

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

EV YAPIMI SİRKELELERDEN VE TAZE KAYISILARDAN
ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,
MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE TEKNOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda BÜYÜKDUMAN

İstanbul
Ağustos-2021

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

EV YAPIMI SİRKELELERDEN VE TAZE KAYISILARDAN
ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER
İDENTİFİKASYONU VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda BÜYÜKDUMAN

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

İstanbul

Ağustos-2021

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

Üye Prof. Dr. Hasan YETİM

Üye Prof. Dr. İsmet ÖZTÜRK

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Metin TOPRAK

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Ev Yapımı Sirkelerden ve Taze Kayıslardan Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler İdentifikasyonu ve Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Eda BÜYÜKDUMAN

ÖN SÖZ

Tezimin belirlenmesinde, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında bilgisini ve desteğini esirgemeyen, birçok araştırma çalışmasında fikir ayrıca deneyim sahibi ve bursiyeri olduğum değerli tez danışmanım Dr. ögr. üyesi Banu METİN'e, araştırma çalışmalarına katılmama vesile olan ayrıca manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Hasan YETİM'e, ayrıca eğitim alanında bize kattığı bilgi ve deneyimlerinden dolayı değerli Prof. Dr. Bülent NAZLI ve Dr. ögr. üyesi Osman ARSLAN hocalarıma, ihtiyaç duyduğumda deneyimlerini benimle paylaşan Arg. gör. H.Ebrar KIRTIL'a, lisans ve yüksek lisans hayatımda bana katkısı olan değerli akademisyen hocalarıma, laboratuvar çalışmalarım sırasında dostluk kardeşlik nedir hissettiren çalışma arkadaşım Ayşegül KAHRAMAN'a; tezimde bulunan şekillerin çizimindeki değerli katkısından ötürü biricik kardeşim Erdem BÜYÜKDUMAN'a ve en büyük teşekkürü hayatımın her alanı boyunca her koşulda olduğu gibi bu tez sürecinde de benden desteğini esirgemeyen sevgili aileme bir borç bilirim. 1190314 no'lu proje kodu ile proje bursiyeri olarak destek aldığım TÜBİTAK kurumuna ve tezimi destekleyen BAP-1000-42 no'lu projesi için İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi'ne ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Tezi güzel bir şekilde sonlandırdığı için Allah'a hamdolsun.

Eda BÜYÜKDUMAN
İstanbul-2021

ÖZET

EV YAPIMI SİRKELEERDEN VE TAZE KAYISILARDAN ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

Ağustos, 2021 - 100 Sayfa

Doğada meyve ve bitki yüzeylerinde bulunan asetik asit bakterileri, şeker alkollerini, şekeri ve etanolü oksitleyerek sirke ve kombucha çayı gibi fermente ürünlerin üretiminde rol oynarlar. Yapılan bu çalışmada, meyve sirkeleri ve Malatya kayısılarından asetik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler identifikasyonu ve bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Hacıhaliloğlu ve Hasanbey Malatya kayısı çeşitleri ile çeşitli meyveler kullanılarak (portakal, elma, ahlat armudu, erik, beyaz üzüm ve kırmızı üzüm) üretilen sirkeler bakteri izolasyonu için kullanılmıştır. AAM (acetic acid medium) ve GYC (glikoz yeast extract calcium carbonate agar) besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda 63 izolat elde edilmiştir. Moleküler tanımlama için izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar (GTG)₅ rep-PCR parmak izi analizinde kullanılmıştır. Aynı parmak izi görüntüsünü veren izolatlar gruplanmış, her grup içerisinde seçilen izolatların, 16S rRNA ve/veya 16S- 23S rRNA ITS bölgeleri PCR ile çoğaltılıp dizilenmiştir. Dizilim analizi sonuçlarına göre izole edilen 63 suşun 19 tanesinin asetik asit bakterisi ve 44 tanesinin ise laktik asit bakterisi olduğu gözlenmiştir. Kayısıda *Gluconobacter cerinus* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri gözlenirken, sirkelerden *Acetobacter syzgiei*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter* sp., *Gluconobacter* sp., *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* ve *Leu. mesenteroides* türleri izole edilmiştir. Her iki kayısı cinsinde de *G. cerinus* ve *Leu. mesenteroides* türlerinin gözlenmesi bu türlerin Malatya kayısı mikrobiyotasının önemli üyeleri olduğuna işaret etmektedir. Sirkelerden izole edilen *Gluconobacter* sp. ELS3, ELS4, ELS5 ve

Komagataeibacter sp. GUS3 izolatları, şimdiye kadar tanımlanmış tip suşlardan farklılık gösterdiğinden bunlar yeni tür olma potansiyeli taşımaktadır. Elde edilen ve tanımlanan asetik asit bakterilerinin sıcaklık toleransları 30°C, 35°C ve 38°C’de, alkole dayanıklılıkları ise % 4, % 6, % 8 ve % 10 etanol içeren GYEC (glukoz maya ekstraktı kalsiyum karbonat agar) test edilmiştir. İzolatlardan 38°C’de üreyebilen olmazken, 19 suşun sadece 8’inin 35°C’de gelişebildiği gözlenmiştir. Kayısı izolatlarının etanole dayanıklılıklığı % 4-6 arasında iken, sirke izolatlarının % 6-8 arasında olduğu belirlenmiştir. İzolatlar Hestrin ve Schramm (HS) besiyerinde selüloz üretimi açısından taranmış, bir izolatın, *Komagataeibacter* sp. GUS3, selüloz ürettiği gözlenmiştir. Bu izolatın selüloz üretimi 26-34°C sıcaklık aralığında HS besiyerinde iki değişik pH değeri kullanılarak (pH 5 ve pH 6) incelenmiş; istatistiksel bir farklılık olmamakla birlikte, en yüksek selüloz üretimi 28°C ve pH 6 koşullarında (1,644±0,4016 g/L) gözlenmiştir. Sonuçlar *Komagataeibacter* sp. GUS3’ün bakteriyel selüloz üretiminde kullanılma potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Asetik asit bakterisi, sirke, Malatya kayısı, *Komagataeibacter*, bakteriyel selüloz

ABSTRACT

**ISOLATION, MOLECULAR IDENTIFICATION AND
DETERMINATION OF TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF
ACETIC ACID BACTERIA FROM HOME-MADE VINEGAR AND
FRESH APRICOT**

Eda BÜYÜKDUMAN

Master, Food Engineering

Thesis Advisor: Asist. Prof. Dr. Banu METİN

August, 2021 - 100 Pages

Acetic acid bacteria found on fruit and plant surfaces in nature play a central role in the production of fermented products such as vinegar and kombucha, by oxidizing sugar alcohols, sugar and ethanol. In this study, it was aimed to isolate, molecularly identify and determine some technological properties of acetic acid bacteria from fruit vinegars and Malatya apricot. For this purpose, Malatya apricot varieties, Hacıhaliloğlu and Hasanbey and vinegar samples produced using various fruits (orange, apple, pear, plum, white grape and red grape) were used for bacterial isolation. As a result of cultivation on AAM (acetic acid medium) and GYC (glucose yeast extract calcium carbonate agar) media, 63 isolates were obtained. For molecular identification, DNA of the isolates was extracted and the obtained DNAs were used in (GTG)₅ rep-PCR fingerprinting analysis. The isolates showing the same fingerprinting pattern were grouped, and the 16S rRNA and/or 16S-23S rRNA ITS regions of the selected isolates from each group were PCR amplified and sequenced. According to the results of the sequencing analysis, 19 of the 63 strains were acetic acid bacteria and 44 were lactic acid bacteria. While the species *Gluconobacter cerinus* and *Leuconostoc mesenteroides* were observed in apricots, *Acetobacter syzgii*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter* sp., *Gluconobacter* sp., *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Leu. mesenteroides* were isolated from vinegars. The presence of *G. cerinus* and *Leu. mesenteroides* in both apricot varieties indicated that these species are important members of the microbiota of Malatya apricot. The isolates *Gluconobacter* sp. ELS3,

ELS4, ELS5 and *Komagataeibacter* sp. GUS3 has the potential to be defined as new species as they differ from the type strains described so far. The temperature tolerances of the acetic acid bacteria obtained were determined at 30°C, 35°C and 38°C, and their alcohol tolerance was determined in GYEC (glucose yeast extract calcium carbonate agar) medium containing 4%, 6%, 8% and 10% ethanol. While no isolates were able to grow at 38°C, only the 8 of 19 strains were able to grow at 35°C. The ethanol tolerance of apricot isolates was 4-6%, while that of vinegar isolates were 6-8%. Isolates were screened for cellulose production on Hestrin and Schramm (HS) medium. One isolate, *Komagataeibacter* sp. GUS3 produced cellulose. Cellulose production of this isolate was investigated using HS medium at two different pH values (pH5 and pH6) in the temperature range of 26-34°C; although there was no statistical difference, the highest cellulose production (1,644±0,4016 g/L) was observed using the conditions 28°C and pH 6. The results indicated the potential of *Komagataeibacter* sp. GUS3 in the production of bacterial cellulose.

Keywords: Acetic acid bacteria, vinegar, Malatya apricot, *Komagataeibacter*, bacterial cellulose

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
İKİNCİ BÖLÜM	
LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Asetik Asit Bakterileri.....	3
2.1.1. Asetik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması.....	4
2.1.2. Asetik asit bakterilerinin üreme parametreleri.....	9
2.1.3. Asetik asit bakterilerinin metabolit yolları.....	9
2.1.4. Asetik asit bakterilerinin metabolizma ürünleri.....	10
2.1.5. Fermantasyon çeşitleri.....	12
2.2. Sirke.....	14
2.2.1. Sirke çeşitleri.....	15
2.2.2. Sirke üretim yöntemleri.....	17
2.2.3. Sirke Fermentasyonu.....	18
2.2.4. Sirke besinleri, biyoaktif bileşenleri ve sağlığa etkileri.....	19
2.3. Malatya Kayısı (Prunus armeniaca L.).....	222
2.4. Amaç ve Gerekçe.....	23

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOD	24
3.1. Materyal.....	24
3.2. Metod.....	25
3.2.1. Sirke Örneklerinde pH Analizi	26
3.2.2. Kayısı ve Sirke Örneklerinden Asetik Asit Bakterilerin İzolasyonu	26
3.2.3. İzolatların Saflaştırılması ve Gliserol Stokların Hazırlanması	27
3.2.4. İzolatların İdentifikasyonu	28
3.2.5. İzolatların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	32

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Sirke Örneklerinin pH Değerleri	34
4.2. Malatya Kayısı ve Sirke Örneklerinden Olası Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	35
4.3. İzolatların Genotipik Çeşitliliği ve Tanımlanması	36
4.4. Teknolojik Özellikler.....	45
4.4.1. İzolatların Etanol Toleransı	45
4.4.2. İzolatların Sıcaklık Toleransı.....	48
4.4.3. Selüloz üretimi.....	50

