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

SİRKE MİKROFLORASINDAKİ ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE TANIMLANMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Tezi Hazırlayan
Ahmet Evren YETİMAN

Tezi Yöneten
Doç. Dr. Zülal KESMEN

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBY-10-3229 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ağustos 2012
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Ahmet Evren YETİMAN

“Sirke Mikroflorasındaki Asetik Asit Bakterilerinin, Moleküler Teknikler ile Tanımlanması” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	Danışman
Ahmet Evren YETİMAN	Doç. Dr. Zülal KESMEN

Gıda Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Mehmet HAYTA

Yrd. Doç. Dr. Zülal KESMEN danışmanlığında **Ahmet Evren YETİMAN** tarafından hazırlanan **"Sirke Mikroflorasındaki Asetik Asit Bakterilerinin Moleküler Teknikler ile Tanımlanması"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

19.06.2012

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Zülal KESMEN .....

Üye : Prof. Dr. Hasan YETİM .....

Üye : Doç. Dr. Hasan YALÇIN .....

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 04/09/2012 tarih ve 2012/40-20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

04/09/2012

Prof. Dr. Necmettin MARAŞLI

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin yürütülmesinde, sonuçlandırılmasında ve sonuçların değerlendirilmesinde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Zülal KESMEN'e;

İhtiyaç duyduğumda hertürlü maddi ve manevi destekleriyle katkıda bulunan Sayın Arş. Gör. Hakiye ETGÜ ve Sayın Arş. Gör. İsmet ÖZTÜRK'e;

Abdullah Gül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. İlker ERDEM'e çalışma süresince verdiği maddi ve manevi destekten dolayı;

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi, bu tez çalışması sırasında da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme;

Bu tezi FBY-10-3229 proje kodu ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunuyorum.

Ahmet Evren YETİMAN

Temmuz-2012

SİRKE MİKROFLORASINDAKİ ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE TANIMLANMASI

Ahmet Evren YETİMAN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2012

Danışman: Doç. Dr. Zülal KESMEN

ÖZET

Sirke, gıda endüstrisinde gün geçtikçe artan bir kullanım alanına sahip olan ve sağlık üzerine etkileri her geçen gün daha iyi anlaşılan bir fermente üründür. Sirkenin karakteristik özelliklerinin, üretiminde kullanılan hammaddeye, iklimsel koşullara ve mikrobiyal floraya bağlı olduğu bilinmektedir. Son yıllarda fermente ürünlere özgü nitelikler kazandıran mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla yoğun araştırmalar yapılmakta ve nükleik asit tabanlı mikrobiyal tanımlama teknikleri kullanılmaktadır.

Bu araştırmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden elde edilen sirke ve sirke analarına ait asetik asit bakteri profili, kültür bağımsız PCR-DGGE ve ve ITS bölgesi ve 16S rDNA sekans analizi ve fenotipik testler kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, sirke ve sirke analarından direkt DNA izole edilerek PCR-DGGE analizine tabi tutulmuş ve sonuçta *Gluconacetobacter hansenii, Lactobacillus ghanensis, Oenococcus oeni, Gluconacetobacter europaeus, Acetobacter nitrogenifigens/A. aceti, Lactobacillus nagelii, Lactobacillus mali/ Lactobacillus hordei, Acetobacter syzygii/ A. pasteurianus/ A. lovaniensis, Gluconacetobacter rhaeticus / Ga. oboediens, Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Gluconacetobacter xylinus, Gluconacetobacter xylinus/ Ga. sucrofermentans* olmak üzere 13 farklı bakteri tanımlanmıştır. Sonuç olarak sirke ve sirke analarının asetik asit bakteri profilini belirlemede, bahsedilen kültür bağımsız ve kültür bağımlı tekniklerin bir arada kullanıldığı zaman daha güvenilir sonuçlar elde edilmiş ve kültür bağımlı ve kültür bağımsız tekniklerin bir arada kullanılmasının gerekli olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sirke, Asetik Asit Bakterisi, PCR tabanlı moleküler teknikler, ITS Bölgesi

IDENTIFICATION OF ACETIC ACID BACTERIA IN VINEGAR MICROFLORA BY MOLECULAR TECHNIQUES

Ahmet Evren YETIMAN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M. Sc. Thesis, July 2012

Supervisor: Assoc. Prof. Zulal KESMEN

ABSTRACT

Vinegar is a fermented product of which consumption in food industry is increasing and of which beneficial effects on health are more well-understood day by day. It is well-known that the characteristics of vinegar are dependent on raw material used, climatic conditions and microbial flora. In recent years, intense research work has been performed on the identification of microorganisms which introduce specific characteristics to the fermented products and nucleic acid based microbial identification techniques have been used.

In this research, acetic acid bacterial profile of vinegars and mother of vinegars collected from different regions of Turkey is investigated by using culture independent PCR-DGGE, ITS region and 16S rDNA sequence analysis. In the first part of the research, DNA was directly isolated from the vinegars and the mothers of the vinegars, PCR-DGGE analysis were performed and as a result 13 different bacteria were identified as *Gluconacetobacter hansenii*, *Lactobacillus ghanensis*, *Oenococcus oeni*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Acetobacter nitrogenifigens/A. aceti*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus mali*/ *Lactobacillus hordei*, *Acetobacter syzygii/ A. pasteurianus/ A. lovaniensis*, *Gluconacetobacter rhaeticus / Ga. oboediens*, *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus/ Ga. Sucrofermentans.* Consequently, in determination of acetic acid bacterial profile of vinegar and mother of vinegar more reliable results were obtained when mentioned culture dependent and independent techniques were used together and it was understood that the culture dependent and independent methods should be used together.

Keywords: Vinegar, Acetic acid bacteria, PCR based molecular techniques, ITS region

İÇİNDEKİLER

SİRKE MİKROFLORASINDAKİ ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE TANIMLANMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMA VE SİMGELER xii
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xv

GİRİŞ 1

1. BÖLÜM
GENEL BİLGİLER

1.1.Sirke Üretiminde Kullanılan Hammadeler ve Coğrafi Dağılımları 7
1.2. Sirke üretim Yöntemleri 11
1.3.Sirke oluşumundan sorumlu mikroorganizmalar 12
1.4.Asetik Asit Bakterileri (AAB) 13
1.4.1. Genel Özellikleri 13
1.4.2. Asetik Asit Bakterilerinin Metabolizmaları 14
1.4.2.1 Karbonhidrat Metabolizması 14
1.4.2.2 Etanol ve diğer alkollerin metabolizması 16
1.4.2.3.Organik asitlerin metabolizması 17
1.4.2.4. Azot metabolizması 17
1.5.Asetik Asit Bakterilerinin sistematiği 18
1.6.Asetik Asit Bakterilerinin kültivasyonu 22
1.7.Asetik Asit Bakterilerinin tanımlanması 22

1.8.Asetik Asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan moleküler teknikler…….…….....26

1.9.Asetik Asit Bakterilerinin Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Teknikler ..……...28

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Materyal 31

2.1.1. Deney Tasarımı..... 31

2.1.2. Sirke Numunelerinin Temini..... 31

2.2.Yöntem 31

2.2.1. pH Tayini 31

2.2.2. Sirke ve sirke anası örneklerinde PCR-DGGE yöntemi ile bakteriyel floranın analizi..... 32

2.2.2.1. Sirke ve sirke anası örneklerinden DNA İzolasyonu 32

2.2.3. PCR-DGGE Analizi 34

2.2.3.1. 16S rRNA V7-V8 Bölgelerinin PCR ile Amplifikasyonu..... 34

2.2.3.2. DGGE analizi..... 35

2.2.3.3. DGGE bantlarının jelden alınması, amplifikasyonu, saflaştırılması ..... ve analizi.. 37

3.BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Sirke örnekleri ve Sirke Analarının pH değerleri..... 38

3.2. Kültür Bağımsız Teknik ile yapılan sirkenin bakteriyel florasının analiz sonuçları 38

4.BÖLÜM
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Sirke ve Sirke anası örneklerinden PCR-DGGE Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi 41

4.2. Tez çalışmasında elde edilen bulgular doğrultusunda yapılan öneriler..... 42

KAYNAKLAR..... 46

KISALTMA VE SİMGELER

PCR **:** Polimeraz zincir reaksiyonu

DGGE **:** Denatüre gradient jel elektroforezi

ARDRA **:** Çoğaltılmış Ribozoman DNA restriksiyon analizi

Rep-PCR **:** Tekrar eden palindromik element-polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP **:** Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi

rDNA **:** Ribozomal deoksiribonükleik asit

rRNA **:** Ribozomal ribonükleik asit

Tm **:** Erime Sıcaklığı

AAB **:** Asetik Asit Bakterileri

LAB **:** Laktik Asit Bakterileri

$CaCO_3$ **:** Kalsiyum Karbonat

H_2O_2 **:** Hidrojen Peroksit

dH_2O **:** Deiyonize su

CO_2 **:** Karbondioksit

ITS **:** 16S rDNA geni ile 23S rDNA geni arasındaki boş bölge

ERIC **:** Çoklu tekrar eden enterobakteriyel genarası bölgeler

RAPD **:** Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

(+) **:** Pozitif

(-) **:** Negatif

mM **:** Mikromolar

µl **:** Mikrolitre

bç **:** Baz Çifti

A **:** Adenin

T **:** Timin

G **:** Guanin

C **:** Sitozin

G **:** Gram

V **:** Volt

vb. **:** ve benzeri

pH **:** Sudaki hirojen iyionlarının eksi logaritması

L **:** Litre

m/L **:** Mol / Litre

FASTA : Nükleik asit dizilerinin görüntülendiği yazı formatı

BLAST **:** Basic Local Alingment Search Tool

GİRİŞ

Sirke, mayalar tarafından fermente olabilir şekerlerin etanola fermantasyonunu takiben, etanolun *Acetobacter, Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter* gibi asetik asit bakterileri tarafından aerobik koşullarda asetik aside oksidasyonu sonucu üretilen üründür[1]. Sirke üretimi sırasında gerçekleşen başlıca reaksiyonlar aşağıda verilmiştir:

$$C_6H_{12}O_{6\ (Glukoz)} \longrightarrow 2C_2H_5OH_{\ (Etil\ Alkol)} + 2CO_2$$

$$C_2H_5OH_{\ (Etil\ Alkol)} + O_2 \longrightarrow CH_3COOH_{\ (Asetik\ asit)} + H_2O$$

Asetik asit bakterileri tarafından etil alkolden asetik asit üretimi, aerobik (oksidatif) bir olaydır. Bu nedenle sirke üretimi mikrobiyolojik açıdan bir fermantasyon olmamasına karşın, endüstride sirke fermantasyonu olarak adlandırılmaktadır. Endüstriyel olarak, *Acetobacter* sirke üretiminde *Gluconobacter*'e kıyasla çok daha yaygın olarak kullanılan ve birincil derecede önem taşıyan bir mikroorganizmadır[2]. Saf asetik asitten üretilen sirkelerde ise fermentasyon söz konusu değildir.

Sirkenin tanımı, bulunduğu ülke ve o ülkenin mevzuatlarına göre değişiklik göstermektedir. TSE 1880 EN 13188 Sirke Standardına göre sirke; "Tarım kökenli sıvılar veya diğer maddelerden, iki aşamalı alkol ve asetik asit fermantasyonuyla, biyolojik yolla üretilen kendine özgü ürün" olarak tanımlanmaktadır. Bu standartta sirke çeşitleri, üretiminde kullanılan hammaddelere göre; şarap sirkesi, meyve sirkesi, meyve şarabı sirkesi, elma şarabı sirkesi, alkol sirkesi, tahıl sirkesi, malt sirkesi, aromalı sirke ve diğer sirkeler olarak verilmiştir. Bunlardan şarap (üzüm) sirkesi "biyolojik yolla asetik asit fermantasyonu ile sadece şaraptan (sadece taze üzümden elde edilen

şarap) elde edilen sirke" şeklinde tanımlanmıştır[3]. Codex Alimentarius'da ise sirke; "iki aşamalı fermantasyon prosesi, yani etil alkol ve asetik asit fermantasyonu ile, nişasta ve/veya şeker içeren tarımsal kökenli hammaddelerden üretilen, insan tüketimi için uygun olan bir sıvı" şeklinde tanımlanmaktadır[4].

Sirkenin evlerde genellikle yemek ve salatalarda tatlandırıcı ve salamuralarda koruyucu olarak kullanımının yanında gıda endüstrisinde yaygın bir kullanım alanı vardır. Sirke başta turşu, ketçap, mayonez, salça, salamuralar, konserve ve soslar olmak üzere birçok gıdanın üretiminde asitlendirici, tat geliştirici ve koruyucu olarak kullanılmaktadır. Gıda sanayinde bir ingredient olarak kullanımının dışında sirkeden ilaç üretiminde de yararlanılmaktadır[5, 6].

Sirkenin kimyasal bileşiminde organik asitler, fenolik bileşenler, alkoller, aminoasitler, tat ve uçucu bileşenler bulunmaktadır[7]. Sirkenin sahip olduğu asitlik, aroma, renk vb fizikokimyasal özelliklerin ve sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin mikroflora kompozisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak bu floranın sabit olmayıp kullanılan hammaddeye, üretim yöntemine ve üretimin yapıldığı bölgenin iklim koşullarına bağlı olarak az ya da çok değişebildiği de bilinmektedir. Bu nedenle sirke mikroflorasının detaylı olarak ortaya konmasının sirke ilgili araştırmalarda kritik önem arz ettiği bir gerçektir[8].

Sirke mikroflorasının kompleks yapısını belirlemek amacıyla bugüne kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Bu amaçla selektif besiyerilerinin kullanımı, morfolojik ve biyokimyasal karakteristiklerin belirlenmesine dayanan pek çok fenotipik tanılama yöntemleri kullanılmıştır [9]. Ancak, fenotipik metotların uzun zaman alması, güven aralıklarının sınırlı ve tekrarlanabilirliklerinin zayıf olması gibi dezavantajlarından dolayı, günümüzde bu gibi çalışmalarda genotipik tekniklerin kullanımı kaçınılmaz olmuştur. Özellikle 1990'lardan sonra DNA'ya dayalı pekçok tanımlama metodu geliştirilmiştir [9, 10]. Bu metotlardan polimeraz zincir reaksiyonuna (polymerase chain reaction, PCR) dayanan yöntemler mikroorganizmaları karakterize etmek ve tiplendirmek için hızlı, güvenilir ve basit yöntemler olarak öne çıkmıştır. PCR temelli tiplendirme metotları mikrobiyal genom yapısının tamamını veya bir kısmını tarama yeteneğine sahiptir [11]. Bu yöntemle çoğaltılan herhangi bir DNA molekülünün hedef fragmentleri, daha sonraki analiz basamaklarında kullanılmaktadır. Yüksek oranda korunmuş bölgelerin çoğaltılması ile

akrabalık ilişkileri tanımlanabilir. Değişken DNA segmentlerinin çoğaltılması ise, yakın ilişkili türler arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılmaktadır [12].

Birçok bakteri türünün çoğaldıkları doğal ortamlarıyla ilgili ayrıntılı bilgi mevcut değildir. Bu nedenle bazı mikroorganizmaların doğal ortamlarına benzer şartların oluşturulması zordur. Son yıllarda bu tür olumsuz etkilerin ortadan kaldırılması amacıyla kültürel olmayan tanılama teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerden en yaygın kullanılanı Denatüre Gradient Jel Elektroforez (DGGE) tekniğidir. PCR tekniğinin DGGE ile kombinasyonu aynı boyuttaki fakat farklı dizilimdeki DNA parçaları arasındaki farklılıkların bulunmasına imkan sağlamaktadır. Bu teknik temelde çok yönlüdür ve pek çok alanda mikrobiyal toplulukların dinamikleri ve ekolojilerinin tanımlanması ve gruplandırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır[9, 12, 13, 14].

