125, A126*	<i>Gluconobacter vitians</i>	100	3	NR_181152.1
18	A101, A128*	<i>Komagataeibacter swingsii</i>	96.17	2	NR_179977.1
19	A132*	<i>Komagataeibacter melaceti</i>	98.56	1	NR_181177.1
20	A140, A141*, A142	<i>Komagataeibacter melomenusus</i>	100.00	3	NR_181178.1
21	A144*, A145, A146, A148, A169, A170, A178	<i>Acetobacter cibinongensis</i>	99.82	7	NR_024771.1
22	A149*, A150	<i>Acetobacter fabarum</i>	100	2	NR_113556.1
23	A151, A152*, A164	<i>Komagataeibacter melaceti</i>	99.30	3	NR_181177.1
24	A137, A138, A139, A153*, A154, A155, A156	<i>Acetobacter ghanensis</i>	100	7	NR_113555.1
25	A159, A160, A161, A162*, A163	<i>Acetobacter ghanensis</i>	100	5	NR_113555.1
26	A165, A166*	<i>Acetobacter suratthaniensis</i>	99.85	2	NR_146709.1
27	A168*	<i>Acetobacter tropicalis</i>	99.44	1	NR_113846.1
28	A173*	<i>Acetobacter persici</i>	98.81	1	NR_113547.1
29	A174*	<i>Gluconobacter potus</i>	97.59	1	NR_118196.1
30	A175*, A133	<i>Komagataeibacter diospyri</i>	100	2	NR_179977.1
31	A176, A177*, A179, A180	<i>Acetobacter fabarum</i>	99.74	4	NR_113556.1

*Sekans işlemi için gönderilen temsili izolatlar



Şekil 23. Asetik asit bakterisi türlerinin, toplam asetik asit bakterisi izolatları içerisindeki yüzdesel dağılımı

Starter ve probiyotik kültür testleri gerçekleştirilerek seçilmiş olan 4 izolatın (A49, A51, A58, A132) 16S rRNA ile tanısının sonucunda A49, A51 ve A58 izolatlarının *A. ghanensis* olduğu; A132 izolatının ise *K. melaceti* olduğu belirlenmiştir. İzolatların tüm analizleri incelendiğinde A132 izolatının (*K. melaceti*) probiyotik sirke üretimi için uygun olmadığı kanısına varılmıştır. A49, A51, A58 izolatları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise; A49 izolatının simüle mide ortamına karşı daha yüksek direnç göstermesi (%96.1 canlı kalma oranı), oto-agregasyon ve ko-agregasyon kapasitesinin daha yüksek olması avantajları ile öne çıktığı görülmektedir. Bu nedenlerden dolayı, planlanan doğal probiyotik sirke üretiminde A49 izolatının (*A. ghanensis*) kullanılmasına karar verilmiştir.

Maya İzolatlarının Starter Kültür Özellikleri

Mayaların starter kültür özelliklerinin belirlenmesinde; farklı şeker konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri, düşük pH değerlerinde gelişme yetenekleri ve farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri tespit edilmiştir. İzolatların farklı şeker konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri Tablo 30'da, düşük pH değerlerinde gelişme yetenekleri Tablo 31'de ve farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri Tablo 32'de verilmiştir.

Senses-Ergul and Ozbas (2016), “Kalecik Karası” ve “Emir” üzümlerinin fermantasyonu sırasında elde edilen 20 adet *S. cerevisiae* izolatının teknolojik özelliklerini incelemiştir. İzolatların tümü 12°C, 16°C, 20°C, 37°C ve 42°C sıcaklık değerlerinde, pH 3, pH 4 değerlerinde ve 30 °Briks şeker konsantrasyonunda gelişim göstermiştir.

Tablo 30. Maya izolatlarının farklı şeker konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri

İzolat numarası	%20 şeker	%25 şeker	%30 şeker	İzolat numarası	%20 şeker	%25 şeker	%30 şeker	İzolat numarası	%20 şeker	%25 şeker	%30 şeker	İzolat numarası	%20 şeker	%25 şeker	%30 şeker
B1	++	+	+	B28	+	+	+	B57	+++	+++	+++	B84	y	y	y
B2	++	++	+	B29	y	+++	+	B58	+++	+++	+++	B85	y	+++	y
B3	+	+	+	B30	y	+++	+	B59	y	-	-	B86	y	y	y
B4	++	++	+	B31	++	++	++	B60	+++	+++	+++	B87	+++	++	++
B5	+	+	+	B32	++	++	++	B61	y	+	-	B88	+++	++	++
B6	y	+++	-	B33	++	++	+	B62	+++	+++	+++	B89	+++	++	++
B7	y	+++	+	B34	++	++	++	B63	+++	+++	y	B90	++	++	++
B8	+	+	+	B35	y	+++	+++	B64	+	+	+	B91	++	++	++
B9	+	+	+	B36	+++	+++	++	B65	++	++	++	B92	y	y	+++
B10	++	++	+++	B37	y	+++	+++	B66	++	+	+	B93	y	y	+++
B11	+++	++	+++	B38	+++	+++	+++	B67	+	+	+	B94	y	y	-
B12	+++	+	+	B39	+++	+++	+++	B68	++	++	+	B95	y	y	y
B13	+++	++	++	B40	+++	+++	++	B69	++	+	+++	B96	+++	+++	+++
B14	+	+	+	B41	y	y	y	B70	-	-	++	B97	++	++	+++
B15	y	y	y	B42	++	++	++	B71	y	y	y	B98	+	+	+
B16	y	y	y	B43	y	y	y	B72	++	+++	y	B99	+	+	+
B17	+	+	+	B44	y	y	y	B73	y	+++	+++	B100	y	+++	+++
B18	+++	+	+++	B45	+++	++	++	B74	y	+++	y	B101	y	y	y
B19	++	++	+++	B46	++	++	++	B75	y	+++	+++	B102	+++	+++	+++
B20	+	+	+	B47	++	++	++	B76	+++	+++	+++	B103	+++	+++	-
B21	+	+	+++	B48	++	++	+	B77	+++	+++	y	B104	y	y	y
B22	+	+	+	B49	+++	+++	++	B78	+++	y	+++	B105	y	y	-
B23	y	++	+	B50	++	++	++	B79	y	+++	+++	B106	y	y	-
B24	+	+	+	B51	++	+++	++	B80	+++	+++	y	B107	y	y	y
B25	++	++	+	B52	y	y	y	B81	+++	+++	y	B108	y	y	y
B26	++	++	+	B55	+	+	++	B82	+++	+++	+++				
B27	+	+	++	B56	++	++	+++	B83	y	y	y				

-: üreme yok, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var, +++: çok iyi düzeyde üreme var, y: yüksek yoğunlukta üreme var

Tablo 31. Maya izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişme yetenekleri

İzolat numarası	pH 3	pH 4	İzolat numarası	pH 3	pH 4	İzolat numarası	pH 3	pH 4	İzolat numarası	pH 3	pH 4
B1	+	++	B28	+++	++	B57	+++	+++	B84	y	y
B2	+	+++	B29	y	+++	B58	+++	+++	B85	y	y
B3	+	++	B30	y	+++	B59	y	+++	B86	+++	+++
B4	+	+++	B31	y	+++	B60	+++	+++	B87	y	+++
B5	+	+	B32	y	+++	B61	y	+++	B88	y	+++
B6	+++	+++	B33	+++	+++	B62	+++	+++	B89	y	+++
B7	+++	+++	B34	+++	+++	B63	+++	+++	B90	+++	+++
B8	++	++	B35	+++	y	B64	+++	+++	B91	+++	+++
B9	+	++	B36	+++	+++	B65	+++	+++	B92	y	+++
B10	y	+++	B37	+++	+++	B66	+++	+++	B93	y	+++
B11	+	++	B38	+++	+++	B67	+++	+++	B94	y	+++
B12	+	+++	B39	+++	+++	B68	+++	+++	B95	+++	+++
B13	+	+++	B40	+++	+++	B69	+++	+++	B96	+++	+++
B14	+	++	B41	+++	+++	B70	+++	+++	B97	+++	+++
B15	++	++	B42	+++	+++	B71	++	+++	B98	++	+
B16	+++	++	B43	+++	+++	B72	+++	+++	B99	++	+
B17	+	++	B44	+++	+++	B73	+++	+++	B100	+++	+++
B18	++	+++	B45	+++	+++	B74	+++	+++	B101	y	y
B19	+++	+++	B46	+++	+++	B75	+++	+++	B102	+++	+++
B20	++	++	B47	+++	+++	B76	+++	+++	B103	+++	+++
B21	+++	+++	B48	+++	++	B77	+++	+++	B104	+++	y
B22	++	+++	B49	+++	+++	B78	+++	+++	B105	y	++
B23	+++	+++	B50	+++	+++	B79	+++	+++	B106	y	+++
B24	++	+	B51	+++	+++	B80	+++	+++	B107	+++	+++
B25	+++	+++	B52	+++	+++	B81	+++	+++	B108	+++	+++
B26	+++	+++	B55	+	++	B82	y	y			
B27	+++	++	B56	+++	+++	B83	+++	+++			

+: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var, +++: çok iyi düzeyde üreme var, y: yüksek yoğunlukta üreme var

Tablo 32. Maya izolatlarının farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri

İzolat numarası	10°C	20°C	37°C	İzolat numarası	10°C	20°C	37°C	İzolat numarası	10°C	20°C	37°C	İzolat numarası	10°C	20°C	37°C
B1	+	+	-	B28	+	+	-	B57	+	++	-	B84	++	+++	+++
B2	+	+	-	B29	+++	+++	+++	B58	+	+++	-	B85	++	+++	++
B3	+	+	-	B30	y	+++	+++	B59	y	+++	++	B86	+	+++	-
B4	+	+	-	B31	-	++	++	B60	+	++	-	B87	-	++	+++
B5	+	+	-	B32	-	+	+++	B61	+++	+++	++	B88	-	+++	+++
B6	-	y	+++	B33	-	+	+++	B62	+	+++	-	B89	-	++	+++
B7	-	y	y	B34	+	+	+++	B63	+	++	-	B90	-	+	+++
B8	+	+	-	B35	+++	+++	+++	B64	+	+	-	B91	-	+++	+++
B9	+	+	-	B36	+	+++	++	B65	+	+	-	B92	+	+++	+++
B10	+	+++	+	B37	+	+++	+	B66	+	+	-	B93	+	+++	+++
B11	+	+++	-	B38	+	+++	+	B67	+	+	-	B94	+++	+++	+++
B12	+	+++	-	B39	-	+++	+++	B68	+	+	-	B95	+	+++	-
B13	+	+	+	B40	+	+++	++	B69	+++	+++	++	B96	-	+++	++
B14	+	+	-	B41	+	+++	+	B70	++	+++	-	B97	+	+	++
B15	-	+++	++	B42	-	+++	+++	B71	+	+++	++	B98	-	+	++
B16	-	+++	++	B43	-	+++	+++	B72	+++	+++	++	B99	+	++	-
B17	+	+	+	B44	-	+++	++	B73	-	+++	+++	B100	+	+++	+++
B18	+	+++	+++	B45	-	++	-	B74	-	+++	+++	B101	++	+++	+++
B19	+	+	+++	B46	-	++	-	B75	-	+++	++	B102	-	+++	+++
B20	+	+	-	B47	-	++	-	B76	-	+++	+++	B103	+++	+++	+++
B21	-	+	-	B48	+	+	-	B77	-	+++	+++	B104	++	+++	+++
B22	-	+	++	B49	+	+++	+++	B78	+++	+++	+++	B105	+++	+++	+++
B23	-	+	+++	B50	-	++	+++	B79	+	+++	+	B106	+++	+++	+++
B24	-	+	-	B51	-	+	+++	B80	+++	+++	++	B107	++	+++	+++
B25	-	++	+	B52	+	+++	-	B81	+++	+++	++	B108	++	+++	++
B26	-	+	++	B55	+	++	-	B82	+++	+++	++				
B27	-	++	-	B56	+	++	-	B83	+	+++	+				

-.: üreme yok, +: üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var, +++: çok iyi düzeyde üreme var, y: yüksek yoğunlukta üreme var

Maya İzolatlarının Probiyotik Kültür Özellikleri

Maya izolatlarının safra tuzuna tolerans, mide ortamına direnç, oto-agregasyon ve ko-agregasyon kapasitesi, hidrofobisite, antifungal direnci, BSH aktivitesi, hemolitik aktivite ve DNaz aktivitesi özellikleri belirlenmiştir.

Safra tuzuna tolerans

İzolatların 24 saatte %0.3 safra tuzuna toleransları ve mide ortamına dirençleri belirlenmiş olup sonuçlar Tablo 33'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde, 106 maya izolatının tümünün 24 saatte %0.3 safra tuzuna tolerans gösterdiği görülmektedir.

Ogunremi *et al.* (2015), bazı tahıl bazlı Nijerya geleneksel fermente gıda ürünlerinden izole etmiş oldukları *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii* *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis* türü mayaların 24 saatte %0.3 safra ortamında canlı kalabildiklerini tespit etmişlerdir. Cumur (2022), geleneksel yöntemlerle üretilmiş zeytin ve zeytin ürünlerinden izole ettiği 106 maya izolatından 101 tanesinin 48 saatte %0.3 safra ortamında canlı kalabildiğini bildirmiştir.

Mide ortamına direnç

%0.3 safra ortamına tolerans gösteren izolatların, simüle mide ortamına dirençleri belirlenerek sonuçlar Tablo 34'de sunulmuştur. %0.3 safra tuzuna tolerans gösteren 106 izolattan 71 tanesinin mide ortamına direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Cumur (2022), geleneksel yöntemlerle üretilmiş zeytin ve zeytin ürünlerinden izole ettiği 106 maya izolatından 47 tanesinin simüle mide ortamına direnç gösterdiğini rapor etmiştir. Amorim *et al.* (2018), 150 maya izolatından 5 tanesinin yüksek canlılık (>%85) göstererek simüle mide ortamında canlı kalabildiğini bildirmiştir. Kefir danelerinden izole edilen mayaların probiyotik karakterizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, 34 maya izolatının simüle mide ortamında canlı kalma oranlarının %13.6-95.0 arasında değiştiği belirlenmiştir (Diosma *et al.* 2014)

Tablo 33. Maya izolatlarının 24 saatte %0.3 safra tuzuna toleransları

İzolat numarası	%0.3 safra tuzu	İzolat numarası	%0.3 safra tuzu	İzolat numarası	%0.3 safra tuzu
B1	+	B37	+++	B74	+++
B2	+	B38	+++	B75	++
B3	+	B39	++	B76	++
B4	+	B40	+++	B77	+++
B5	+	B41	+++	B78	+++
B6	+++	B42	+++	B79	++
B7	y	B43	++	B80	+++
B8	+	B44	++	B81	+++
B9	+	B45	+	B82	y
B10	+++	B46	+	B83	+++
B11	+++	B47	+++	B84	+++
B12	+++	B48	+	B85	+++
B13	+++	B49	+++	B86	++
B14	+	B50	+	B87	+
B15	++	B51	++	B88	+
B16	++	B52	+++	B89	+
B17	+	B55	+	B90	+
B18	+	B56	+	B91	+
B19	+	B57	+	B92	+++
B20	+	B58	+++	B93	+++
B21	+	B59	+++	B94	+++
B22	+	B60	+	B95	+++
B23	+	B61	y	B96	+++
B24	+	B62	+++	B97	+
B25	+	B63	+++	B98	+
B26	+++	B64	+	B99	+
B27	+	B65	+	B100	+++
B28	+	B66	+	B101	++
B29	y	B67	+	B102	+++
B30	+++	B68	+	B103	+++
B31	+	B69	+++	B104	+++
B32	+	B70	+++	B105	+++
B33	+	B71	++	B106	+++
B34	+	B72	y	B107	y
B35	+++	B73	+++	B108	+++
B36	+++				

-: üreme yok, üreme var, ++: iyi düzeyde üreme var, +++: çok iyi düzeyde üreme var, y: yüksek yoğunlukta üreme var

Tablo 34. Safra tolerans gösteren maya izolatlarının simüle mide ortamına (pH 3) dirençleri

İzolat numarası	Mide ortamı	İzolat numarası	Mide ortamı	İzolat numarası	Mide ortamı
B1	+	B37	+	B74	-
B2	+	B38	+	B75	-
B3	+	B39	+	B76	-
B4	-	B40	+	B77	-
B5	+	B41	+	B78	+
B6	-	B42	-	B79	+
B7	-	B43	+	B80	+
B8	+	B44	+	B81	+
B9	+	B45	+	B82	+
B10	-	B46	+	B83	+
B11	-	B47	-	B84	+
B12	+	B48	-	B85	+
B13	+	B49	+	B86	+
B14	-	B50	-	B87	+
B15	+	B51	-	B88	+
B16	+	B52	-	B89	+
B17	-	B55	-	B90	+
B18	+	B56	-	B91	+
B19	+	B57	+	B92	+
B20	+	B58	-	B93	+
B21	+	B59	+	B94	+
B22	-	B60	-	B95	+
B23	-	B61	+	B96	+
B24	-	B62	+	B97	+
B25	-	B63	+	B98	-
B26	-	B64	-	B99	-
B27	-	B65	-	B100	+
B28	+	B66	-	B101	+
B29	+	B67	-	B102	+
B30	+	B68	-	B103	+
B31	+	B69	+	B104	+
B32	+	B70	+	B105	+
B33	+	B71	+	B106	+
B34	+	B72	+	B107	+
B35	+	B73	-	B108	+
B36	+				