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKÇA.....	57
EKLER	72
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Dünyanın Değişik Ülkelerinde Farklı Hammedelerden Üretilen Bazı Sirke Çeşitleri.....	16
Tablo 2.2: Farklı Sirke Çeşitleri ve İçerdikleri Mineraller.....	19
Tablo 3.1: Rep-PCR Reaksiyon Elemanları.....	29
Tablo 3.2: Sekans İçin Kullanılan Primerler.....	30
Tablo 4.1: Sirke Örneklerinin pH Değerleri.....	34
Tablo 4.2: İzolatların Saflaştırıldıkları Besiyerleri.....	35
Tablo 4.3: Asetik Asit Bakterilerinin Rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatların İdentifikasyonları.....	39
Tablo 4.4: Laktik Asit Bakterilerinin Rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatların İdentifikasyonları.....	41
Tablo 4.5: İzolatların Farklı Etanol Konsantrasyonlarında Gelişebilme Yeteneği.....	45
Tablo 4.6: İzolatların Farklı Sıcaklıklarda Gelişebilme Yeteneği.....	47
Tablo 4.7: Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde <i>Komagataeibacter</i> sp. GUS3 Tarafından Üretilen Selülozun Miktarı.....	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: <i>Acetobacteraceae</i> ailesinin 2014 yılına kadar tanımlanan cinslerle hazırlanmış filogenetik ağacı.....	6
Şekil 2.2: Asetik asit bakterilerinin 85 tür ile oluşturulmuş 16S rRNA filogenetik ağacı..	8
Şekil 2.3: Asetik asit bakterilerinin kullandıkları alternatif metabolit yollarının şematik diyagramı.....	10
Şekil 2.4: Alkol fermantasyonu.....	12
Şekil 2.5: Krebs Döngüsü.....	13
Şekil 2.6: Laktik asit fermantasyonu.....	13
Şekil 2.7: Propiyonat fermantasyonu.....	14
Şekil 2.8: Etil Alkol Oluşumu.....	18
Şekil 2.9: Asetik Asit Oluşumu.....	18
Şekil 2.10: Su ve CO ₂ Oluşumu.....	18
Şekil 2.11: Sirkenin Biyoaktif Bileşenleri.....	21
Şekil 3.1: Ahlat Armudu; Elma Sirkesi ve Sirke Anası.....	24
Şekil 3.2: Bakteri İzolasyonu ve Moleküler Tanımlama Akış Şeması	25
Şekil 3.3: Yayma Plak Metodu.....	26
Şekil 3.4: Üç Çizgi Ekim Yöntemi.....	27
Şekil 3.5: AAM Brothlarda Bakterilerin İnkübasyon Sonrası Görüntüsü.....	27
Şekil 4.1: İzolatların Rep-PCR Jel Görüntüleri.....	37
Şekil 4.2: HS Besiyerindeki 10 mL'lik Tüplerde ve 250 mL'lik Erlenlerde Selüloz Üretimi.....	50

Şekil 4.3: 10 mL'lik Tüplerde Farklı Besiyerinde Selüloz Gösterimi.....	51
Şekil 4.4: En Kalın Yaş Selülozun Görüntüsü.....	51
Şekil 4.5: Selülozların Kurutma Sonra Görüntüleri	52



KISALTMALAR LİSTESİ

Dak	: Dakika
AAM	: Acetic Acid Medium
GYC	: Glucose Yeast Extract CaCO ₃
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
g	: Gram
L	: Litre
kob	: Koloni Oluşturan Birim
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
rpm	: Revolutions per minute
RNA	: Ribonükleik Asit
°C	: Derece Santigrat
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Asetik asit bakterileri (AAB) şeker içeren organik maddelerde, özellikle meyve ve bitki yüzeyleri üzerinde bulunurlar (Komagata vd. 2014; Yetiman, 2012). Etanolü okside ederek sirke ve kombucha gibi fermente ürünlerin üretiminde rol oynamalarının yanı sıra, bazı AAB türleri besiyerinde pigment ve selüloz üretebilmektedir (Cleenwerck ve Vos, 2008). AAB zorunlu aerobik ve Gram negatiflerdir. Bazı türlerinde termotolerant özelliğe rastlanabilir. Optimum olarak pH 5.0-6.5 değerlerinde gelişirler, ancak düşük pH 3.0-4.0 değerlerinde de gelişmelerini sürdürebilirler (González ve Mas, 2011; Şengün ve Kılıç, 2019). AAB, bakterilerin *Proteobacteria* şubesi, *Alphaproteobacteria* sınıfı, *Rhodospirillales* takımı, *Acetobacteraceae* ailesinin iki grubundan biri olan “asetik” grubundandır. 2021 yılında Fricke vd.’nin yayınladıkları makalede *Acetobacteraceae* ailesinin 49 cinsten oluştuğu belirtilmiştir.

Asetik asit bakterileri, asetik asit, selüloz, glukonik asit, sorboz ve ekzopolisakkaritler gibi teknolojik öneme sahip metabolitleri açısından ve fermente gıda ürünlerinin üretiminde rol oynamaları sebebiyle ilgi çekicidir. Gelişen teknoloji ile yeni türlerin keşfi ve sınıflandırılmaları, son yıllarda gelişmeye devam ettiğinden, bilimsel potansiyel taşımakta ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç devam etmektedir.

Şekerli meyvelerde ve alkol içeren ortamlarda bulunan AAB’nin değişik ülkelerdeki endemik bitki ve meyve yüzeylerinden izolasyonuna yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (Naloka vd., 2020; Liu vd., 2018). Bu kapsamda, ülkemizde kayısı üretiminde ilk sırada olan ve coğrafi işaret belgesi alan Malatya kayısının mikroflorasına yönelik bir çalışma literatürde gözlenmemiştir. Bu bakımdan gerçekleştirilen bu çalışma yeni bir nitelik taşımaktadır.

Sirke kısa tanımıyla, asetik asit ve diğer bileşenlerin sulu bir çözeltisidir ve dünya çapında bir gıda çeşni ve koruyucusu olarak bilinir ve tüketilir. Sirke yaklaşık 10.000 yıldır eski medeniyetler tarafından halk tıbbında, yara tedavisinde, enfeksiyonu önlemek amacıyla ve el dezenfeksiyonu olarak kullanılmaktadır. Günümüzde, turşu, salata sosları ve diğer gıda ürünlerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Sirke ayrıca antibakteriyel, antioksidan, kan basıncını düşürücü, diyabetin etkisini azaltıcı ve

kardiyovasküler hastalıkları önleyici fonksiyonel özellikleriyle de tanınmaktadır (Gomes vd., 2018).

Bu çalışmada kırmızı üzüm, beyaz üzüm, yeşil elma, kırmızı erik, ahlat armudu ve portakaldan geleneksel yollarla sirke kurulmuş, bu sirkeler, Malatya'dan Hacıhaliloğlu ve Hasanbey çeşidi kayısılarla birlikte asetik asit bakteri izolasyonuna tabi tutulmuştur. İzolatların genotipik profillerinin belirlenmesi amacıyla (GTG)5 rep-PCR gerçekleştirilmiş, aynı profili veren izolatlar gruplanmış ve her gruptan seçilen izolatların 16S rRNA ve/veya 16S-23S rRNA ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgelerinin dizilimleri belirlenerek moleküler identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen AAB'in endüstriyel kullanımı için önem arz eden teknolojik özelliklerden; etanol toleransı, sıcaklık toleransı ve selüloz üretim kapasitesi incelenmiştir.

İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Asetik Asit Bakterileri

Asetik asit bakterileri (AAB) zorunlu aerobik, Gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif olup spor oluşturmazlar (Arıcı, 2017). Çubuk şeklinde (0.4-1.0 µm genişliğinde ve 0.8-4.5 µm uzunluğunda), hücreleri tekli, çiftli ya da zincir şeklinde, hareketli veya hareketsiz ellipsoidal yapıda mikroorganizmalardır. Çok çeşitli şekerleri ve alkolleri iyi şekilde okside etme özelliği göstererek son üründe organik asitlerin birikmesine neden olurlar. Optimum sıcaklıkları 25-30°C arasında, gelişme sıcaklıkları ise 5-45°C arasında değişebilmekle birlikte, bazı türlerinde termotolerant özelliğe de rastlanılmıştır. Optimum pH 5.0-6.5 değerlerinde gelişmelerine rağmen, düşük pH 3.0-4.0 değerlerine de dayanıklılık gösterirler (González ve Mas, 2011; Şengün ve Kılıç, 2019).

Doğada AAB, havada ve şeker içeren organik maddelerde, özellikle de meyvelerin üzerinde bulunurlar. Bu bakterilerin faaliyetleri çoğunlukla, mayaların faaliyetleriyle birlikte gerçekleşmektedir (Yetiman, 2012). AAB alkollü ve asidik ortamlarda yaygın olarak bulunur ve sirke, şarap, bira, sake, elma şarabı gibi fermente ürünler ile meyveler, çiçekler ve bitkilerden izole edilirler. *Asaia* suşları çiçeklerin yanı sıra sivrisineklerden ve böceklerden de izole edilmiştir (Komagata vd., 2014). Asetik asit bakterilerinin bazıları besiyeri ortamında pigment ve selüloz üretebilirler. Ayrıca asetik asit bakterilerinde sıklıkla spontane mutasyonlar meydana gelebilir (Cleenwerck ve Vos, 2008).

Asetik asit bakterilerinin izolasyonu amacıyla geliştirilen besiyerleri içinde glucose yeast agar (GY), glucose yeast extract CaCO₃ (GYC) agar ve reinforced AE-medium (RAE) sayılabilir. Ayrıca, mannitol yeast extract pepton (MYP) agar (% 2.5 D-Mannitol, % 0.5 maya, % 0.3 pepton, % 2 agar) da kullanılmıştır (Millet ve Funel, 2000). Asetik asit bakterilerinin belirlenmesi besiyerinde etanolden asetik asit üreterek bakteriyel gelişmenin olduğu yeri berraklaştırmasıyla Frateur (1950) tarafından tanımlanan yöntemle veya besiyerindeki bromokresol moru göstergesinin yeşilden sarıya renk değişim göstermesiyle (Carr, 1968) tespit edilebilir (Swings vd., 1992; Cleenwerck ve Vos, 2008). Daha fazla asetik asit bakterisi tanımlamak amacıyla yeni

besiyerleriyle de çalışmalar yapılmaktadır (Şengün ve Kılıç, 2019). Bunlara rağmen asetik asit bakterilerinin izolasyonu için kullanılan besiyerleri kültüre edilemeyen türlerin (viable but non-cultivable-VNBC) belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir (Şengün ve Kılıç, 2019).

İzole edilen AAB fenotipik olarak; farklı pH ve sıcaklık değerlerinde gelişme, etanolden asit üretimi, asetat ve laktat oksidasyonu ve şeker fermantasyon testleri yapılarak tanımlanabilmektedir. AAB'nin moleküler düzeyde tanımlanması için bir çok yöntem bulunmakta olup bunlar arasında DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyonu ile ribozomal RNA gen dizilemesi (5S rRNA, 16S rRNA ve 23S rRNA) sayılabilir (Sievers vd., 1996; Yamada vd., 1996).