Son yıllarda spontan fermantasyon yöntemi kullanılarak, geleneksel olarak üretilen sirkelerin mikrobiyal florasının tanımlaması amacıyla dünyanın pek çok ülkesinde yoğun çalışmalar ve ulusal ve uluslar arası projeler (WINEGAR-(COOP-CT-2005/017269)-Avrupa Birliği, Program 863: (2006AA10Z1A3)-Çin, AGL2001-0467-İspanya vb.) yapılmaktadır. Bu çalışmalarda biyolojik çeşitliliğin tespit edilerek korunması, mikrobiyal açıdan üretimin standardize edilmesi ve tespit edilen mikroorganizmaların, starter kültür olma potansiyelinin ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ancak, ülkemizde geleneksel yöntemlerle üretilen sirkelerin sahip olduğu mikrobiyal kompozisyonunun tanımlanmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Oysa sirke, ülkemizde meyve ve bağcılık potansiyelinin karlı bir şekilde değerlendirildiği alternatif bir üründür. Diğer taraftan geleneksel yöntemle sirke üretimi tüketicilerin, son yıllarda giderek artan, doğal ve geleneksel ürünlere olan talebini karşılayabilecek potansiyel bir ürün durumundadır. İşte bu nedenle, ülkemizde geleneksel yöntemle üretilen sirkelerde spontan olarak gelişen ve sirkeye karakteristik nitelikler kazandıran asetik asit bakterilerinin hassas ve güvenilir yöntemlerle tanımlanması, bunların sirke kalitesi üzerine etkilerinin ve starter kültür olarak kullanılabilme potansiyelinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada Türkiye'nin değişik yerlerinden toplanan, spontan fermantasyon ve geleneksel yöntemler kullanılarak üretilmiş sirkeler ve sirke analarının asetik asit bakteri (AAB) profili, kültürel olmayan PCR-DGGE analizi ile kültürel rep-PCR, Tm analizi, (16S-23S) ITS bölgesi

sekans analizi ve fenotipik test teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Böylece fenotipik metotların yetersizliğini elimine eden genotipik metotlar kullanılarak sirkenin, karmaşık mikroflorasında bulunan AAB'ni daha detaylı olarak açığa çıkarmak ve farklı kaynaklardan temin edilen sirke ve sirke analarının bakteriyel floralarını karşılaştırmak amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

Sirke üretiminin tarihi, M.Ö. 3000 yıllarına dayanmaktadır. Başlangıçta, alkollü içkilerin kendi kendilerine (spontan) asetik asit fermantasyonuna uğramaları, yani sirkeleşmeleri istenmeyen bir durum olarak görülmekteydi. Çünkü şarap ve bira gibi içkiler açık bir kapta kendi haline bırakıldığında sıvının yüzeyinde asetik asit bakterileri ve sirke mikroflorasındaki diğer mikroorganizmaların (mayalar) oluşturduğu bir zarın (biyofilm) meydana gelmesiyle şarap veya biranın bozulduğu, yani sirkeleştiği, görülmüştür. Ancak insanlar, ilerleyen zamanlarda bu olaydan yararlanmasını bilmişler ve sirkeye de kullanmaya başlayınca bu işlemi inceleyerek öğrenmişlerdir [1].

Alkollü içkilerden ilk önce bal şarabı sonra hurma şarabı ve daha sonra bira ile üzümden şarap yapıldığı göz önüne alınırsa, sirkelerden de önce bal sirkesi sonra hurma ve bira sirkesi ve ondan sonra da şarap sirkesinin yapıldığı kabul edilir. Kazılarda elde edilen eski eser ve bulgulardan Sümerlerin, Asurluların, Etililerin, Perslerin, Eski Mısırlıların ve eski Yunanlıların sirke yaptıkları anlaşılmaktadır[3].

Sirke üretimi çok eski yıllara dayanmasına rağmen, sirke yapımındaki teknolojik olaylar daha sonra aydınlanabilmiştir. Becher (1653-1682) ilk olarak sirke yapımında havanın gerekli olduğu görüşünü ileri sürmüştür. Daha sonraki yıllarda Boerhave (1668-1738) sirke üretiminde sirke çiçeği adını verdiği bitkisel maddelerin gerekli olduğunu ileri sürmüştür. 1812 yılında Peerson ise, alkollü sıvıların yüzeyinde meydana gelen selülozik özellikteki zarın sirkeleşme olayını gerçekleştirdiğini

öne sürmüş ve bu zardaki canlılara "Mycoderma" ismini vermiştir. Kutzing 1837'de sirke zarını mikroskopta inceleyerek asetik asidi tek hücreli bir organizmanın yaptığını bulmuş ve buna *"Ulvino asidi"* adını vermiştir. Pasteur ise 1868 yılında "Etud sur le vinaigre" adlı eserlerinde şarap sirkesi zarında bulduğu asetik asit bakterilerinin kısa çubuk şeklinde bakteriler olduğunu saptamış ve bu bakterilere *"Mycoderma aceti"* adını vermiştir. Sirkeleştirmek istediği şarabı bir süre ısıttıktan sonra, ortamda alkol, asetik asit, organik maddeler, hava ve optimum sıcaklık bulunmasına karşın sirke bakterisi katılmadan sirkeleşme olmayacağını kanıtlamıştır. Daha sonra Buchner, sirke bakterilerindeki dehidrogenaz enziminin sirkeleşmeyi yaptığını kanıtlamıştır. Bundan sonra 1878 yılında Hansen, *Mycoderma acetinin, Acetobacter aceti ve Acetobacter pasteurianum* olmak üzere iki türden oluştuğunu belirlemiştir. Böylece asetik asit fermantasyonu daha iyi anlaşılmıştır [1].

Sirkenin bir gıda olmadığı, hatta fermantasyon sırasında besleyici içeriğe sahip bileşenler fermente olduğu için önceden sirkenin besinsel değerinin olmadığı düşünülmekteydi. Ancak günümüzde sirke sofralarda tat ve lezzet verici olarak kullanılmasının yanında endüstride, et ürünlerinin marinasyonunda, çeşitli meyve ve sebze ürünlerinde, salamura veya turşu yapımında ve su ürünlerinin tüketime hazırlanmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu uygulamalara ek olarak sirkenin sos, mayonez, ketçap, hardal gibi endüstriyel ürünlerin üretiminde ve çeşnilendirici ve koruyucu olarak, hatta bazı ülkelerde şifalı bir içecek olarak kullanıldığını söyleyebiliriz [15].

Sirke, mayaların ve asetik asit bakterilerinin gerçekleştirdiği iki aşamalı fermantasyonda fermente olabilecek hemen hemen her karbonhidrat kaynağından üretilebilmektedir. Sirke yapımında en çok kullanılan hammaddeler; elma, armut, üzüm, bal, şuruplar, tahıllar, hidroliz olmuş nişastalar, bira ve şaraptır [3, 16].

Sirke, endüstriyel olarak, düşük kaliteli meyveler, sezonluk tarımsal üretim fazlalıkları, meyve artıkları gibi, düşük maliyetli ham maddelerden üretildiğinden dolayı pahalı olmayan bir üründür. Diğer taraftan, kaliteli hammadde kullanılarak, geleneksel fermantasyon teknikleri ile üretilmiş sirkeler de vardır. Bunlara, balzamik sirke (Modena, İtalya) ve şeri sirkesi (İspanya) örnek olarak verilebilir [17]. Doğal sirkeler fermantasyon yoluyla elde edilir ve bu sirkeler ile yapay sirkeler birbirlerinden bileşimlerinin analiz edilmesi yoluyla ayırt edilebilir [18]. Ayrıca, her ne kadar distile edilmiş çözeltiler, fermantasyon prosesi içermediği için sirke olarak kabul edilmese de, endüstriyel etanol veya fermente olmuş arpa püresinin direkt distilasyonundan elde alkolün oksidasyonu sonucu, alkol sirkesi denilen asetik asit içeren bir sıvı elde edilmektedir [17].

1.1. Sirke Üretiminde Kullanılan Hammadeler ve Coğrafi Dağılımları

Dünyanın pek çok bölgesinde geleneksel yöntemle sirke üretiminde bitkisel kaynaklı, alkole fermente olabilen şekerce zengin hammaddeler kullanılmaktadır. Ancak bazı sirkeler için istisnai durumlar söz konusu olmaktadır. Bunlara örnek olarak peynir altı suyu sirkesi ve bal sirkesi verilebilir. Peynir altı suyu, peynir üretimi sırasında meydana gelen laktoz ve/veya galaktoz, glukoz ve hidrolize şekerlerce zengin bir yan üründür. Bununla birlikte, ekşi peynir altı suyu yüksek miktarda laktik asit bakterisi (LAB) ile kontamine olmuştur, bu nedenle alkol ve asetik asit fermantasyonundan önce pastörize edilmesi gerekmektedir. Bal ise, şekerlerce çok zengin olan bir hammaddedir. En çok sükroz, glukoz ve fruktoz bulunmaktadır. Bu şekerlerin bal içerisindeki oranı, arılar tarafından toplanan nektarın, botanik kökenine göre değişiklik göstermektedir. Bal her zaman alkol fermantasyonu meydana gelmeden önce seyreltilir, baldan meydana gelen şarapta %17'ye varan oranlarda alkol bulunabilir [17]. Bu baldan üretilen alkollü içki dünya çapında, "ambrosia" "hydromel" "aguamiel" "metheglin" gibi değişik isimlerle anılır ve sirke üretiminde de kullanılır. Bunların dışında sirke üretiminde bir çok değişik bitkisel kaynaklı hammaddeler de kullanılmaktadır (Tablo 1.1.).

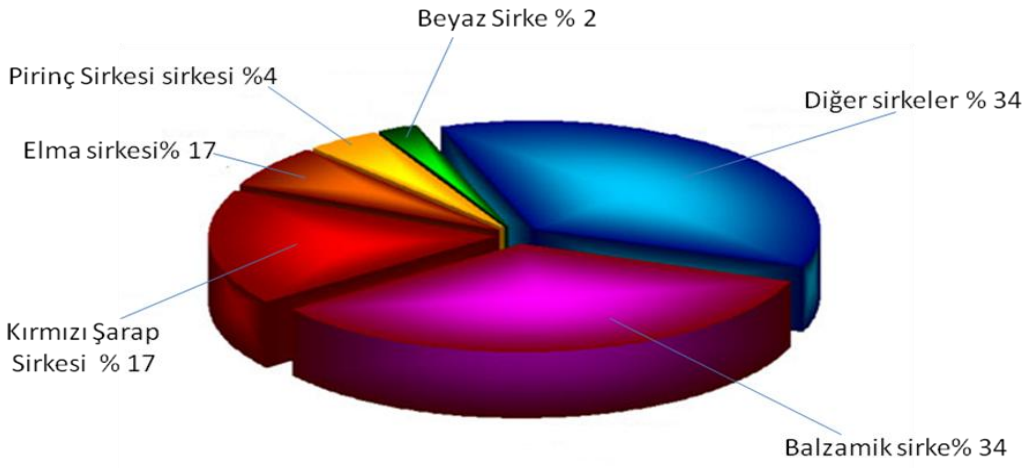
Tablo 1.1. Sirke üretiminde kullanılan hammaddeler ve coğrafi dağılımları [20].

Kategori	**Hammadde**	**Sirke İsmi**	**Coğrafi Dağılımı**
Sebze Kaynaklı	Pirinç	Komesu, kurosu (Japonca), Heicu (Çince)	Güney ve Güneydoğu Asya
	Bambu özsuyu	Bambu Sirkesi	Japonya, Kore
	Malt	Malt Sirkesi	Kuzey Avrupa, Amerika
	Palm özsuyu	Palm sirkesi	Güney Doğu Asya, Afrika
	Arpa	Bira sirkesi	Almanya, Avusturya, Hollanda
	Darı	Kara sirke	Çin, Doğu Asya
	Buğday	Kara sirke	Çin, Doğu Asya
	Sorgum	Kara sirke	Çin, Doğu Asya
	Çay ve Şeker	Kombucha sirkesi	Rusya, Doğu Asya
	Soğan	Soğan sirkesi	Doğu ve Güneydoğu Asya
	Domates	Domates sirkesi	Japonya, Doğu Asya

Tablo 1.1. in devamı

Kategori	Hammadde	Sirke İsmi	Coğrafi Dağılımı
Meyve Kaynaklı	Şeker Kamışı	Şeker Kamışı Sukang iloko Kibizu	Amerika Filipinler Japonya
Meyve kaynaklı	Elma	Elma sirkesi	Amerika, Kanada
	Üzüm	Üzüm Sirkesi, Şeri Sirkesi, Balzamik Sirke	Türkiye, Ortadoğu, İspanya, İtalya
	Hindistan cevizi	Hindistan cevizi suyu sirkesi	Filipinler, Sri Lanka
	Hurma	Hurma sirkesi	Ortadoğu
	Mango	Mango sirkesi	Güney ve Güneydoğu Asya
	Hünnap	Hünnap sirkesi	Çin
	Ahududu	Ahududu sirkesi	Doğu ve Güneydoğu Asya
	Siyah kuş üzümü	Siyah kuş üzümü sirkesi	Doğu ve Güneydoğu Asya
	Böğürtlen	Böğürtlen sirkesi	Doğu ve Güneydoğu Asya
	Dut	Dut sirkesi	Doğu ve Güneydoğu Asya
	Erik	Ume-su (Japonca)	Japonya
	Yaban mersini	Yabanmersini sirkesi	Doğu ve Güneydoğu Asya
	Cennet hurması	Persimon sirkesi Kakisu (Japonca)	Güney Kore Japonya
Hayvansal Kaynaklı	Peynir altı suyu	Peynir altı suyu sirkesi	Avrupa
	Bal	Bal Sirkesi	Avrupa, Amerika, Afrika

Ekonomik yönden değerlendirildiğinde, sirke üretiminin dünyadaki tüm endüstrileşmiş ülkelerde önemli bir paya sahip olduğu söylenebilir [21]. Daha çok Fransa, İtalya ve İspanya'nın ana tedarikçi konumunda olduğu Avrupa pazarında, sadece 2002 yılında 234.3 milyon avro değerinde (500 milyon litre) sirke üretilmiştir. İstatistiklere göre, 2005 yılında dünyada; %34 balzamik sirke, %17 kırmızı şarap (üzüm) sirkesi, %7 elma sirkesi, %4 pirinç sirkesi, %2 beyaz şarap sirkesi ve %36 diğer sirkelerden üretilmiştir (Şekil 1.1.). Amerika'da bulunan Sirke Enstitüsü'nün 2006 yılı raporlarına göre, Amerika sirke pazarında beyaz şarap sirkesi %68, elma sirkesi %20 özel sirkelerin (pahalı hammaddeler kullanılarak yapılan) ise % 12 oranında bir paya sahip olduğu bildirilmiştir [21] (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. 2005 yılı, dünyada üretilen sirkelerin yüzde dağılımı [20].

İnsanların ve hayvanların tüketimi için güvenli aynı zamanda fermente olabilir şekerler açısından direkt ya da dolaylı yoldan kaynak olabilecek bir çok botanik tür sirke üretiminde kullanılabilir. Dünya genelinde sirke üretiminde kullanılan botanik türler sınıflandırılırken, bu türlerin yenilebilir kısımlarının kimyasal kompozisyonu göz önünde bulundurulur (Tablo 1.2.).

Tablo 1.2. Dünya genelinde sirke üretiminde hammadde olarak kullanılan botanik türler ve özellikleri [22].

Genel İsmi	**Sistematik İsmi**	**Yenilebilir Kısmı**	**Temel Karbon kaynakları**
Elma	*Malus domestica*	Meyve	Fruktoz, sükroz, glukoz
Kayısı	*Prunus armeniaca*	Meyve	Sükroz, glukoz, fruktoz
Bambu	*Poaceace* familyasından, *Bambusoideaea* alt familyası üyeleri	Bambu öz suyu	Sükroz
Muz	*Musa* genus'una ait türler	Meyve	Sükroz, glukoz, fruktoz

Tablo 1.2. devamı

Genel İsmi	**Sistematik İsmi**	**Yenilebilir Kısmı**	**Temel Karbon kaynakları**
Arpa	*Hordeum vulgare*	Tohum	Nişasta
Karambola[a]	*Averrhoa carambola*	Meyve	Fruktoz, glukoz
Kaju	*Anacardium occidentale*	Meyve	Sükroz, invert şekerler
Kakao	*Theobroma cacao*	Tanelerden elde edilen müsilajlar	Glukoz
Hindistan cevizi	*Cocos nucifera*	Hindistan cevizi suyu	Glukoz, Fruktoz
Hurma	*Phoenix dactylifera*	Meyve	Sükroz
İncir	*Ficus carica*	Meyve	Glukoz, fruktoz
Üzüm	*Vitis vinifera*	Meyve	Glukoz, fruktoz
Palmiye ağacı	*Elaeis guineensis*	Öz suyu (ksilem)	Sükroz
Soğan	*Allium cepa*	Soğan	Frukroz, glukoz, sükroz
Darı	*Panicum miliaceum*	Tohum	Nişasta
Armut	*Pyrus communis*	Meyve	Fruktoz, sükroz, glukoz
Ananas	*Ananas camosus*	Meyve	Sükroz, glukoz, fruktoz
Erik	*Prunus domestica*	Meyve	Sükroz, fruktoz, glukoz
Patates	*Solanum tuberosum*	Yumru	Nişasta
Rafya palimiyesi	*Raphia hookeri, Raphia vinifera*	Özsuyu (ksilem)	Sükroz
Kuşüzümü	*Ribes spp.*	Meyve	Fruktoz, glukoz
Pirinç	*Oryza sativa, Oryza glaberrima*	Tohum	Nişasta
Sorgum	*Sorghum bicolor* ve diğer sorgum türleri	Tohum	Nişasta
Şeker pancarı	*Beta vulgaris*	kök	Sükroz
Şeker kamışı	*Saccharum* genusuna ait türler	Sap	Sükroz
Buğday	*Triticum aestivum* ve diğer buğday türleri	Tohum	Nişasta

[a] Brezilya'da yetişen bir meyve

Sirke üretiminde kullanılan botanik türler aşağıdaki gibi sınıflandırılır [22].