-: canlılık yok, +: canlılık var

İzolatların starter kültür özellikleri, %0.3 safra tuzuna tolerans ve mide ortamına direnç analizlerinin sonuçları incelendikten sonra, diğer probiyotik kültür analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla izolatlar arasından seçim yapılmıştır. Tablo 30, Tablo 31, Tablo 32, Tablo 33 ve Tablo 34'deki sonuçlara bakıldığında, izolatların genel itibarıyla iyi üreme göstermelerinden dolayı, mümkün mertebe farklı starter kültür özelliklerine sahip izolatlar seçilmeye çalışılmıştır. %0.3 safra tuzunu tolere eden ve mide ortamına direnç gösteren, iyi starter kültür özelliklerine sahip olduğu düşünülerek seçilen izolatlar B13, B19, B30, B39, B41, B49, B71, B83, B91, B96, B97, B102 ve B104 olmak üzere toplamda 13 maya izolatıdır. Seçilen bu 13 maya izolatının simüle mide ortamına ne düzeyde direnç gösterdiği Tablo 35'de

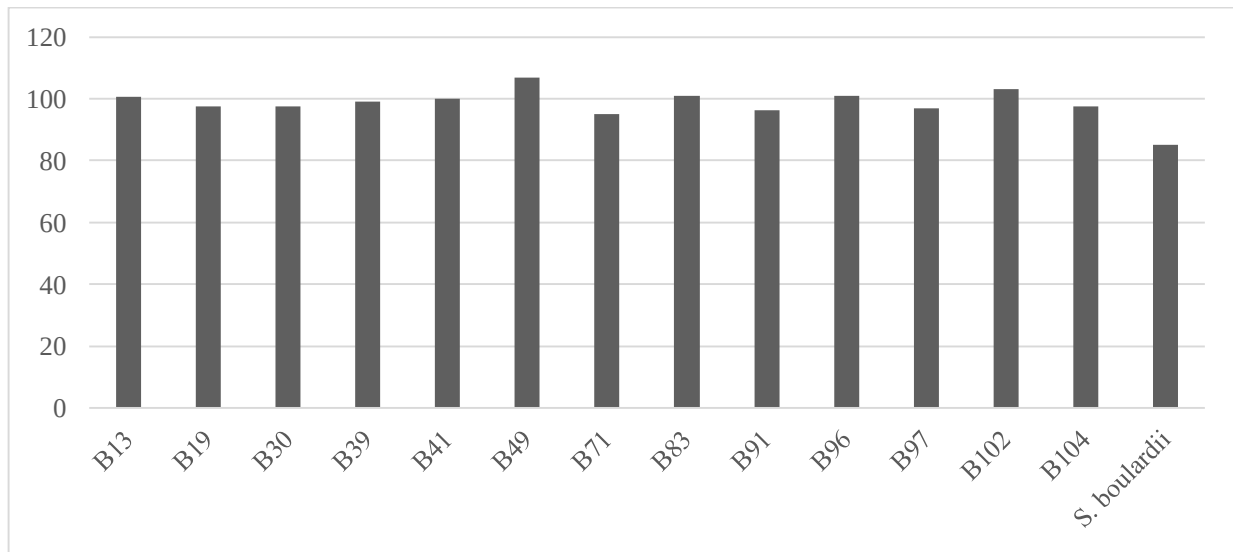
verilmiştir. Kontrol olarak ticari probiyotik *Saccharomyces boulardii* suşu kullanılmıştır. B13, B41, B49, B83, B96 ve B102 izolatlarının simüle mide ortamında sayılarının arttığı tespit edilmiştir.

Tablo 35. Maya izolatlarının başlangıç sayıları (0.sa), simüle mide ortamında (pH 3) bekledikten sonraki sayıları (3.sa)

İzolat	Başlangıç sayısı (kob/ml)	Mide ortamında bekledikten sonraki sayısı (kob/ml)
	0.sa	3.sa
B13	2.8×10^6	3.0×10^6
B19	7.8×10^6	5.2×10^6
B30	8.2×10^6	5.5×10^6
B39	1.0×10^6	9.0×10^5
B41	2.5×10^6	2.6×10^6
B49	1.4×10^6	3.8×10^6
B71	8.0×10^5	4.0×10^5
B83	1.7×10^6	2.0×10^6
B91	4.0×10^6	2.3×10^6
B96	9.6×10^6	1.1×10^7
B97	3.2×10^6	1.9×10^6
B102	5.5×10^6	9.2×10^6
B104	3.1×10^6	2.2×10^6
Ticari probiyotik <i>S. boulardii</i>	5.2×10^6	5.0×10^5

Sonuçlar ortalama değerler hesaplanarak verilmiştir.

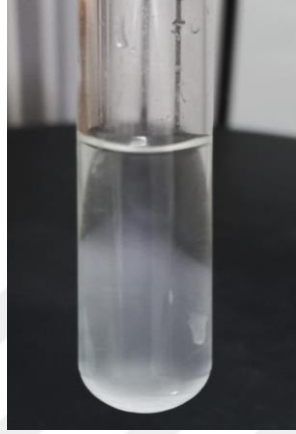
Şekil 24’de izolatların canlılık yüzdeleri sütun grafiği ile gösterilmiştir. Grafiğe göre, en yüksek canlılık oranının %107 ile B49 izolatına ait olduğu, en düşük canlılık oranının ise %95 ile B71 izolatına ait olduğu görülmektedir.



Şekil 24. Simüle mide ortamında maya izolatlarının canlı kalma yüzdeleri

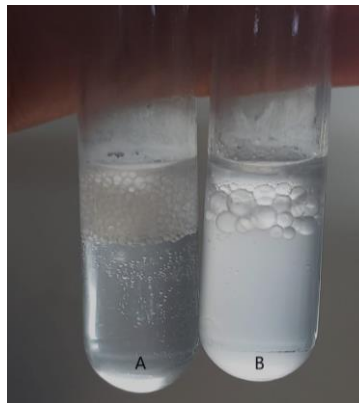
Oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite kapasitesi

Seçilen 13 izolatın oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri tespit edilerek sonuçlar Tablo 36’da verilmiştir. Maya izolatlarının oto-agregasyon kapasiteleri 2., 4. ve 24. saatlerde değişkenlik göstermiştir. 2. saatten 24. saate kadarki bu değişkenlik dikkate alındığında, en iyi oto-agregasyon kapasitesinin B13, B19, B30, B39, B71 ve B91 izolatlarına ait olduğu görülmüştür. Şekil 25’de B19 izolatına ait oto-agregasyon görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 25. B19 izolatının 4. saatteki oto-agregasyonu

Maya izolatlarının ko-agregasyon kapasitelerine bakıldığında; *E. coli* BC12 için %14.47-47.71 arasında olduğu, *S. Typhimurium* RSHMB 95091 için %21.64-45.45 arasında olduğu, *S. aureus* ATCC 29213 için %27.96-50.65 arasında olduğu, *L. monocytogenes* ATCC 7644 için ise %23.53-53.66 arasında olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, izolatların benzer ko-agregasyon yeteneği gösterdikleri ancak B30 ve B71 izolatlarının diğer izolatlara göre daha iyi bir ko-agregasyon kapasitesine sahip oldukları görülmüştür. Maya izolatlarının %14.45-85.0 arasında değişen hidrofobisite yeteneklerine sahip oldukları; en düşük hidrofobisite kapasitesinin B102 izolatına ve en yüksek hidrofobisite kapasitesinin B39 ve B71 izolatlarına ait olduğu tespit edilmiştir. Şekil 26’da B30 ve B41 izolatlarına ait hidrofobisite görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 26. B41 izolatı (A) ve B30 izolatının (B) hidrofobisite yetenekleri

Tablo 36. Maya izolatların oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri (%)

İzolat	Oto-agregasyon			Ko-agregasyon				Hidrofobisite
	2.sa	4.sa	24.sa	<i>E. coli</i> BC12	<i>S. Typhimurium</i> RSHMB 95091	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	
B13	83.46±1.04	72.91±3.88	74.54±0.71	28.37±1.87	36.26±1.64	37.50±0.04	42.00±0.88	32.70±7.11
B19	77.67±6.62	76.36±3.76	77.02±2.30	33.85±0.37	36.50±0.23	41.37±1.89	53.66±1.60	33.70±0.56
B30	74.75±4.46	74.33±1.48	84.51±3.52	42.51±1.00	45.45±0.92	50.65±1.01	46.72±1.21	23.35±3.88
B39	68.80±0.84	77.37±2.72	84.52±0.78	34.55±0.44	33.66±0.33	35.41±0.07	40.68±0.56	85.00±0.49
B41	68.70±4.52	71.36±1.98	72.09±1.47	28.09±1.21	30.35±2.39	44.53±1.67	35.46±0.81	71.48±0.12
B49	68.56±0.63	60.11±1.40	61.24±1.54	29.56±0.54	28.69±0.91	27.96±1.54	34.00±0.25	69.18±4.41
B71	80.60±1.55	76.20±4.24	87.20±1.82	44.71±0.78	42.06±0.03	46.34±0.40	43.56±0.57	84.23±4.21
B83	50.0±1.42	48.0±2.58	63.30±0.00	26.84±0.01	26.48±0.21	36.58±0.47	31.92±0.44	65.85±5.62
B91	78.25±0.21	72.75±1.62	75.54±2.45	34.12±0.13	38.23±0.49	42.20±0.64	39.02±3.60	68.35±4.17
B96	52.20±1.55	54.00±4.20	61.78±0.89	23.42±0.90	29.55±0.27	31.15±0.47	30.76±0.93	26.91±1.00
B97	16.20±2.12	39.42±2.80	39.92±2.84	14.47±0.67	21.64±1.09	31.06±0.51	23.53±0.34	76.15±2.00
B102	74.90±1.13	77.15±0.07	66.14±0.76	22.88±0.20	25.76±0.61	39.44±0.55	32.92±0.15	14.45±2.19
B104	67.80±1.83	67.08±2.85	75.54±1.32	35.27±0.10	38.79±0.37	50.20±5.87	41.79±0.85	68.27±3.68

Tablo 37. Maya izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	Oto-agregasyon			Varyasyon kaynakları	Ko-agregasyon			Varyasyon kaynakları	Hidrofobisite		
	SD	KO	F		SD	KO	F		SD	KO	F
İzolat türü (A)	12	1141.408	176.765**	İzolat türü (A)	12	377.109	223.826**	İzolat türü	12	1255,012	92,800**
Oto-agregasyon süresi (B)	2	178.762	27.684**	Patojen türü (B)	3	447.431	265.564**	Hata	13	13,524	
A×B	24	72.600	11.243**	A×B	36	26.680	15.836**	Genel	26		
Hata	39	6.457		Hata	52	1.685					
Genel	78			Genel	104						

*önemli (p<0.05); **çok önemli (p<0.01); SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Maya izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yeteneklerinin sonuçları üzerine gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 37’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, izolatların oto-agregasyon değerleri üzerine izolat türü, oto-agregasyon süresi ve izolat türü×oto-agregasyon süresi interaksiyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu; izolatların ko-agregasyon değerleri üzerine izolat türü, patojen türü ve izolat türü×patojen türü interaksiyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu; izolatların hidrofobisite değerleri üzerinde izolat türünün $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Maya izolatlarının oto-agregasyon değerlerinin Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 38’de, ko-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 39’da, hidrofobisite değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 40’da verilmiştir. Sonuçlar izolat türünün oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 38. Maya izolatlarının oto-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

İzolat	N	Oto-agregasyon
B13	6	76.9733 ^b
B19	6	77.0183 ^b
B30	6	77.8650 ^b
B39	6	76.8967 ^b
B41	6	70.7167 ^d
B49	6	63.3050 ^e
B71	6	81.3350 ^a
B83	6	53.7683 ^f
B91	6	75.5150 ^{bc}
B96	6	55.9917 ^f
B97	6	31.8467 ^g
B102	6	72.7300 ^{cd}
B104	6	70.1448 ^d

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Tablo 39. Maya izolatlarının ko-agregasyon değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

İzolat	N	Ko-agregasyon
B13	8	36.0325 ^e
B19	8	41.3450 ^c
B30	8	46.3350 ^a
B39	8	36.0774 ^e
B41	8	34.6088 ^f
B49	8	30.0550 ^g
B71	8	44.1700 ^b
B83	8	30.4563 ^g
B91	8	38.3941 ^d
B96	8	28.7200 ^h
B97	8	22.6763 ⁱ
B102	8	30.2513 ^g
B104	8	41.5125 ^c

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

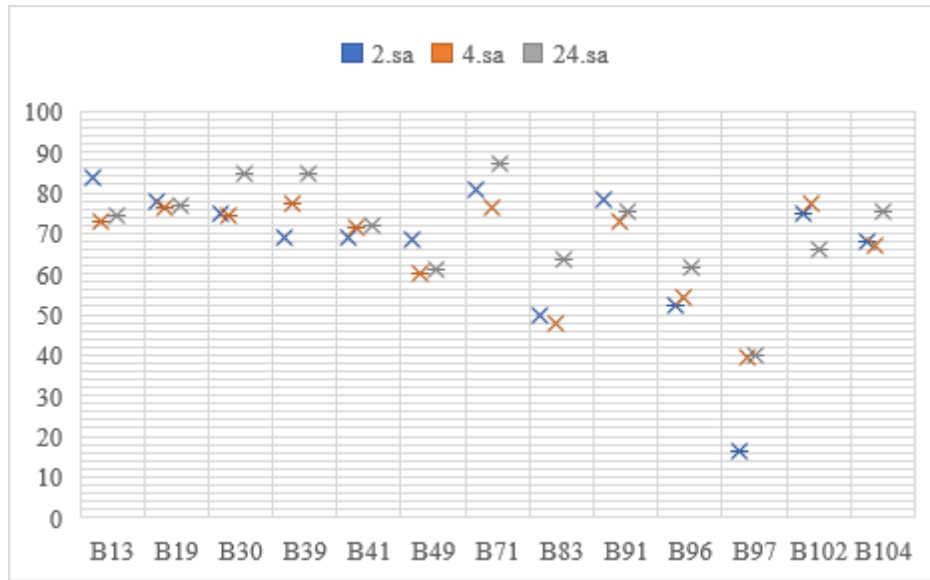
Tablo 40. Maya izolatlarının hidrofobisite değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

İzolat	N	Hidrofobisite
B13	2	32.7000 ^d
B19	2	33.7045 ^d
B30	2	23.3550 ^e
B39	2	84.9950 ^a
B41	2	71.4850 ^{bc}
B49	2	69.1800 ^{bc}
B71	2	84.2300 ^a
B83	2	65.8550 ^c
B91	2	68.3500 ^{bc}
B96	2	26.9100 ^{de}
B97	2	76.1450 ^b
B102	2	14.4500 ^f
B104	2	68.2700 ^{bc}

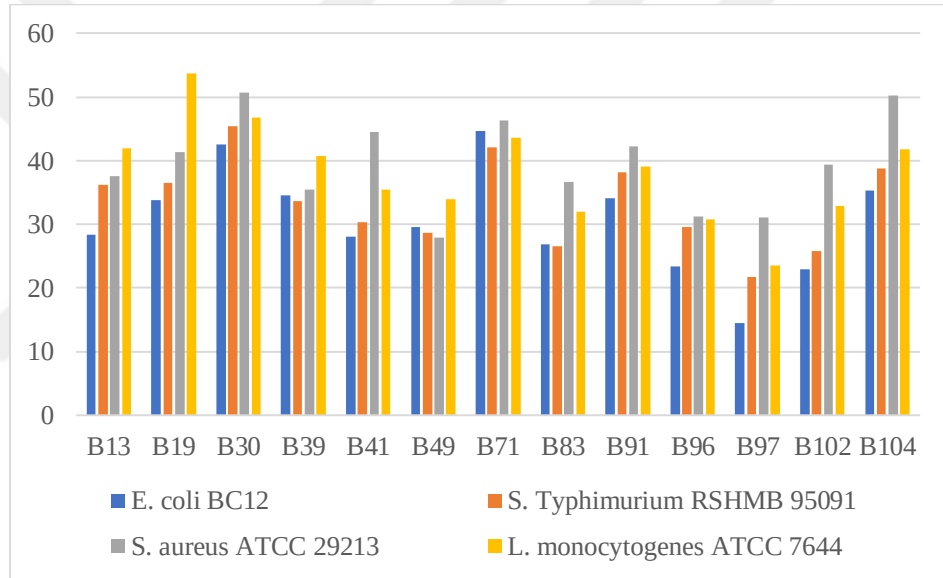
*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p < 0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Menezes *et al.* (2019), Brezilya'nın yerli fermente gıdalarından, kakao fermantasyonundan ve kefirden izole etmiş oldukları *Kluveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia guilliermondii*, *Candida orthopsilosis*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum* ve *Candida quercitrusa*'nın oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite yeteneklerini incelemişlerdir. İzolatların tümünün yüksek hidrofobisite kapasitesine (>%94) sahip olduklarını bildirmişlerdir. Oto-agregasyon kapasitelerinin %66-100; *E. coli* CDC 055'e karşı koagregasyon kapasitelerinin %0.9-76.2 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

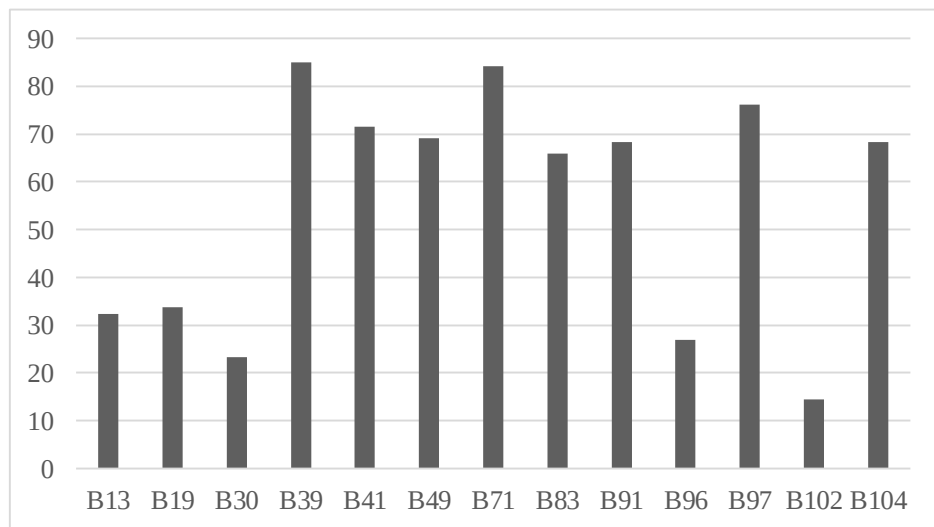
Şekil 27, Şekil 28 ve Şekil 29'da maya izolatlarına ait oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite kapasiteleri ile ilgili grafikler görülmektedir.