AAB glukozu glukonik aside, arabinozu; arabonik aside, galaktozu; galaktonik aside sorbitolü de sorboza okside edebilir. Bu ürünler, fermantasyon endüstrisi için önem taşımaktadır. Bazı AAB türleri selüloz üretme yeteneğine sahiptirler (Yetiman, 2012). AAB etanol, şeker ve şeker alkollerini oksitleme ve saf kristalin nano-selüloz biyosentezi yetenekleri ile biyoteknoloji ve gıda endüstrilerinde önemli rol oynamaktadır. Önemli endüstriyel uygulanabilirliğe sahip biyomoleküllerin yanı sıra, antioksidan özellikler ve insan sağlığı üzerinde yararlı etkiler sunan sirke ve kombucha gibi ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır. Gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde kullanılan D-glukonik asit ve keto-D-glukonik asitler, *Gluconobacter* suşları tarafından D-glikozdan üretilir (Gomes vd., 2018; Komagata vd., 2014).

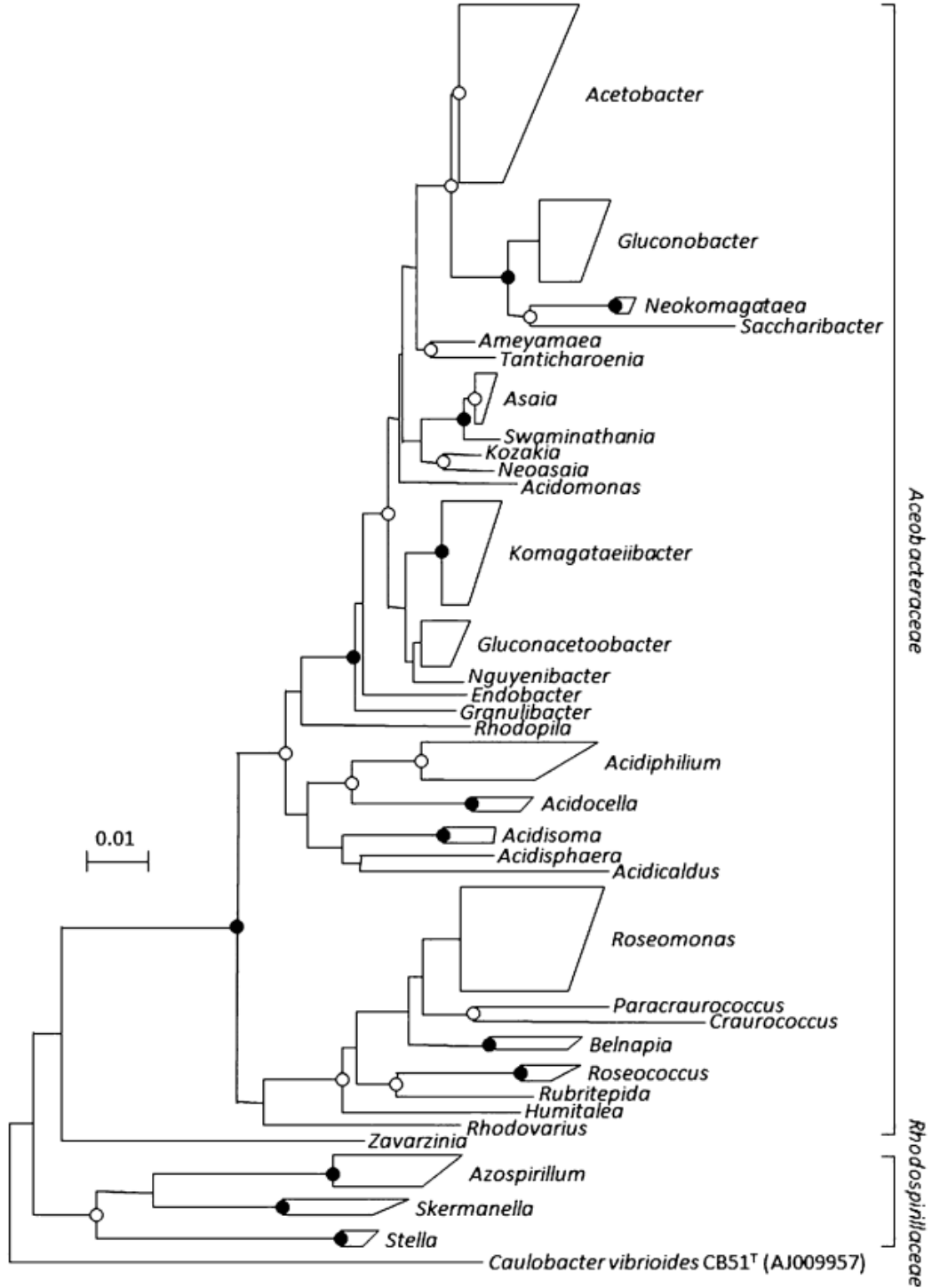
2.1.1 Asetik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Asetik asit bakterilerini sınıflandırmaya yönelik ilk girişim 1894 yılında Hansen tarafından yapılmıştır. Beijerinck, 1898'de *Acetobacter* cinsini ilk defa isimlendirmiş, 1925 yılında Visser't Hooft, asetik asit bakteri sınıflandırmasında biyokimyasal özellikleri düşünen ilk bilim insanı olmuştur (Gomes vd., 2018). AAB'nin morfoloji, biyokimyasal ve fizyolojik kriterlere göre ilk sınıflandırılması Asai (1934- 1935) tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırmada asetik asit bakterileri iki cins şeklinde *Acetobacter* ve *Gluconobacter* olarak ayrılmıştır. 1950'de Frateur beş fizyolojik kritere göre sınıflandırma yapmıştır. *Acetobacter* türlerinin etanolü, asetik aside dönüştürüp ardından asetik asidi, su ve CO₂'e okside etmeleri ve *Gluconobacter* türlerinin ise

etanolü asetik aside okside edip ardından su ve CO₂'e okside edememeleri bu cins arasındaki ana farklılık olmaya devam etmektedir (Yetiman, 2012).

Gonzales ve Mas (2011) mevcut tüm AAB cinslerini kullanarak toplam 64 suş ile bir çalışma yapmıştır. 16S-23S ITS bölgesinin AAB'lerin daha ileri sınıflandırılması olan polifazik yaklaşımlarda kullanıma dahil olmasının yararlı olduğundan bahsetmişlerdir (Gonzales ve Mas, 2011). AAB 12 cins olarak (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Kozakia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Neoasaia*, *Saccharibacter* ve *Swaminatania*) Proteobakterilerin α -alt bölümünde asidofilik bakterilerin bir dalı olarak *Acetobacteraceae* ailesinde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmayı geleneksel fenotipik testlerle gerçekleştirip, bu testlerle AAB izolatlarının tanımlanmasının zor olduğundan ancak gıda işlemlerinin uygunluk kontrolü için büyük önem taşıdığından bahsetmişlerdir (Cleenwerck ve De Vos, 2008).

AAB *Acetobacteriaceae* familyası altında olup filogenetik olarak üç ana gruba ayrılır: Birinci grup *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Neokomagataea* ve *Saccharibacter* cinslerini, ikinci grup; *Asaia*, *Kozakia*, *Neoasaia* ve *Swaminathania* cinslerini ve üçüncü grup; *Gluconacetobacter* ve *Komagataeibacter* cinslerini içerir. *Acidomonas*, *Endobacter* ve *Granulibacter* cinsleri, AAB altında her biri tek bir türe sahip bağımsız alt soylar oluşturur (Komagata vd., 2014). Şekil 2.1'de *Acetobacteriaceae* familyasının 2014 yılında oluşturulmuş filogenetik ağacı verilmiştir.



Şekil 2.1: Acetobacteraceae ailesinin 2014 yılına kadar tanımlanan cinslerle hazırlanmış filogenetik ağacı

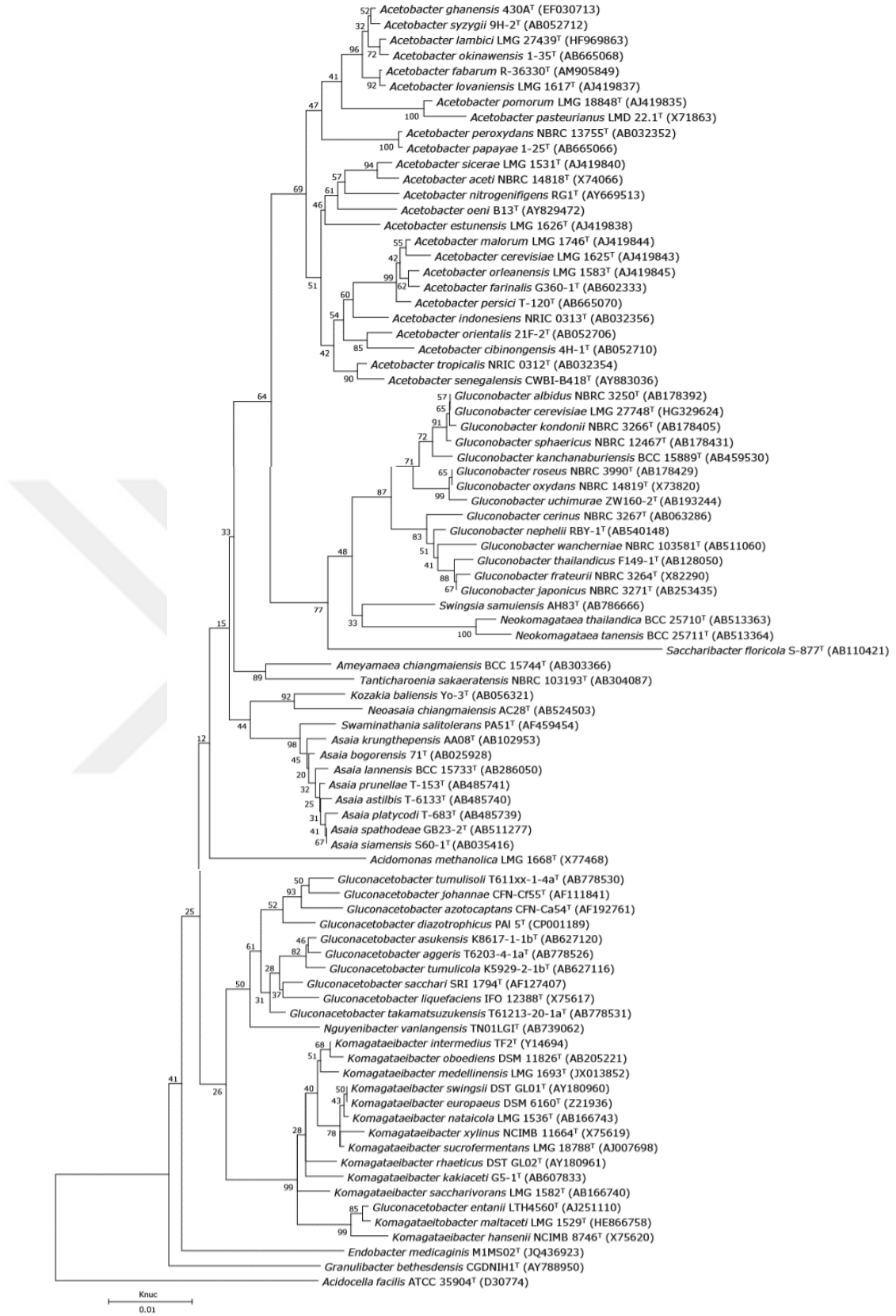
Kaynak: Komagata vd., 2014

Yamada (2016) AAB'ni 17 cins ve 84 tür altında toplamıştır. 17 cinsinden 5 cinsi; *Acetobacter* (25 tür), *Gluconobacter* (14 tür), *Gluconacetobacter* (11 tür), *Asaia* (8 tür) ve *Komagataeibacter* (13 tür) çok sayıda türü içerir ama geri kalan 12 cinsin monotipik olduğu, yani 2 türden oluşan *Neokomagataea* cinsi hariç diğerlerinin sadece 1 tür içerdiği belirtilmiştir. Çalışmada AAB cins adları şöyle sıralanmıştır; *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Swaminathania*, *Tanticharoenia*, *Neokomagataea*, *Ameyamaea*, *Endobacter*, *Nguyenibacter* ve *Swingsia* (Yamada, 2016).