- Asidik ve kolay fermente olabilenler: pH'sı 3.5'dan düşük ve glukoz, sükroz, fruktoz ana bileşenleridir (üzüm, elma, erik, böğürtlen vb.).
- Orta asitlikte ve kolay fermente olabilenler: pH'sı 3.5-4.5 arasında olanlardır (incir, hurma vb.).
- Düşük asitlikte ve kolay fermente olabilenler: pH'sı 4.5'in üzerinde olanlardır (palm özsuyu vb.)
- Fermente olamayanlar: fermantasyondan önce hidroliz edilmiş, parçalanmış olmaları gerekmektedir (tohumlar vb.)

Sirke yapımında kullanılan hammaddelerin sahip kimyasal kompozisyonu, mikroorganizmalar üzerinde seçici bir etki meydana getirir, asetik asit fermantasyonu ile ilgili hakim mikrofloranın belirlenmesinde çok büyük bir etkiye sahiptir. Sirke üretimindeki en kritik basamaklar hammaddenin hazırlanması ve fermantasyona tabi tutulmasıdır. Hammaddenin hazırlanması sırasında, fermantasyon için gerekli olan, fermente olabilen şekerleri ve proteinleri içeren meyve suyu elde etmek için doğrama, ezme gibi teknolojik işlemler uygulanır. Eğer sirke üretimi için tahıllar hammadde olarak kullanılacak ise parçalama işleminden sonra, mikroorganizmaların kullanabileceği substrat oluşturmak için, nişastanın enzimatik hidrolizi gerçekleştirilir. Bunlardan başka, ülkemizde çok fazla rastlanmasa da, bazı durumlarda madde pişirilebilir veya buhara maruz bırakılabilir. Genel olarak, sirke üretimi için hammadde hazırlanırken meyveler, tahıllara göre daha az teknolojik işlemden geçerler. Diğer bir taraftan tahıllar kolayca uzun süre muhafaza edilebilirler ve hasattan sonra istenildiği zaman kullanılabilirler. Meyveler ise çok çabuk bozulabildiklerinden özellikle yüksek miktarda su içeren meyveler, eğer sirke üretimi için kullanılacaksa, hasattan hemen sonra üretime alınmalıdır. Ülkemizde ise, endüstriyel sirke üretiminde, hammadde olarak genellikle üzüm veya elma kullanılmakta tahıllar veya hayvansal maddelerin hammadde olarak kullanıldığı sirkelere rastlanmamaktadır [1].

1.2. Sirke Üretim Yöntemleri

Sirke üretim yöntemleri yavaş yöntem, hızlı yöntem ve derin kültür yöntemi (submers yöntemi) olmak üzere üç ana grup altında incelenebilir [1].

Bir diğer ismi de yüzey kültür yöntemi olan yavaş yöntem ile alkollü bir sıvı, bir fıçı içinde uzun süre tutulmak suretiyle sirkeleştirilir. Fıçıya, yaklaşık olarak ¼ oranında pastörize edilmemiş, yüksek asitlikte sirke karıştırılmış olan şarap veya ¼ oranında sirke karıştırılmış, sirkesi yapılacak olan hammaddenin (elma, üzüm vb.)sulu süspansiyonu eklenir, ardından 28-30ºC sıcaklıkta, sirkeleşmeye bırakılır. Bir süre sonra sıvının üzerinde selülozik yapıda bir zar (sirke anası) meydana gelir. Sirkeleşme tamamlandığında, sirke anası kendiliğinden sıvının dibine batmaktadır. Ancak, sirkeleşmenin tamamlandığını tam olarak anlamak için sıvı içeriğindeki alkol ve asit miktarları saptanmaktatır. Sirkeleşmenin sonunda üst oksidasyonu, yani asetik asidin parçalanmasını engellemek ve sirkeye has aromatik bileşiklerin meydana gelebilmesi için % 0.5-1 oranında alkolün sirkede kalması sağlanır. Bu yöntemde, üretim 6-8 hafta içerisinde tamamlanmaktadır [1, 23,24, 25, 26].

Sirke üretim yöntemlerinden olan hızlı yöntem (Frings yöntemi) ise, endüstriyel tesislerde çok yaygın bir şekilde kullanılan bir yöntemdir [1]. Sirkeleştirilecek şarap veya alkollü sıvı, geniş bir yüzey üzerinde yayılarak, yavaşça akarken bu geniş yüzeye yerleştirilmiş olan asetik asit bakterileri tarafından sirkeleştirme işlemi gerçekleştirilir. Gerekli olan hava, sirke üretimi için kullanılan ortamın (jeneratör) kenarlarında açılan hava kanallarından sağlanır. Hızlı yöntem ile sirke üretimi 3 ile 7 gün arasında değişiklik gösterir [1,23, 26, 27].

Derin kültür yöntemi ile sirke üretiminde ise dolgu maddesi olmadan, sirkeleştirilecek olan sıvının içerisinde çoğalan asetik asit bakterileri ile gerçekleştirilir. Asetik asit bakterileri ile aşılanmış şarap veya sirkeleşecek sıvıya, çok ince kabarcıklar halinde hava verilirek, bu bakterilerin gelişmesi sağlanır.. Bu yöntem ile, alkol diğer endüstriyel yöntemlere göre, 30 kat daha hızlı bir şeklide sirkeye dönüştürülür. Günümüzde sirke üretiminde genellikle derin kültür yöntemi kullanılır [1, 23, 26, 27].

1.3.Sirke Oluşumundan Sorumlu Mikroorganizmalar

Daha önceden de bahsedildiği gibi, sirke oluşumunda görevli mikroorganizmalar mayalar ve asetik asit bakterileridir. Mayalar öncelikle alkolik fermantasyonu gerçekleştirirken, asetik asit bakterileri de alkolik fermantasyonu takiben etil alkolün asetik asite oksidasyonunu gerçekleştirirler. Değişik substratların kullanıldığı, bazı özel sirkelerde ise asetik asit bakterileri ile birlikte, laktik asit bakterilerinin de fermantasyonda aktif rol aldığı bilinmektedir [22].

1.4.1.Asetik Asit Bakterileri (AAB)

Asetik asit bakterileri tabiatta, şeker içeren organik maddelerin özellikle meyvelerin üzerinde ve havada bulunurlar. Bu bakterilerin faaliyetleri genellikle, mayaların faaliyetleri ile birlikte gerçekleşmektedir [22].

1.4.1.1.Genel Özellikleri

Asetik asit bakterileri Gram negatif veya değişken Gram yapısında hücre duvarı olan, mikroskopta bakıldığında, tek, çift, küme veya zincir halinde görülen, elipsoid veya silindirik hücre yapısına sahip bakterilerdir. Hücre genişlikleri 0.4 µm ile 1 µm arasında değişiklik gösterirken, hücre uzunlukları ise 0.8 µm ile 4.5 µm arasında değişiklik göstermektedir [3]. Mikroskop ile bakıldığında belirgin bir şekilde hareketli oldukları görülür, ayrıca polar veya peritrik flagellaya sahiptirler. Olumsuz ortam koşullarına karşı dayanıklılık için endospor oluşumu göstermezler. Aerobik solunum yaparlar ve metabolizmalarında son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanırlar. Bununla birlikte düşük konsantrasyonda oksijen ya da anaerobik koşullar gibi, olumsuz ortam koşullarında, metabolik reaksiyonlarını yavaş da olsa gerçekleştirebilmek için alternatif elektron alıcıları kullanabilirler. Asetik asit bakterileri katalaz pozitif ve oksidaz negatiftirler. Gelişimleri için gerekli olan optimum sıcaklık 25ºC ile 30ºC arasında değişiklik gösterirken, optimum pH değeri 5 ile 6 arasında değişiklik gösterir. Diğer taraftan 4'ün altındaki pH değerlerinde de rahatlıkla gelişebilmektedirler [3, 28]. Asetik asit bakterilerinin bazı türleri besiyeri ortamında pigment ve değişik türlerde polisakkaritler üretebilirler [28].

Bu bakteriler şeker ve/veya alkol gibi substratlar içeren, meyve suyu, şarap, sirke, bira gibi ortamlarda bulunurlar. Bu substratların bakteriyel metabolizmadaki tamamlanan oksidasyonlarının bir sonucu olarak, ortamda organik asitler birikir. Bu bakterilerin büyük çoğunluğu etanolden asetik asit üretimine sebep olurlar. Bununla birlikte glukozu, glukonik aside, galaktozu, galaktonik aside ve arabinozu da arabonik aside okside edebilirler. Bu reaksiyonlardan bazıları fermantasyon endüstrisi için büyük önem taşımaktadır. Yine bu bakteriler selüloz üretme ve sorbitolü, sorboza okside etme yeteneğine sahiptirler.

Asetik asit bakterileri zorunlu aerob bakteriler olduğu için, gelişimleri önemli derecede ortamlarındaki moleküler oksijenin konsantrasyonuna bağlıdır. Bununla birlikte oksijenin

olmadığı ortamlarda diğer alternatif elektron alıcılarını da (quinonlar gibi) kullanabilirler. Bu yüzden asetik asit bakterileri neredeyse tamamen anaerobik koşullarda da yaşamlarını sürdürebilirler, ancak gelişmeleri kısıtlanır. Gelişmeleri ortama oksijen verilerek ya da havalandırılarak teşvik edilebilir [8, 28].

1.4.1.2. Asetik Asit Bakterilerinin Metabolizması

Karbon kaynağı asetik asit bakterileri için önemli bir gelişme faktörüdür Karbon kaynakları sayesinde, bakterinin hangi metabolik yolları kullandığı belirlenebilir ve üretilen fermente ürüne göre, ürün kalitesi açısından hangi metabolik ara ürün ya da son ürün, gıdanın kalitesini etkilemektedir, bunun tespiti yapılabilmektedir [22].

1.4.1.2.1 Karbonhidrat Metabolizması

Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi, asetik asit bakterilerinin birçok türü de glukozu ve diğer birçok karbonhidratı, karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Mayaların aksine, glukoz glikolizde olduğu gibi metabolize edilmez. Asetik asit bakterilerinde glikoliz metabolik yolunun, hemen hemen her basamağı aktif olmasına rağmen, fosfofruktokinaz enzimi eksikliğinin sonucu olarak, glikoliz tamamlanamaz. Bundan dolayı karbonhidratları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmek için, alternatif metabolik yolları kullanmak zorunda kalırlar (Şekil 1.2.).

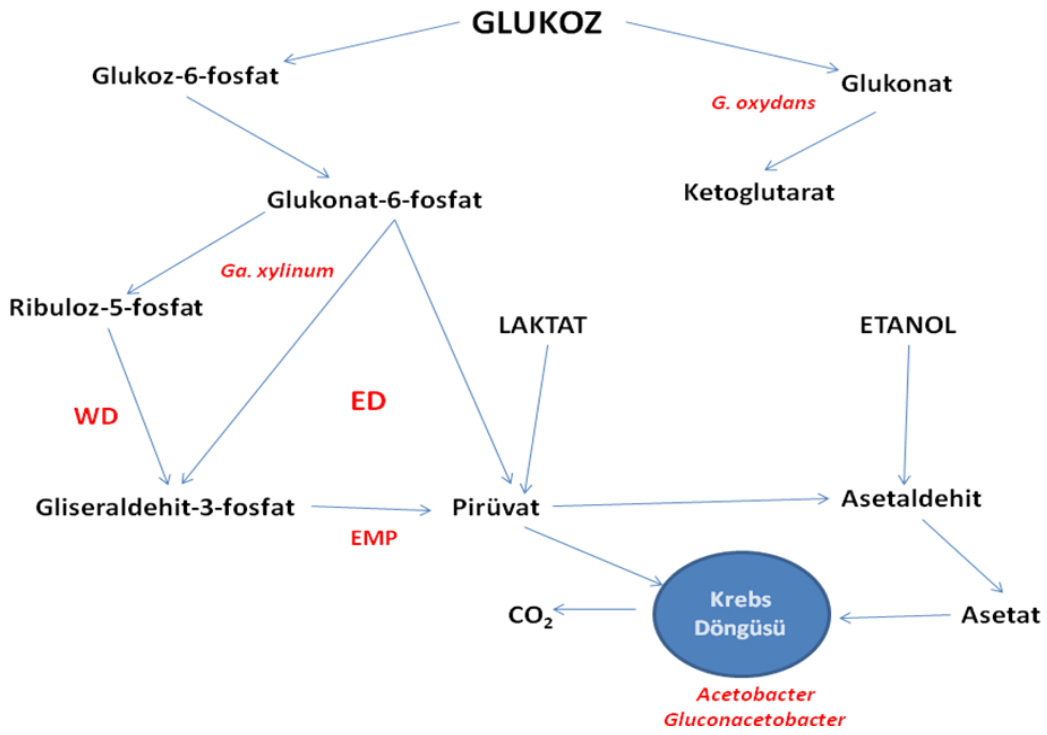
Asetik asit bakterilerinin kullandıkları alternatif metabolik yollar:

1. Glukoz-6-fosfat dehidrogeneaz enzim sisteminde, üç reaksiyon ile, bir mol glukoz-6-fosfat dan, bir mol ribuloz-5-fosfat ile iki mol indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oluşur. NADPH'ın solunum zincirinde oksidasyonu ve oksidatif fosforilasyon ile adenozin trifosfat (ATP) üretimi sonucunda enerji üretimi meydana gelir.

2. Entner- Doudoroff metabolik yolu ise, glukoz-6-fosfat'ı, glukonat-6-fosfat'a çeviren, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enzim sisteminin devamı olarak anılmaktadır. Bu dönüşümden sonra ise, Glukonat-6-fosfat aldolaz enzimi aracılığıyla, pirüvat ve gliseraldehit-3-fosfat'a dönüşmektedir. Her iki molekül de dekarboksilasyon ile asetata dönüştürülür. Bu reaksiyon *Gluconacetobacter oxydans*'ın bazı suşları için karakteristiktir.

3. Glukoz metabolizmasındaki en genel metabolik yol olan, Warburg-Dickens metabolik yolu/ heksoz monofosfat döngüsü, asetik asit bakterilerinin tüm türlerinde yaygın olarak

bulunmaktadır. Bu metabolik yol, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim sisteminin bulunduğu üç reaksiyonu içerir. Warburg-Dickens metabolik yolunda üretilen, değişik boyutlardaki monosakkaritler, Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) metabolik yolunda, metabolize olmak üzere, trioz fosfatlara dönüştürülürler.



Şekil 1.2. Asetik asit bakterilerinin kullandıkları alternatif metabolik yolların şematik diyagramı (WD: Warburg-Dickens, ED: Entner-Doudoroff; EMP: Embden-Meyerhoff-Parnas) [19].

Bu metabolik yollarda oluşan son ürünlerin hepsi, krebs döngüsüne girebilir, CO_2 ve H_2O açığa çıkacak şekilde tamamen okside olabilirler. Bununla birlikte asetik asit bakterileri içerisinde, *Acetobacter, Acidomonas* ve *Gluconacetobacter* cinsleri etanolü direkt aşırı oksidasyona maruz bırakarak, krebs döngüsünü tamamlayabilirler. Ancak *Gluconobacter* cinsine ait bakterilerin metabolizmasında fonksiyonel krebs döngüsü bulunmamaktadır. Bu nedenle metabolik yolların önceki basamaklarında oluşan molekülleri tamamen okside edemezler. Bu cinste, α-ketoglutarat dehidrogenaz ve süksinat dehidrogenaz eksikliği döngünün tamamlanmasını engeller. Asetik asit bakterileri, türlerine karakteristik olarak karbon kaynaklarını bir veya iki metabolik reaksiyon ile tamamlanmamış bir şekilde okside edip, ara ürün birikimine neden olsalar da, glukozu tamamen parçalayabilirler.