Şekil 27. Maya izolatlarının oto-agregasyon kapasiteleri



Şekil 28. Maya izolatlarının ko-agregasyon kapasiteleri



Şekil 29. Maya izolatlarının hidrofobisite yetenekleri

Antifungal direnci

Seçilen 13 izolatın 7 farklı antifungal diske (amfoterisin B, nistatin, mikonazol, flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, vorikonazol) karşı dirençleri tespit edilmiş ve sonuçlar Tablo 41’de verilmiştir. İzolatların flukonazol haricindeki tüm antifungallere karşı bir hassasiyetinin olduğu görülmüştür. Tüm izolatların dirençleri incelendiğinde, antifungallere karşı en yüksek hassasiyetin genel olarak B71 izolatına ait olduğu belirlenmiştir.

Tablo 41. Maya izolatlarının antifungal direnci

İzolat	Antifungaller (zon çapı, mm)						
	AMB 10 µg	MCL 10 µg	KCA 10 µg	VO 10 µg	FLU 25 µg	ITC 50 µg	NY 100 IU
B13	13.0±0.1	23.0±0.3	22.0±1.4	19.5±0.7	D	23.5±0.7	25.5±0.7
B19	13.0±0.1	22.5±0.7	22.00±0.1	21.5±0.7	D	21.5±0.7	22.0±0.1
B30	12.0±0.1	25.0±0.2	21.5±0.7	25.1±0.2	10.0±0.4	26.0±0.3	27.0±0.1
B39	22.0±0.4	40.0±0.1	25.0±0.3	11.5±0.7	D	30.5±0.7	29.0±0.1
B41	16.0±0.1	29.5±0.7	26.0±0.1	20.5±0.7	9.0±0.1	27.0±0.1	30.0±0.4
B49	13.0±0.6	25.0±0.7	28.0±0.1	22.0±0.7	6.5±0.7	24.0±0.6	23.5±0.7
B71	18.5±0.7	47.0±1.4	28.0±0.1	30.0±0.1	12.5±0.7	26.0±0.1	31.5±0.7
B83	12.0±0.3	23.0±0.1	22.0±0.1	21.0±0.3	D	23.0±0.1	25.0±0.4
B91	11.0±0.1	22.1±0.1	22.0±0.1	17.0±0.1	D	22.0±0.3	23.5±0.7
B96	11.0±0.1	13.0±0.1	13.0±0.1	13.0±0.3	9.0±0.1	19.0±0.4	21.0±0.3
B97	14.1±0.1	21.0±0.1	18.5±0.7	19.0±1.41	10.0±0.1	20.1±0.1	26.0±0.1
B102	11.0±0.4	14.0±0.1	13.0±0.1	8.5±0.7	8.0±1.3	20.0±0.3	20.0±0.1
B104	11.5±0.7	25.0±0.1	28.5±0.7	18.5±0.7	11.0±0.1	22.0±0.4	22.0±0.1

AMB: Amfoterisin B, MCL: Mikonazol, KCA: Ketokonazol, VO: Vorikonazol, FLU: Flukonazol, ITC: İtrakonazol, NY: Nistatin; D: dirençli (zon yok)

İzolatların antifungal direnç hassasiyeti değerleri üzerine gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 42’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, izolatların antifungal direnç değerleri üzerine izolat türü, antifungal çeşidi ve izolat türü× antifungal çeşidi interaksiyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 42. Maya izolatlarının antifungal direnç hassasiyeti değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	Antifungal direnç hassasiyeti		
	SD	KO	F
İzolat türü (A)	12	196.737	788.682**
Antifungal çeşidi (B)	6	1340.914	5375.471**
A×B	72	35.017	140.377**
Hata	91	0.249	
Genel	182		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

İzolatların antifungal direnç hassasiyeti değerlerinin Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 43’de verilmiştir. Sonuçlara göre izolat türünün antifungal direnç hassasiyeti değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 43. Maya izolatlarının antifungal direnç hassasiyeti değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

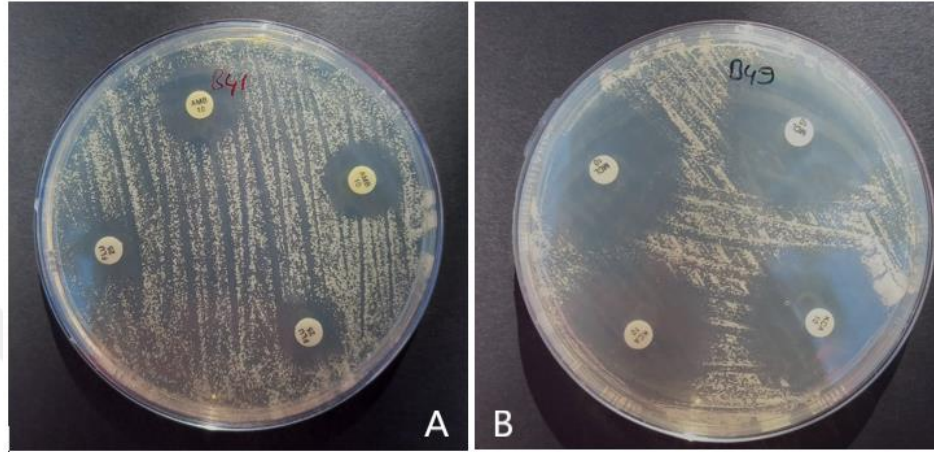
İzolat	N	Antifungal direnç hassasiyeti
B13	14	18.0714 ^f
B19	14	17.5143 ^g
B30	14	20.9571 ^c
B39	14	22.5857 ^b
B41	14	22.5857 ^b
B49	14	20.3643 ^d
B71	14	27.6571 ^a
B83	14	18.0214 ^f
B91	14	16.8143 ^h
B96	14	14.1643 ⁱ
B97	14	18.4071 ^f
B102	14	13.5214 ^j
B104	14	19.8071 ^e

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Göktaş *et al.* (2021), kefir örneklerinden izole ettikleri mayaların antifungal dirençlerini gözlemlemiştir. Maya izolatlarından 2 tanesinin amfoterisin B’ye dirençli olduklarını;

diğerlerinin ise klotrimazol, flukonazol, ketokonazol ve nistatine karşı hassas olduklarını belirtmişlerdir. Lata *et al.* (2022), geleneksel ev yapımı mango turşusundan izole etmiş oldukları *P. kudriavzevii* Y33‘ün vankomisin, penisilin, klindamisin ve ampisiline karşı dirençli olduğunu; ketokonazol, klotrimazol, itrakonazol, amfoterisin B, nistatin ve eritromisine karşı ise çeşitli düzeylerde hassasiyetinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Şekil 30‘da B41 ve B49 izolatlarının bazı antifungallere karşı direnç durumu yer almaktadır.



Şekil 30. B41 izolatının (A) ve B49 izolatının (B) antifungal direnç durumları

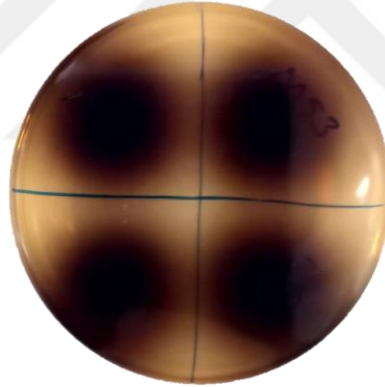
Safra tuzu hidrolaz aktivitesi

Maya izolatlarının BSH aktivitesi belirlenmiş ve B104 haricindeki izolatlardan hiçbirinin BSH aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Tablo 44‘de izolatların BEA besiyeri üzerinde oluşturdukları zon çapı ve BSH aktivite sonuçları yer almaktadır. Şekil 31‘de B104 izolatının agar besiyerindeki BSH aktivitesi görülmektedir.

Istiqomah *et al.* (2018), *Saccharomyces*, *Candida* ve *Cryptococcus* cinslerinin bulunduğu 104 maya izolatında BSH aktivitesinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Batı Himalayalar‘dan geleneksel fermente gıdalarından elde edilen 23 maya izolatının probiyotik özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada, izolatların hiçbirinde BSH aktivitesi gözlenmemiştir (Sourabh *et al.* 2011).

Tablo 44. Maya izolatlarının safra tuzu hidrolaz (BSH) aktiviteleri

İzolat	BEA besiyerindeki zon çapı (mm)	BSH aktivitesi
B13	0	-
B19	0	-
B30	0	-
B39	0	-
B41	0	-
B49	0	-
B71	0	-
B83	0	-
B91	0	-
B96	0	-
B97	0	-
B102	0	-
B104	17	+



Şekil 31. B104 izolatının BSH aktivitesi

Hemolitik aktivite

Maya izolatlarının hemolitik aktiviteleri incelenmiş olup B30 izolatı haricindeki tüm izolatların γ -hemolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Tablo 45’de kanlı agar besiyerlerinde izolatların gösterdikleri hemolitik aktivite sonuçları görülmektedir.

Gıda ortamlarından izole edilen 20 maya izolatının bulunduğu bir araştırmada, izolatların hemolitik aktiviteleri incelenmiş ve hiçbir izolatta hemolitik aktivite gözlenmemiştir (Fernández-Pacheco *et al.* 2021). Lata *et al.* (2022), mango turşusundan izole etmiş oldukları *P. kudriavzevii* Y33 izolatının hemolitik aktivitesinin olmadığını bildirmişlerdir. Geleneksel yöntemlerle üretilmiş zeytin ve zeytin ürünlerinden 106 maya izolatının izole edildiği bir çalışmada, 31 maya izolatı β -hemolitik aktivite göstermiştir (Cumur 2022).

Tablo 45. Maya izolatlarının hemolitik aktiviteleri

İzolat	Kanlı agar	Hemolitik aktivite
B13	γ -hemolitik	-
B19	γ -hemolitik	-
B30	β -hemolitik	+
B39	γ -hemolitik	-
B41	γ -hemolitik	-
B49	γ -hemolitik	-
B71	γ -hemolitik	-
B83	γ -hemolitik	-
B91	γ -hemolitik	-
B96	γ -hemolitik	-
B97	γ -hemolitik	-
B102	γ -hemolitik	-
B104	γ -hemolitik	-

DNaz aktivitesi

Maya izolatlarının DNaz aktiviteleri incelenmiş olup sonuçlar Tablo 46’da sunulmuştur. İzolatlardan hiçbirinin DNaz aktivitesi göstermediği görülmüştür. Kontrol amacıyla DNaz aktivitesine sahip olmayan *L. casei* ATCC 393 ile DNaz aktivitesine sahip olan *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

Geleneksel Goan fermente gıdası Bollo hamurundan izole edilen *Saccharomyces cerevisiae* DABRP5’in probiyotik potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada, izolatın DNaz aktivitesinin olmadığı bildirilmiştir (Pereira *et al.* 2021).

Tablo 46. Maya izolatlarının DNaz aktiviteleri

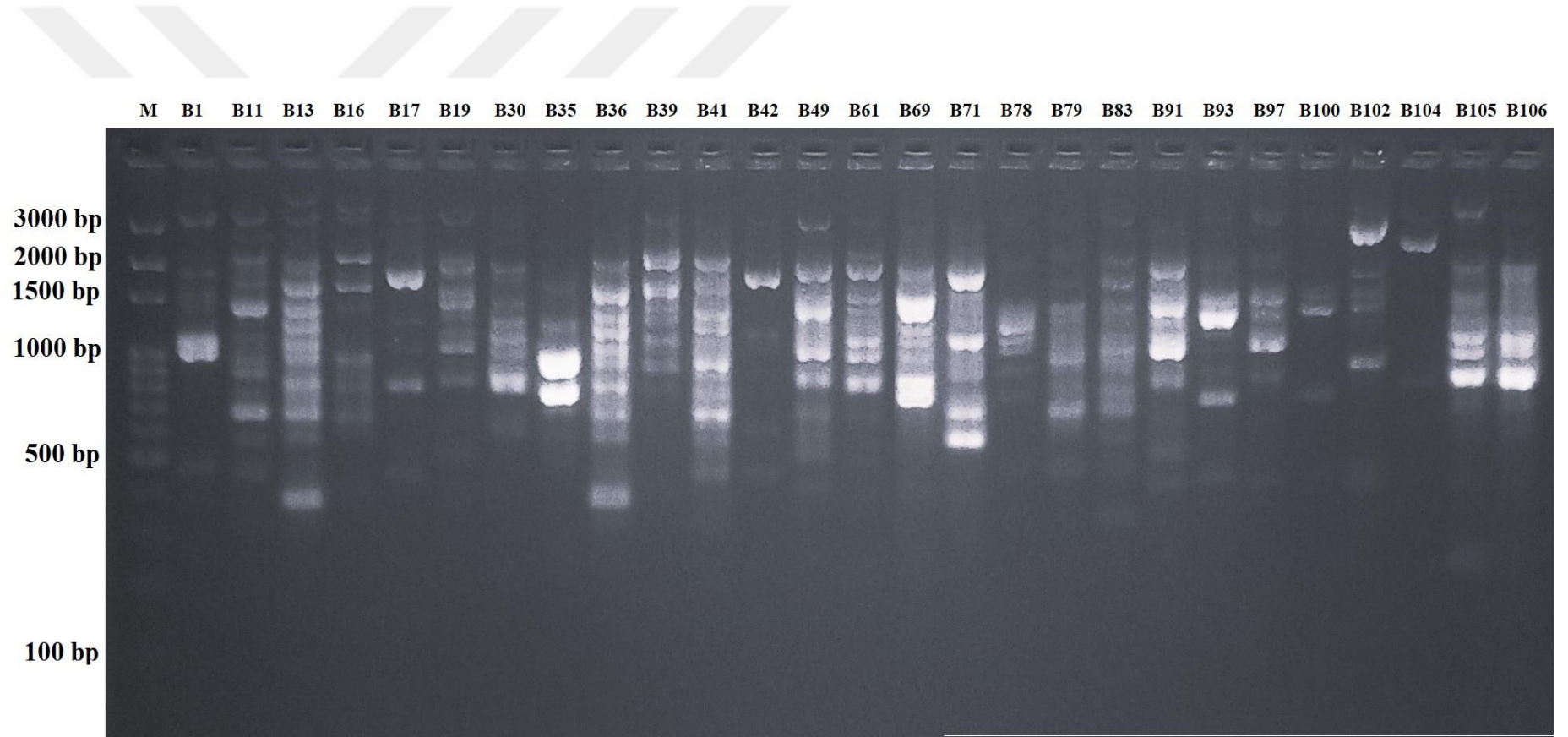
İzolat	DNaz besiyerinde şeffaf zon	DNaz aktivitesi
B13	-	-
B19	-	-
B30	-	-
B39	-	-
B41	-	-
B49	-	-
B71	-	-
B83	-	-
B91	-	-
B96	-	-
B97	-	-
B102	-	-
B104	-	-
<i>L. casei</i> ATCC 393	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC	+	+

Maya İzolatlarının Moleküler Tanısı

Maya izolatlarının tanısı için klasik PCR yöntemi kullanılarak izolatlar M13-RAPD-PCR ile DNA fingerprintlerine göre gruplandırılmıştır. Daha sonra, her gruptan temsili bir izolat seçilerek 26S rRNA PCR yöntemi ile tanılanmıştır.