Son yıllarda yapılmış çalışmalardan Liu vd. (2018) makalesindeki veriler dahilinde *Acetobacteraceae* ailesi 35 cins ve 135 tür olarak belirtilmiştir (Liu vd., 2018). Fricke vd. 2021 yılında yayınladıkları makalede de 49 cins belirtilmiştir (Fricke vd., 2021).

Acetobacteraceae ailesi genişlemeye devam etmektedir. Son on yılda yeni AAB türleri önerilmiştir. Bu nedenle, sınıflandırma ve taksonomileri moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dayanan çeşitli değişikliklerin ve güncellemelerin konusu olmuştur (Gomes vd., 2018).

Asetik asit bakterilerinin belirli metotlarla saflaştırıldıktan sonra dizilimlerinin belirlenmeleriyle filogenetik ağaçlar vasıtasıyla sınıflandırmaları daha net yapılmaya başlanmıştır. Yeni türler keşfedildikçe yapılan çalışmalarda karşılaştırma amaçlı ağaçlar yenilenmiştir. En kapsamlı yapılan ağaçlara örnek olarak Şekil 2.2'de 2016 yılı ait bir çalışma konmuştur.



Şekil 2.2: Asetik asit bakterilerinin 85 tür ile oluşturulmuş 16S rRNA filogenetik ağacı

Kaynak: Yamada, 2016

2.1.2 Asetik asit bakterilerinin üreme parametreleri

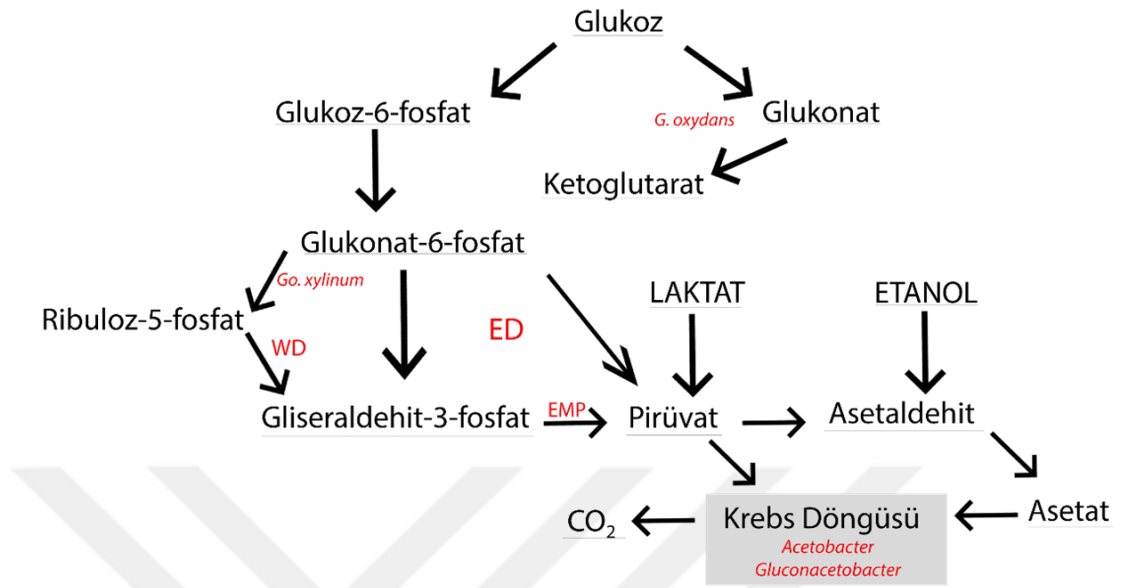
Asetik asit bakterileri ve asetik asit fermantasyonu üzerine pH, sıcaklık, etanol ve asit konsantrasyonu, kükürt dioksit, oksijen ve diğer besin elementleri gibi faktörler etki etmektedir (Ünal, 2007).

Asetik asit bakterileri yaklaşık 30°C için optimum gelişme sıcaklığına sahip mezofilik bakterilerdir. Üreme, daha yüksek sıcaklıklarda önemli ölçüde azalır ve genellikle 34°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda pek gözlenmez. Termotolerant suşlar yüksek sıcaklıklara diğer bakterilere göre daha dayanıklıdır. Örneğin 37°C'de ve hatta 42°C'ye kadar sıcaklıklarda gelişme gösteren izolatlar rastlanmıştır (Soemphol vd, 2011; Charee vd., 2020). Fermantasyon sırasında, biyolojik aktivitenin bir parçası olarak ısı üretilir. Ancak asetik asit bakterilerinin mezofilik karakterinden dolayı, optimum sıcaklığı koruma için soğutma sistemi gereklidir. Bu da endüstriyel uygulamalar için önemli dezavantaj oluşturmaktadır (Saichana vd., 2014). Yapılan çalışmalarda tropikal ülkelerden izole edilen birçok AAB'nin endüstriyel uygulamalar için daha uygun termotolerant yeteneğe sahip oldukları farkedilmiştir. Saeki vd. (1997) *Acetobacter rancens*, *A. pastorianus*, *A. lovaniensis*, *A. aceti*, *A. liquefaciens* ve *A. xylinum*, olarak sınıflandırılan termotolerant AAB suşları izole etmişlerdir. Bazı suşların, 38 ile 40°C'de asetik asit üretebildikleri, ayrıca yüksek konsantrasyonlarda etanolü (%9'a kadar) oksitleyebildikleri gösterilmiştir (Saeki vd., 1997).

Termotolerans özellik gösterebilen bakterilerin ölümcül olmayan stres koşulları yaşadığında gösterdiği uyum, yaşadığı yüksek sıcaklık gibi durumlarda mutasyonlar geçirip bunu tolere edebilmelerine neden olabilmektedir (Soemphol vd., 2011; Charee vd., 2020).

2.1.3 Asetik asit bakterilerinin metabolik yolları

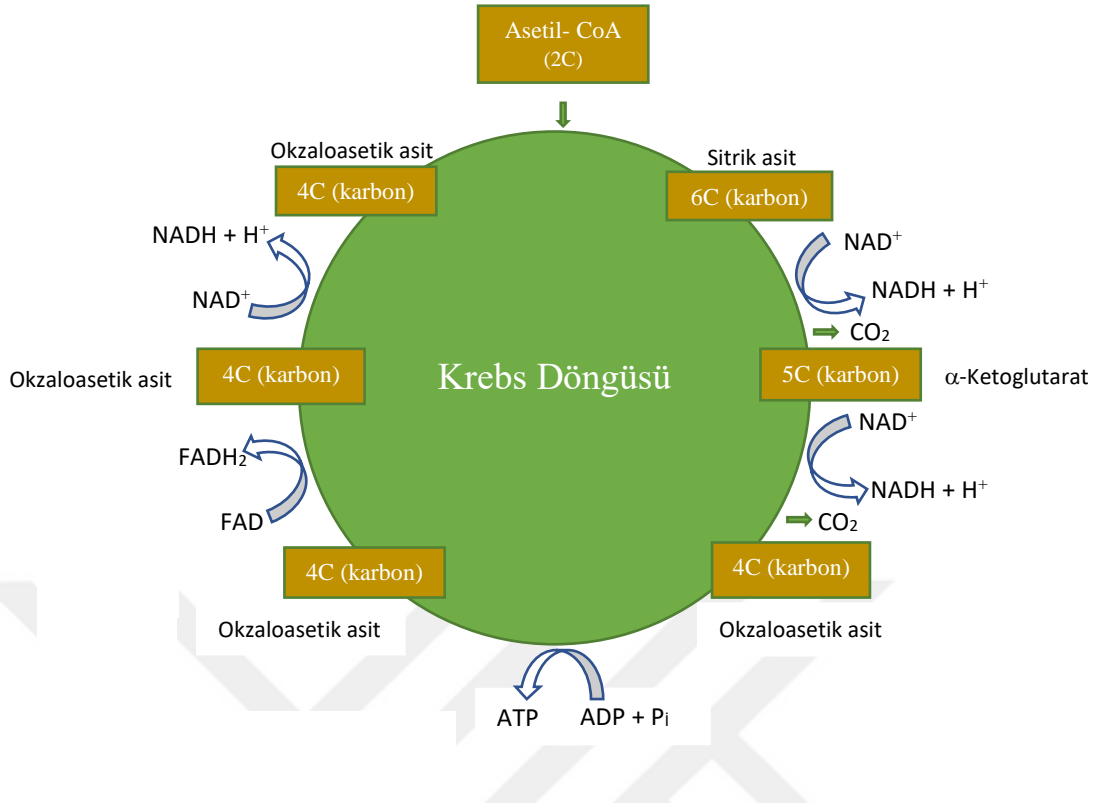
Asetik asit bakterilerinin metabolik yollarında oluşan son ürünleri Krebs döngüsüne girerek CO₂ ve su oluşana kadar okside olabilirler. Şekil 2.3'de gösterilen diyagramda metabolit yollar şematize edilmiştir. Asetik asit bakterilerinden; *Acetobacter*, *Acidomonas* ve *Gluconacetobacter* cinsleri etanolün neredeyse tamamını oksidasyona uğratarak Krebs döngüsünü tamamlayabilirlerken, *Gluconobacter* cinsine ait bakterilerin metabolizmasında fonksiyonel Krebs döngüsü yoktur (Yetiman, 2012).



Şekil 2.3: Asetik asit bakterilerinin kullandıkları alternatif metabolik yollarının şematik diyagramı (EMP: Embden-Meyerhoff-Parnas, WD: Warburg-Dickens, ED: Entner-Doudoroff)

Kaynak: Yetiman, 2012

Krebs döngüsü, hücresel oksijenli solunumun, glikoliz evresinden sonra gelen ikinci aşamasıdır. Krebs döngüsü sonrası 2 mol pirüvik asitten 2 ATP, 4 CO₂, 6 NADH ve 2 FADH₂ oluşur. Şekil 2.4'te verilen krebs döngüsünde de görülen döngü basamaklarında oluşan her NADH ve FADH₂, enerji üretimi için elektron taşıma sistemine (ETS) aktarılır (Allen ve Cowling, 2011).