1.4.1.2.2 Etanol ve Diğer Alkollerin Metabolizması

Sirke üretiminde, etanolün asetik aside dönüşümünün, asetik asit bakterilerine özel bir reaksiyon olduğu yaygın olarak bilinmektedir. Bu dönüşüm iki biyokimyasal reaksiyon aracılığıyla gerçekleşmektedir, öncelikle alkol dehidrogenaz enzimi aracılığla, etanol, asetaldehite oksitlenir, ardından aldehit dehidrogenaz enzimi aracılığla asetaldehit, asetik aside dönüştürülür. Her iki reaksiyonda da elektron transferi moleküler oksijen aracılığıyla gerçekleşmektedir. Asetik asit bakterilerindeki, quinonlar gibi alternatif terminal elektron alıcılarının varlığı yaşamlarının sürdürebilmelerini ve hatta alkolik fermantasyon sırasında ya da, tamamen anaerobik ortamlarda bulunabilmelerini açıklamaktadır [29]. *Acetobacter* cinsinin, sahip olduğu alkol dehidrogenaz aktivitesi, özellikle şarap üretiminin yapıldığı ortamlarda *Gluconobacter* türlerine göre daha yüksektir. Bu nedenle *Acetobacter* cinsine ait türler, yüksek miktarda asetik asit üretirler. Ortamda aşırı miktarda sülfit oluşumu, asetaldehit konsantrasyonunda artışa neden olur ve bu moleküller arasında, kararlı bağlar oluşacağı için, alkolün, asetik aside dönüşümü engellenmiş olur. Alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenaz enzim sistemlerinin her ikisi de aktif bölgeleri ile birlikte, bakterilerin hücre zarının dış kısmında konumlanmaktadırlar. Bunun sonucu olarak, reaksiyon ürünleri, hücre içinde değil bakterinin bulunduğu besiyeri ortamında sentezlenir [30]. Bununla birlikte alkol dehidrogenaz enziminin sitoplazmik formunun da bulunduğu ve diğer alkol dehidrogenazlara göre çok düşük aktiviteye sahip olduğu literatürde belirtilmiştir [31].

1.4.1.2.3.Organik Asitlerin Metabolizması

Birçok asetik asit bakterisi için laktik asit, iyi bir karbon kaynağıdır ve çeşitli metabolik yollar aracılığıyla, değişik son ürünlere oksitlenebilir. Bu yollardan birisi, laktik asidin pirüvata okside olduğu ve ardından pirüvat dekarboksilaz enzimi tarafından, pirüvatın asetaldehit ve karbon dioksit (CO_2)'e okside olduğu reaksiyon zinciridir. Asetaldehit ise daha sonra son ürün olan asetik asit oluşumu için okside olur. Burada, pirüvat dekarboksilaz enziminin aktivitesi, bakterinin bulunduğu besiyerinde baskın olan substrata bağlıdır. Bu aktivite mannitol varlığında tespit edilemez iken, laktik asit varlığında maksimum seviyededir [32].

Birçok organik asidin tam oksidasyonu, bakteri metabolizmasında fonksiyonel krebs döngüsünün bulunabilmesine bağlıdır. *Gluconobacter* cinsine ait bakteriler asetik asidi tamamen okside edemedikleri gibi, diğer organik asitleri de tamamen okside edemezler. Bakteri metabolizmasında

asetik asit, asetil koenzim A (KoA) sentetaz enzimi aracılığıyla, asetil koenzim A'ya okside olur [30]. Asetil koenzim A ise, krebs döngüsüne girer ve döngü tamamlanıp CO_2 ve su oluşmadan önce ara metabolitlere dönüştürülür. Asetik asitin ortamda bulunması, asetil koenzim A sentetaz enziminin aktivitesini artmasına sebep olsa da, bu aktivite etanol ve glukoz tarafından güçlü bir şekilde engellenir [19].

1.4.1.2.4. Azot Metabolizması

Asetik asit bakterilerinden, bazı türler atmosferik azotu fiske edebilmektedir. Bu özellik ilk defa, 1980'lerin sonunda *Gluconacetobacter diazotropicus*'ta tanımlanmıştır [33]. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda *Ga. diazotropicus* dışında altı türün daha bu özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Bu türler: *Gluconoacetobacter johannae, Gluconacetobacter azocaptans, Acetobacter peroxydans, Swaminathania salitolerans, Acetobacter nitrogenifigens* ve *Gluconacetobacter kombuchae*'dir [34]. Diğer türler ise basit bir azot kaynağı olarak amonyağı kullanırlar [35]. Böylece, bu bakteriler kendi amino asitlerinin tamamını ve diğer azotlu bileşikleri amonyaktan sentezleyebilirler. Bakterilerin geliştirildiği besiyerinde kullanılan amino asit türünün bakteriyel gelişmi teşvik edici yada engelleyici etkisi bulunabilir. Bu nedenle, glutamat, glutamin, prolin ve histamin bakterilerin gelişimini teşvik ederken, valin'in *G.oxydans*'ın, treonin ve homoserin'in ise *Acetobacter aceti*'nin gelişimini engellediği gözlenmiştir [36].

Asetik asit bakterilerinin, sirke üretimi sırasında belirli aminoasitleri tercih ettiği gözlenmiştir [37, 38]. Üzüm şırasında ve şarapta bol miktarda bulunan prolin aminoasidinin, asetik asit bakterileri tarafında tercih edilmesi dikkate değerdir. Çünkü fermantatif koşullarda bu aminoasit mayalar tarafından kullanılmaz. Yine fermantasyon sırasında mayaların otolizi sonucu, ortama dağılan amimoasitler de asetik asit bakterilerinin gelişimine katkıda bulunabilir. Aslında, amino asit miktarının düşük olduğu besiyeri ortamında, alkolden ya da diğer substratlardan sirke üretimi yapılırken ek besinsel takviyeler eklenmelidir. Ancak bu genellikle şarap gibi fermantasyon ürünleri için gerekli değildir [38].

1.5. Asetik Asit Bakterilerinin Sistematiği

Asetik asit bakterilerinin morfoloji, biyokimyasal ve fizyolojik kriterlere göre ilk sınıflandırması Visser't Hooft (1925) ve Asai (1935) tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırmada asetik asit bakterileri, *Acetobacter* ve *Gluconobacter* cinsleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Daha sonra 1950'de Frateur, esas olarak beş fizyolojik kritere göre sınıflandırma yapmıştır. Bu fizyolojik kriterler, katalaz aktivitesi, glukozdan glukonik asit üretimi, asetik asidin su ve CO_2'e oksidayonu, laktik asidin su ve CO_2'e oksidasyonu ve gliserol'ün dihidroksi asetona oksidasyonudur. Bu kriterlere göre *Acetobacter* cinsi, *peroxydans, oxydans, mexosydans* ve *suboxydans* olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Bakteriyel sistematik için iyi bir referans olan "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" isimli eserin 6. baskısında ise, *Acetobacter* cinsi, asetik asit ve laktik asidi, su ve CO_2'e okside edebilen, peritrik flagella sayesinde hareketli ya da hareketsiz bakteriler olarak tanımlanırken, *Gluconobacte*r cinsi ise, asetik asit ve laktik asidi su ve CO_2'e okside edemeyen, polar flagellaları sayesinde hareket edebilen ya da haraketsiz bakteriler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca *Gluconobacter* cinsi, *Pseudomonadacea*e familyasına dahil edilirken [39] *Acetobacter* cinsi ise ne tek başına bir familya olarak tanımlanmış, ne de başka bir familyaya dahil edilmiştir. Adı geçen referans kitabın 1984 tarihli baskısının ismi, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* olarak değiştirilmiştir. Bu kitabın 2005 tarihli baskısında, bakterilerin sınıflandırlmasında, bakteriyel genomdaki yüzde olarak guanin-sitozin (GC) miktarının belirlenmesi, DNA-DNA melezlenmesi, DNA-rRNA melezlemesi ve ribozomal gen dizilerinin (5s rRNA, 16s rRNA ve 23s rRNA) analizi gibi bazı moleküler tekniklerin taksonomik kriter olarak kullanılabilirliğinden bahsedilmiştir. Bu teknikler sayesinde, *Acetobacter* ve *Gluconobacter* cinslerinin yoğun bir şekilde, filogenetik benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir, bunun sonucu olarak bahsedilen kitabın bu baskısında daha önce α-Proteobacteria bölümüne dahil olan [40] iki cins de *Acetobacteriaceae* familyasına dahil edilmiştir[35]. Ayrıca *Acetobacter* cinsi içerisinde dört bakteri türü *Acetobacter aceti, A.pasteurianus, A.liquefaciens* ve *A. hansenii* bulunurken, *Gluconobacter* cinsi ise sadece tek bir tür (*G.oxydans*) içermekteydi. *Acetobacter* türlerinin etanolü, asetik aside dönüştürüp ardından asetik asidi, su ve CO_2'e okside etmeleri ve *Gluconobacter* türlerinin ise etanolü, asetik aside okside edip, ancak asetik aside okside ettiği halde su ve CO_2'e okside edememeleri bu cins arasındaki ana farklılık olmaya devam etmiştir.

Geçtiğimiz son 30 yıl içerisinde, moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, bakterilerin taksonomisi sürekli olarak revize edilip, yeniden düzenlenmektedir. *Acetobacteriaceae* familyası da bu düzenlemelerin dışında kalmamıştır. Daha önce ki, iki asetik asit bakteri cinsine ek olarak dokuz yeni cins de *Acetobacteriaceae* familyasına dahil edilmiştir. Bu cinsler: *Acidomonas* [41], *Gluconacetobacter* [42], *Asaia* [43], *Kozakia* [44], *Saccharibacter* [45], *Swaminathania* [46]., *Neoasaia* [47], *Granulibacter* [48] ve *Tanticharoenia* [49]'dır. Böylece günümüze kadar tanımlanmış asetik asit bakterileri 11 cins ve 58 türden oluşmaktadır (Tablo 1.3.).

Tablo 1.3. Asetik Asit Bakterilerinin cins ve türleri [19].

Cins	**Tür**
Acetobacter	*Acetobacter aceti*
	Acetobacter pasteurianus
	Acetobacter pomorum
	Acetobacter peroxydans
	Acetobacter indonesiensis
	Acetobacter tropicalis
	Acetobacter syzygii
	Acetobacter cibinongenesis
	Acetobacter orientalis
	Acetobacter orleaniensis
	Acetobacter lovaniensis
	Acetobacter estuniensis
	Acetobacter malorum
	Acetobacter cerevisiae
Acetobacter	*Acetobacter oeni*
	Acetobacter nitrogenifigens
	Acetobacter senegalensis
	Acetobacter ghanensis
	Acetobacter fabarum
Acidomonas	*Acidomonas methanolica*
Asaia	*Asaia bogorensis*
	Asaia siamensis

Asaia	*Asaia krugthepensis*
	Asaia lamnensis
Gluconacetobacter	*Gluconacetobacter liquefaciens*
	Gluconacetobacter diazotrophicus
	Gluconacetobacter xylinus
	Gluconacetobacter hansenii
	Gluconacetobacter europaeus
	Gluconacetobacter oboediens
	Gluconacetobacter intermedius
	Gluconacetobacter sacchari
	Gluconacetobacter entanii
	Gluconacetobacter johannae
	Gluconacetobacter azotocaptans
	Gluconacetobacter swingsii
	Gluconacetobacter kombuchae
	Gluconacetobacter nataicola
	Gluconacetobacter rhaeticus
	Gluconacetobacter saccharivorans
	Gluconacetobacter persimmonis
Gluconobacter	*Gluconobacter oxydans*
	Gluconobacter frateurii
	Gluconobacter assai
	Gluconobacter cerinus
	Gluconobacter aibidus
	Gluconobacter thailandicus
Gluconobacter	*Gluconobacter kondonii*
	Gluconobacter roseus
Gluconobacter	*Gluconobacter sphaericus*
	Gluconobacter japonicus
	Gluconobacter kanchanaburiensis
	Gluconacetobacter wancherniae
Granulibacter	*Granulibacter bethesdensis*
Kozakia	*Kozakia baliensis*

Neoasaia	*Neoasaia chiangmaiensis*
Saccharibacter	*Saccharibacter floricola*
Swaminathania	*Swaminathania salitolerans*
Tanticharoenia	*Tanticharoenia sakaeratensis*

Acetobacter cinsi, *Gluconacetobacter* cinsinden biyokimyasal olarak ubikinon-10 (Q-10) yerine, ubikinon-9 (Q-9) üretmesiyle ayrılmaktadır [42]. Ubikinon-10 (Q-10) ise, diğer tüm asetik asit bakterilerinde bulunan alternatif bir elektron alıcısıdır [28]. Sadece *Acidomonas methanolica* türünden oluşan, *Acidomonas* cinsi ise, kendine özgü olarak metanolü karbon kaynağı olarak kullanarak gelişebilmektedir [41]. Son zamanlarda tanımlanan *Granulibacter* cinsinin de böyle bir kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir [48]. *Asaia* ve *Swaminathania* cinsine asit bakteriler ise etanolden çok az asetik asit üretirler ya da hiç üretmezler, ayrıca % 0.35 üzerindeki asetik asit konsantrasyonlarında gelişim gösteremezler. Literatürdeki çalışmalara göre, bu cinslere ait suşlar genellikle çiçeklerden [43] ve pirinçten [46] izole edilmiştirler.

Kozakia, Saccharibacter, Neoasaia, Granulibacter ve *Tanticharoenia* cinslerinin her birinde sadece tek bir bakteri türü bulunmaktadır. Etanolden çok az miktarda asetik asit üretimi yapan, asetik asit ve laktik asidi okside etme kapasiteleri çok düşük olan bu türler, genellikle Asya ülkelerinde topraktan, çiçeklerden ve meyvelerden izole edilmişlerdir [8]. Diğer taraftan *Granulibacter* cinsi bakteriler ABD'de hastanelerde tedavi gören kronik granulomatozis hastalarından izole edilmiştir. Bu nadir görülen durum, katalaz aktivitesine sahip parazitlerin gelişimini kolaylaştıracak hidrojen peroksit ve süper oksitlerin birikimi ile karakterize edilmektedir [48]. Bazı türler; *Acidomonas, Asaia, Neoasaia, Saccharibacter* ve *Tancticharoenia* ise, yüksek ozmofilik özellik gösterir ve %30'un üzerindeki şeker konsantrasyonuna sahip besiyeri ortamında gelişim gösterebilmektedir [50, 51].

1.6.Asetik Asit Bakterilerinin Kültivasyonu

Asetik asit bakterileri geleneksel olarak, besiyeri ortamında gelişimleri zayıf olduğu için, kültivasyonu zor olan mikroorganizmalar olarak kabul edilir. Bunun sonucu olarak, literatüre bakıldığında asetik asit bakterilerinin kültüre alınması için çeşitli besiyerlerinin kullanıldığı gözlenmiştir. Daha çok üzüm, üzüm şırası gibi ortamlarda gelişen asetik asit bakterilerini izole

etmek için Glukoz-Yeast extract -Carbonat (GYC) agar (%5 D-glukoz, %1 maya ekstraktı, %0.5 $CaCO_3$ ve % 2 agar) kullanılır[50]. $CaCO_3$ varlığında besiyerinin opak bir görünümü vardır, ancak bakteri gelişip asit ürettiği zaman, $CaCO_3$ çözünür ve koloninin etrafında, berrak zonlar oluşur. Bu besiyerine 100mg/L olacak şekilde natamisin eklenirse, maya ve küflerin gelişmi de engellenmiş olur[53].

Mannitol-Yeast Extract-Pepton (MYP) agar (% 2.5 D-Mannitol, % 0.5 maya özütü, % 0.3 pepton, % 2 agar) da asetik asit bakterilerinin izolasyonu için benzer sonuçlar verebilmektedir. Bu besiyerlerinde asetik asit bakterileri, 2 ile 4 gün arasında, 28ºC sıcaklıkta, aerobik koşullarda gelişebilmektedirler. Yine literatüdeki bazı çalışmalarda besiyerine takviye olarak, %2 etanol ya da %10 steril şarap eklendiği görülmüştür[54]. Ancak, bu besiyerleri şarap üretiminde kullanılan örnekler ile yapılan çalışmalarda bir problem rapor edilmese de, besiyerlerindeki bakteriyel gelişimde farklılıklar gözlenmiştir. Hatta mikroskobik sayım sonucunda kültür ortamında canlılığını devam ettirebilen, ancak agar ortamında sayımı yapılacak kadar gelişim gösteremeyen bakteriler olduğu belirlenmiştir[55]. Bu duruma paralel olarak, literatürde, sirke üretimi sırasında alınan örneklerdeki, asetik asit bakterilerinin kültüre edilmesinde zorlukların olduğu bir çok çalışma da rapor edilmiştir[56, 57, 58, 59]. Bu problemler, alt katmanında %0.5'lik, üst katmanına %1'lik agar bulunan çift katmanlı Asetik asit-etanol (AE) agar kullanılarak kısmen çözülmüştür AE agar gibi, alkol ve asetik asit içeren, çift katmanlı agar ile asetifikasyon ortamı taklit edilebilmektedir[60].