Maya izolatlarının M13-RAPD-PCR ile gruplandırılması

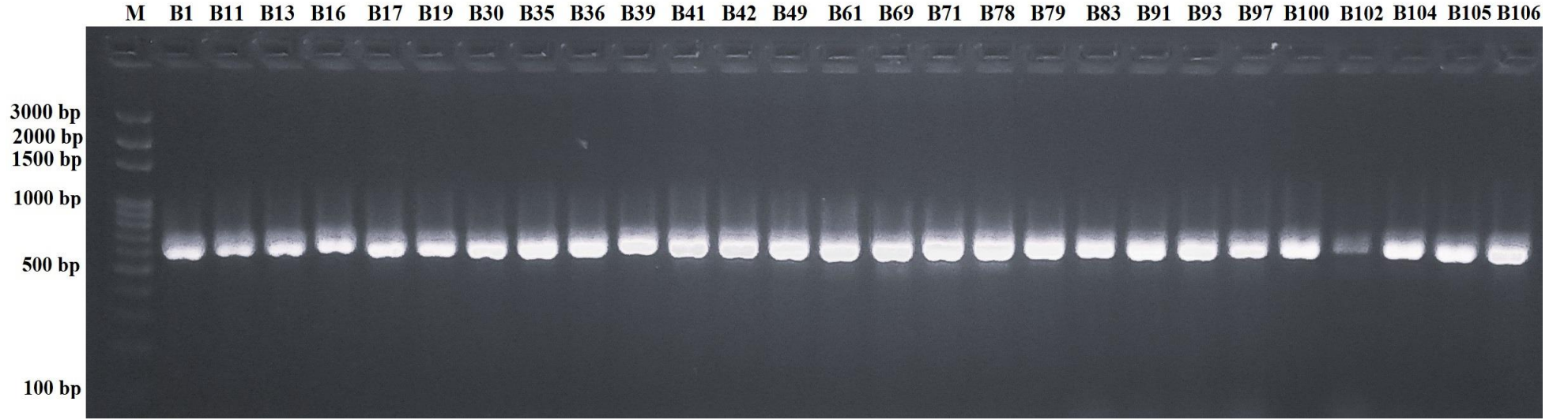
Maya izolatlarının M13-RAPD-PCR ile DNA fingerprintleri elde edildikten sonra, elde edilen sonuçlara göre izolatlar arasında bir gruplandırma yapılmıştır. Toplamda 106 maya izolatından 27 farklı grup oluşturulmuştur. Gruplandırıldıktan sonra seçilen temsili izolatların DNA fingerprint jel görüntüleri Şekil 32’de verilmiştir.



Şekil 32. Temsili izolatların M13-RAPD-PCR ile elde edilen DNA fingerprint görüntüleri (M: marker, bp: baz çifti)

Maya izolatlarının 26S rRNA ile tanınması

Temsili izolatlara ait 26S rRNA amplikonlarının jel görüntüsü Şekil 33'de görülmektedir. Sirke örneklerinden elde edilen tüm maya izolatlarının gruplandırılması ve seçilen temsili izolatlara ait 26S rRNA tanı sonuçları ise Tablo 47'de verilmiştir. 106 maya izolatından oluşturulan 27 farklı gruptan, seçilen temsili izolatların 26S rRNA tanısının yapılması sonucunda, temin edilen sirke örneklerinde 12 farklı maya türü olduğu görülmüştür. Bu 12 farklı maya türleri; *Pichia membranifaciens*, *Pichia bruneiensis*, *Pichia manshurica*, *Pichia deserticola*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida boidinii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Kregervanrija fluxuum* şeklindedir. Şekil 34'de ise sirke örneklerinde tespit edilen 12 farklı maya türünün, toplam maya izolatları içerisindeki yüzdesel dağılımı daire grafik ile gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde, sirke örneklerinde en yüksek sayıda *K. fluxuum* (%25) ve *P. manshurica* (%24) olduğu, en düşük sayıda ise *S. cerevisiae* (%1), *C. boidinii* (%1) ve *H. guilliermondii* (%1) olduğu görülmektedir.



Şekil 33. Temsili izolatların NL-1/NL-4 primerleri ile elde edilen 26S rRNA amplikonlarının jeldeki görüntüsü (M: marker, bp: baz çifti)

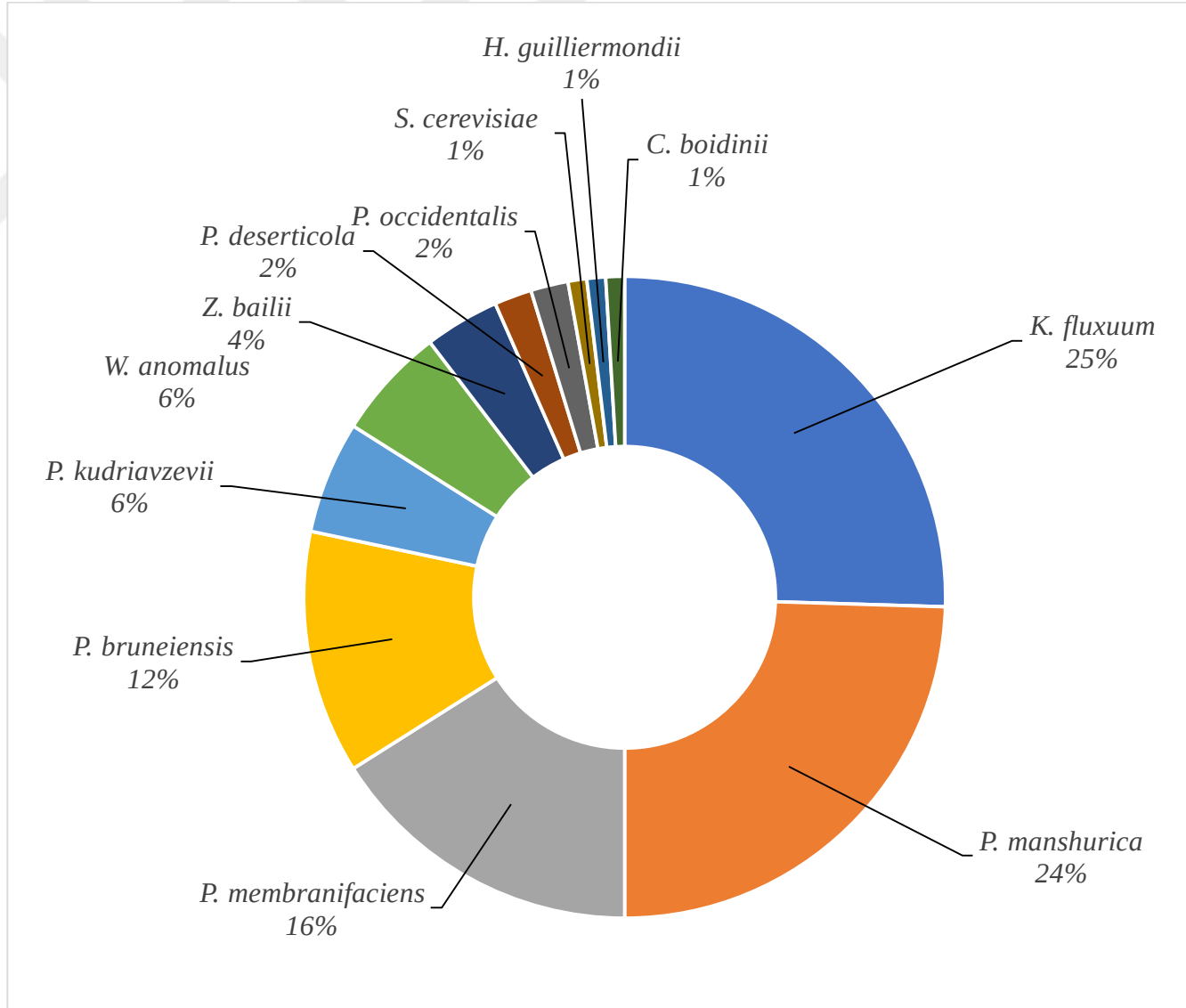
Tablo 47. Maya izolatlarının tanı sonuçları

Grup	İzolatlar	26S rRNA tanı sonucu	Benzerlik oranı (%)	İzolat sayısı	Sekans ID
1	B1*, B2, B3, B4, B5, B8, B9, B14, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26, B27, B28, B48, B55, B56, B64, B65, B66, B67, B68, B98, B99	<i>Kregervanrija fluxuum</i>	100	27	NG_042445.1
2	B11*, B12, B15	<i>Pichia membranifaciens</i>	99.27	3	NG_042444.1
3	B10, B13*	<i>Pichia membranifaciens</i>	98.47	2	NG_042444.1
4	B16*	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99.72	1	NG_055054.1
5	B17*	<i>Pichia deserticola</i>	98.77	1	NG_055106.1
6	B18, B19*	<i>Pichia manshurica</i>	100	2	NG_055078.1
7	B29, B30*	<i>Pichia bruneiensis</i>	97.11	2	NG_075177.1
8	B35*	<i>Candida boidinii</i>	100	1	NG_055130.1
9	B36*	<i>Pichia membranifaciens</i>	99.7	1	NG_042444.1
10	B39*, B43, B44	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99.31%	3	NG_055054.1
11	B37, B38, B40, B41*	<i>Pichia membranifaciens</i>	99.31	4	NG_042444.1
12	B42*	<i>Pichia deserticola</i>	99.4	1	NG_055106.1
13	B49*, B87	<i>Pichia manshurica</i>	100	2	NG_055078.1
14	B59, B61*, B80, B81, B82	<i>Pichia bruneiensis</i>	97.08	5	NG_075177.1
15	B69*, B70, B72	<i>Pichia bruneiensis</i>	96.99	3	NG_075177.1

Tablo 47. (Devamı)

Grup	İzolatlar	26S rRNA tanı sonucu	Benzerlik oranı (%)	İzolat sayısı	Sekans ID
16	B71*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	1	NG_042623.1
17	B78*	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99.29	1	NG_055420.1
18	B58, B62, B63, B79*	<i>Pichia membranifaciens</i>	99.12	4	NG_042444.1
19	B83*, B85, B95	<i>Pichia membranifaciens</i>	99.45	3	NG_042444.1
20	B6, B7, B31, B32, B33, B34, B45, B46, B47, B50, B51, B52, B73, B74, B75, B76, B77, B88, B89, B90, B91*	<i>Pichia manshurica</i>	100	21	NG_055078.1
21	B92, B93*, B94	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100	3	NG_055104.1
22	B97*	<i>Pichia manshurica</i>	100	1	NG_055078.1
23	B57, B60, B100*	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100	3	NG_055104.1
24	B96, B102*	<i>Pichia occidentalis</i>	100	2	NG_055110.1
25	B84, B86, B101, B104*, B107, B108	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.14	6	NG_057174.1
26	B103, B105*	<i>Pichia bruneiensis</i>	96.70	2	NG_075177.1
27	B106*	<i>Pichia bruneiensis</i>	96.97	1	NG_075177.1

*Sekans işlemi için gönderilen temsili izolatlar



Şekil 34. Maya türlerinin toplam maya izolatları içerisindeki yüzdesel dağılımı

Starter ve probiyotik kültür testleri gerçekleştirilerek seçilmiş olan maya izolatlarının 26S rRNA ile tanımlarının sonucunda B13, B41 ve B83 izolatlarının *P. membranifaciens*; B19, B49, B91 ve B97 izolatlarının *P. manshurica*; B96 ve B102 izolatlarının *P. occidentalis*; B30 izolatının *P. bruneiensis*; B39 izolatının *Z. bailii*; B71 izolatının *S. cerevisiae* ve B104 izolatının ise *W. anomalus* olduğu belirlenmiştir.

İzolatların starter kültür özellikleri incelendiğinde, 10°C haricindeki parametrelerde tüm izolatlarda bir gelişim olduğu görülmektedir. 10°C’de gelişim göstermeyen izolatlar B39, B91, B96 ve B102 izolatlarıdır. İzolatların probiyotik kültür özellikleri incelendiğinde ise, B71 izolatının oto-agregasyon, ko-agregasyon, hidrofobisite kapasitesinin yüksek olduğu ve tüm antibiyotiklere en yüksek hassasiyet gösteren izolat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca B71 izolatının hemolitik aktivite ve DNaz aktivitesi gibi virülans özellikleri de bulunmamaktadır. B30 izolatının oto-agregasyon ve ko-agregasyon kapasitesi yüksek olmasına rağmen hidrofobisite yeteneği düşük ve hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Yüksek oto-agregasyon ve hidrofobisite yeteneğine sahip olan B39 izolatının ise flukonazole karşı dirençli olduğu ve ko-agregasyonunun B71 izolatına göre daha düşük olduğu görülmüştür. Diğer izolatlar ise mideyi geçme yüzdesi bakımından çok iyi düzeyde olsalar da, istatistiki sonuçlar değerlendirildiğinde daha geri planda kalmaktadırlar.

Ayrıca *Pichia* cinsi mayalar oksidatif mayalar olarak bilinmekte ve %11 etanolü tolere ederek gıdalarda bozulmalara neden olabilmektedirler. Bu cins mayalar düşük pH düzeyine sahip ürünlerden izole edilebilmektedirler (Sperber 2010; Öztürk 2016). Bu nedenle, temin ettiğimiz sirkelerde, alkol fermantasyonu aşamasını ve düşük pH düzeylerini tolere ederek baskın düzeyde olmaları beklenen bir sonuçtur. Bunlara ilave olarak, *S. cerevisiae*’nın probiyotik bir mikroorganizma olduğu ile ilgili çalışmaların olması ve araştırmamızda elde edilen sonuçlardan dolayı, planlanan doğal probiyotik sirke üretiminde B71 izolatının (*S. cerevisiae*) kullanılmasına karar verilmiştir.

Sirke Üretimi

Sirke üretimi için kullanılan materyal ve uygulanan prosedür ‘Materyal ve Metot’ kısmında belirtilmiştir. Üretimde kullanılacak olan maya izolatının B71; AAB izolatının ise A49 olarak seçildiği ilgili başlıklarda ifade edilmiştir.

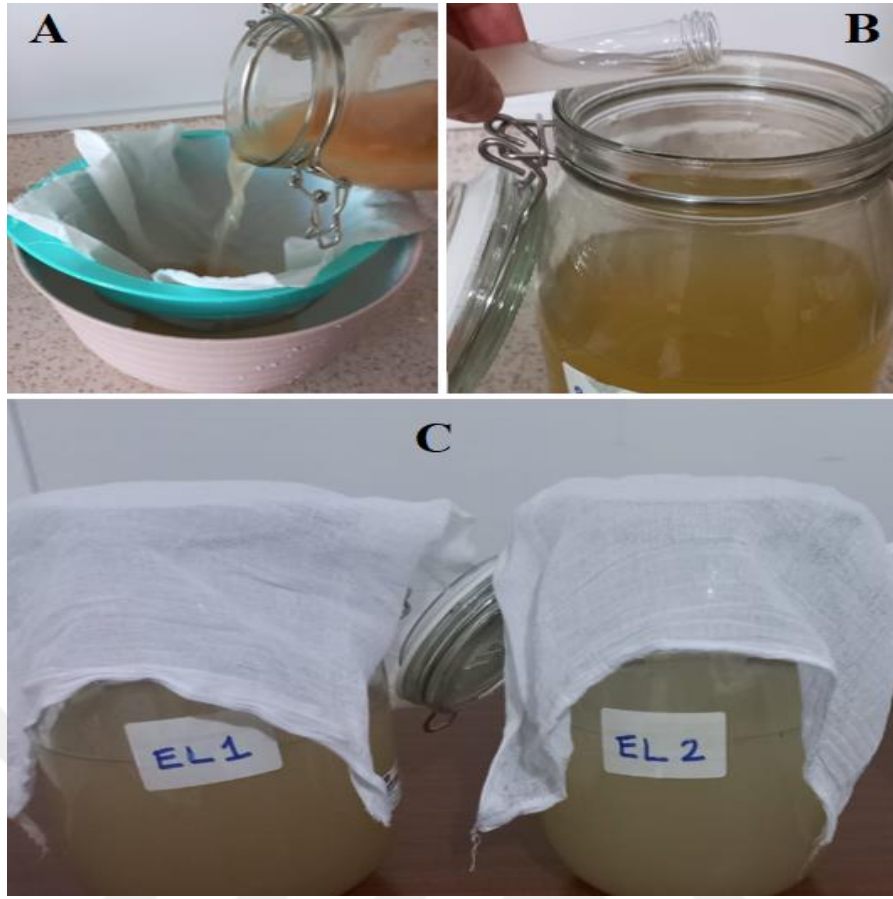
Tablo 5 dikkate alınarak; belirtilen prosedüre göre elma-bal karışımları hazırlandıktan sonra ilk olarak B71 izolatı (*S. cerevisiae*) eklenmiş ve örneklerin alkol fermantasyonları 30 gün boyunca sürdürülmüştür. 30 gün sonunda, örneklerin konulduğu şişelerin ağzı açılıp, A49 izolatı (*A. ghanensis*) eklenerek asetik asit fermantasyonuna geçilmiştir. Asetik asit

fermantasyonu, TS 1880 EN 13188 Sirke Standardı'na uygun olacak şekilde en az %4 asetik asit oluşuncaya kadar 90 gün devam ettirilmiştir. Böylece, toplamda 120 günlük bir fermentasyon süresi sonunda sirke örneklerinin üretimleri tamamlanmıştır.

Başlangıçta, üretim sırasında örneklere eklenecek olan mikroorganizma kültürleri steril fizyolojik tuzlu su içerisinde süspanse edilmiş ve solüsyonların McFarland değerleri 5 olarak ayarlanmıştır. Bu değer ayarlanmadan önce ön denemeler gerçekleştirilmiş olup, sirke örneklerinde 10^6 kob/ml olacak şekilde hesap edilmiştir. Şekil 35'de örneklere eklenecek olan mikroorganizma kültürlerinin hazırlanma aşaması; Şekil 36'da alkol fermentasyonu tamamlanan örneklerden süzme işlemi ile hammaddenin uzaklaştırılması (A), ardından asetik asit bakterisi kültürünün eklenmesi (B) ve şişelerin kapaklarının açılıp oksijen geçiren ince bir örtü ile kapatılmasıyla asetik asit fermentasyonu aşamasına geçilmesi (C) görülmektedir.