Şekil 2.4: Krebs Döngüsü

Kaynak: Çelik, 2019

2.1.4 Asetik asit bakterilerinin metabolizma ürünleri

a) Glukonik asit

Glukonik asit meyvelerde, bitkilerde ve şarap, sirke ve bal gibi diğer gıdalarda doğal olarak bulunur (Gomes vd., 2018). E574 kodlu gıda katkı maddesi olarak anılır ve meyve suyu ve şarap gibi içeceklerle ekşi aroma vermek ve acı tadı azaltmak amacıyla katılır. Aynı zamanda şelatör özelliğiyle kireç ve pas giderme için deterjan yapısına katılmaktadır. İnşaat sektöründe çimentonun hızlı kurummasına katkısıyla dayanıklılığını arttırır (Kızılkaya ve Dinçer, 2019). Gıdaların aromatik profilindeki rolü nedeniyle son ürünün duyu kalitesi açısından fermantasyon sırasında eş zamanlı olarak glukonik asit ve asetik asit üreten AAB suşlarının kullanılması tercih edilir. Glukonik asit ilaç endüstrisinde ayrıca, hipokalsemi, hipomagnezemi ve anemiye tedavi etmek için mineral takviyeleri olarak işlev gören Ca⁺², Mg⁺² ve Fe⁺² gibi iki değerlikli metallerin glukonatlarının oluşturulması amacıyla kullanılır. Endüstriyel üretimlerde maliyet

dikkate alındığından az substrata karşı hızlı üretim ve çok ürün öncelikli hedeflerdendir (Gomes vd., 2018; Kızılkaya ve Dinçer, 2019).

b) Sorboz ve askorbik asit

Özellikle geniş bir oksidatif kapasiteye sahip bir AAB olan *Gluconobacter* cinsinin suşları, D-sorbitolün endüstriyel L-askorbik asidin (C vitamini) üretiminde önemli bir ara ürün olan L-sorboza dönüştürülmesi için kullanılabilir (Gomes vd., 2018).

c) Bakteriyel selüloz

Selüloz, bitkiler, algler ve bazı bakteriler olmak üzere birçok farklı organizma tarafından sentezlenir. Dünyada en fazla bulunan biyopolimerlerden biridir. Selülozun mikrobiyolojik üretimi ve bakteriyel selülozun olağandışı özellikleri son yıllarda ilgi çekmiştir. Tipik olarak lignin, hemiselüloz ve pektin ile karışık bulunan bitkisel selülozun aksine, bakteriyel selüloz son derece saftır. Ayrıca, bakteriyel selüloz yüksek kristallik, yüksek derecede polimerizasyon, yüksek molekül kütlesi, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek gerilme mukavemeti, yüksek elastikiyet ve mükemmel biyoyuymululuk ve biyo-bozunurluk gibi birçok benzersiz fizikokimyasal ve mekanik özellik gösterir. Bakteriyel selüloz gıdalarda jelleştirici, stabilize edici ve koyulaştırıcı bir ajan olarak farmasötik uygulamalarda; yara iyileşmesi ve yanık tedavileri için biyomedikal ve kalp kapak protezlerinde, yapay kan damarları üretimlerinde kullanılma potansiyeline sahiptir. Sıvı bir ortamda bakteriyel selülozun hücreleri yüzeye yakın durarak aerobik bakterilerin oksijen elde etmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Gomes vd., 2018; Gündüz vd., 2015).

d) Diğer ekzopolisakkaritler

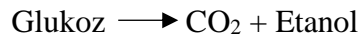
AAB tarafından üretilen en yaygın ekzopolisakkarit selüloz olmasına rağmen, levan ve dekstranlar gibi diğer önemli polisakkaritleri de üretebilirler. Levan, biyolojik olarak bozunabilirlik, biyoyuymululuk ve nanoparçacıkların yanı sıra filmlerin oluşturulması gibi özelliklerden dolayı önemli biyomedikal ve fonksiyonel gıda özellikleri sergiler. Çiftlik hayvanları üzerine yapılan çalışmalarda hayvanların bağırsaklarında levanın mikrobiyal bağırsak topluluğu üzerindeki yararlı etkileri gösterilmiştir. Gıda endüstrisinde levan, bir emülsifiye edici ajan, renklendirici ve tatlandırıcı araç olarak ve

bir yağ ikamesi olarak kullanılır. Ayrıca, levan mükemmel antioksidan ve antienflamatuar potansiyel sergiler. Asetik asit bakterileri tarafından üretilen diğer mikrobiyal ekzopolisakkaritler arasında asetan veya ksilinan, mannan ve glukonasetan da bulunur (Gomes vd., 2018).

2.1.5 Fermantasyon çeşitleri

İnsanlık tarihinde bilinen en eski gıda işleme teknolojisi fermantasyondur (Yurdakul vd., 2017). Büyük moleküllü maddelerin küçük moleküllere ayrılmasına fermantasyon denir mikroorganizmalar vasıtasıyla (Pamir, 1985; Ünlütürk ve Turantaş, 2003). Fermantasyonda rol oynayan mikroorganizmalar olarak bakteriler (laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri, propiyonik asit bakterileri), mayalar (*Saccharomyces*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces marxianu*) ve küfler (*Penicillium camembertii*, *P. roqueforti*, *Mucor rasmussen*, *Aspergillus oryzae*) sayılabilir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003). Oksidasyon reaksiyonu sonucunda farklı bakteri, maya ve küflerin etkileri ile substrat indirgeme ve yükseltgeme reaksiyonları sonrasında fermantasyon son ürünlerinin çıktıklarına göre fermantasyon çeşitleri aşağıdaki şekilde adlandırılır (Müller, 2001).

1. Alkol fermantasyonu: Mayaların ve aynı zamanda *Zymomonas* türlerinin anaerobik metabolizmasının son ana ürünü etanoldür. Her ikisinde de etanol aşağıda verildiği gibi fermantasyona uğrar (Müller, 2001).



Şekil 2.5: Alkol fermantasyonu

Kaynak: Müller, 2001

2. Laktik asit fermantasyonu: Anaerobik koşullarda gıda maddelerinin yapısında bulunan şeker LAB'leri tarafından laktik asit ve diğer bazı son ürünlere dönüştürölür (Ünlütürk ve Turantaş, 2003). Dönüştürölün son ürünlerin cins ve miktarına göre de sınıflandırılırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri, glukoz şekerini fruktoz difosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu %95 ve üstü oranlarda laktik asit üretirlerken; heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, glukoz şekerini heksoz monofosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu yarısı laktik asit ve bunun yanında diğer yarısı yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003).

Homofermentatif yol:



Heterofermentatif yol:



şekil 2.6: Laktik asit fermantasyonu

Kaynak: Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003

3. Diğer tip fermantasyonlar:

- Propiyonat fermantasyonu



şekil 2.7: Propiyonat fermantasyonu

Kaynak: Müller, 2001

- Karışık asit ve bütandiol fermantasyonu
- Bütirat ve aseton-bütanol fermantasyonu
- Homoasetat fermantasyonu (Müller, 2001).

2.2 Sirke

Sirke alkolün asetik aside dönüştürüldüğü bir fermantasyon ürünüdür. Sirke üretim aşamalarından olan alkolleşme süreci göz önüne alındığında şarap ve bira gibi alkollerin tarihçesinin, tarihin ilk çağlarına uzandığı düşünülebilir (Türker, 1963). MÖ 5.000'lere kadar, Babillerin hem hurma şarabı hem de hurma sirkesi yapmak için hurmayı fermente ettiklerine inanılıyordu. Orta Asya Türklerinin, Sümerlerin, Asurluların, İranlıların, eski Mısırlıların, Etililerin ve eski Yunanlıların da sirke yaptıkları belirlenmiştir. MÖ 3000 yıllarına ait eski Mısır küpündeki tortuda doğada yalnızca sirkede bulunan sirke solucanı fosili görülmüştür. Eski çağlarda sirke, ilaç olarak kullanılmasının yanında, serinletici bir içecek ve sofralarda salatalarda yemeklere katkı olarak tüketilmiştir (Akbaş ve Cabaroğlu, 2010).

Sirkenin tanımı, ülkelere ve mevzuatlarına göre farklılık arz etmektedir. TSE 1880 EN 13188 Sirke Standardı; "Tarım kökenli sıvılar veya diğer maddelerden, iki aşamalı alkol ve asetik asit fermantasyonuyla, biyolojik yolla üretilen kendine özgü ürün" olarak sirkeyi tanımlanmaktadır. Bu standartta sirke çeşitleri, üretiminde kullanılan hammaddelere göre isimlendirilmiştir. Şarap sirkesi, meyve sirkesi, meyve şarabı sirkesi, elma şarabı sirkesi, alkol sirkesi, tahıl sirkesi, malt sirkesi, aromalı sirkeler ve diğer sirkeler gibi (Gülcü 2009: Ünal, 2017). Codex Alimentarius'a ve FAO/WHO gıda standartlarına göre 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" olarak tanımlanır (Yetiman, 2012: Anon., 2000).

Sirkenin kimyasal bileşiminde; organik asitler, alkoller, fenolik maddeler, amino asitler, tat ve aroma bileşenleri vardır. Sirkenin sahip olduğu mikroflora çeşitliliğinin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin yanısıra asitlik, aroma, renk gibi özellikleri kıymetlidir. Fakat hammaddeye, üretim yöntemine, hammaddenin hasat iklimine göre bile değişebilen bu floranın sabit olmadığı bilinmektedir. Sirke mikroflorasının kompleks yapısını belirlemek amacıyla bugüne kadar pek çok çalışma yapılmıştır. (Yetiman, 2012). Sirke, doğal üretimi dışında sirkenin içine sonradan eklenebilen asetik asit, renk verici maddeler ve kuru madde arttırıcılar değişik oranlarda katılarak en fazla tağşiş ve hilelere maruz kalan ürünlerden biridir (Akbaş ve Cabaroğlu, 2010).

2.2.1 Sirke çeşitleri

Doğada bitkisel kaynaklı, alkole fermente olabilen şekerce zengin hammaddeler veya diğer hammaddelerden ilk olarak alkol ve asetik asit fermentasyonu ile elde edilen sirke üretildiği hammaddeye göre isimlendirilir. Örnek olarak bal sirkesi, elma sirkesi, pirinç sirkesi vb verilebilir. (Yetiman, 2012). Tablo 2.1’de hammaddelere göre sirke çeşitleri verilmiş ve bu sirkelerin üretildiği ülkeler sıralanmıştır. Sirkelerin kurulduğu hammaddeler çok çeşitli olmakla beraber tabloda 5 grupta toplanmıştır, bunlar meyve, sebze, hububat, şarap ve diğer sirkelerdir.

Tablo 2.1: Dünyanın değişik ülkelerinde farklı hammaddelerden üretilen bazı sirke çeşitleri

Sirke Çeşidi	Hammadde	Üretildiği Ülke
<i>Meyve sirkeleri</i>		
Balsamik sirke	Üzüm şırası	İtalya
Çilek sirkesi	Çilek	İspanya
Dut sirkesi	Beyaz ve karadut	Türkiye
Elma sirkesi	Elma ya da elma şarabı	Dünya geneli
Hindistan cevizi sirkesi	Hindistan cevizi	Güneydoğu Asya
Hurma sirkesi	Hurma	Japonya, Güney Kore
İncir sirkesi	İncir	Türkiye
Vişne sirkesi	Vişne	Avrupa, ABD
Üzüm sirkesi	Üzüm	Türkiye, Orta Doğu
<i>Hububat sirkeleri</i>		
Bira sirkesi	Arpa	Almanya
Kurosu (Siyah pirinç sirkesi)	Pirinç	Japonya
Siyah sirke	Buğday, darı	Doğu Asya, Çin
Pirinç sirkesi	Pirinç ya da sake	Japonya, Çin
<i>Sebze sirkeleri</i>		
Domates sirkesi	Domates	Japonya, Doğu Asya
Soğan sirkesi	Soğan	Doğu Asya
<i>Şarap sirkeleri</i>		
Şarap sirkesi	Düşük alkollü şaraplar	Dünya geneli
Palmiye suyu sirkesi	Palmiye şarabı	Afrika, Asya ve Güney Amerika

<i>Diğer sirkeler</i>		
Bal sirkesi	Bal	Avrupa, Afrika, Amerika
Beyaz distile sirke	Alkol	ABD, Çin
Kombucha sirkesi	Çay ve şeker	Asya
Malt sirkesi	Malt	Kuzey Avrupa
Peynir altı suyu sirkesi	Peynir altı suyu	Avrupa

Kaynak: Şengün ve Kılıç, 2019

2.2.2 Sirke üretim yöntemleri

Sirke üretiminde 3 temel yöntem vardır: 1. Yavaş yöntem (yüzey kültürü fermantasyonu ya da Orleans ya da geleneksel süreç), 2. Çabuk yöntem (jeneratör yöntemi) ve 3. Derin kültür yöntemi (submers, batık süreç ya da daldırma) (Ünal, 2007; Şengün ve Kılıç, 2019).