1.7.Asetik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

Yakın geçmişte, bakteriyel türlerin sınıflandırılması, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik kriterlere dayanmaktaydı. Bu tip fenotipik karakteristikler, izolatların hangi cins ve türe ait olduğunu belirlemek için kullanılabilmektedir. Genelde asetik asit bakterileri sınıflandırılırken, hücre ve koloni morfolojisine, Gram (+/-) davranışına, katalaz ve oksidaz aktivitesine bakılır [8]. Asetik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında tür ve cins bazında ayrım verecek kadar kullanışlı olan testler aşağıdaki gibidir:

1. Etanolden, asetik asit üretimi

2. Laktik asit ve asetik asitin aşırı oksidasyonu sonucu, CO_2 ve H_2O oluşumu
3. % 0.35'lik asetik asit varlığında gelişim
4. % 1'lik nitrik asitli ortamda gelişim
5. Glukozdan, 2-ketoglukonik asit, 5-ketoglukonik asit ve 2,5- ketoglukonik asit oluşumu
6. Gliserolün ketogenezi
7. Değişik karbon kaynaklarında gelişim (metanol gibi)
8. Kahverengi ve suda çözünebilir pigmentlerin oluşumu
9. Glukoz veya fruktozdan, γ-pironların oluşumu
10. Şekerlerden asit üretimi
11. Selüloz üretimi
12. % 30'luk glukozlu ortamda gelişim
13. Flagella varlığı, hücredeki pozisyonu, ve hareketlilik (motilite) testleridir.

Bu testler asetik asit bakterilerinin tanımlanmasında, cins ve tür ayrımı yapılmasında yaygın olarak kullanılabilmektedir (Tablo 1.4.). Testlerin bir çoğu farklı türler arasında, hatta aynı türün farklı suşları arasında da, değişik sonuçlar vermektedir. Bu ise izolatların, anlamlı bir şekilde tanımlanmasını zorlaştırırken, güvenilir sonuçlar almak için daha fazla testin yapılması zorunluluğunu ortaya çıkarır. Bu testlerin dışında, genotipik ve moleküler kriterlere dayanan daha iyi alternatif testlerde bulunmaktadır. Genetik bilimi ve moleküler biyolojideki gelişmeler, özellikle DNA gibi moleküllerdeki, polimorfizim ve değişkenliğin, gıdalardaki mikroorganizmaların karakterizasyonuna ve tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bunun sonucu olarak, son yıllarda, DNA-DNA melezleme, ribozomal genlerin dizi analizi gibi moleküler teknikler kullanılarak, asetik asit bakterileri içine dahil olan tanımlanmış cins ve türlerin sayısı artmıştır[19].

Tablo 1.4. Asetik asit bakterilerinin değişik cinslerinin fenotipik karakteristikleri [8, 28].

Karakteristik	**A**	**G**	**Ac**	**Ga**	**As**	**K**	**S**	**Sa**	**Na**	**Gr**	**T**
Etanolden, asetat üretimi	+	+	+	+	-	-	-	z/-	+	z	-
Asetat'ın CO_2 ve H_2O'ya oksidasyonu	+	-	+	+	z	z	z	-	-	z	-
%0.35'lik asetik asitte gelişim	+	+	+	+	-	-	-	-	+	te	-
%1'lik nitrik asitte gelişim	-	-	+	-	-	-	+	te	-	te	-
Glukozdan, glukoronik asit oluşumu	+	+	-	+	+	+	te	te	te	te	te
Gliserolün, ketogenezi	+	+	-	+	z	z	+	-	z	-	-
Metanolde gelişim	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Kahverengi, suda çözünebilir pigment oluşumu	-	-	-	+	-	-	+	-	-	te	-
Glukozdan, γ-pironların sentezlenmesi	-	+	te	+	-	-	te	te	te	te	te
Fruktozdan asit üretimi	-	+	-	+	+	-	+	+	+	te	te
Selüloz üretimi	-	-	-	+	-	-	-	te	te	te	te
%30'luk glukozda gelişim	-	-	+	-	+	z	+	+	+	te	-
Flagellanın, varlığı ve hücredeki konumu	per	pol	pol	per	per	-	per	-	-	-	-
Major elektron alıcısı (Ubikinon)	Q9	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10
GC içeriği (%)	52-64	54-64	62-63	56-67	59-61	56-57	52-53	57-60	63	59	66

A-*Acetobacter*, G-*Gluconobacter*, Ac-*Acidomonas*, Ga-*Gluconacetobacter*, As-*Asaia*, K-*Kozakia*, S-*Swaminathania*, Sa-*Saccharibacter*, Na-*Neoasaia*, Gr-*Granulibacter*, T-*Tanticharoenia*, (+)pozitif, (-) negatif, Z-zayıf, te-tespit edilmemiş, per-peritrik, pol-polar

1.8.Asetik Asit Bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan moleküler teknikler

Bu tekniklerden ilki, bakterilere ait DNA parçacıklarındaki GC yüzdesinin analizidir. *Acetobacteriaceae* familyasındaki her tür için belirli bir GC yüzdesi tespit edilmiştir, ancak GC yüzdesi, bir izolatın tanımlanması için tek başına yeterli değildir [35]. Asetik asit bakterilerinin DNA'larındaki GC yüzdesi, %52 ile %67 arasında değişiklik göstermesine rağmen, birçok türün GC yüzdesi bu aralığın ortasındadır (ör: % 59). Diğer taraftan bu kriter, DNA-DNA melezlemesi, DNA-rRNA (16s rRNA) ve çeşitli morfolojik ve fizyolojik testlerle birlikte, yeni türlerin tanımlanmasında kullanılabilir. Bu şekilde fenotipik ve genotipik yöntemlerin birlikte kullanımına polifazik yaklaşım denilmektedir [19].

Asetik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan diğer bir teknik ise, ribozomal genlerin veya 16S ribozomal DNA (rDNA) geni ile 23S rDNA geni arasındaki intergenik bölgenin, DNA dizi analizi ile belirlenmesidir [28]. Bu intergenik bölgeler, internal transribed spacers (ITSs) olarak bilinmektedir. Bunların dışında, asetik asit bakterilerinin sınıflandırılması amacıyla *RecA* geninin DNA dizi analizinin de kullanımı önerilmiştir [8]. Fakat, son yıllardaki gelişmelerle birlikte DNA dizi analizinin maliyetinin düşmesine rağmen, yüzlerce izolatın dizi analizini yaparak, sistematik amaçlı kullanımı kolay ve pratik değildir. Bu nedenle mikroorganizmaları tanımlamak ve gruplamak için, hızlı, kolay ve pahalı olmayan tekniklerin kullanıldığı alternatif yaklaşımlar gerekmektedir. Bu teknikler genellikle, ribozomal genlerin fragment analizine dayanan elektroforetik tekniklerdir. Bu teknikler tek başlarına kesin bir sınıflandırma için kullanışsızdırlar, ancak elde edilen gruplardan seçilen izolatların, DNA dizi analizi tekniği ile analizi sonucunda yüksek doğrulukta bir tanımlanma mümkündür[19].

Bu metotlardan ilki 16S-ARDRA olarak bilinen, 16S rDNA geninin, PCR sonrasında, restriksiyon enzimleri ile kesimi ve asetik asit bakteri izolatlarına ait olan DNA fragmentlerinin karşılaştırmalı olarak analizidir. Bu teknikte asetik asit bakterilerinin 16S rDNA geni yalnızca asetik asit bakterileri ile 1450 bç uzunluğunda PCR ürünü veren spesifik primerler ile çoğaltılır. PCR ürünleri, en iyi sonuçların alındığı, *TaqI* ve *RsaI* restriksiyon enzimlerinin kullanılarak, fragmentlere ayrıldıktan sonra elektroforetik olarak analiz edilir [53, 61]. Ancak iki bakteri grubunun bu teknik ile

ayrımı mümkün olmamıştır. Bunlardan birincisi, *Gluconoacetobacter liquefaciens, Ga. xylinus* ve *Ga. europaeus* grubudur. İkincisi ise, *Gluconobacter frateurii* ve *Gluconobacter asaii*'nin olduğu gruptur. Bu sorunu aşmak için, değişik restriksiyon enzimleri kullanılmıştır [56]. Bu bahsedilen yöntem daha çok üzüm şıraları ve şaraplardan izole edilen asetik asit bakterilerinin tanımlanması için tercih edilmiştir. Yine bu yöntemle endüstriyel fermantasyonlardan elde edilen izolatların, restriksiyon profilleri referans suşlar ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu teknik üzüm [62] ve sirkelerdeki asetik asit bakteri florasını taramak [57] ve balzamik sirke üretimi sırasında izole edilen asetik asit bakteri izolatlarını tanımlamak için kullanılmıştır [64].

Asetik asit bakterilerini tanımlamak için, 16S-23S ITS bölgesine göre de primerler dizayn edilmiştir [52]. Bu bölge ribozomal bölgelere göre, daha yüksek derecede dizi çeşitliliği sağladığı için , restriksiyon enzimleri ile yapılan analizlerde asetik asit bakterileri arasında mükemmel seviyede bir polimorfizm ve çeşitlilik beklenmiştir Ancak aynı referans suşların, ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılması sonrasında, *TaqI* ve *RsaI* restriksiyon enzimleri ile kesilen PCR ürünleri analiz edildiğinde, çok mükemmel bir tür ayrımı gözlenememiştir [52]. Bu teknik Sievers ve ark. tarafından *Acetobacter europaeus* ve *Acetobacter xylinum*'u birbirinden ayırt etmek için kullanılmıştır [17]. Daha sonra Trcek ve Teuber, aynı restriksiyon enzimlerini kullanarak, 57 tane farklı asetik asit bakteri suşunu karakterize etmeye çalışmışlardır [63]. Ancak bu araştırıcılar, *Ga. xylinus* ile *Ga.europaeus*'u ayırt edemez iken, *Ga. liquefaciens* suşlarını birbirinden ayırabilmişlerdir [62]. Gullo ve ark. ise önceki iki tekniği kombine ederek, geleneksel balzamik sirkeden izole edilen izolatları 16S-23S-5S rDNA genleri ve ITS bölgelerini analiz ederek tanımlamaya çalışmışlardır [65]. Ancak, analiz edilen bölgenin çok uzun olması (yaklaşık 4500 bç) bu metot için büyük bir dezavantaj olmuştur.

Buraya kadar bahsedilen metotların hepsi kültür bağımlı metotlar olmakla birlikte, direkt örneklerdeki asetik asit bakterilerinin tespiti için kültürel olmayan metotlar da bulunmaktadır. Kültürel olmayan metotlardan birincisi, gerçek zamanlı kantitatif PCR'dır. Bu teknikte hedef bakteri türlerine spesifik olarak dizayn edilmiş primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi, sürekli olarak izlenir ve bakteriye ait DNA konsantrasyonu, döngü sayısının, logaritmik DNA konsantrasyonuna karşı oluşturulan standart eğriler çizilerek belirlenir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR tekniği daha çok sirke veya şarap üretiminde kullanılan subsratlarda ya da fermantasyonu henüz

tamamlanmamış ürünlerdeki florayı kontrol etmek için kullanılmıştır [55]. Ancak, bu teknikte kullanılan primer ve problar (TaqMan probları) daha çok üzümden yapılan şarap ve sirkelerin analizinde kullanılmak üzere dizayn edilmiştir. Dolayısıyla bu tekniğin, bu tür ürünlerdeki, en yaygın bulunan türlerin tespiti için uygun olduğu bildirilmiştir[55]. Diğer taraftan kültürel olmayan yöntemlerden, Denatüre Gradiyent Jel Elektroforezi (DGGE) ise direkt DNA izolasyonu yapılan örneklerin mikrobiyal kompozisyonunu belirlemek için kullanılmaktadır. DGGE kompleks mikrobiyal toplulukların tanımlanması için en uygun ve en fazla kullanılma sahip olan bir metottur [9]. Çift sarmallı DNA (dsDNA) molekülünün, doğrusal denatürantlar (üre ve formamid karışımı) gradiyenti içeren poliakrilamit jeldeki azalan elektroforetik mobilitesi bu ayırımın nedenidir [66]. PCR tabanlı bu teknik amplifiye edilmiş DNA parçalarından oluşmuş karışımın, denatüre edici bileşenler içeren poliakrilamit jel içinde ayrılmasını sağlar. Normalde agaroz ya da akrilamid jel elektroforezinde her bir DNA parçasının elektroforetik mobilitesi onun boyutu ile orantılıdır. Oysa DGGE'de aynı boyuttaki DNA parçaları denatürasyon profillerine göre jel üzerinde ayrılır. Çift zincirli DNA (dsDNA) artan denatürasyon şartlarına maruz kalınca, tek zincirli DNA(ssDNA) haline dönüşür [10]. ds DNA'nın denatürasyonunda fragmentler erime bölgeleri denen yerlerde kademe kademe denatüre olurlar ve sonuçta dsDNA, ssDNA'ya dönüşür. Erime bölgeleri, aynı sıcaklıktaki eriyen baz dizilerinin oluşturduğu alanlardır. Denatüre edici gradiyent jelin belli bir noktasındaki erime sıcaklığı çift zincirli DNA'nın erime sıcaklığına ulaştığı zaman sarmallar kısmi olarak açılır ve molekülün ilerleyişi pratik olarak durur. Sekans çeşitliliği erime sıcaklıklarının farklı olmasına neden olur ve farklı dizilime sahip moleküllerin ilerleyişi jelin değişik noktalarında sonlanır. Böylece jelde farklı bant profilleri oluşur. dsDNA parçalarının eriyip tek zincirli haline geldiği nokta nükleotid dizilimine ve G-C yüzdesine bağlıdır [9, 10, 67]. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, bu tekniğin sirke ve şaraplardaki asetik asit bakterilerinin tanımlanması için, başarılı bir şekilde kullanıldığı görülmektedir [55, 68, 69, 70, 77, 78].

1.9.Asetik Asit Bakterilerinin Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Teknikler

Herhangi bir mikrobiyal sınıflandırma tekniğinin asıl amacı, bir izolatın esas olarak hangi taksonomik birime ait olduğunu belirlemektir. Fakat, bilinen bir türün farklı genotiplerinin ya da farklı suşlarının, tiplendirilmesinin ya da ayrımının endüstriyel açıdan önemi gün geçtikçe artmaktadır. Çünkü endüstriyel amaçlı kullanılan bir türün,

tüm suşları üründe aynı özellikleri göstermemektedir. Moleküler teknikler tür, hatta suş seviyesinde bir ayrım sağlayabilmektedir.

Sirke endüstrisinde, asetik asit bakterilerinin tür bazında tanımlanması, endüstriyel açıdan önemlidir [58]. Bu amaçla, son yıllarda DNA'ya dayalı moleküler tekniklerin tüm fermente ürünlerde olduğu gibi, sirke mikroflorasının da detaylı analizinde yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu tekniklerin önemli bir kısmı, tekrar eden bölgelerdeki dizileri çoğaltmak üzere dizayn edilmiş primerlerin kullanılarak PCR ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bu spesifik oligonükleotitler kullanılarak elde edilmiş PCR ürünleri, agaroz jelde yürütüldüğünde, türe ya da suşa spesifik bantlar elde etmek mümkündür. Bakterileri tanımlamak için kullanılan bu tekniklerle elde edilen, genetik parmak izleri, marketlerde herhangi bir üründe bulunan barkodlara benzetilebilir [73].