Şekil 35. Örneklere eklenecek olan mikroorganizma kültürlerinin hazırlanma aşaması



Şekil 36. Alkol fermantasyonu tamamlanan örneklerden süzme işlemi ile hammaddenin uzaklaştırılması (A), ardından asetik asit bakterisi kültürünün eklenmesi (B) ve şişelerin kapaklarının açılıp oksijen geçiren ince bir örtü ile kapatılmasıyla asetik asit fermantasyonu aşamasına geçilmesi (C)

Sirke üretiminde kullanılmış olan doğal balın analizleri ve satışı Bingöl Üniversitesi tarafından gerçekleştirilmiş olup, ilgili ürünün özellikleri Tablo 48’de verilmiştir.

Tablo 48. Sirke üretiminde kullanılan doğal balın özellikleri

Özellikler	Sonuç
Nem (%)	16
Prolin (mgkg ⁻¹)	1052.24
Diastaz sayısı (DS)	38.2
HMF (mgkg ⁻¹)	5.110
Fruktoz (%)	40.083
Glukoz (%)	30.397
Sakkaroz (%)	0.105
Maltoz (%)	2.595
Serbest asitlik (meqkg ⁻¹)	21.33

Tablo 5’te verilen 2 çeşit örneğin üretimi gerçekleştirilmiş olup, Tablo 49’da üretimi tamamlanan ELBL1 örneği ve kontrolü olan ELBL2 örneği görülmektedir.

Tablo 49. Üretimi tamamlanan sirke örnekleri

Örnek	Kodu	Gıda içeriği		Mikroorganizma içeriği	
		Elma	Bal	B71 (<i>S. cerevisiae</i>)	A49 (<i>A. ghanensis</i>)
Elmalı ballı probiyotik sirke	ELBL-1	+	+	+	+
Elmalı ballı sirke	ELBL-2	+	+	-	-

Üretilen sirke örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

Üretimi tamamlanan EBL1 ve EBL2 örneklerinde 120 günlük fermantasyon süresi boyunca belli aralıklarla pH, asitlik tayini ve briks değerlerinin tespiti gerçekleştirilmiş olup sonuçlar Tablo 50’de sunulmuştur.

Tablo 50. Üretilen sirke örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

Örnek	Fermantasyon süresi (gün)	pH	Asitlik (%)	Briks
ELBL1	0	5.64±0.01	0.01±0.00	8.50±0.00
	30	3.37±0.02	0.39±0.00	4.00±0.00
	60	3.01±0.00	2.81±0.03	3.50±0.00
	90	2.96±0.01	3.83±0.02	3.35±0.21
	120	2.85±0.00	5.01±0.03	2.60±0.14
	Ort.	3.57±1.11	2.41±2.04	4.39±2.22
ELBL2	0	5.80±0.01	0.01±0.00	8.50±0.00
	30	3.69±0.00	0.57±0.00	4.00±0.00
	60	3.18±0.02	0.51±0.00	3.50±0.00
	90	3.12±0.01	0.32±0.00	3.00±0.00
	120	2.97±0.01	0.16±0.00	3.00±0.00
	Ort.	3.75±1.11	0.31±0.22	4.40±2.20

Ort: Ortalama değer

Üretimi gerçekleştirilen sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca belli aralıklarla gerçekleştirilen pH değerlerinin sonuçları üzerine gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 51’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, örneklerin pH değerleri üzerine sirke çeşidi, fermantasyon süresi ve sirke çeşidi×fermentasyon süresi interaksyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 51. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pH değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	pH		
	SD	KO	F
Sirke çeşidi (A)	1	0.173	1330.615**
Fermantasyon süresi	4	5.524	42488.692**
A×B	4	0.006	42.538**
Hata	10	0.000	
Genel	20		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi; KO: Kareler ortalaması

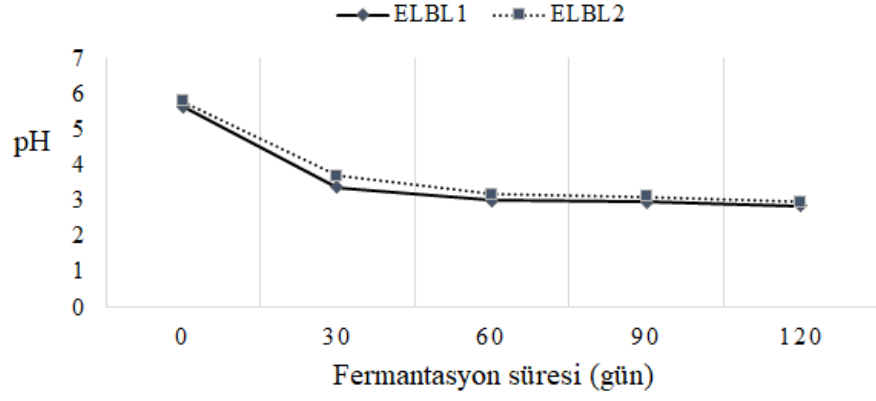
Sirke örneklerine ait pH değerleri Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 52’de verilmiştir. Sonuçlar fermantasyon süresinin pH değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 52. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca pH değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Fermantasyon süresi	N	pH
0	4	5.7225 ^a
30	4	3.5325 ^b
60	4	3.0975 ^c
90	4	3.0450 ^d
120	4	2.9125 ^e

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Örneklerin fermantasyon süresinin pH değerleri üzerine etkisi Şekil 37’de çizgi grafik ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, örneklerin pH değerleri arasında fermantasyon süresi boyunca benzer sonuçlar elde edilmiştir. Geleneksel ve ticari sirkelerin pH değerlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada yaklaşık %5 asitliğe sahip olan elma ev sirkelerinin pH değerlerinin ortalama 2.86 düzeyinde olduğu belirlenmiştir (Cosmulescu *et al.* 2022). Dolayısıyla, ELBL1 örneğinde pH düzeyinin 2.85 olması beklenen bir sonuçtur. Ayrıca, kullanılan hammaddeler ve meydana gelen çeşitli bileşikler pH düzeyinin değişmesine neden olabilmektedir (Aksoy 2021). Bu nedenle, ELBL1 ve ELBL2 örneklerinin pH değerleri kullanılan hammadde veya mikroorganizmaların oluşturduğu bileşiklerden etkilenmiş olabilir.



Şekil 37. Sirke örneklerinin pH değerleri üzerine fermentasyon süresinin etkisi

Üretimi gerçekleştirilen sirke örneklerinin fermentasyon süresi boyunca belli aralıklarla tespit edilen asitlik değerlerinin sonuçları üzerine gerçekleştirilen varyans analizi Tablo 53’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, örneklerin asitlik değerleri üzerine sirke çeşidi, fermentasyon süresi ve sirke çeşidi×fermentasyon süresi interaksiyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 53. Sirke örneklerinin fermentasyon süresi boyunca asitlik değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Asitlik			
Varyasyon kaynakları	SD	KO	F
Sirke çeşidi (A)	1	21.967	115659.569**
Fermentasyon süresi	4	4.687	24675.995**
A×B	4	4.796	25248.678**
Hata	10	0.000	
Genel	20		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi; KO: Kareler ortalaması

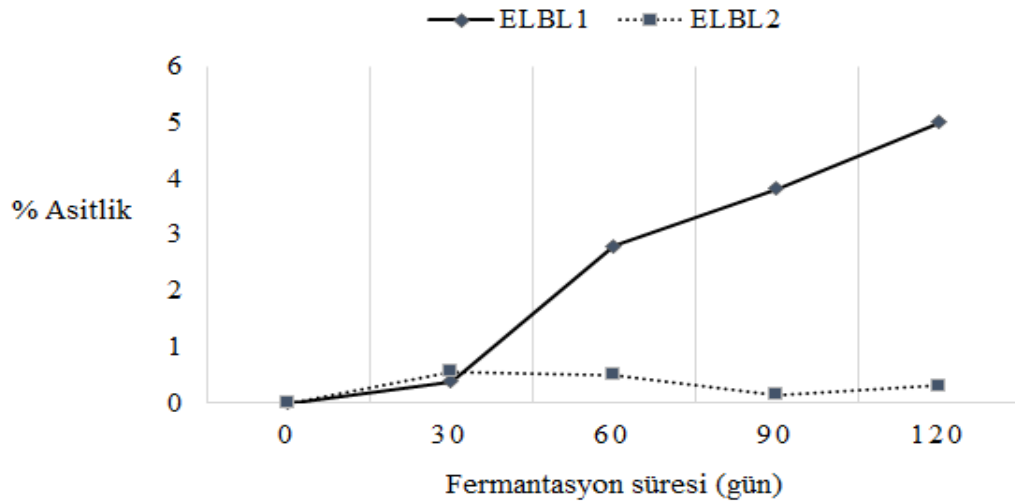
Sirke örneklerine ait asitlik değerleri Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 54’de verilmiştir. Sonuçlar fermentasyon süresinin asitlik değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 54. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca asitlik değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Fermantasyon süresi	N	Asitlik
0	4	0.0090 ^e
30	4	0.4830 ^d
60	4	1.6573 ^c
90	4	2.0755 ^b
120	4	2.5815 ^a

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Örneklerin fermantasyon süresinin interaksiyonun asitlik değerleri üzerine etkisi Şekil 38’de çizgi grafik ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sirke oluşumunda önemli bir gösterge olan asitlik düzeyinin, örnekler arasında belirgin farklılıkları olduğu görülmüştür. İnokülasyon işlemi gerçekleştirilen ELBL1 örneğinde fermantasyon süresi boyunca asitlik artışı devam ederken, inokülasyon işlemi gerçekleştirilmemiş olan ELBL2 örneğinde asitlik artışı meydana gelmemiştir. Böyle bir durumun oluşması, ortamda yeterli sayıda sirke mikroorganizma kültürlerinin bulunması, bu kültürlerin sirke oluşumuna önemli düzeyde katkı sağladığının göstergesidir.



Şekil 38. Sirke örneklerinin asitlik değerleri üzerine fermantasyon süresinin etkisi

Üretimi gerçekleştirilen sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca belli aralıklarla tespit edilen briks değerlerinin sonuçları üzerine gerçekleştirilen varyans analizi Tablo 55’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, örneklerin briks değerleri üzerine sirke çeşidinin etkisinin olmadığı ($p>0.01$), fermantasyon süresinin etkisinin belirgin olduğu ($p<0.01$) ve sirke çeşidi×fermentasyon süresi interaksiyonunun etkisinin olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir.

Tablo 55. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca briks değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Briks			
Varyasyon kaynakları	SD	KO	F
Sirke çeşidi (A)	1	0.000	0.077
Fermantasyon süresi	4	21.841	3360.077**
A×B	4	0.070	10.846*
Hata	10	0.000	
Genel	20		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi; KO: Kareler ortalaması

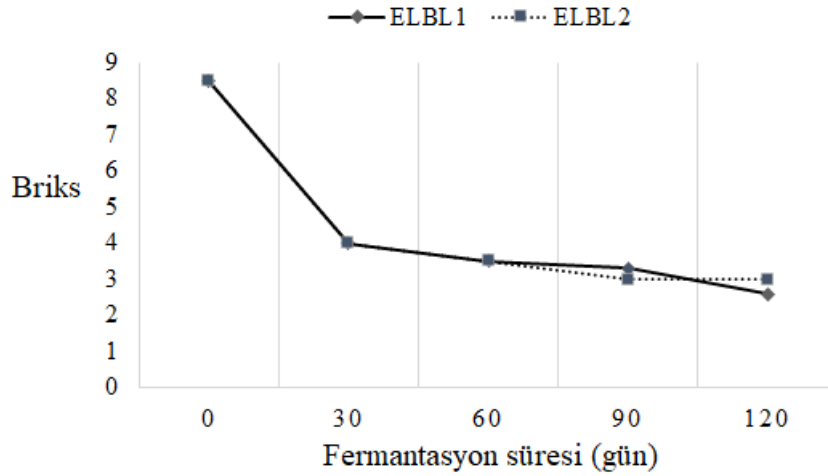
Sirke örneklerine ait briks değerleri Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 56'da verilmiştir. Sonuçlar fermantasyon süresinin briks değerleri üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 56. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca briks değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Fermantasyon süresi	N	Briks
0	4	8.5000 ^a
30	4	4.0000 ^b
60	4	3.5000 ^c
90	4	3.1750 ^d
120	4	2.8000 ^e

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Örneklerin fermantasyon süresinin briks değerleri üzerine etkisi Şekil 39'da çizgi grafik ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, örneklerin briks değerleri arasında fermantasyon süresi boyunca benzer sonuçlar elde edilmiştir. Özdemir and Budak (2022), gül bitkisinden elde ettikleri gül sirkesinin 1, 2 ve 3 yıllık yaşlanma süreci boyunca briks değerlerinin sırasıyla ortalama 8.90; 9.05 ve 9.80 olduğunu tespit etmişlerdir. Geleneksel balsamik sirkelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada briks değerlerinin 55.00'in üzerinde olduğu belirlenmiştir (Masino *et al.* 2018). Sengun *et al.* (2020), çeşitli hammaddelerden üretilen meyve sirkelerinde briks değerlerinin 1.00-5.00 arasında olduğunu bildirmiştir. ELBL1 ve ELBL2 örneklerinde meydana gelen benzer briks değerlerinin, mayaların ortamda bulunan şekeri kullanmaları sonucunda çözünmüş şeker seviyesinin düşmesi ile açıklanabilir.



Şekil 39. Sirke örneklerinin briks değerleri üzerine fermantasyon süresinin etkisi

Üretilen sirke örneklerinin mikrobiyolojik özellikleri

Üretimi tamamlanan ELBL1 ve ELBL2 örneklerinde 120 günlük fermantasyon süresi boyunca belli aralıklarla AAB, maya-küf, TAMB ve koliform sayıları takip edilerek sonuçlar Tablo 57’de gösterilmiştir.

Tablo 57. Üretilen sirkelerin depolama süresi boyunca mikrobiyolojik özellikleri ($\log_{10}$ kob/ml)

Örnek	Fermantasyon süresi (gün)	Maya-Küf	AAB	TAMB	Koliform
ELBL1	0	6.50±0.70	2.98±0.03	3.41±0.10	<1
	30	7.09±0.08	7.19±0.16	7.20±0.00	<1
	60	<2	6.35±0.08	6.68±0.44	<1
	90	<2	6.07±0.10	6.16±0.11	<1
	120	<2	3.88±0.16	3.94±0.01	<1
	Ort.	2.72±3.52	5.29±1.68	5.48±1.61	-
ELBL2	0	2.91±0.17	2.90±0.11	3.36±0.04	<1
	30	7.02±0.06	<2	2.72±0.00	<1
	60	6.42±0.08	<2	1.36±0.02	<1
	90	6.06±0.11	<2	<2	<1
	120	6.12±0.15	<2	<2	<1
	Ort.	5.71±1.52	0.58±1.22	1.49±1.45	-

AAB: Asetik asit bakterisi; TAMB: Toplam aerobik mezofilik bakteri; Ort: Ortalama değer

Üretimi gerçekleştirilen sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca belli aralıklarla gerçekleştirilen maya-küf sayılarının sonuçları üzerine gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 58’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, örneklerin maya-küf sayıları üzerine

sirke çeşidi, fermantasyon süresi ve sirke çeşidi×fermantasyon süresi interaksiyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 58. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca maya-küf sayısına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	Maya-küf		
	SD	KO	F
Sirke çeşidi (A)	1	44.701	766.207**
Fermantasyon süresi	4	12.079	207.046**
A×B	4	20.903	358.297**
Hata	10	0.058	
Genel	20		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi; KO: Kareler ortalaması

Sirke örneklerine ait maya-küf sayıları Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 59’da verilmiştir. Sonuçlar sirke çeşidinin maya-küf sayıları üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

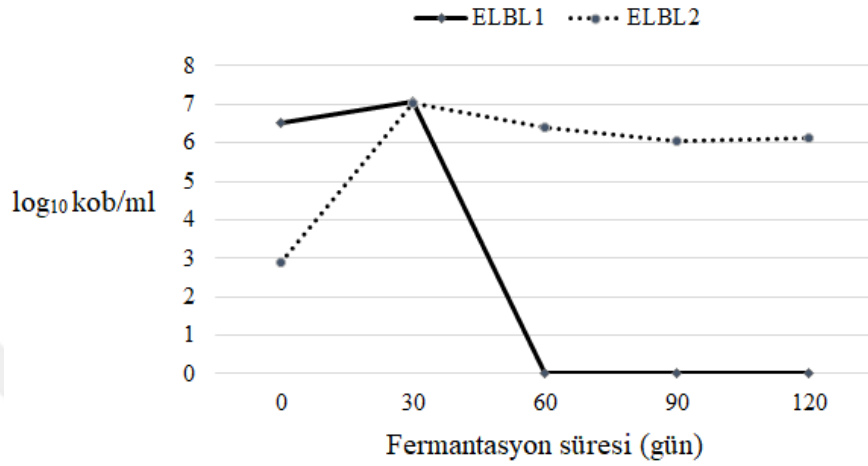
Tablo 59. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca maya-küf değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Fermantasyon süresi	N	Maya-küf
0	4	4.7075 ^b
30	4	7.0600 ^a
60	4	3.2100 ^c
90	4	3.0300 ^c
120	4	3.0625 ^c

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Örneklerin fermantasyon süresinin maya-küf sayıları üzerine etkisi Şekil 40’da çizgi grafik ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, örneklerin fermantasyon süresi boyunca maya-küf sayılarında belirgin farklılık görülmüştür. Anaerobik fermantasyonun başlangıcı olan 0. günde maya inokülasyonu gerçekleştirilen ELBL1 örneğinde maya-küf sayısı 30. güne kadar devam ederken, aerobik fermantasyona geçilen 30. günden sonra maya-küf sayısında giderek azalma meydana geldiği ve 60. günden sonra <2 log kob/ml düzeyine kadar düştüğü görülmüştür. Bu durum, ELBL1 örneğinde meydana gelen asitlik artışına paralel olarak maya-küf sayısının azaldığı fikrini güçlendirmektedir. İnokülasyon işlemi gerçekleştirilmemiş olan ELBL2 örneğinde ise anaerobik şartlara bağlı olarak maya-küf sayısı 0. günden 30. güne kadar artış gösterirken, aerobik şartlara geçilen 30. günden sonra maya-küf sayısında kısmen azalma

olduğu görülmüştür. ELBL2 örneğinin fermantasyon süreci sırasındaki izlenimleri ve mikrobiyolojik sayım sonuçları dikkate alındığında, 0. günden itibaren üründe küf oluşumunun meydana geldiği ve ortama hâkim oldukları gözlenmiştir. Dolayısıyla ELBL2 örneğindeki maya-küf sayılarının sadece maya kaynaklı değil küf kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, ELBL2 örneğinde spontane gelişen fermantasyon sürecinden kaynaklı olduğu fikrini güçlendirmektedir.