1. Yavaş yöntem: Fıçı gibi ağzı açık hava alabilen alkollü sıvı sirkeleşmeye bırakılır. Sirkeleşme 1.5 -2 ay sürer. 1 m² zar alanı günde 0,5 litre saf alkolü okside eder. Kalite açısından yavaş yöntem iz elementlerin oluşabilmesi için iyi bir sonuç verir (Ünal, 2007).

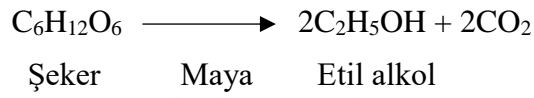
2. Çabuk yöntem (jeneratör yöntemi): Kap içerisine mikroorganizmanın tutunabileceği geniş yüzeyden sirkeleştirilecek olan alkollü sıvı yukarıdan damlama suretiyle akıtılır. Dolgu materyali üzerindeki tutunmuş olan AAB ile temas eden alkol, fermantasyon sonunda asetik asite dönüştürülür. Alkolün tamamının asite dönüşeceği şekilde alkollü sıvının akış hızı ayarlanır ve gerekli olan hava sirkülasyonu kabın kenar deliklerinden sağlanır. Özel olarak Frings Jeneratörü bu amaçla geliştirilmiş ve hala kullanılmaktadır. (Ünal, 2007; Aktan ve Kalkan, 1998).

3. Derin kültür yöntemi (submers) yöntemi: Asetik asit bakterileri bu yöntemde alkollü sıvıların yüzeyinde değil içinde çalışırlar. Sirkeleştirilecek sıvının içerisine devamlı çok ince hava kabarcıkları verilir. Sirke üretimi böylece çabuk yöneme göre 30 kez daha hızlı gerçekleşmektedir. Asetatörlerde yapılacak üretimlerde “özel bakteri kültürlerinin” kullanılması gerekmektedir. Derin kültür yöntemi ve hızlı yöntem, ekonomik ve üretim süresi açısından, yavaş yöneme göre daha avantajlı olduğundan ticari olarak en çok bu

yöntemler tercih edilmektedir (Ünal, 2007; Türker, 1963). Derin kültür yöntemiyle elde edilen sirkelerin daha yüksek miktarda asetik asit, laktik asit, tartarik asit, malik asit, süksinik asit ve sitrik asit içerdiği tespit edilmiştir (Kırcı, 2017).

2.2.3 Sirke Fermentasyonu

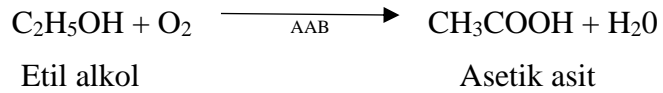
Sirke alkol ve asetik asit fermentasyon aşamalarıyla üretilen bir üründür. Fermentasyonun ilk aşamasında mayalar (genellikle *Saccharomyces cerevisiae*) anaerobik yolla şekerleri etil alkole ve suya dönüştürür (Şekil 2.4: Etil alkol oluşumu) (Aktan ve Kalkan, 1998).



Şekil 2.8: Etil alkol oluşumu

Kaynak: Aktan ve Kalkan, 1998

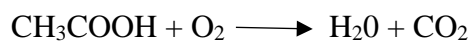
İkinci aşamada üretilen etil alkol *Acetobacter* ve *Gluconobacter* gibi AAB tarafından aerobik şartlarda asetik asite okside edilir (Şekil 2.5: Asetik asit oluşumu) (Aktan ve Kalkan, 1998).



Şekil 2.9: Asetik asit oluşumu

Kaynak: Aktan ve Kalkan, 1998

Asetik asit fermentasyonundan sonra ortama oksijen verilmeye devam edilirse üst oksidasyon meydana gelir, asetik asit su ve karbondioksite parçalanır (Şekil 2.6: Su ve CO₂ oluşumu) (Aktan ve Kalkan, 1998).



Şekil 2.10: Su ve CO₂ oluşumu

Kaynak: Aktan ve Kalkan, 1998

100 g glikozdan yaklaşık 51 g alkol ve 49 g karbondioksit, 10 g alkolden de yaklaşık 130 g asetik asitin meydana geldiği belirlenmiştir. Endüstride 1 g alkolden 1g sirke asidinin meydana gelmesi ekonomiktir ve bu miktar yaklaşık %76'lık bir randıman vermektedir (Ünal, 2007).

2.2.4 Sirke besinleri, biyoaktif bileşenleri ve sağlığa etkileri

Sirke içindeki besin bileşenleri arasında asit baz dengesini koruyabilen, hücre metabolizmasını düzenleyen, enerji sağlayan ve bağışıklığı artıran amino asitler, şekerler, vitaminler ve mineraller, polifenoller, melanoidinler, tetrametilpirazin ve diğer biyoaktif bileşikler zengin olarak bulunur. İçindeki maddelerin türleri ve konsantrasyonları, kullanılan ham maddeler, kullanılan üretim teknolojisi ve mikrobiyal fermantasyonlar ile ilişkilidir (Xia vd., 2020). Tablo 2.2' de verilen sirkelere göre içerdikleri mineraller gösterilmiştir. Üretildikleri ülkelere ve hammaddelere göre mineral içerikleri farklılaşabilmektedir.

Tablo 2.2: Farklı sirke çeşitleri ve içerdikleri mineraller

Sirke çeşitleri	Hammadde	Fermantasyon yöntemi	Ülke	Analitik yöntem	Mineraller	Referans
Geleneksel ev yapımı Türk sirkesi	Üzüm/ elma	Sıvı fermantasyon	Türkiye	ICP-OES	Se, Cr, Cu, Mg, Co, Zn, Na, K, Ca, Ni ve Mn	Öztürk vd. (2015)
Palmiye sirkesi	Palmiye suyu	Sıvı fermantasyon	Hindistan	HPLC	Mg, Ca, Mn, Cu, Zn, Na, K ve Fe	Ghosh vd (2015)
Siyah sirke	-	-	Çin	ICP-OES	K, Mg, Ca, Fe, Mn ve Se	Chou vd. (2015)
Endülüs şarap sirkesi	Üzüm	Sıvı fermantasyon	İspanya	ICP-OES	Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, V ve Zn	Paneque vd. (2016)
Domates sirkesi	Domates	Sıvı fermantasyon	Japonya	AAS	Ca, Na, K, Mg ve Fe	Koyama vd. (2017)

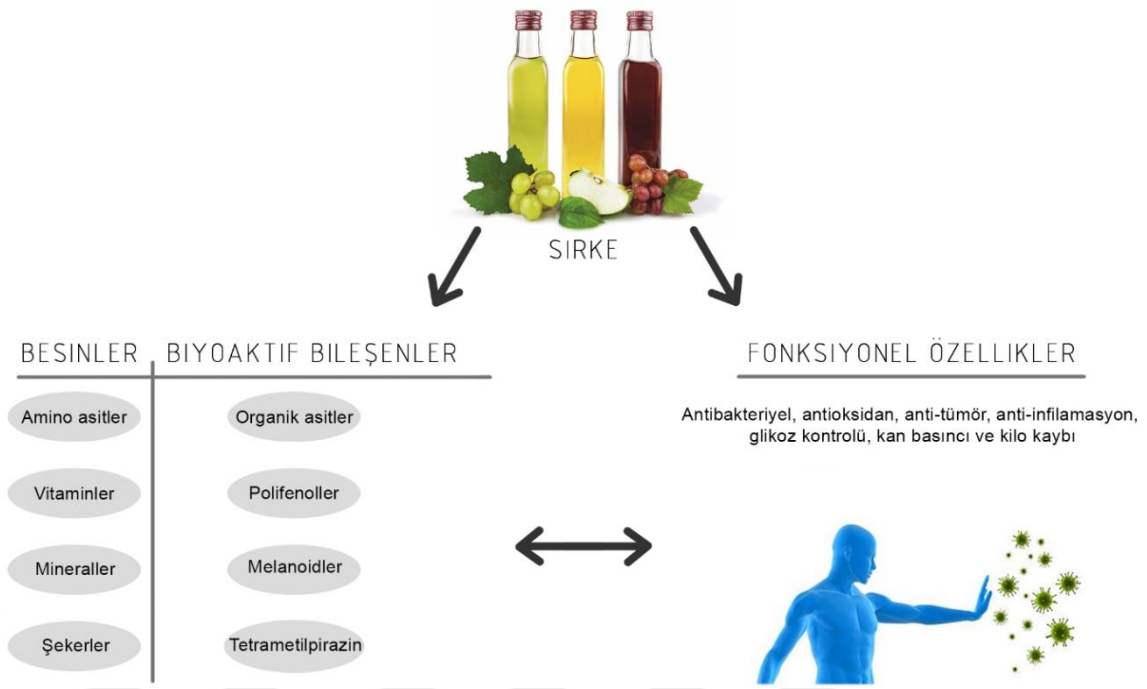
Kaynak: Xia vd., 2020

Geleneksel ve endüstriyel sirkelerde yapılan araştırmada, sirkede en bol bulunan mineraller Na, K ve Ca olarak belirlenmiştir. Geleneksel ev yapımı sirkeler antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve endüstriyel sirke örneklerine kıyasla daha çok laktik asit bakterisi, asetik asit bakterisi, maya ve küf yüküne sahip oldukları gözlemlenmiştir (Öztürk vd., 2015).

Sirke hammaddelerinin işlevleri sadece sirke lezzetlerine katkıda bulunmakla kalmaz, antibakteriyel aktivite, kan basıncını düşürme, antioksidan aktivite, diyabetin etkilerini azaltma ve kardiyovasküler hastalığın önlenmesi ve tedavisinde de önemli rol oynar. Sirkenin fonksiyonel özellikleri yanında hücre metabolizması regülasyonunun düzenlenmesi, immünoregülasyon, antikoagülasyon ve beyin gelişiminin iyileştirilmesinde faydaları olduğu kanıtlanmış ve lipit metabolizmasının düzenlenmesi, karaciğer koruması ve kan basıncı ve glikoz kontrolünde etkili olduğu ortaya konmuştur (Xia vd., 2020; Gomes vd., 2018).