Literatüre bakıldığında, bu tekniklerin sirke ve şarap gibi ürünlerde bakteriyel floranın analizi için de kullanıldığı görülmektedir [71, 72]. Örneğin, Nanda et. al.'ın yaptığı bir çalışmada, pirinç sirkesinden izole edilen asetik asit bakteri izolatlarını karakterize etmek için, ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-PCR ve RAPD (Random amplified polimorphic DNA)-PCR tekniklerini kullanmıştır [24]. RAPD-PCR tekniğinde, bakteriyel genomda rastgele yerlere bağlanıp, her suş için değişik sayıda ve büyüklükte fragmentler oluşumuna sebep olan, küçük oligonükleotitler (9-10 bç) kullanılır. ERIC-PCR ve REP (Repetitive element Palindrome) –PCR ise, Gram-negatif bakteri türlerinin neredeyse tamamında, gram-pozitif bakterilerinde, birkaç türünün genomlarında doğal olarak oluşmuş, yüksek seviyede, çoklu kopyası bulunan ve tekrar edilen DNA dizilerine spesifik, primerler kullanılarak yapılan genetik parmak izi teknikleridir [73].

Asetik asit bakterilerinin tiplendirilmesinde en yaygın kullanılan rep-PCR tekniği ise hemen hemen bir çok bakterinin genomunda, çok fazla tekrarı bulunan $(GTG)_5$ dizilerinin kullanımına dayanmaktadır. Bu teknik ilk olarak kakao tanelerindeki, fermantasyondan sorumlu, asetik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve izlenmesi için kullanılmıştır [75]. Daha sonralarda ise, çeşitli ağaç türlerine ait fıçılar kullanılarak üretilen sirkelerdeki mevcut asetik asit bakterilerinin tiplendirilmesi için kullanılmıştır [76].

Görüldüğü üzere, dünyada fermantasyon olaylarının detaylı olarak anlaşılması, ürün kalitesinin standardize edilmesi ve potansiyel starter kültürlerin belirlenmesi amacıyla geleneksel yöntemle üretilen sirkelerin, mikrobiyal florasının detaylı olarak tanımlanması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Ülkemizde ise, sirke mikroflorasının tanımlanmasına yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Oysa bilindiği gibi, fermente ürünlerin mikrobiyal florası hammadde ve üretim tekniğine bağlı olduğu kadar bölgesel floraya da bağlıdır. Diğer taraftan geleneksel yöntemle üretilen sirkelerde gelişen mikrofloranın ve dolaysıyla üretim sırasında gerçekleşen biyokimyasal dönüşümlerin detaylı olarak bilinmesi ülkemiz koşullarında kaliteli ve güvenilir sirke üretimi için birinci derecede önemli bir faktör olarak görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, ülkemizde geleneksel ve spontan fermantasyon teknikleri kullanılarak üretilmiş, sirkelerin bakteriyel florası kültür bağımlı ve kültür bağımsız moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1. Deney Tasarımı

Bu araştırmada ülkemizin 2 farklı bölgesinden temin edilen geleneksel yöntemle üretilmiş sirke örnekleri ile bu örneklere ait sirke analarının bakteriyel florası PCR-DGGE, rep-PCR, 16s RNA ve ITS bölgesi dizi analizi gibi kültürel ve kültürel olmayan yöntemlerle analiz edilerek tanımlanmıştır.

2.1.2. Sirke Numunelerinin Temini

Bu çalışmada starter kültür kullanılmadan geleneksel yöntemle üretim yapan 3 farklı yerel üreticiden aseptik koşullarda 4 farklı elma sirkesi ve anası ve yine 4 farklı üzüm sirkesi ve anası örneği alınmıştır. Hammadde ve üretim yöntemi hakkında üreticilerden alınan bilgiler Tablo 2.1'de verilmiştir.

2.2.Yöntem

2.2.1. pH Tayini

pH tayini, Inolab 720 marka (WTW, Almanya) pH metre kullanılarak 3 paralelli olarak yapılmıştır.

Tablo 2.1. Sirke ve sirke anası örneklerinin genel özellikleri.

Üretici	Bölge	Örnek Kodu	Örnek Tipi	Fermentasyon Metodu
A	Bolu-Düzce	RE	Elma Sirkesi	Yüzey Kültür Yöntemi
		REA	Elma Sirkesi Anası	
		RÜ	Üzüm Sirkesi	Yüzey Kültür Yöntemi
		RÜA	Üzüm Sirkesi Anası	
B	Kayseri	SE	Elma Sirkesi	Yüzey Kültür Yöntemi
		SEA	Elma Sirkesi Anası	
C	Kayseri	ZÜ	Üzüm Sirkesi	Yüzey Kültür Yöntemi
		ZÜA	Üzüm Sirkesi Anası	

2.2.2. Sirke ve Sirke Anası Örneklerinde PCR-DGGE Yöntemi ile Bakteriyel Floranın Analizi

2.2.2.1. Sirke ve sirke anası örneklerinden direkt DNA izolasyonu

Sirke örneklerinden direkt DNA izolasyonu için steril santrifüj tüplerine 2 ml örnek aktarılarak 8000g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonucunda oluşan süpernatant dökülmüş ve dipte kalan pellet, 1.5 ml saline-EDTA-PVP çözeltisi (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, %2 PVP; pH: 8.0) ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra aynı çözeltiden 500 µl tüplere ilave edilerek aşağıdaki işlem basamakları takip edilmiştir;

1. Tüpler, 30 dakika 75°C'de ısıtıcı blokta (Bioer-Thermo Cell-HB-202, China) bekletilmiştir.
2. Tüplere, 20 µl lizozim çözeltisi (50mg/ml) ilave edilerek 37°C'de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır.

3. Tüplerdeki sıvı hacminin %10'u kadar Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 20 µl Proteinaz K ilave edildikten sonra 40°C'de tüpler berraklaşıncaya kadar inkübe edilmiştir.

4. İnkübasyondan sonra tüplerin içindeki toplam sıvı hacminin %20'si kadar 5M NaCl ve %10'u kadar Cetyl trimetil amonyum bromür (CTAB) çözeltisi (%10 CTAB /0.7M NaCl) çözeltisi ilave edilmiştir.

5. Tüpler, 65°C'de 10 dakika ısıtıcı blokta inkübe edilmiştir.

6. İnkübasyondan sonra tüplerin içindeki sıvı ile eşit hacimde fenol;kloroform;izoamilalkol (25;24;1) ilave edilerek tüpler 15 dakika yavaşça ters düz edilmiştir.

7. Tüpler 15000g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz, yeni bir tüpe aktarılmıştır.

8. Tüplerin içindeki sıvı ile eşit hacimde kloroform;izoamilalkol (24;1) ilave edilerek tüpler 15 dakika yavaşça ters düz edilmiştir.

9. Tüpler 15000g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz, yeni bir tüpe aktarılmıştır.

10. DNA'yı çöktürmek için tüplerdeki hacmin 0.6 katı kadar soğuk izopropanol eklenerek tüpler bir gece -20°C'de bekletilmiştir.

11. Sonra tüpler, 15000g'de 15 dakika santrifüj edilerek, santrifüj sonunda süpernatant atılmıştır.

12. Tüplere 500µl, %70'lik etanol ilave edilerek, tekrar 15000g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

13. Tüplerdeki süpernatant atılırak pellet kurumaya bırakılmıştır.

14. Sonra DNA, içinde 2µl RNAaz bulunan 50µl TE (10mM Tris, 1mM EDTA) buffer içerisinde çözülmüştür.

15. DNA miktarı, nanodrop (ACTGene, UVS-99) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda DNA konsantrasyonu 100ng/µl olacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

Sirke analarından aseptik koşullarda 10 g örnek, bilyeli doku parçalayıcı cihazının (Restch MM400, Almanya) kapsülü içerisine tartılmış ve üzerine 3ml saline- EDTA-PVP çözeltisi ilave edilerek 30 MHz frekansda 2 dakika parçalanmıştır. Elde edilen homojenattan 100 µl alınıp 2 ml'lik steril tüplere aktarılmış ve üzerine 500 µl saline-EDTA-PVP çözeltisi eklenmiştir. Ardından sirke örneklerinden direkt DNA izolasyonunda kullanılan protokolün basamakları uygulanarak DNA izolasyonuna devam edilmiştir.

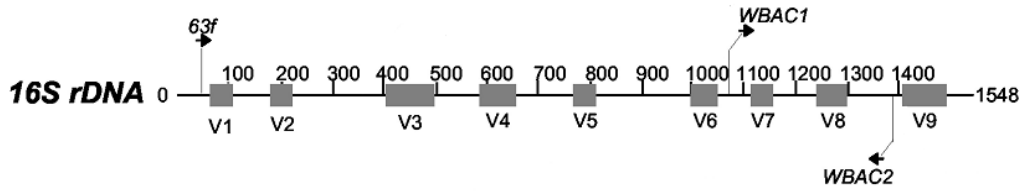
2.2.3. PCR-DGGE Analizi

2.2.3.1. 16S rRNA V7-V8 Bölgelerinin PCR ile Amplifikasyonu

Asetik asit bakterilerinin DGGE ile analizi için pek çok bakteriye spesifik bölgeler içeren 16S rRNA geni üzerindeki V7-V8 bölgeleri, WBAC1-GC ve WBAC2 primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (Tablo 2.1.). WBAC primer setinin 16S rDNA geni üzerindeki konumu Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmiştir. Toplam reaksiyon 50 µl olacak şekilde 25 µl ticari PCR master mix (Qiagen, GmbH, Germany), 18.6 µl dH_2O, 40 µM ileri primer, 20 µM geri primer, 4 µl DNA kullanılmıştır. 16S rRNA' nın V7-V8 bölgelerinin amplifikasyonu için PCR kuşulları cihaza yüklenmiş (Techne TC-5000, ABD) ve optimize edilmiştir (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. V7-V8 bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan primerlerin baz dizilimi.

Oligonükleotid	Dizi (5'–3')	Amplikon uzunlugu	Literatür
İleri pimer WBAC1	5'-GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA-3'	328 bç	[68]
Geri primer WBAC2	5'-CCCGGGAACGTATTCACCGCG-3'		
GC clamp	5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCC GGCCCGCCGCCCCCGCCCC-3'		



Şekil 2.1. 16S rDNA genine göre dizayn edilen WBAC primer setinin şematik olarak gösterimi (*Lactobacillus plantarum*' a göre, Gen Bankası Erişim Numarası, AJ271852) [68].

Tablo 2.3. V7-V8 bölgelerinin amplifikasyonu için uygulanan PCR döngü koşulları

İşlem basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	5dk	1
Denatürasyon	95	1 dk	30
Yapışma	67	30 sn	
Uzama	72	1 dk	
Final uzama	72	5 dk	1

2.2.3.2. DGGE analizi

2.2.3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

% 40 lık akrilamid/bis (37.5:1) hazırlanması: 38.93g akrilamid (Sigma/ A9099) ve 1.07g bis-akrilamid (Sigma/ M7279) tartılmıştır ve dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.45µl'lik filtreden geçirilerek 4 °C'de muhafaza edilmiştir

50X TAE tamponunun hazırlanması: 242g tris base (Sigma/ T6066), 57.1ml glasiyal asetik asit (Merck), 100 ml 0.5 M EDTA (Sigma/ E5134) (pH 8.0), ultra safH_2O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X TAE yürütme tamponunun hazırlanması: 140 ml 50X TAE tamponuna 6860 ml dH_2O ilave edilerek toplam hacim 7.000 ml tamamlanmıştır.

% 10 luk amonyum persulfat (APS) hazırlanması: 0.1g amonyum persülfat (Sigma/ A9164) tartılıp dH_2O ile 1 ml' ye tamamlanmıştır, -20 °C'de muhafaza edilmiş ve düzenli olarak haftalık hazırlanmıştır.

Boyama solüsyonunun hazırlanması: 0.1 g bromfenol blue-xylene cyanol (Sigma/ B3269), 1 x TAE tamponu ile 10 ml'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

2X Jel yükleme boya solüsyonun hazırlanması: 0.5 ml %2'lik bromfenol blue-xylene cyanol (Sigma/ B3269), 7 ml gliserol (Sigma /G5516), 2.5 ml dH_2O ile 10 ml' ye tamamlanmıştır.

% 8 lik % 60 denatürant içeren jelin (yüksek konsantrasyonlu jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 24 ml deiyonize formamid (Merck, 1.09684.1000), 25.2 g üre (Sigma/ U5378) ve 2 ml 50X TAE tamponu dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 15 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

% 8 lik % 30 denatürant içeren jelin (düşük konsantrasyonlu jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 12ml deiyonize formamid, 12.6 g üre ve 2 ml 50X TAE tamponu, dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 15 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

2.2.2.2.1. Denturant Gradient jelin hazırlanması, yürütülmesi ve görüntü alınması:

Yüksek konsantrasyonlu (%60) ve düşük konsantrasyonlu (%30) solüsyonların her birinden 20 ml kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyonlu solüsyona jeli renklendirerek görünürlüğünü sağlamak amacı ile 400 µl, boya solüsyonu ilave edilmiştir. Her iki solüsyona da jelleşmeyi sağlamak amacı ile 14 µl TEMED (Tetrametilendiamin / T7024 Sigma) ve 140 µl % 10'luk APS eklenmiştir.

Gradient jel oluşturmak için DGGE (Dcode Universal Mutation Detection System /BioRad) sisteminin özel jel dökme aparatından faydalanılmıştır. 30 ml'lik enjektörlerden birine %30, diğerine %60 denaturant içeren jel enjektörle çekilerek gradiyenti jel oluşturacak olan aparata yerleştirilmiştir. Denaturant konsantrasyonu jelin altından üstüne doğru azalacak (%60 → %30) şekilde cam plakalar arasına, yaklaşık 10 ml/dak. hızla jel dökülmüş ve ardından kuyucukları oluşturacak olan tarak yerleştirilmiştir. Jelin polimerleşmesi için minimum 2 saat beklenmiştir. Diğer taraftan DGGE tankına 7 litre 1X TAE tampon konulmuş ve 60°C sabit sıcaklığa ulaşıncaya kadar ısıtılmıştır. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki tarak çıkarılarak tanka

yerleştirilmiş ve oluşan kuyucuklar önce 1X TAE tamponla yıkanmıştır. Daha sonra 50 µl PCR ürünleri ve 5 µl jel yükleme boyası karışımı kuyucuklara sırası ile yüklenmiştir. Tampon sıcaklığı 60 ºC'ye ayarlanmış ve sistemin pompası çalıştırılmıştır. Sistem güç kaynağına bağlanarak örneklere önce 150 V'da 4 saat elektrik akımı uygulanmıştır. Elektroforez sonunda tanktan çıkarılan jel 50 µg/ml etidyum bromür (Sigma / E1510) içeren 1X TAE buffer içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra 5 dakika saf su içerisinde bekletilerek yıkanmıştır. Oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (GelDoc XR, BioRad, Hercules CA) görüntülenmiştir.