Şekil 40. Sirke örneklerinin maya-küf sayıları üzerine fermantasyon süresinin etkisi

Üretimi gerçekleştirilen sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca belli aralıklarla gerçekleştirilen AAB sayılarının sonuçları üzerine gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 60’da verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, örneklerin AAB sayıları üzerine sirke çeşidi, fermantasyon süresi ve sirke çeşidi×fermentasyon süresi interaksyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 60. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca AAB sayısına ait varyans analiz sonuçları

AAB			
Varyasyon kaynakları	SD	KO	F
Sirke çeşidi (A)	1	111.156	13680.754**
Fermentasyon süresi	4	1.488	183.169**
A×B	4	8.202	1009.446**
Hata	10	0.008	
Genel	20		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi; KO: Kareler ortalaması

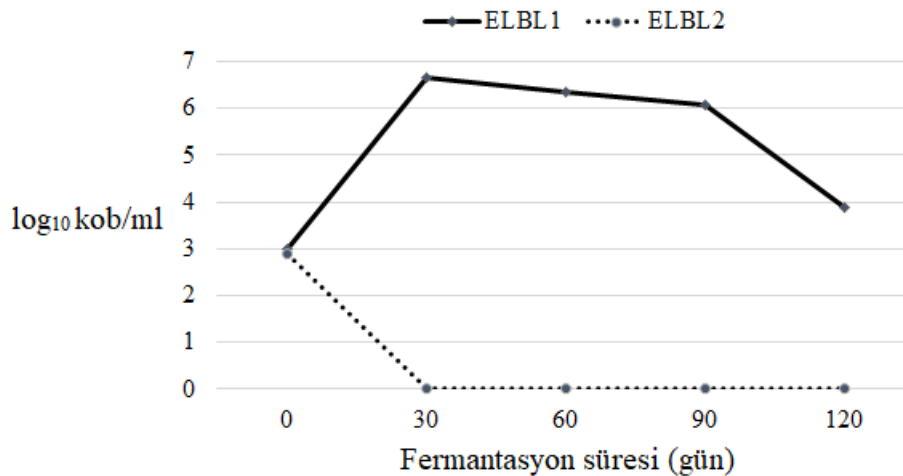
Sirke örneklerine ait AAB sayıları Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 61’de verilmiştir. Sonuçlar sirke çeşidinin AAB sayıları üzerinde önemli düzeyde farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 61. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca AAB değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Fermantasyon süresi	N	AAB
0	4	2.9400 ^c
30	4	3.5950 ^a
60	4	3.1750 ^b
90	4	3.0350 ^{bc}
120	4	1.9425 ^d

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Örneklerin fermantasyon süresinin AAB sayıları üzerine etkisi Şekil 41’de çizgi grafik ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, örneklerin fermantasyon süresi boyunca AAB sayılarında belirgin farklılık görülmüştür. ELBL1 ve ELBL2 örneklerinin 0. günde benzer AAB sayılarına sahip olduğu tespit edilmiştir. ELBL1 örneğine 30. günde AAB inokülasyonu yapılmış ve 30. günden 90. güne kadarki süreçte AAB sayısında kısmen düşüş belirlenmiştir. 90. günden sonra ise AAB sayısında belirgin bir düşüş görülerek ortalama 3,88 log kob/ml seviyelerine ulaşmıştır. Bu durum, ELBL1 örneğinde meydana gelen asitlik artışına paralel olarak AAB sayısında düşüşe neden olduğu fikrini güçlendirmektedir. ELBL2 örneğine ise 30. günde AAB inokülasyonu yapılmamış olup, AAB sayılarının 120. güne kadarki süreçte <2 log kob/ml seviyelerinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 41. Sirke örneklerinin AAB sayıları üzerine fermantasyon süresinin etkisi

Üretimi tamamlanan sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca belli aralıklarla belirlenen TAMB sayılarının sonuçlarına ait varyans analizi Tablo 62’de verilmiştir. Varyans

analiz sonuçlarına göre, örneklerin TAMB sayıları üzerine sirke çeşidi, fermantasyon süresi ve sirke çeşidi×fermantasyon süresi interaksiyonunun $p<0.01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 62. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca TAMB sayısına ait varyans analiz sonuçları

TAMB			
Varyasyon kaynakları	SD	KO	F
Sirke çeşidi (A)	1	79.640	3584.983**
Fermantasyon süresi	4	4.936	222.191**
A×B	4	5.551	249.883**
Hata	10	0.022	
Genel	20		

*önemli ($p<0.05$); **çok önemli ($p<0.01$); SD: Serbestlik derecesi; KO: Kareler ortalaması

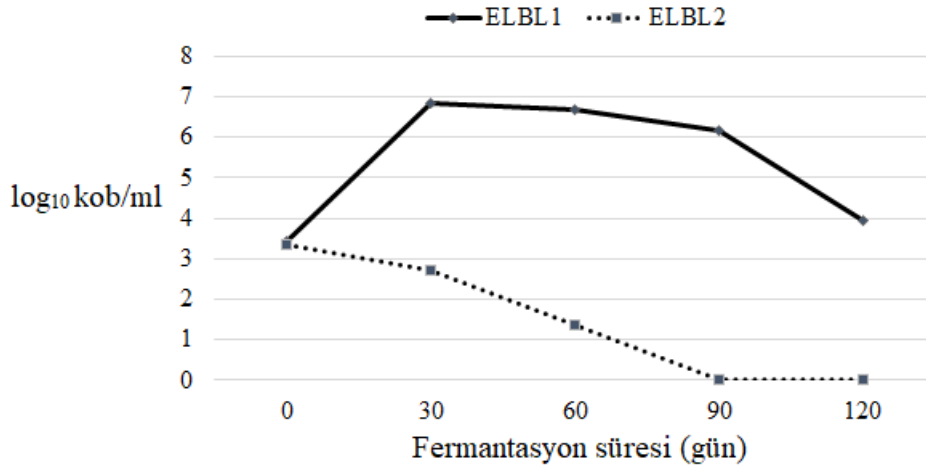
Sirke örneklerine ait TAMB sayıları Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 63’de verilmiştir. Sonuçlar sirke çeşidinin TAMB sayıları üzerinde önemli düzeyde farklılığa neden olduğunu göstermiştir ($p<0.05$).

Tablo 63. Sirke örneklerinin fermantasyon süresi boyunca TAMB değerlerinin ortalamalarının Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Fermantasyon süresi	N	TAMB
0	4	3.3875 ^c
30	4	4.9600 ^a
60	4	4.0250 ^b
90	4	3.0800 ^d
120	4	1.9700 ^e

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır. N: Örnek sayısı

Örneklerin fermantasyon süresinin TAMB sayıları üzerine etkisi Şekil 42’de çizgi grafik ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, örneklerin fermantasyon süresi boyunca TAMB sayılarında belirgin farklılık görülmüştür. AAB inokülasyonu yapılan ELBL1 örneğinin TAMB sayılarının AAB sayılarına benzer şekilde ilerlediği görülmektedir. AAB inokülasyonu yapılmamış olan ELBL2 örneğinde ise TAMB sayılarının başlangıçta ortalama 3.36 log kob/ml düzeyindeyken fermantasyon süreci boyunca giderek azaldığı ve 90. günden sonra <2 log kob/ml seviyesine düştüğü belirlenmiştir. ELBL2 örneğinde TAMB sayılarının düşmesinde, ortama hâkim olan maya ve küflerin etkisinin olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 42. Sirke örneklerinin TAMB sayıları üzerine fermentasyon süresinin etkisi

Li *et al.* (2016), 19 günlük aerobik katı hal fermentasyonu ile üretilen Shanxi sirkesinin AAB, laktik asit bakterisi (LAB), *Bacillus* ve toplam bakteri sayısını qPCR ile analiz ederek takip etmişlerdir. 1-7. gün arasında AAB sayısı 6.91-8.82 log kob/g düzeyinde ilerleyip, 9-19. günlerde yaklaşık 8.70 log kob/g düzeylerinde sabit kalmıştır. Toplam bakteri sayısı 1-7. Gün arasında 10.13-11.58 log kob/g düzeyindeyken, daha sonra giderek azalarak 19. günde 10.00 log kob/g düzeyinin altına düşmüştür.

120 günlük fermentasyon süresi boyunca ürünlerde koliform grubu bakteri gelişimi görülmemiştir. Bu da üretim sırasında hijyenik koşullara dikkat edildiğinin bir göstergesidir.

Üretilen sirke örneklerinin antimikrobiyal etkileri

Üretimi tamamlanmış olan (120. gün) sirke örneklerinin antimikrobiyal etkilerinin pH değerlerinden kaynaklı olup olmadığını görmek amacıyla, sirke örneklerinin pH değerleri nötrlenerek (pH 7,0) ve nötrlenmeden olmak üzere iki farklı parametre kullanılarak birbirleriyle kıyaslanmıştır. Sirke örneklerinin *S. Typhimurium* RSHMB 95091, *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* BC12, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *C. albicans* ATCC 1223, *A. niger* ATCC 16888 patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş olup sonuçlar Tablo 58’de verilmiştir.

Tablo 50’de görüldüğü üzere üretimi tamamlanmış olan EBL1 örneğinin son pH değeri 2.85 ve EBL2 örneğinin son pH değeri ise 2.97’dir. Tablo 64’de örneklerin kendi pH değerleri (pH) ve nötrlenmiş pH değerlerinin (nötr pH) patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkileri yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde, EBL2 örneğinin hiçbir patojen üzerinde antimikrobiyal etkisinin olmadığı görülmektedir. EBL1 örneğinin *S. Typhimurium* RSHMB 95091 ve *E. coli* BC12 patojenleri üzerinde yüksek antimikrobiyal etkisinin olduğu belirlenmiştir. EBL1 örneğinin *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *C.*

albicans ATCC 1223, *A. niger* ATCC 16888 patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etki düzeylerinin ise üründe meydana gelen düşük pH düzeyinden kaynaklı olduğu belirlenmiştir.

Ousaaid *et al.* (2021), dört farklı çeşitteki elma sirkesi üzerinde yaptıkları çalışmada, tüm sirke örneklerinin *E. coli* O157:H7 ve *Vibrio cholerae* üzerinde inhibisyon etkisinin olduğunu ve zon çaplarının sırasıyla 8-19 mm ve 9-16 mm arasında değiştiğini bildirmişlerdir. *Salmonella typhi* üzerinde iki çeşit sirkenin inhibisyon etkisinin olduğunu ve zon çaplarının 15 ve 14 mm olduğunu; *C. albicans* ve *Candida tropicalis* üzerinde ise tek bir çeşit sirkenin inhibe edici etkisinin olduğunu ve zon çaplarının sırasıyla 12 ve 11 mm olduğunu tespit etmişlerdir. Bakir *et al.* (2017), 18 farklı sirke çeşidinin *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* üzerinde inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Analiz sonucunda, %5-7 asitlik aralığına sahip sirkelerin inhibisyon etkilerinin *S. Typhimurium* için 11.57-15.81; *S. aureus* için 9.33-11.63; *E. coli* için 10.06-12.19 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Saqib (2017), yaptığı bir çalışmada elma sirkesinin *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* ve *A. niger* üzerindeki antimikrobiyal ve antifungal etkilerini ortalama olarak sırasıyla 31.60; 26.60; 20.80 ve 26.60 olarak tespit etmiştir.

Üretimi gerçekleştirilen sirke örneklerinin antimikrobiyal etkilerine ait gerçekleştirilen varyans analiz sonuçları Tablo 65’de verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre, örneklerin antimikrobiyal etkileri üzerine sirke çeşidi, patojen türü ve sirke çeşidi×patojen türü interaksiyonunun çok önemli derecede farklılığa neden olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$).

Tablo 64. Sirke örneklerinin patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkileri (inhibisyon zon çapı, mm)

Örnek	Patojenler											
	<i>S. Typhimurium</i> RSHMB 95091		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>E. coli</i> BC12		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644		<i>A. albicans</i> ATCC 1223		<i>A. niger</i> ATCC 16888	
	pH	Nötr pH	pH	Nötr pH	pH	Nötr pH	pH	Nötr pH	pH	Nötr pH	pH	Nötr pH
ELBL1	31.0±1.4	10.0±0.0	31.5±2.1	-	29.5±2.1	9.0±0.0	11.1±0.2	-	12.5±0.7	-	15.2±0.3	-
ELBL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 65. Sirke örneklerinin antimikrobiyal etkilerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	<i>S. Typhimurium</i> RSHMB 95091		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>E. coli</i> BC12		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644		<i>C. albicans</i> ATCC 1223		<i>A. niger</i> ATCC 16888	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
Sirke çeşidi	1	840.50	1681.000**	496.125	441.000**	741.125	658.778**	62.161	5525.444**	78.125	625.000**	116.281	3721.000**
Patojen türü	1	220.50	441.000**	496.125	441.000**	210.125	186.778**	62.161	5525.444**	78.125	625.000**	116.281	3721.000**
A×B	1	220.50	441.000**	496.125	441.000**	210.125	186.778**	62.161	5525.444**	78.125	625.000**	116.281	3721.000**
Hata	4	0.50		1.125		1.125		0.011		0.125		0.031	
Genel	8												

*önemli (p<0.05); **çok önemli (p<0.01); SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

SONUÇLAR

Bu çalışmada, Türkiye'nin 17 farklı ilinden 48 adet ev yapımı ve 13 adet ticari olmak üzere 61 sirke örneği temin edilerek bu örneklerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiştir. Sirke örneklerinden toplamda 176 adet muhtemel AAB izole edilerek, izolatların gram ve katalaz özellikleri incelenmiş ve bunun sonucunda 95 adet muhtemel AAB olduğu belirlenmiştir. Yapılan genetik tanı sonucunda 95 adet muhtemel AAB izolatının 85 tanesinin AAB olduğu ve 16 farklı türü temsil ettiği tespit edilmiştir. Sirke örneklerinden toplamda 106 maya izolatı elde edilerek genetik tanıları gerçekleştirilmiştir. Tanı sonucunda 106 maya izolatının 12 farklı maya türünü temsil ettiği görülmüştür. Çalışma kapsamında üretilmesi planlanan probiyotik sirke örnekleri için izolatların starter ve probiyotik özellikleri incelenmiştir. AAB izolatlarının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi amacıyla glukoz toleransı, etanol toleransı, farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri, asetik asit toleransı, farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri ve asetik asit üretim hızı belirlenmiştir. Maya izolatlarının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı şeker konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri, düşük pH değerlerinde gelişme yetenekleri farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri analiz edilmiştir. AAB ve maya izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesinde ise safra tuzuna tolerans, mide ortamına direnç, oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite kapasitesi, antibiyotik direnci, virülans faktör genlerin tespiti, safra tuzu hidrolaz aktivitesi, hemolitik aktivite, DNaz aktivitesi gibi analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda en iyi starter ve probiyotik kültür özellik gösteren izolatlar seçilerek elmalı ballı probiyotik sirke örnekleri üretiminde kullanılmıştır. 30 gün alkol fermantasyonu ve 90 gün asetik asit fermantasyonu olmak üzere toplamda 120 günlük fermantasyon süreci boyunca; belirli aralıklarla, üretilen sirke örneklerinin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri incelenmiştir. Gerçekleştirilen analizlere dayanarak, elde edilen çalışma sonuçları maddeler halinde verilmiştir.

1. Çalışmada kullanılan 48 adet ev yapımı ve 13 adet ticari sirke örneklerinin pH ve briks değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ancak asitlik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.01$). Ev yapımı sirkelerin asitlik değerleri ortalama %1.45 iken, ticari sirkelerin asitlik değerleri ortalama %3.20'dir. Ülkemizin TS 1880 EN 13188 Sirke Standardı'na göre, üretimi yapılacak olan sirkelerin toplam asit içeriğinin (suda serbest asetik asit cinsinden) en az

%4 olması gerekmektedir. Asitlik değerleri açısından örnekler incelendiğinde, genel itibariyle ev yapımı sirkelerin standarda uygun olmadığı; ticari sirkelerden ise 24, 25 ve 30 numaralı örneklerin haricindeki örneklerin yine standarda uygun olmadığı görülmüştür.