Sirke, hammaddesine göre değişen biyoaktif bileşenleri sayesinde kanser gelişimini önlemesi gibi sağlık açısından olumlu etkilere sahiptir. Sirke çeşitlerinden, “üzüm sirkesinin sindirimi kolaylaştırdığı, hububat sirkesinin iştah açıcı olduğu ve kalsiyum emilimini desteklediği, pirinç sirkesinin kan basıncını dengelediği, elma sirkesinin antitümör etkiye sahip olduğu ve çilek sirkesinin kan glukozunu ve serum insülinini düzenleyici etkiye sahip olduğu bilinmektedir.” olarak bahsedilmiştir (Kırcı, 2017; Samanidou vd., 2001).

Sirke sadece yemeklerde, salatalarda değil, turşu yapımında da kullanılmaktadır. Salça, mayonez, hardal ve diğer benzeri gıdaların hazırlanıp konservelenmesinde ve gıdalarda koruyucu madde olarak ve ilaç üretimlerinde de yararlanılmaktadır (Ünal, 2007). Şekil 2.7’te sirke hammaddelerinin içerdiği besinler ve biyoaktif bileşenler verilmiştir. Bu biyoaktif bileşenlerin fonksiyonel açıdan özellikleri örneklenmiştir.



Şekil 2.11: Sirkenin Biyoaktif bileşenleri

Kaynak: Xia vd., 2020

Üretilen sirkelerin hammaddelerine göre birçok fonksiyonel özellikler belirlenmiştir. Son zamanlarda farklı hammaddelerden üretilen sirkelerde yapılan araştırmalar farklı fonksiyonel özellikler ortaya koymuştur. Vişneden ve konsantre vişne suyundan elde edilmiş sirke örneklerinde gallik asit, klorojenik asit, kateşin, epikateşin, kafeik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit gibi bileşikler tespit edilmiştir (Özen, 2018). Dut sirkesinin güçlü antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Aydın, 2013). Karadut meyvesinden sirke üretim süresince içinde bulunan kateşin, klorojenik asit ve kafeik asitte artışlar oluşmuştur (Marangoz, 2016). Güvem sirkesi insan sağlığını destekleyici fenolik bileşikler, antosiyanin, flavonoid, tanen ve antioksidan aktivite niteliklerini barındıran fonksiyonel bir sirkedir (Kırcı, 2017). Genellikle tahıl ve meyve sirkelerinin, pişirme ve yıllardırma aşamalarında oluşan sirkedeki makromolekül bileşenlerden olan melanoidinlerden dolayı daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Şengün ve Kılıç, 2019). Günümüzde sirke az miktarda antiseptik olarak da kullanılmaktadır (Akbaş ve Cabaroğlu, 2010).

2.3 Malatya Kayısı (*Prunus armeniaca* L.)

Türkiye kayısının genetik kökeni olmamasına rağmen dünyanın en önemli kayısı üreticisidir. Türkiye’de neredeyse bütün kayısı türleri yetiştirilir (Yılmaz, 2008; Yılmaz, Kargı ve Kafkas, 2011). FAO’nun 2019 verilerine göre dünyada yaklaşık olarak 4.084.000 ton taze kayısı üretilmiştir. Türkiye bunların içinde ~ 847000 ton taze kayısı üretim payını tek başına karşılamıştır. Ayrıca bitkisel üretim genel müdürlüğü, tarım havzaları genel başkanlığı tarafından 2019 yılında yayınlanan kayısı bültenine göre; 2018 yılında Malatya’da yaklaşık 750.000 ton yaş kayısı üretimi gerçekleşmiştir (Anonim, 2019). Türkiye yaklaşık %21’lik pay ile dünya kayısı üretiminde ilk sırada yer alır. Türkiye’yi Pakistan, İran, Özbekistan, ve İtalya gibi ülkeler takip etmektedir (Ünal, 2010).

Türkiye’deki kayısılar diğer bölgelerdeki kayıılardan daha fazla çeşitliliğe sahip olup renk, lezzet ve tat gibi özellikleriyle farklılık gösterirler. Türkiye kayısı ihracatının yarısından fazlası Malatya tarafından karşılanmaktadır. Malatya’da mevsimine ve coğrafi bölgesine uygun meyveler yetiştirilmekle birlikte; Malatya, dünyada en fazla hasılatı yapılan kayısılarıyla ünlüdür. Evliya Çelebi, 1655 yılındaki Malatya seyahatinden 7.800 meyve bahçesi ve 7 kayısı çeşidinden; “kırmızı, beyaz, sarı, sulu, etli adlarında kayıılardan” bahsetmiştir. Malatya ismini dönemin halklarından Hititler zamanında "Melitue, Maldiya, Melita" olan kelimelerden "meyve bahçesi" anlamına gelmesinden almıştır (Ünal, 2010). Kayısı taze olarak, kurutulmuş ve konserve şeklinde yıl içerisinde tüketilebilen bir meyvedir. Potasyum ve A vitamininin öncülü olan β -karoten yönünden zengindir (Alan vd., 2013). Malatya kayısı, bahçelerinin % 90-95’lik bölümü kurutmalık kayısı çeşitlerine tesis edilmiştir. Yetiştirilen kayısı çeşitlerinin % 73’nü Hacıhaliloğlu, % 17’sini Kabaası, kalan kısmı ise % 1’den az olan diğer türlerin Soğancı, Hasanbey, Zerdali (yabani kayısı) ve Çataloğlu ağaçları oluşturur (Güçlü vd., 2006: Ünal, 2010).

Malatya bölgesinde TÜİK 2009 verilerine göre yaş kayısının % 50’si, kuru kayısının % 90’ı üretilmektedir (Asma, 2000; Yıldırım vd., 2011). 28 ocak 2001’de Türk patent enstitüsünün coğrafi işaret tescil belgesi yayınlanmıştır. Malatya’nın en önemli kurutmalık kayısı çeşidi Hacıhaliloğlu’dur. 1900’lü yılların başında bir seleksiyon sonucu Malatya’nın 12 km kuzeydoğusundaki Hacıhaliloğlu çiftliğinde bulunduğundan adını burdan almıştır. Adını 1930 Yılında Malatya’nın eski belediye başkanlarından olan Hasan Derinkök’ün bahçesindeki çeşitten alan Hasanbey, en önemli sofralık kayısı

çeşididir. Hasanbey çeşidinin suda çözünür kuru madde miktarının yüksek olmasından dolayı ilk başlarda kurutulması denenmiş ancak çeşidin zor koşullara, yola dayanıklılığından ve meyvesinin iri olmasından dolayı tüketim açısından sofralık olarak üretilmesine devam edilmiştir. Türkiye'nin diğer bölgeleri ve dünyaki kayısılarla karşılaştırıldığında, Malatya kayısının kuru madde oranı %25-30 iken diğerleri %15'i geçmemektedir. Böylece diğer bölgelerde yaklaşık 6-7 kg yaş kayısından 1 kg kuru kayısı randımanı alınırken, Malatya'da 3-4 kg yaş kayısından 1 kg kuru kayısı elde edilmektedir (Ünal, 2010).

2.4 Amaç ve Gerekeçe

Acetobacteriaceae ailesinin içerisinde bulunan AAB özellikle moleküler çalışmaların hızlanmasıyla tanımlanan yeni türlerle genişlemeye devam etmektedir. Meyve ve bitki yüzeyleri ile fermente ürünler AAB için kaynak teşkil etmektedir. AAB, sirke ve kombucha çayı gibi fermente ürünlerin üretiminde rol oynamaları ve teknolojik öneme sahip asetik asit, glukonik asit, L-sorboz, bakteriyel selüloz gibi metabolitleri sebebiyle bilimsel araştırmalar açısından ilgi çekmektedir. Ülkemizde coğrafi işaret almış ve yüksek kuru madde oranıyla diğer türlerden ayrılan Malatya kayısının mikrofloresına yönelik bir çalışma bugüne kadar gerçekleştirilmemiştir. Bundan dolayı öncelikle kayısıya ait bir AAB florası çıkarılması amaçlanmıştır. Yüksek şeker içeriği ile AAB ve LAB gibi bakteri türlerinin ekolojik nişi olma potansiyeli göz önünde bulundurularak Malatya kayısı AAB izolasyonu için bir kaynak olarak seçilmiştir. Kayısının yanı sıra çeşitli meyveler kullanılarak kurulan ev sirkeleri de AAB izolasyonu için kullanılmıştır. Ev sirkeleri için kullanılan hammaddeler spontan fermantasyon yoluyla sirkeleştirilmiştir. Starter kültür kullanılmadığından doğal gelişen mikrofloranın farklı ve zengin bir AAB potansiyeli olacağı öngörülmüştür. İzole edilen bakteriler moleküler yöntemlerle tanımlanmış ve endüstri için önemlilik arz eden sıcaklık ve etanol toleransı ile bakteriyel selüloz üretim potansiyelleri incelenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada meyvelerden doğal fermantasyon yöntemi ile kurulan ev sirkeleri ve Malatya'dan getirilen taze kayısılar kullanılmıştır. Hacıhaliloğlu ve Hasanbey kayısı çeşitleri 2019'un Temmuz ayında Malatya'dan temin edilmiştir.

İkinci araştırma materyali olan 6 çeşit sirke (elma sirkesi, Adapazarı üzüm sirkesi, beyaz üzüm sirkesi, portakal sirkesi, erik sirkesi ve ahlat armudu sirkeleri) Ağustos- Eylül (2019) aylarında kurulmuş ev sirkeleridir. İstanbul'dan elma ve beyaz üzüm, Adapazarı'ndan kırmızı üzüm, Edirne'den kırmızı erik ve Şekil 3.1'de sol tarafta gösterilen ahlat armudu ilaçsız yetiştirilen ağaçlardan toplanmıştır. Portakal İstanbul'daki marketten temin edilmiştir. Her bir meyve güzelce yıkanıp parçalandıktan sonra hijyenik şartlar altında içme suyu ile oda sıcaklığında cam şişede olmak üzere evde doğal fermantasyon yöntemi ile daha önce üretilmiş elma sirkesi (İstanbul'da toplanan elma ile 2018 yılında üretilmiş sirke) katılarak üretilmiştir. Sirkeler 1,5 - 3 ayda olgunlaştıktan sonra sirke anaları sağ taraftaki resimde Şekil 3.1'de gösterildiği gibi alınarak sıvı kısım analizlerde kullanılmıştır.