2.2.3.2.2. DGGE bantlarının jelden alınması, amplifikasyonu, saflaştırılması ve analizi

DGGE jelinde ayrılan bantlar steril pipet ucu ile kesilerek jelden alınmış ve, içerisinde 50 ml steril ultra saf su bulunan 0.2 ml'lik tüplere aktarılmış ve DNA fragmentlerinin suya geçmesi için iki gün 4ºC'de bekletilmiştir. Suya geçen DNA fragmentleri WBAC1-GC ve WBAC2 primerleri kullanılarak, V7-V8 bölgeleri tekrar amplifiye edilmiş ve PCR ürünlerinin DGGE analizi yapılarak bantlar kontrol edilmiştir. Tek tek yürüyen bantlar jelden kesilerek alınmış ve yine 50 µl steril saf su bulunan 0.2 ml'lik tüplere aktarılarak DNA fragmentlerinin suya geçmesi için iki gün 4ºC'de bekletilmiştir. Suya geçen DNA fragmentleri bu kez WBAC1 ve WBAC2 primerleri ile amplifiye edilmiştir. PCR işlemi için 25 µl ticari PCR master mix (Qiagen, GmbH, Germany), 0.8 µl WBAC1 primer, 0.8 µl WBAC2 primer, 4 µl DNA kullanılmış ve toplam hacim, dH_2O (PCR saflığında) ile 50 µl hacime tamamlanmıştır. Tablo 2.2. 'deki PCR termal döngü şartları uygulanmıştır. DGGE bantlarından elde edilen PCR ürünleri tekrar kesilmiş ve içerisinde 30 µl steril dH_2O bulunan tüplere aktarılmıştır. Tekrar iki gün 4ºC'de bekletilen tüplerden, WBAC1 ve WBAC2 primerleri kullanılarak, aynı termal döngü şartlarında, V7-V8 bölgeleri tekrar amplifiye edilmiştir. PCR ürünleri, RefGen Biyoteknoloji LTD. ŞTİ'ne DNA dizi analizi için gönderilmiştir. Dizi analizi Sonuçları ise NCBI (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi), BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) algoritması kullanılarak, internet erişimi vasıtasıyla analiz edilmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Sirke ve sirke anası örneklerinin pH değerleri

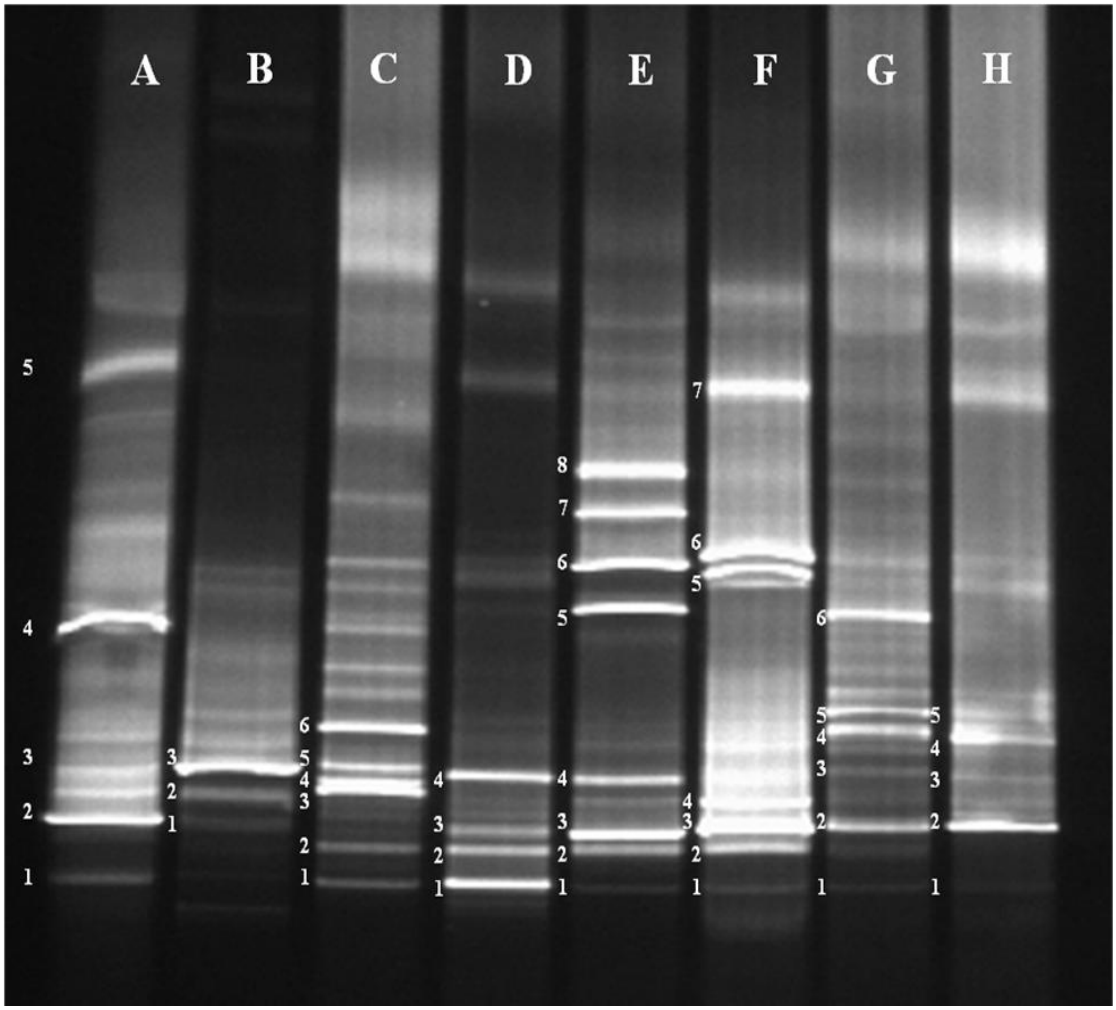
Bu çalışmada 3 farklı üreticiden temin edilen toplam, 4 sirke ve 4 sirke anası örneğinde pH analizi yapılmış ve sonuçlar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Sirke ve sirke anası örneklerinin pH analizi sonuçları

Örnek	RE (A)	REA (B)	RÜ (C)	RÜA (D)	ZÜ (E)	ZÜA (F)	SE(G)	SEA (H)
pH	3.25	3.35	3.36	3.40	3.35	3.39	2.97	3.41

3.2. Sirke ve sirke anası örneklerinin PCR-DGGE analiz sonuçları

Sirke ve sirke anası örneklerinden yapılan direkt genomik DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'lar kullanılarak, çoğaltılan 16S rDNA'nın V7-V8 bölgelerinden elde edilen DNA fragmentleri DGGE analizi ile belirlenmiştir. Analiz edilen örneklere ait DGGE jel profili Şekil 3.1.'de verilirken, tanımlanan mikroorganizmalar ise Tablo 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Sirke ve sirke anası örneklerine ait bakteriyel 16S rDNA geni V7-V8 bölgesinin DGGE profili (A1, C1, D1, E1, F1, G1, H1; *Gluconacetobacter h*ansenii, A2, A5, B1, D3, G2, H2; *Gluconacetobacter europaeus*, E3, F3; *Gluconacetobacter europaeus/ Gluconacetobacter xylinus*, E2, F2, F4, F5, F6; G*luconacetobacter xylinus*, F7; *Gluconacetobacter* sp., A3, B3, D4, E4, G3, H3; *Acetobacter tropicalis/ Acetobacter indonesiensis*, A4; *Lactobacillus ghanensis*, B2; Gluconacetobacter diazotrophicus, C2, D2; *Gluconacetobacter intermedius*, E5, E6, E7, E8; *Oenococcus oeni*, C5*; Acetobacter nitrogenifigens/ Acetobacter aceti, C6, G4, H4; Acetobacter ghanensis/ Acetobacter syzygii*, G5, H5; *Lactobacillus* sp., G6; *Lactobacillus mali*, C3, C4; Kültüre alınamamış asetik asit bakterisi).

Tablo 3.2. Kültür Bağımsız Teknikle 16S rDNA Gen Bölgesine Göre Tanımlanan Bakteriler

Erişim No.[a]	**Tür**	**% Eşleşme**
AB681098.1	*Gluconacetobacter xylinus*	100
JF793989.1	*Gluconacetobacter hansenii*	98
HQ400672.1	*Gluconacetobacter europaeus*	99
GU808422.1	*Lactobacillus* sp.	98
FJ157230.1	*Lactobacillus mali*	97
DQ523496.1	*Acetobacter syzygii*	98
AB645730.1	*Gluconacetobacter intermedius*	99
JF794003.1	*Gluconacetobacter oboediens*	97
AB598742.1	*Gluconacetobacter sucrofermentans*	97
AB682235.1	*Acetobacter nitrogenifigens / Acetobacter aceti*	98
AB645732.1	*Gluconacetobacter rhaeticus / Gluconacetobacter oboediens*	97
JQ951092.1	*Oenococcus oeni*	98
AB680037.1	*Acetobacter pasteurianus*	97
AB682084.1	*Acetobacter lovaniensis*	98
AB645736.1	*Gluconacetobacter swingsii*	97
AB690235.1	*Lactobacillus ghanensis*	97

a- NCBI tarafından kullanılmakta olan Gen Bankası için her canlı organizmanın sahip olduğu her hangi bir gen bölgesi için kullanılan “accession number” olarak bilinen numaradır.

4.BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Kayseri ve Bolu-Düzce'de geleneksel yöntemle sirke üretimi yapan 3 farklı üreticiden toplamda 4 adet sirke (iki elma sirkesi, iki de üzüm sirkesi) ve 4 adet sirke anasını (iki elma sirke anası, iki de üzüm sirke anası) örneğinin bakteriyel florası kültürel ve kültürel olmayan moleküler tekniklerle analiz edilerek tanımlanmıştır. Bu amaçla bir taraftan sirke ve sirke anası örneklerinden direkt DNA izole edielerek kültürel olmayan PCR-DGGE yöntemi ile analiz edilmiştir. Diğer taraftan asetik asit bakterilerine özel besiyerleri kullanılarak ekim yapılmış, ekim sonunda gelişen mikroorganizmalar şansa ve koloni morfolojilerine bağlı olarak seçilmiş ve saflaştırılmış, ardından bu mikroorganizmaların fenotipik ve genotipik testler kullanılarak tiplendirilmesi yapılmıştır. Ancak kullanılan fenotipik testler tiplendirme için yetersiz kalmıştır. Yine de mikroorganizmaların, hangi substratı spesifik olarak metabolize edebildiği belirlenebilmiştir. Bunun dışında Tm analizi, $(GTG)_5$-rep- PCR ve DNA dizi analizinin kombine edildiği moleküler teknikler kullanılarak sirke mikroflorasından izole edilen bakteriyel izolatlar tipledirilmiş ve tanımlanmıştır.

4.1. Sirke ve sirke anası örneklerinin PCR-DGGE Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genetik parmak izi teknikleri belirli bir bölgedeki mikroorganizmaların genetik çeşitliliğini gösterebilmektedir. DGGE tekniği, kültürel olmayan genetik parmak izi teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Gıda numunelerinden elde edilen DGGE profillerinin analizi sayesinde bakteriyel türlerin tanımlanmasının mümkün oluşu, gıda mikrobiyolojisi alanındaki analiz metotlarına önemli bir yenilik getirmiştir [Ercolini, 2004].

Literatüdeki çalışmalara bakıldığında bu teknik ile bakterilerin 16S rRNA üzerindeki V1, V3 ve V7-V8 bölgelerinin, bakterilerde gösterdikleri farklılıklara göre mikrobiyal

çeşitliliği karakterize etmek için geliştirilmiş ve geniş bir kullanım alanı bulmuştur [Lopandic, 2006; Lopez, 2003].

Farklı yöntemlerle sirke veya sirke üretimnde kullanılan meyvelerin mikroflorasının belirlendiği bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda sirkelerde bulunan mikroorganizmalar geleneksel metotlarla tanımlanmaya çalışılmıştır [Hanmoungjai et. al., 2007].

Ancak, DNA ve PCR temelli genomik parmak izi metotlarının, mikroorganizmaların karakterizasyonu ve tiplendilirmesi için hızlı, güvenilir ve basit yöntemler olduğu açıktır. Bu çalışmada, sirke ve sirke analarından direkt izole edilen, genomik DNA'lar kullanılarak PCR-DGGE sistemi ile analiz edilmiştir. Bununla birlikte PCR-DGGE analiz sonuçları, DNA dizi analizi sonuçları ile desteklenmiştir. Sirke ve sirke analarının DNA'ları kullanılarak, ürünün üretiminde kültür olarak kullanılan biyokütlenin bakteriyel florası ile, son üründe mevcut kalan bakteriyel floranın karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Sirke ve sirke analarından direkt DNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilen PCR-DGGE analizi sonucnda farklı türlere ait 13 farklı bant tanımlanmıştır. Bunlar: *Gluconacetobacter hansenii, Gluconacetobacter europaeus, Gluconacetobacter xylinus, Gluconacetobacter europaeus/Gluconacetobacter xylinus, Gluconacetobacter intermedius, Gluconacetobacter* sp., *Acetobacter tropicalis/ Acetobacter indenesiensis, Acetobacter nitrogenifigens/ Acetobacter aceti, Acetobacter ghanensis/ Acetobacter syzygii, Oenococcus oeni, Lactobacillus ghanensis, Lactobacillus mali, Lactobacillus* sp., dır.

Bu çalışmada yapılan DGGE analizleri sonucunda *Oenococcus oeni* ve *Gluconacetobacter xylinus,* bakterilerine ait çoklu bantlara rastlanılmıştır. Aynı şekilde literatürde de farklı bakteriler tarafından DGGE jelinde çoklu bantların oluşumuna rastlanmıştır, bu durum analizi yapılan bakterilerin ribozomal genlerin çoklu kopyasına sahip oldukları ve bu gen kopyalarının her birinin farklı evrimleşmesinden kaynaklandığı ve bu sorunun üstesinden gelmek için hücre içerisinde tek kopyası bulunan ve heterojenlik göstermeyen genlere (*rpoB* gibi) spesifik primerlerin kullanılması tavsiye edilmiştir. [Dahllöf, 2000]. *Gluconacetobacter hansenii* türüne ait bantlar DGGE jelinde çok belirgin bir şekilde ayırt edilebilmişitr. *Gluconacetobacter*

europaeus ve *Gluconacetobacter xylinus, Acetobacter nitrogenifigens/Acetobacter aceti* ve *Acetobacter tropicalis/ Acetobacter indonesiensis*'e ait bantların Gradient jelde eşit mesafelerde yürüyerek birbirlerinden net bir şekilde ayrılmadığı gözlenmiştir. Bu durum bu çalışmada PCR-DGGE analizinde hedef alınan V6-V8 bölgesinin bu türlerde aynı nükleotid dizine sahip olmasından ileri gelmektedir. Bu durum daha önce yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir. Örneğin;

De Vero *et. al.,* PCR-DGGE analizi için referans asetik asit bakteri suşları kullanarak, metod optimizasyonu amacıyla yaptıkları bir çalışmada *Gluconacetobacter hansenii, Ga. azotocaptans, Acetobacter malorum, Ga. diazotrophicus*' a ait bantları belirgin bir şekilde ayırt etmişlerdir. Analizde kullanılan DGGE koşullarında (%30-%60 gradientte) *Ga. xylinus* ve *Ga. europaeus* birbirinin aynı bantlar vermiştir. Yine aynı şekilde *A. pasteurianus* ve *A. aceti, Gluconobacter oxydans* ve *Gluconobacter frauterii* birbirine çok yakın amplikonlar vermiştir [De vero, 2006].

Bu tez çalışmasında da olduğu gibi, literatürdeki PCR-DGGE analizine dayanarak yapılan bir çok çalışmada, farklı türlere ait bantların, elektroforez sırasında birlikte göç ettiği gözlenmiştir. Bunun nedeni ise bakterilerin 16S rDNA gen dizilerinin birbirlerine benzer olup, çok büyük farklılıklara sahip olmamasından kaynaklanmaktadır [Ercolini, 2001; Van beek, 2002; Millet and Lonvaud-funel, 2000].

Yine, De Vero *et. al*. PCR-DGGE analizi ile yaptıkları başka bir çalışmada bir önceki çalışmayı teyid eden sonuçlar almışlardır, ancak bu çalışmada da kullanıldığı gibi, kendi çalışmalarında da kullandıkları primerin orijinal olarak *Lactobacillus plantarum*'un 16S rDNA dizisine göre dizayn edildiği ve bu primer ile *Acetobacter aceti* ve alt gruplarının %90'nın PCR ürünü verdiğini, Gram-pozitif bakterilerin ise %75'in PCR ürünü verdiğini belirtmişlerdir [Lopez, 2003; De Vero, 2006].

Bunların dışında, literatürde yapılan çalışmara bakıldığında, bu çalışmadan farklı olarak, De vero et. al. yaptıkları çalışmada 3 farklı balzamik sirke örneği kullanarak yaptıkları DGGE analizi sonucunda, *Gluconacetobacter hansenii, Ga. azotocaptans, Acetobacter malorum, Ga. diazotrophicus*' a ait bantları tanımlamışlardır. Bunların dışında birbirlerine çok yakın göç etmiş bile olsalar, *Acetobacter pasteurianus, Acetobacter aceti, Gluconobacter frauterii, Gluconobacter oxydans, Gluconacetobacter*

liquefaciens, Gluconacetobacter sacchari' ye ait bantları tanımlamışlardır [De Vero, 2006].

Haruta et. al. ise, pirinç sirkesinin bakteriyel florasını tespit etmek amacıyla, yaptıkları DGGE analizi sonucunda, *Lactobacillus acetotolerans* ve *Acetobacter pasteurianus*'a ait bantları tanımlamışlardır [Haruta et. al., 2006].

Bu çalışmada, sirke ve sirke analarına ait DGGE profilleri karşılaştırıldığında ortak bantlara rastlanılmıştır. DGGE jelindeki A, C, E, G örneklerinden elde edilen profiller sirkelere ait iken, B, D, F, H örneklerinden elde edilen profiller ise sirke analarına aittir. Her sirke örneği ile yanyana, aynı örneğin anası analiz edilmiştir. Buna göre DGGE jelindeki A ve B numunelerine ait profillerde *Gluconacetobacter europaeus* ve *Acetobacter tropicalis/Acetobacter indonesiensis'e*, C ve D numunelerine ait profillerde, *Gluconacetobacter hansenii* ve *Gluconacetobacter intermedius*'a, E ve F numunelerine ait profillerde, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter xylinus* ve *Gluconacetobacter europaeus/Gluconacetobacter xylinus*'a, G ve H numunelerine ait profillerde ise, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Acetobacter tropicalis/Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter ghanensis/ Acetobacter syzygii* ve *Lactobacillus* sp.'ye ait bantlar bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, üreticilerin beyanlarına göre temin edilen sirke ve sirke anaları arasında tanımlanan bakteriler açısından uyumluluk olduğu tespit edilmiştir. Bu yönüyle, yapılan çalışma literatürde bir ilk olmuştur.