2. Çalışma kapsamında temin edilen 48 adet ev yapımı ve 13 adet ticari sirke örneklerinin TAMB ve AAB sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ev yapımı ve ticari sirke örneklerinin maya-küf sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ev yapımı sirke örneklerinde ortalama 2.80 log kob/ml maya-küf sayısı bulunurken, ticari sirke örneklerinde ortalama 0.88 log kob/ml maya-küf sayısı tespit edilmiştir. Bu durumun, ev şartlarında daha fazla kontaminasyon kaynağı oluşturmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.
3. Temin edilen sirke örneklerinden toplamda 176 adet muhtemel AAB izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların gram ve katalaz özellikleri incelendiğinde, 95 tanesinin gram negatif ve katalaz pozitif özelliklere sahip olmasından dolayı yüksek muhtemel AAB olabileceği belirlenmiştir.
4. 95 muhtemel AAB izolatının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi amacıyla glukoz toleransı, etanol toleransı, farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri, asetik asit toleransı, farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri analiz edilmiştir. Bir starter kültür özelliği olan asetik asit üretim hızı ise safra tuzu ve mide ortamına direnç gösteren izolatlardan seçilerek uygulanmıştır.
5. 95 muhtemel AAB izolatı için probiyotik özelliklerin belirlenmesi amacıyla izolatların safra tuzuna tolerans ve mide ortamına direnç analizleri gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan 41 tanesinin safra tuzunu tolere ettiği, safra tuzunu tolere eden 41 izolattan ise 18 tanesinin mide ortamına direnç gösterdiği tespit edilmiştir.
6. Bu 95 muhtemel AAB izolatının probiyotik ve starter kültür özellikleri tümüyle incelenerek, kaliteli bir sirke üretimi için iyi starter kültür özelliği gösteren ve probiyotik potansiyeli taşıyan suşlar seçilerek asetik asit üretim hızları belirlenmiştir. Belirtilen şartlara göre seçilmiş olan izolatlar A25, A49, A51, A58, A69, A72, A126, A132, A140, A141, A144, A146, A149, A174 şeklinde olup 14 tanedir.

Asetik asit üretim hızları belirlenen 14 izolatın, starter kültür özellikleri iyi olsa bile safra tuzu ve mide ortamına direnç özellikleri incelendiğinde probiyotik potansiyeli taşımayan

izolatlar elenerek diğer karakterizasyon çalışmalarına A49, A51, A58 ve A132 izolatları ile devam edilmiştir.

7. Probiyotik potansiyeli taşıyan A49, A51, A58 ve A132 izolatlarının simüle mide ortamını ne düzeyde geçtiği belirlenmiş ve en yüksek canlılık oranının %96.1 ile A49 izolatına ait olduğu, en düşük canlılık oranının ise %74 ile A132 izolatına ait olduğu tespit edilmiştir.
8. A49, A51, A58 ve A132 izolatlarının oto-agregasyon, ko-agregasyon ve hidrofobisite kapasiteleri incelendiğinde ise A49, A51 ve A58 izolatlarının daha iyi özelliklere sahip olduğu görülmüştür. İzolatların oto-agregasyon kapasitelerinin 2. ve 4. saatlerde çok düşük olduğu ve 24. saatte ise %19.44 ile %24.64 arasında değiştiği belirlenmiştir. İzolatların ko-agregasyon kapasiteleri ise *E. coli* BC12 için %8.41-9.90 arasında olduğu, *S. Typhimurium* RSHMB 95091 için %7.68-10.08 arasında olduğu, *S. aureus* ATCC 29213 için %14.47-17.84 arasında olduğu, *L. monocytogenes* ATCC 7644 için %0-27,68 arasında olduğu tespit edilmiştir. A49, A51, A58 izolatlarının en güçlü ko-agregasyon yeteneğini *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde gösterdiği ancak A132 izolatının *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde ko-agregasyon yeteneği gösteremediği bulunmuştur. Hidrofobisite yeteneklerinin ise %1.21-54.35 arasında olduğu ve en düşük hidrofobisite yeteneğinin A132 izolatına ait olduğu tespit edilmiştir.
9. A49, A51, A58 ve A132 izolatlarının antibiyotik dirençleri incelendiğinde A132 izolatının klindamisin hariç tüm antibiyotiklere karşı hassas olduğu belirlenmiştir. A49, A51 ve A58 izolatlarının ise ampisilin, vankomisin, eritromisin, klindamisin ve kloramfenikola karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinde virülans faktör genlerinin bulunmadığı ve DNaz aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. A49, A51, A58 izolatlarının hemolitik aktivitelerinin bulunmadığı ancak A132 izolatının α -hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Yine A49, A51, A58 izolatlarının BSH aktivitelerinin bulunmadığı ancak A132 izolatının BSH aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.
10. 95 muhtemel AAB izolatı için gerçekleştirilen genetik tanı sonucunda 85 tanesinin AAB türü olduğu ve 16 farklı türü temsil ettiği tespit edilmiştir. Bu 16 farklı AAB türü; *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter lambici*, *Acetobacter sicerae*, *Acetobacter oryzoeni*, *Acetobacter surattaniensis*, *Acetobacter persici*, *Acetobacter tropicalis*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter melaceti*, *Komagataeibacter melomenusus*, *Komagataeibacter swingsii*, *Komagataeibacter diospyri*, *Gluconobacter vitians*, *Gluconobacter potus*

şeklindedir. Bu türler içerisinde en yüksek sayıda *A. ghanensis* (%26) ve *A. fabarum* (%19) olduğu, en düşük sayıda ise *A. persici* (%1), *A. tropicalis* (%1) ve *G. potus* (%1) olduğu belirlenmiştir.

11. Çalışma kapsamında starter ve probiyotik kültür özellikleri incelenen ve AAB olduğu belirlenen 85 izolat içerisinde, probiyotik sirke üretimi için A49 (*A. ghanensis*) kodlu izolatın kullanımına karar verilmiştir.
12. Temin edilen sirke örneklerinden toplamda 106 adet maya izolatı elde edilmiştir. Elde edilen 106 maya izolatının starter kültür özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı şeker konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri, düşük pH değerlerinde gelişme yetenekleri farklı sıcaklık değerlerinde gelişme yetenekleri tespit edilmiştir.
13. 106 maya izolatının probiyotik özelliklerin belirlenmesi amacıyla izolatların safra tuzuna tolerans analizleri gerçekleştirilmiş ve tüm izolatların safra tuzunu tolere ettiği belirlenmiştir. Safra tuzuna tolerans gösteren 106 izolattan 71 tanesinin mide ortamına direnç gösterdiği tespit edilmiştir.
14. Maya izolatların çoğunun safra tuzunu tolere etmeleri ve mide ortamına direnç göstermelerinden dolayı, izolatların starter kültür özellikleri de incelenerek mümkün mertebe farklı starter kültür özellikleri gösteren izolatlar seçilerek diğer deneylere devam edilmiştir. Safra tuzunu tolere eden ve mide ortamına direnç gösteren, iyi starter kültür özelliklerine sahip olduğu düşünülerek seçilen izolatlar B13, B19, B30, B39, B41, B49, B71, B83, B91, B96, B97, B102 ve B104 olmak üzere toplamda 13 maya izolatıdır.
15. Seçilen 13 maya izolatı için gerçekleştirilen mide ortamına direnç analizinde, en yüksek canlılık oranının %107 ile B49 izolatına ait olduğu, en düşük canlılık oranının ise %95 ile B71 izolatına ait olduğu tespit edilmiştir.
16. 13 maya izolatı içerisinde en iyi oto-agregasyon kapasitesinin B13, B19, B30, B39, B71 ve B91 izolatlarına ait olduğu; en iyi ko-agregasyon kapasitesinin B30 ve B71 izolatlarına ait olduğu; en yüksek hidrofobisite kapasitesinin B39 ve B71 izolatlarına ait olduğu belirlenmiştir.
17. 13 maya izolatının antifungal dirençleri incelendiğinde ise sadece B13, B19, B39, B83 ve B91 izolatlarının flukonazole dirençli oldukları görülmüştür. Antifungallere en yüksek hassasiyeti B71 izolatının gösterdiği istatistikî analizlerle belirlenmiştir.

18. 13 maya izolatından B30 izolatının β -hemolitik aktivite gösterdiği, izolatların hiçbirinde DNaz aktivitesinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Sadece B104 izolatının BSH aktivitesinin olduğu görülmüştür.
19. Sirke örneklerinden elde edilen 106 maya izolatının genetik tanıları gerçekleştirilmiş ve 12 farklı türü temsil ettiği belirlenmiştir. Bu 12 farklı maya türü; *Pichia membranifaciens*, *Pichia bruneiensis*, *Pichia manshurica*, *Pichia deserticola*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida boidinii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Kregervanrija fluxuum* şeklindedir. Bu türler içerisinde en yüksek sayıda *K. fluxuum* (%25) ve *P. manshurica* (%24) olduğu, en düşük sayıda ise *S. cerevisiae* (%1), *C. boidinii* (%1) ve *H. guilliermondii* (%1) olduğu görülmüştür.
20. Çalışma kapsamında starter ve probiyotik kültür özellikleri incelenen 106 maya izolatu içerisinde, probiyotik sirke üretimi için B71 (*S. cerevisiae*) kodlu izolatın kullanımına karar verilmiştir.
21. Elmalı ballı probiyotik sirke (ELBL1) ve kontrolü olan elmalı ballı sirkenin (ELBL2) 120 günlük fermantasyon süresi boyunca pH, asitlik, briks değerleri ve mikrobiyolojik sayım sonuçları takip edilmiştir.
22. 120 günlük fermantasyon süresi boyunca; inokülasyon yapılan ELBL1 örneğinde arzu edilen sirkeleşmenin olduğu görülürken, inokülasyon yapılmamış olan ELBL2 örneğinde sirkeleşmenin olmadığı görülmüştür. Bu durum, ELBL1 örneğinde kullandığımız A49 ve B71 kodlu izolatların sirke oluşum sürecine katkı sağladığını ve sirke üretimi için uygun izolatlar olduklarını göstermektedir. Ortamda sirkeleşmeyi sağlayacak yeterli mikroorganizma kültürünün bulunmamasından dolayı, ELBL2 örneğinde sirkeleşmenin sağlanamadığı açıkça görülmüştür.
23. 120. gün sonunda ELBL1 ve ELBL2 örneklerinin sırasıyla pH değerleri 2.85 ve 2.97; asitlik değerleri %5.01 ve %0.16; briks değerleri 2.60 ve 3.00 olarak ölçülmüştür.
24. ELBL1 ve ELBL2 örneklerinde fermantasyon süresi boyunca gerçekleştirilen istatistikî sonuçlar, sirke çeşidinin maya-küf, AAB ve TAMB sayıları üzerinde önemli derecede farklılığa neden olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). Ürünlerde fermantasyon süresi boyunca koliform grubu bakterilere rastlanmamıştır. Bu da, üretim sırasında hijyenik koşulların sağlanabildiğinin göstergesidir.
25. Üretilen ürünlerin antimikrobiyal etkileri incelendiğinde, ELBL2 örneğinin normal pH ve nötr pH şartlarda hiçbir patojen üzerinde antimikrobiyal etkisinin olmadığı

belirlenmiştir. ELBL1 örneğinin normal pH ve nötr pH şartlarında *S. Typhimurium* RSHMB 95091 ve *E. coli* BC12 patojenleri üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. ELBL1 örneğinin normal pH şartlarında *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *C. albicans* ATCC 1223, *A. niger* ATCC 16888 patojenleri üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu; nötr pH şartlarında ise antimikrobiyal etkisinin olmadığı belirlenmiştir. pH düzeyleri düşük olan her iki örnekten, ELBL1 örneğinde antimikrobiyal etki gözlenirken ELBL2 örneğinde antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. Bu durumda, ELBL1 örneğinin ELBL2 örneğine göre yüksek antimikrobiyal etki göstermesinin, ELBL1 örneğinin yüksek titrasyon asitliği değerine sahip olmasından kaynaklı olabileceği kanısını güçlendirmektedir.

26. Eldeki tüm veriler değerlendirildiğinde, üretim sırasında kullanılan A49 (*A. ghanensis*) ve B71 (*S. cerevisiae*) kodlu izolatlardan sirke üretiminin gerçekleştirilebileceği görülmüştür. Fakat, bir gıdanın probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için gerekli olan minimum mikroorganizma sayısı olan 10^6 kob/ml, 120. günde %5 asitlik değerine ulaşan üründe devam ettirilememiştir. Buna rağmen, 90. günde %3.8 asitlik değerine ulaşan üründe AAB sayısının 10^6 kob/ml değerini sağladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, ülkemiz standartları da dikkate alınarak probiyotik sirke üretmenin mümkün olabileceği ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerektiği mevcut çalışma ile ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

- 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.
- Adetoye, A., Pinloche, E., Adeniyi, B.A. and Ayele, F.A., 2018. Characterization and anti-*Salmonella* activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. BMC microbiology, 18(1), 1-11.
- Ahmad, I., Sharma, J. and Ahmad, F., 2004. Isolation and characterization of resistance traits of indigenous strains of *Acetobacter diazotrophicus* associated with sugarcane. Sugar Tech, 6, 41-46.
- Akay, Ö., 1985. Çeşitli kaynaklardan izole edilen Stafilokok suşlarının koagülaz ve DNaz aktiviteleri üzerinde bir araştırma. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 32 (3): 429-437.
- Aksoy A., 2021. Gıdalarda pH Ölçümünün Önemi. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2021, 4(2), 193-216.
- Aktan, N. ve Yıldırım, H., 2011. Sirke Teknolojisi, Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye.
- Al-Dalali, S., Zheng, F., Xu, B., Abughoush, M., Li, L. and Sun, B., 2023. Processing technologies and flavor analysis of Chinese cereal vinegar: A comprehensive review. Food Analytical Methods, 16(1), 1-28.
- Altunatmaz, S.S., Kahraman, T. and Aksu, F.Y., 2010. Probiyotik gıdalar ve insan sağlığı üzerindeki etkileri. Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi, (19), 90-95.
- Alvarez, S.C.V., Alaniz, M.J.L., Furlani, M.V.M., Vazquez, F., Agresti, P.M., Nally, M.C. and Maturano, Y.P., 2023. Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. Fungal Genetics and Biology, 164, 103767.
- Amorim, J.C., Piccoli, R.H. and Duarte, W.F., 2018. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. Food Research International, 107, 518-527.
- Anonim, 2016. Sirke-tarım kökenli sıvılardan elde edilen ürün-tarifler, özellikler ve işaretleme, Türk Standardı TS 1880 EN 13188, Türk Standartları Enstitüsü Ankara.
- Anonymous, 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.
- Arslankoz, N., 2011. Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye.
- Bakir, S., Devecioglu, D., Kayacan, S., Toydemir, G., Karbancioglu-Guler, F. and Capanoglu, E., 2017. Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars. European Food Research and Technology, 243, 2083-2094.
- Bilginer, H. ve Çetin, B., 2019. Probiyotikler ve belirlenmelerinde kullanılan *in vitro* testler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50(3), 312-325.

- Bilginer, H., 2018. Geleneksel Yöntemlerle Üretilen Sirkelerin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Mikrobiyotasında Yer Alan Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Erzurum, Türkiye.
- Boranbayeva, T., Karahan, A.G. and Tulemissova, Z., 2020. Properties of a new probiotic candidate and Lactobacterin-TK² against diarrhea in calves. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 12, 918-928.
- Budak, N.H., Aykın, E., Seydim, A.C., Greene, A.K. and Guzel-Seydim, Z.B., 2014. Functional properties of vinegar. Journal of Food Science, 79-5.
- Cavdaroglu, C. and Ozen, B., 2023. Authentication of vinegars with targeted and non-targeted methods. Food Reviews International, 39(1), 41-58.
- Corzo, G. and Gilliland, S. E., 1999. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science, 82(3), 472-480.
- Cosmulescu, S., Stoenescu, A. M., Trandafir, I. and Tuşulescu, F., 2022. Comparison of chemical properties between traditional and commercial vinegar. Horticulturae, 8(3), 225.
- Cui, K., Gong, I., Dong, A., Yan, J., Wang, M. and Huang, Z., 2020. Investigation of virulence genes detected in antimicrobial-resistance pathogens isolates for five countries across the world. Processes, 8(12), 1589.
- Cumur P., 2022. Geleneksel Yöntemlerle Üretilmiş Zeytin ve Zeytin Ürünlerinden Mayaların İzolasyonu, Tanımlanması ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Sakarya, Türkiye.
- Çetin, B. ve Çırpıcı, B. B. Mayalarda safra tuzu toleransının belirlenmesinde farklı sıcaklık ve besiyeri kullanımının etkisi. Gıda, 48(5), 1004-1020.
- Demirok, N.T., Alpaslan, M. and Yıkılmış, S., 2023. Some *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Acetobacter* strains in traditional turkish yoghurt, cheese, kefir samples as a probiotic candidate. International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences, 7(2), 326-334.
- Dıraman, H., Karataş, D., Guner, S. ve Ünsal, T. E., 2023. Bir Çeşni Kaynağı Olarak Kırmızı Pancar Sirkesi: Üretimi ve Özellikleri. Helal ve Etik Araştırmalar Dergisi, 5(1), 37-50.
- Diguță, C. F., Mihai, C., Toma, R. C., Cîmpeanu, C., and Matei, F., 2022. In vitro assessment of yeasts strains with probiotic attributes for aquaculture use. Foods, 12(1), 124.
- Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A. and Garrote, G.L., 2014. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30, 43-53.
- Dlamini, Z.C., Langa, R.L.S., Aiyegoro, O.A. and Okoh, A.I., 2019. Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11 (2), 397-402.
- El-Askri, T., Yatim, M., Sehli, Y., Rahou, A., Belhaj, A., Castro, R., Guerrero E.D., Hafidi M. and Zouhair, R., 2022. Screening and characterization of new *Acetobacter fabarum* and *Acetobacter pasteurianus* strains with high ethanol-thermo tolerance and the optimization of acetic acid production. Microorganisms, 10(9), 1741.
- Elcioglu, O. and Kunduhoglu, B., 2014. Probiotic characteristics of natural Lactobacilli isolated from traditional Kargi tulum cheese. Italian Journal of Food Science, 26(1), 31-40.

- Ertürkmen, P., Fırıncioğulları, B., Öner, Z., 2023. The expression levels of genes responsible for the enzymatic activity of bile salt hydrolase (BSH) and the relationship of cholesterol assimilation in *L. plantarum* and *L. paracasei*. *Current Microbiology*, 80(6), 205.
- Esen, Y. and Çetin, B., 2021. Bacterial and yeast microbial diversity of the ripened traditional middle east surk cheese. *International Dairy Journal*, 117, 105004.
- Fernández-Pacheco, P., Ramos Monge, I.M., Fernández-González, M., Poveda Colado, J.M. and Arévalo-Villena, M., 2021. Safety evaluation of yeasts with probiotic potential. *Frontiers in Nutrition*, 8, 239.
- Fernandez-Perez, R., Torres, C., Sanz, S. and Ruiz-Larrea, F., 2010. Rapid molecular methods for enumeration and taxonomical identification of acetic acid bacteria responsible for submerged vinegar production. *European Food Research and Technology*, 231, 813-819.
- Fleet, G.H., 2006. The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production, Chapter 1. Yeasts in Food and Beverages, Ed: Querol A. and Fleet G. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1-12.
- Franz, C.M., Specht, I., Haberer, P. and Holzapfel, W.H., 2001. Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: Screening and quantitative determination. *Journal of Food Protection*, 64(5), 725-729.
- Fraqueza, M. J., 2015. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76-88.
- Fuochi, V., Petronio, G.P., Lissandrello, E. and Furneri, P.M., 2015. Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus* spp. isolates. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28(3), 426-433.
- Gebre, T.S., Emire, S.A., Chelliah, R., Aloo, S.O. and Oh, D.H., 2023. Isolation, functional activity, and safety of probiotics from Ethiopian traditional cereal-based fermented beverage, “Borde”. *LWT*, 184, 115076.
- Gerard, L.M., Corrado, M.B., Davies, C.V., Soldá, C.A., Dalzotto, M. G. and Esteche, S., 2023. Isolation and identification of native yeasts from the spontaneous fermentation of grape musts. *Research Square*, 1-24.
- Goktas, H., Dikmen, H., Demirbas, F., Sagdic, O. and Dertli, E., 2021. Characterisation of probiotic properties of yeast strains isolated from kefir samples. *International Journal of Dairy Technology*, 74(4), 715-722.
- Gökırmaklı, Ç., Budak, H. N. and Güzel-Seydim, Z. B., 2019. Antimicrobial effect of vinegar. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7, 1635-1640.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. and Giudici, P., 2006. Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Balsamic Vinegar. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 209-212.
- Gullo, M. and Giudici, P., 2006. Isolation and Selection of Acetic Acid Bacteria Strains for Traditional Balsamic Vinegar [Emilia-Romagna]. *Industria delle Bevande (Italy)*.
- Gülbandılar, A., Okur, M. ve Dönmez, M., 2017. Fonksiyonel gıda olarak kullanılan probiyotikler ve özellikleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10(1), 44-47.
- Günay, M. and Genç, T.T., 2023. Molecular identification of yeasts from Turkish traditional cheeses: Extracellular enzyme activities and physiological properties important for dairy industry. *Nusantara Bioscience*, 15(1).

- Güzel, N. ve Bahçeci, K.S., 2020. Çorum Yöresi Ballarının Bazı Kimyasal Kalite Parametrelerinin Değerlendirilmesi Gıda, 45(2), 230-241.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A. and Yari Khosroushahi, A., 2015. Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. International Journal of Food Science and Technology, 50(4), 1056-1064.
- Halkman, K., 1995. Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye.
- He, Y., Xie, Z., Zhang, H., Liebl, W., Toyama, H. and Chen, F., 2022. Oxidative fermentation of acetic acid bacteria and its products. Frontiers in Microbiology, 13.
- Ho, C.W., Lazim, A.M., Fazry, S., Hussein, Zaki U.K. and Lim, S.J., 2016. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. Food Chemistry, 221, 1621-1630.
- Istiqomah, L., Anwar, M., Anggraeni, A.S. and Damayanti, E., 2018. Cholesterol Assimilation of *Saccharomyces cerevisiae* B-18 isolated from gastrointestinal tract of Javanese duck. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 43(2).
- Jacques, N. and Casaregola, S., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. International Journal of Food Microbiology, 126(3), 321-326.
- Jones, M.L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T., and Prakash, S., 2004. Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. BioMed Research International, 2004, 61-69.
- Kadiroğlu, H. and Çetin, B., 2023. Identification of bacterial microbiota of traditional homemade vinegars. Journal of Food and Nutrition Research, 62(4).
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Inoue, T., Yakushi, T., Adachi, O. and Matsushita, K., 2010. Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74(8), 1591-1597.
- Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S. and Malaiyan, J., 2020. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of Enterococci. BMC Research Notes, 13, 1-7.
- Kou, R., Li, M., Xing, J., He, Y., Wang, H. and Fan, X., 2022. Exploring of seasonal dynamics of microbial community in multispecies fermentation of shanxi mature vinegar. Journal of Bioscience and Bioengineering, 133, 375-381.
- Koutsokali, M. and Valahas, M., 2020. Anaerobic and aerobic respiration in yeast: small-scale variations on a classic laboratory activity. Journal of Chemical Education, 97(4), 1041-1047.
- Krausova, G., Hyrslova, I. and Hynstova, I., 2019. In vitro evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. Fermentation, 5(4), 100.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. and Robbert V., 2011. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts, Chapter 7. The Yeasts A Taxonomic Study, 5th ed., Ed: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. and Boekhout, T. Elsevier, San Diego, USA, 87-110.

- La, China, S., Zanichelli, G., De Vero, L. and Gullo, M., 2018. Oxidative fermentations and exopolysaccharides production by acetic acid bacteria: a mini review. *Biotechnology Letters*, 40:1289-1302.
- Lad, V., Panchal, D., Pithawala, M., Dwivedi, M.K. and Amaresan, N., 2022. Determination of Hemolytic Activity. Ed: Dwivedi, M.K., Amaresan, N., Sankaranarayanan, A. and Begum, R. *Biosafety Assessment of Probiotic Potential. Methods and Protocols in Food Science*. Humana, New York, NY.
- Lata, P., Kumari, R., Sharma, K. B., Rangra, S. and Savitri, 2022. In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 132.
- Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman A., Riaz T., AAdil R.M., Khan I.M., Özogul F., Rocha J.M., Esatbeyoglu T. and Korma, S. A., 2023. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Lavilla-Lerma, L., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. and Valdivia, E., 2013. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 136-145.
- Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J. and Willems, R. J., 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 672-682.
- Li, S., Li, P., Feng, F. and Luo, L.X., 2015. Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4997-5024.
- Li, S., Li, P., Liu, X., Luo, L. and Lin, W., 2016. Bacterial dynamics and metabolite changes in solid-state acetic acid fermentation of Shanxi aged vinegar. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 4395-4411.
- Liasi, S.A., Azmi, T.I., Hassan, M.D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M. and Ariff, A.B., 2009. Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5 (1), 33-37.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5), 325-328.
- Lynch, K.M., Zannini, E., Wilkinson, S., Daenen, L. and Arendt, E.K., 2019. Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 587-625.
- Łysakowska, M. E., Denys, A. and Sienkiewicz, M., 2012. Frequency of *ace*, *epa* and *elrA* genes in clinical and environmental strains of *Enterococcus faecalis*. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 612-616.
- Mamlouk, D. and Gullo M., 2013. Acetic Acid Bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4):377-384.
- Mas, A., Torija, M.J., Garcia-Parrilla, M.C. and Troncoso, A.M., 2014. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *The Scientific World Journal*, 394671, 6p.
- Masino, F., Chinnici, F., Bendini, A., Montevecchi, G. and Antonelli, A., 2008. A study on relationships among chemical, physical, and qualitative assessment in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, 106(1), 90-95.

- Matsutani, M., Nishikura, M., Saichana, N., Hatano, T., Masud-Tippayasak, U., Theergool, G., Yakushi T. and Matsushita, K., 2013. Adaptive mutation of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 enhances acetic acid fermentation ability at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 165(2), 109-119.
- McLandsborough L., 2005. *Fish Microflora: Basic Microbiological Techniques and Standard Plate Counts*, Laboratory 1, 2nd ed., Ed: F.M. Clydesdale. Food Microbiology Laboratory. CRC Press, USA, 1-16p.
- Megep, 2011. Koloni Sayımı. Gıda Teknolojisi, 541GI0069.
- Menezes, A. G. T., Ramos, C. L., Cenzi, G., Melo, D. S., Dias, D. R. and Schwan, R. F., 2020. Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 280-288.
- Mercuri, A.J. and Cox, N.A., 1979. Coliforms and *Enterobacteriaceae* Isolates from Selected Foods. *Journal of Food Protection*, 42(9), 712-714.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M.R. and Ferrero, M.Á., 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 531-541.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E. and Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23, 205-211.
- Nowakiewicz, A., Ziółkowska, G., Trościańczyk, A., Zięba, P., and Gnat, S., 2017. Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. *Poultry Science*, 96(4), 986-996.
- Ogunremi, O.R., Sanni, A.I., and Agrawal, R.J.J.O.A.M., 2015. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal - based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808.
- Ousaaid, D., Laaroussi, H., Bakour, M., Ennaji, H., Lyoussi, B. and El Arabi, I., 2021. Antifungal and antibacterial activities of apple vinegar of different cultivars. *International Journal of Microbiology*, 2021.
- Özdemir, N. and Budak, N. H., 2022. Bioactive compounds and volatile aroma compounds in rose (*Rosa damascena* Mill.) vinegar during the aging period. *Food Bioscience*, 50, 102062.
- Öztürk P., 2016. Organik Ev Yapımı Meyve Sirkelerinde Organik-İnorganik Koruyucular (Benzoat ve Sorbat) ve Non-Termal Uygulamaların Sirke Kalitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Isparta, Türkiye.
- Pandey, K.R., Naik, S.R. and Vakil, B.V., 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 7577-7587.
- Patra, F. and Duany, R.K., 2022. Determination and Safety Aspects of Probiotic Cultures, Chapter 6. *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Technological Advancements Towards Safety and Industrial Applications*. Ed: Panesar, P. S. and Anal, A.K. Wiley, New Jersey, USA, 122-160.

- Pereira, R.P., Jadhav, R., Baghela, A. and Barretto, D.A., 2021. In vitro assessment of probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* DABRP5 isolated from Bollo batter, a traditional Goan fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 796-808.
- Perumpuli, P.A.B.N. and Dilrukshi, D.M.N., 2022. Vinegar: A functional ingredient for human health. *International Food Research Journal*, 29(5).
- Pichhardt, K., 2004. Gıda mikrobiyolojisi, Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar, 4. basımdan çeviri. Çevirenler: Y. Sekin, N. Karagözlü, Literatür Yayıncılık, İstanbul, Türkiye.
- Qiu, X., Zhang, Y. and Hong, H., 2021. Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. *AMB Express*, 11, 1-15.
- Rainieri, S. and Zambonelli, C., 2009. Organisms associated with acetic acid bacteria in vinegar production. In *Vinegars of the World*, 73-95, Springer, Milano.
- Raspor, P. and Goranovič, D., 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28:101-124.
- Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I. and Frebortova, J., 2015. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 33,1260–1271.
- Satıcı M., 2021. Çeşitli Hammaddelerden Üretilen Ev Yapımı Sirkelerin Fizikokimyasal ve Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi ile Bazı Gıda Kaynaklı Patojen Mikroorganizmaların Canlı Kalma Durumları Üzerine Etkilerinin Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyosüreç Mühendisliği Anabilim Dalı, Giresun, Türkiye.
- Saqib, A., 2017. Antimicrobial activity of apple cider vinegar. *Mapana Journal of sciences*, 16(2), 11-15.
- Sengun, I. Y., Kilic, G. and Ozturk, B., 2020. Screening physicochemical, microbiological and bioactive properties of fruit vinegars produced from various raw materials. *Food Science and Biotechnology*, 29, 401-408.
- Senses-Ergul, S. and Ozbas, Z.Y., 2016. Characterization of some indigenous *Saccharomyces cerevisiae* isolates obtained during vinification of ‘Kalecik Karasi’ and ‘Emir’ grapes grown in central anatolia. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 31(2), 51-62.
- Sert, S., 2002. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Notları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 138 (Üçüncü Baskı), Erzurum.
- Shaheen A.E., El-Baghdady K.Z. and Zakaria A.E., 2019. Isolation and identification of potent probiotics with high lead removal capability. *The Egyptian Journal of Botany*, 59(1), 95-105.
- Sharafi, S.M., Rasooli, I. and 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.
- Soares, R.O., Fedi, A.C., Reiter, K.C., Caierão, J. and d'Azevedo, P.A., 2014. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence*, 5(5), 634-637.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamagushi, C.T., Lindner, J.D., Pandey, A. and Thomaz-Soccol, V., 2010. The potential of probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4): 413-434.

- Sourabh, A., Kanwar, S.S. and Sharma, O.P., 2011. Screening of indigenous yeast isolates obtained from traditional fermented foods of Western Himalayas for probiotic attributes Journal of Yeast and Fungal Research, 2(8), 117-26.
- Sperber W.H., 2010. Introduction to the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Ed(s): Sperber W. And Doyle M. Springer, 367s, Georgia, USA, 1-41.
- Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Van Sinderen, D., 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. Current Opinion in Biotechnology, 16(2), 198-203.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S. and Coppola, R., 2005. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS microbiology letters, 244(1), 129-137.
- Şanlıbaba, P., 2023. Fermented nondairy functional foods based on probiotics. Italian Journal of Food Science, 35(1), 91-105.
- Şengün, İ.Y. ve Kılıç, G., 2019. Farklı sirke çeşitlerinin mikroflorası, biyoaktif bileşenleri ve sağlık üzerine etkileri. Akademik Gıda, 17(1), 89-101.
- Şengün, İ. Y. ve Kılıç, G., 2018. Dut sirkesinin mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal, antiradikal ve antimikrobiyal özellikleri. Akademik Gıda, 16(2), 168-175.
- Talebi, S., Makhdoumi, A., Bahreini, M., Matin, M.M. and Moradi, H. S., 2018. Three novel *Bacillus* strains from a traditional lacto-fermented pickle as potential probiotics. Journal of Applied Microbiology, 125 (3), 888-896.
- Taşdemir, A., 2017. Probiyotikler, prebiyotikler, sinbiyotikler. Sağlık Akademisi Kastamonu, 2(1), 71-88.
- Tomičić, R., Tomićić, Z. and Raspor, P., 2022. Influence of culture conditions on co-aggregation of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* with *Candida* spp. and their auto-aggregation. Folia Microbiologica, 67(3), 507-515.
- Trček, J., Jernejc, K. and Matsushita, K., 2007. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. Extremophiles, 11, 627-635.
- Trcek, J., Toyama, H., Czuba, J., Misiewicz, A. and Matsushita, K., 2006. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 70, 366-373.
- TS EN ISO 4833-1: Gıda zinciri mikrobiyolojisi-Mikroorganizmaların sayımı için yatay yöntem-Bölüm 1: Dökme plak tekniğiyle 30°C'ta koloni sayımı. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü, 2014.
- TS ISO 21527-1: Gıda ve hayvan yemlerinin mikrobiyolojisi-Maya ve küflerin sayımı için yatay yöntem-Bölüm 1: Su aktivitesi 0,95'ten fazla olan ürünlerde koloni sayım tekniği. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü, 2014.
- TS ISO 4832: Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Koliiformların sayımı için yatay yöntem-Koloni sayım tekniği. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü, 2010.
- Tunail, N., 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara.
- Urçar Gelen, S., 2017. Beyaz Peynirde Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye.

- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes D. and Goossens, H., 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4473-4479.
- Wang, B., Shao, Y. and Chen, F., 2015. Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 255-263.
- Wu, X., Yao, H., Liu, Q., Zheng, Z., Cao, L., Mu, D. and Li, X., 2018. Producing acetic acid of *Acetobacter pasteurianus* by fermentation characteristics and metabolic flux analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186, 217-232.
- Yang, H., Chen, T., Wang, M., Zhou, J., Liebl, W., Barja, F. and Chen, F., 2022. Molecular biology: Fantastic toolkits to improve knowledge and application of acetic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 107911.
- Yucel-Sengun İ., 2016. Acetic Acid Bacteria and Food fermentations, Chapter 4. Fermented Foods (Part I: Biochemistry and Biotechnology). Ed: Montet D. and Ray R.C., CRC Press, Boca Raton, USA.
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G. and Giraffa, G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033-1040.
- Zamora, F., 2009. Biochemistry of Alcoholic Fermentation, Chapter 1. Wine Chemistry and Biochemistry. Ed: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. Springer, New York, USA.
- Zawistowska-Rojek, A., Kośmider, A., Stępień, K. and Tyski, S., 2022. Adhesion and aggregation properties of *Lactobacillaceae* strains as protection ways against enteropathogenic bacteria. *Archives of Microbiology*, 204(5), 285.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Hafsa KADİROĞLU
Eğitim	
Lise:	Erzurum Mecidiye Anadolu Lisesi (2006)
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2010)
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2014)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2018)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Almanca:	Başlangıç seviyesi
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
-	