4.2. Tez çalışmasında elde edilen bulgular doğrultusunda yapılan öneriler

1. Kültür bağımsız olarak yapılan, PCR-DGGE analizi her ne kadar diğer mikroorganizmaların analizinde kendini çok iyi bir şekilde kanıtlamış olsa bile, 16S rDNA genine dayalı yapılan PCR-DGGE analizlerinde, özellikler V7-V8 bölgelerine dayanan analizler yapıldığında(asetik asit bakteri için), her ne kadar bakteriler tür grupları veya kesin tür olarak tanımlanabilse de bazı bakteriler tam olarak tanımlanamamaktadır. Bu nedenle Asetik Asit bakterilerine ait mikroflorayı DGGE ile daha yüksek kesinlikte kültür bağımsız olarak tespit edebilmek için, bu bakterilere spesifik, analiz edilecek bakteri türleri arasında, daha düşük benzerlikte PCR ürünü alınmasını sağlayan, dolayısıyla gradient jelde daha iyi ayrılmış bantlar alınmasını

sağlayan, başka gen bölgelerine (16S-23S arası boşluk bölge gibi.) özgün ve türden türe farklılık sağlayabilecek primerler dizayn edilmelidir.

2. Kültür bağımlı teknikle yapılan analizlerde ise, bu çalışmada yapılan fenotipik testler, izolatların tür bazında ayrımı ve tanımlanması için yetersiz kalmıştır. Ancak Real-time PCR ile Tm analizi yapılarak, izolatların erime sıcaklığına göre sıralandırlması, izolatların tanımlanması için büyük bir avantaj sağlamıştır. Bu nedenle, sirkedeki asetik asit bakterilerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanabilmesi için genotipik testlerin kullanımı tavsiye etmekteyiz.

Ayrıca kültür bağımsız teknikle, sirke ortamında canlılığını sürdürebilen ancak, klasik mikrobiyolojik sayım ve kültüvasyon teknikleriyle sayımı ve izolasyonu mümkün olmayan Asetik asit bakterilerinin tanımlanması mümkündür. Bunula birlikte, daha güvenilir sonuçlar alabilmek için, kültür bağımsız teknikler ile birlikte, kültür bağımlı tekniklerin kullanımını tavsiye etmekteyiz. Kültür bağımı bir teknik olan $(GTG)_5$-rep-PCR tekniğinin, literatürde de belirtildiği gibi, daha az DNA parmak izi verebildiği, farklı türden olan bakterilerin aynı DNA parmak izi profilini verebildiği söylenmiş, ancak bu sıkıntının giderilmesi için ERIC-PCR tekniğinin kullanılması tavsiye edilmiştir [Vegas et. al., 2010].

Bu çalışmada ise $(GTG)_5$-rep-PCR tekniğinin yetersizliğini elimine etmek için, her izolatın DNA'sı ITS bölgesine göre real-time PCR ile çoğaltılmış ve Tm analizi yapılmıştır. İzolatlar, $(GTG)_5$-rep-PCR tekniği ile analiz edilmeden önce Tm değerlerine göre gruplandırlmıştır. Bu sayede $(GTG)_5$-rep-PCR tekniğinin yetersizliği elimine edilmiştir. $(GTG)_5$-rep-PCR sonucunda elde edilen DNA parmak izleri gruplandırılarak, her grubu temsil edecek en az üç izolat'a ait DNA'lar kullanılarak, ITS bölgesine göre PCR ile çoğaltılmış ve DNA dizi analizi yapılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada kullandığımız teknikler ile ülkemizde geleneksel ve spontan fermantasyon teknikleri ile üretilen sirkelerdeki asetik asit bakteri, kültür bağımlı ve kültür bağımsız teknikler bir arada kullanılarak detaylı olarak tanımlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aktan, N., Kalkan, H. (1998). Sirke Teknolojisi, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 86s

2. Ünlütürk, A., Turantaş. F., (2003). Gıda mikrobiyolojisi, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, 430s

3. Adams, M.R., (1985). Vinegar. In Microbiology of Fermented Foods, p 1-45, (Ed.; Wood, B.J.) Elsevier Applied Science Publishers: New York.

4. Anonim 2000. Proposed Draft Revised Regional Standard for Vinegar. **CL 2000/18-EURO**. Joint FAO/WHO Food Standards Programme – FAO Viale delle Terme di Caracalla 00100 Rome, Italy

5. Shimoji, Y., Tamura, Y., Nakamura, Y., Nanda, K. Nishidai, S., Nishikawa, Y., Ishihara, N., Uenakai, K., Ohigashi, H., (2002). Isolation of identification of DPPH radical scavenging compounds in Kurosu (Japanese unpolished rice vinegar). **Journal of Agricultural Food Chemistry,** 50: 6501-6503.

6. Tan, S.C., 2005. Vinegar Fermentation. Louisiana, Yüksek lisans tezi, 101s. Lafayette.

7. Casale, M., Abajo , M.J.S., Saiz, J.M.G., Pizarro, C., Forina, M., 2006. Study of the aging and oxidation prosesses of vinegar samples from different origins during storage by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, 557: 360-366.

8. Cleenwerck, I., de Vos, P., (2008). Polyfasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. **International Journal of Food Microbiology**, (125): 2-14.

9. Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies for Detection of Microbes in Food**. International Journal of Microbiological Methods**, (56): 297-314

10. Temmerman,R., Huys, G., Swings, J., (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. **Trens in Food Science & Technology**, (15): 348-359.

11. Tekeli, A., Ustaçelebi, Ş., 2006. PCR Amplifikasyon temelli mikrobiyal tiplendirme. Moleküler Mikrobiyoloji: tanı prensipleri ve uygulamaları.

12. Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G., 2000. Development of a rapid method for the identification of Lactobacillus spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel eletrophoresis**. Letters in Applied Microbiology**, 30: 126–129.

13. Muyzer, G., Smalla, K., (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek, 73**, (1): 127-141

14. Gonzalez, A., Mas, A., (2011). Differantiation of acetic acid bacteria based on sequence analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer equences. **International Journal of Fodd Microbiology**, (147): 217-222.

15. Stasiak, L., Blazejak, S., 2009. Acetic Acid Bacteria- perpectives of application in biotechnology- a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 59**, (1): 17-23.

16. Adams, S.L., Nielsen, G.V., 1963. Beverage from honey and process for making it. US patent 3 100 706, 1963.

17. Sievers, M., Lorenzo, A., Gianotti, S., Boesch, C., Teuber, M. (1996). 16e 23S ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and anti-termination sequences. **FEMS Microbiology Letters**, (142): 43-48.

18. Akbaş, M., Cabaroğlu, T., 2010.Ülkemizde üretilen Bazı Üzüm Sirkelerinin Bileşimleri ve Gıda Mevzuatına Uygunlukları Üzerine bir Araştırma. **Gıda Teknolojisi Derneği Dergisi**, (35), 3: 183-188.

19. Guillamon, J.M., Mas, A., 2011. Acetic Acid Bacteria, pp; 227-256, In: Carrascosa, A.V., Munoz, R., Gonzalez, R. (Eds.), Molecular Wine Microbiology, Academic Press, San Diego, USA.

20. Anonim 2006. Vinegar Institute, Market Trends. (web adresi: www.versatilevinegar.org/markettrends.html) , Giriş Tarihi, Eylül, 2011

21. Anonim, (1995). Development Education Exchange Paper. FAO, Rome.

22. Solieri, L., Giudici, P., 2009. Vinegars of the world, pp 1-16, In: Vinegars of the World, Springer, Germany.

23. Türker,İ., (1963). Kayseri-Niğde Bölgesi Şarapçılığındaki Gelişmeler ve Şarapları Üzerinde Araştırmlar. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 121, A.Ü. Basımevi, Ankara

24. Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., et al. (2001). Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentations of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 986-990.

25. Bamforth, C.W., (2005). Food, Fermentation and Microorganisms. Blackwell Publishing Company, UK, pp: 154-159.

26. Ünal, E., 2007. Dimrit Üziminden Değişik Yöntemlerle Sirke Üretimi Üzerinde bir Araştırma. Yüksek lisans tezi, 60s.Çukurova Üniversitesi, Adana.

27. Presscott, S.C., Dunn, C.G., (1959). Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Company, Inc., United States of America, pp945.

28. Yamada, Y., Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, (125): 15-24.

29. Drysdale, G.S., Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, (2): 143-154.

30. Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Taniguchi, M.,Toyama, H., Lotong, N., et al. (1997). Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful

for vinegar fermentation at higher temperatures. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, (61): 138-145.

31. Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K., Ameyama, M., (1978). Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from Acetobacter aceti. **Agricultural and Biological Chemisrty**, (42): 2331- 2340.

32. De Ley, J. (1959). On the formation of acetoin by Acetobacter. **Journal of General Microbiology**, (21): 352-365.

33. Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, M., Stephan, M.P., et al. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. , a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, (39): 361-364.

34. Dutta, D., Gachhui, R. (2007). Nitrogen-fixing and cellulose-producing Gluconacetobacter kombuchae sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionaty Microbiology**, (57): 35 -357.

35. De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. (1984). Family VI. Acetobacteriaceaea. In N. R. Krieg, & J. C. Holt (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1 (p. 267-278). Baltimore, MD: Williams & Wilkins.

36. Belly, R. T., & Claus, G. W. (1972). Effect of amino acids on the growth of Acetobacter suboxydans**. Archives of Mikrobiology**, (83): 237-245.

37. Maestre, O., Santos-Duenas, I. M., Peinado, R., Jimenez-Ot, C., Garcia-Garcıa, I., Mauricio, J. C. (2008). Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a fully automatic pilot acetator. **Process Biochemistry**, (43): 803-807.

38. Valero, E., Berlanga, T.M., Roldan, P.M., Jimenez, C., Garcia, I., Mauricio, J.C., (2005). Free amino acids and volatile compounds in vinegars obtained from different types of substrate. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, (85): 603-608.

39. Buchanan, R. E., & Gibbons, N. E. (1974). In Bergey's manual of determinative bacteriology (8th ed.). Baltimore, MD: Williams & Wilkins.

40. Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., Trüper, H. G. (1988).Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, (38): 321-325.

41. Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., Komogata, K., (1989). *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacterioogy**, (39): 50-55.

42. Yamada, Y., Hoshino, K. I., & Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, (61): 1244-1251.

43. Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov. , an unusual acetic acid bacterium in the α-Proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, (50): 823-829.

44. Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., et al. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov. sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α-Proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, (52): 813-818.

45. Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S., Fudou, R. (2004). Saccharibacter floricola gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, (54): 2263-2267.

46. Loganathan, P., Nair, S. (2004). *Swaminathania salitorans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, (54): 1185-1190.

47. Yukphan, P., Malimas, T., Potachareon, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., Yamada, Y., (2005). Neoasaia chiangmaiensis gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α-protobacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, 51: 301-311.

48. Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Zelazny, A. M., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Kupko, J. J., et al. (2006). Genome sequence analysis of the emerging human pathogenic acetic acid bacterium Granulibacter bethesdensis. **Journal of Bacteriology**, (189): 8727-8736.

49. Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., et al. (2008). *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov, a new osmotolerant acetic acid bacterium in the a- Proteobacteria. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, (72): 672 e676.

50. Cleenwerck, I., Vandermeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J., (2002). Re-examination of the genus Acetobacter, with descriptions of Acetobacter cerevisiae sp. nov. And Acetobacter malorum sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, (52): 1551-1558.

51. Carr, J. G., Passmore, S.M., (1979). Methods for identifying acetic acid bacteria, p. 33-47 In (Eds.; F. A. Skinner, D.W., Lovelock), Identification methods for microbiologists. London, UK: Academic Press.

52. Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamon, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, (50): 1981-1987.

53. Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A. (2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, (36): 307-314.

54. Millet, V., Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorgamisms during storage. **Letters in Applied Microbiology**, (30): 126-141.

55. Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamon, J.M. (2006). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, (254):123-128.

56. Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. **International Journal of Food Microbiology**, (126): 245-249.

57. Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., (1998). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. **International journal of Systematic Bacteriology**, (48): 935-940.

58. Trcek, J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. **Systematic and Applied Microbiology**, (28): 735-745.

59. Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K. I. (1985). *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar withhigh acidity. **Journal of General and Applied Microbiology**, (31): 475-490.

60. Poblet, M., Rozes, N., Guillamon, J. M., Mas, A. (2000). Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. **Letters in Applied Microbiology**, (31): 63-67.

61. Prieto, C., Jara, C., Mas, A., Romero, J. (2007). Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, (115): 348-355.

62. Giudici, P., Gullo, M., Pulvirenti, A., Solieri, L., De Vero, L. (2003). Microflora yla tecnologıa de produccion del vinagre balsamico tradicional. In A. Mas,

J. M. Guillamon (Eds.), Primeras jornadas en I +D+i en la elaboracio´ n de vinagre de vino (pp. 59-70). Tarragona, Spain: Servei de publicacions.

63. Trcek, J., Teuber, M., (2002). Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of acetic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, (208): 69-75

64. Gullo, M., Caggia, C., de Vero, L., Giudici, P. (2006). Characterisation of acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. **International Journal of Food Microbiology**, 106, 209-212.

65. Jara, C. (2009). Desarrollo de metodos de biologia molecular para el analisis directo de bacterias aceticas de vinagre. Tarragona, Spain: Doctoral thesis, Universidad Rovira i Virgili.

66. Wilson, I.G., (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Applied and Environmental Microbiology, 63**, (10): 3741-3751.

67. Andorra, I., Landi, S., Mas, A., Guillamon, J.M., Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of enological practices on microbial populations using culture-independent techniques. **Food Microbiology**, (25): 849-856.

68. Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., et al. (2003). Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, (69): 6801-6807.

69. Gullo, M., de Vero, L., & Giudici, P. (2009). Succession of selected strains of Acetobacter pasteurianus and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. **Applied and Environmental Microbiology**, (75): 2585-2589

70. Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., et al. (2006). Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermenta-tion of rice vinegar assessed by PCR-mediated dena-turing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, (109): 79-89.

71. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, R. J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, (19): 6823-6831.

72. Lupski, J.R., Weinstock, G.M., (1992). Short, Interspersed Repetitive DNA sequences in Prokaryotic Genomes. **Journal of Bacteriology, 174**, (14): 4525-4529.

73. Woods, C.R., Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., (1993). Whole-Cell Repetitive Element Sequence-Based Polymerase Chain Reaction Allows Rapid Assesment of Clonal Relationships of Bacterial Isolates. **Journal of Clinical Microbiology, 31**, (7): 1927-1931.

74. Camu, N., de Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I.,Vandamme, P., Takrama, J. S., et al. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, (73):1809-1824.

75. Vegas, C., Mateo, E., Gonzalez, A., Jara, C., Guillamon, J.M., Poblet, M., Torija, M.J., Mas, A., (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production**. International Journal of Food Microbiology**, 138: 130-136.

76. Hanmoungjai, W., chukeatirote, E., Pathom-aree, W., Yamada, Y., Lumyoung, S., (2007). Identification of Acidotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated from Thailand Sources. **Research Journal of Microbiology** 2, (2): 194-197.

77. De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., &Giudici, P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. **Food Microbiology**, (23): 809-813.

78. Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., (2001). Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in

denaturing gradient gel electrophoresis. **Current Microbiology**, (42): 199-202.

79. Van beek, S., Priest, F.G., (2002). Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermantation: a polyphasic study. **Applied and Environmental Microbiology**, (68): 297-305.

80. Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., et al. (2006). Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermenta-tion of rice vinegar assessed by PCR-mediated dena-turing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, (109): 79-89.

81. Wu, J.J., Ma, Y.K., Zhang, F.F., Chen, F.S., (2012). Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar. **Food Microbiology**, (30): 289-297.

82. Woo, P.C.Y., Fung, A.M.Y., Lau, S.K.P., Yuen, K., (2002). Identification by 16S rRNA Gene Sequencing of Lactobacillus salivarus Bacteremic Cholecystitis. **Journal of Clinical Microbiology, 40,** (1): 265-267.

83. Dahllöf, I.,Baillie, H., Kjelleberg, S., (2000). rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, (8): 3376-3380.