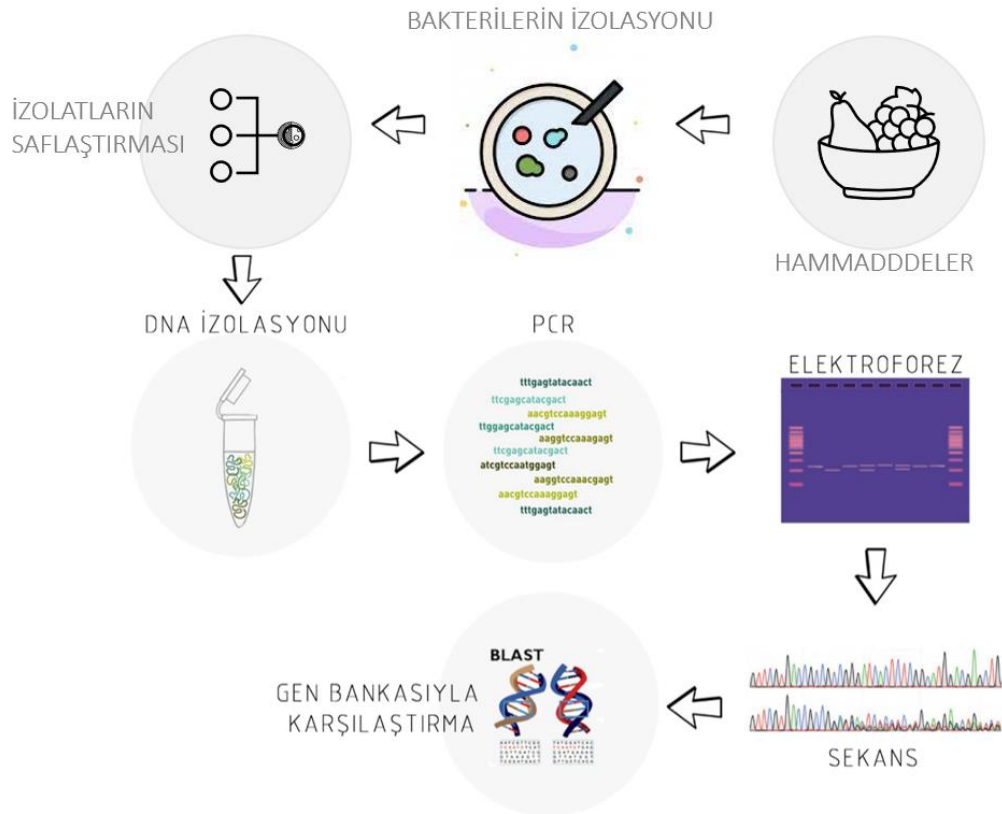


Şekil 3.1: Ahlat Armudu; Elma Sirkesi ve Sirke Anası

3.2. Metod

Araştırma materyali olan taze Malatya kayısısi asetik asit bakterilerini zenginleştirmek amacıyla, homojenize edilerek ağırlığı sabitlenene kadar fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fermente olmuş homojenizat ile diğer araştırma materyalimiz, 6 farklı meyvelerden doğal fermantasyon yoluyla kurulup olgunlaşan ev sirkeleri, peptonlu su ile belirli oranlarda seyreltilip, AAM (acetic acid medium) ve GYC (glikoz yeast extract calcium carbonate agar) petrilere ekilerek bakterilerin izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Petrilere üreyen bakteriler saflaştırılıp ve Gram (-) DNA izolasyonu prosedürüne göre DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu DNA'ların 16S rRNA ve 16S-23S rRNA ITS bölgeleri PCR yapılarak jel elektroforez vasıtasıyla görüntüleri alınmıştır. Daha sonra PCR ürünlerinin pürifikasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve dizilimi belirlenmiştir. DNA dizilimleri BLAST programı ile incelenerek tanımlamaları yapılmıştır. Şekil 3.2'de bu akış şematize edilmiştir.

Asetik asit bakterisi olarak tanımlanan izolatların sıcaklık ve etanol toleransları belirlenmiştir. Ayrıca selüloz üretme kapasiteleri de ölçülmüş ve selüloz üretebilen izolatların belirli sıcaklık ve pH'lardaki selüloz üretim kapasiteleri incelenmiştir.

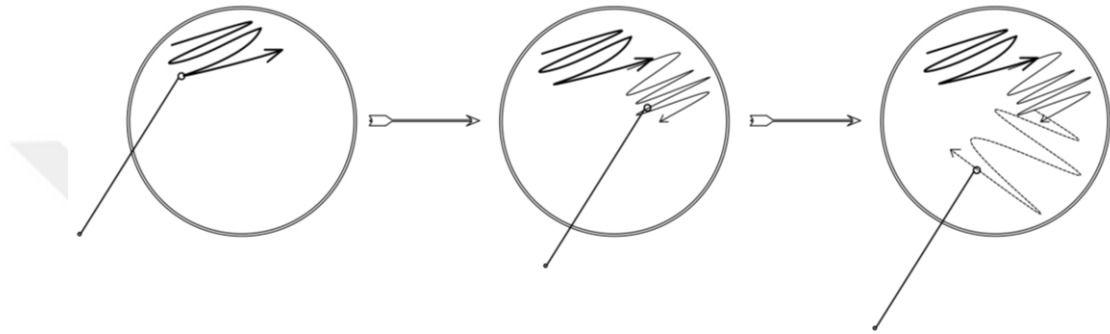


Şekil 3.2: Bakteri İzolasyonu ve Moleküler Tanımlama Akış Şeması

ve AAM besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir. Petriler inokülasyondan sonra 30°C’de 2-4 gün inkübe edilmişlerdir (Sharafi vd., 2010).

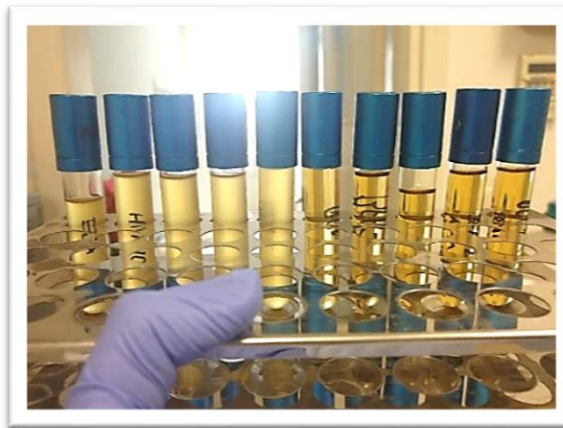
3.2.3. İzolatların Saflaştırılması ve Gliserol Stokların Hazırlanması

Ekimler neticesinde inkübasyon sonucunda 25 - 250 arası koloni gelişen petrilere, morfolojik olarak farklılık arz eden kolonilerin sayısının karekökü kadar koloni seçilmiş ve saflaştırmak üzere başka petrilere Şekil 3.4’te gösterildiği gibi üç çizgi ekimi yapılmıştır.



Şekil 3.4: Üç Çizgi Ekim Yöntemi

Bu sürenin sonunda petrilere üreyen tek kolonilerden seçilerek aynı sıvı besiyerlerine ekilmiştir. Aynı koşullarda inkübe edilip tüplerde gelişen bakteriler Şekil 3.5’de gösterildiği şekilde inkübatörden çıkarılmış ve kryo tüplerine 500 µL miktarda olacak şekilde ve 2 paralel olarak alınmıştır. Üstlerine son hacim %20 gliserol içerecek şekilde gliserol (Sigma-Aldrich) eklenerek vortekslenmiş ve -80°C’de stoklanmıştır (Nielsen vd., 2007).



Şekil 3.5: AAM Brothlarda Bakterilerin İnkübasyon Sonrası Görüntüsü

3.2.4. İzolatların İdentifikasyonu

a) DNA İzolasyonu

Malatya kayısısından ve sirkelerden elde edilen izolatlar DNA izolasyonuna tabi tutulmuştur. Bunun için, PureLink™ Genomic DNA Mini Kit'inin (Thermo Scientific, Waltham, ABD) Gram (-) bakterileri için kullanılan prosedürü kit el kitabında anlatıldığı şekilde kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, bir gece sıvı besiyerlerinde üremiş kültür (10 mL) 13.000 rpm'de 5 dak. süreyle santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra süpernatant atılmış, pelletin üzerine 180 µL digestion buffer ve 20 µL proteinaz K (kit içerisinde mevcuttur) eklenerek tüpler hafif bir şekilde vortekslenmiştir. Tüpler Termomikserde (Miulab, Zhejiang, Çin) 55°C'de 30 dak. inkübe edilip inkübasyon sonunda 1 µL RNase (kit içerisinde mevcuttur) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında (20-25°C) 2 dak. bekletildikten sonra içerisine 200 µL lysis/binding buffer eklenmiş ve homojen bir solüsyon elde edilecek şekilde vortekslenmiştir. Tüplere 200 µL %96-100 etanol (Merck) ilave edilip 5 saniye vortekslenmiş ve bu karışım kit içerisinde bulunan kolonlara aktarılmıştır. Kolonlar 10 000 g'de 2 dak. santrifüj (Hitachi, Himac CR22N, Japonya) edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpleri atılmış, kolonlar yeni toplama tüpleri üzerine yerleştirilmişlerdir. Kolonlara 500 µL wash buffer 1 eklendikten sonra 10 000 g'de 1 dak. santrifüj edilerek yıkanmış, toplama tüpleri atılarak kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine 500 µL wash buffer 2 eklenen kolonlar tekrar 10 000 g'de 1 dak. santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerinde biriken sıvı döküldükten sonra tekrar kolonlar tüplere yerleştirilmiş ve tüpler maximum hızda 3 dak. santrifüj edilmiştir. Süre sonunda kolonlar steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilerek içerisine 70 µL elution buffer eklenip 1 dak. oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüpler maximum hızda 1 dak. santrifüj edilerek izole edilen DNA mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve -20°C'de saklanmıştır.

b) Rep-PCR İle Gruplama

Elde edilen izolatları dizilim analizinden önce gruplamak ve birbirleriyle aynı olan suşları elemek amacıyla rep-PCR gerçekleştirilmiştir. Rep-PCR sonucunda jelde aynı profili veren izolatlardan biri veya bir kaç seçilerek 16S rRNA identifikasyon PCR'ı yapılmış ve dizi analizine tabi tutulmuştur.

Rep-PCR'ı reaksiyonun final hacmi 25 µl olacak şekilde Tablo 3.1'de gösterilen reaksiyon elemanlarından her bir örnek için PCR tüplerine belirtilen miktarlar konmuştur. PCR reaksiyonu, ön denatürasyon 95°C'de 7 dak. 30 döngü 90°C'de 30 s. denatürasyon, 40°C'de 60 s. bağlanma ve 65°C 8 dak. uzama ve son uzama 65°C'de 16 dak olacak şekilde T100 Thermal Cycler (Biorad, California, USA) cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Dream Taq el kitabı, Thermo Scientific) (Versolavic, 1994). DNA kontaminasyonunun kontrolü amaçlı negatif kontrol olarak aynı reaksiyon DNA yerine steril distile su kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 3.1: Rep-PCR Reaksiyon Elemanları

Reaksiyon Elemanları	Miktar (µL)
Dream Buffer (10x) (Thermo Scientific, 20 mM)	2,5 µL
Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, 5 U/µL)	0,25 µL
GTG-5 (Macrogen, 10 mM)	2 µL
dNTP Mix (2,5 mM)	2 µL
DNA (≈100 ng/µL)	1 µL
dH ₂ O (Distile su)	17,25 µL
Toplam Hacim	25 µL

c) İdentifikasyon PCR'ı

Asetik asit bakterilerinin tanımlanması için hem 16S hem de 16S-23SITS bölgesinin dizilimi başarı ile kullanılmıştır (Gonzales ve Mas, 2011; Ruiz vd., 2000). 16S-23S ITS PCR için 16S its1 ve 23S its2 primerleri, 16S rRNA PCR için 27F ve 1492R primerleri veya 616V ve 630R primerleri kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri için ise 16S rRNA ile sonuç alınmadığı durumlarda *rpoA* ve *dnaK* bölgeleri çoğaltılmıştır (Tablo 3.2). Primerlerin dizilimleri Tablo 3.2'de verilmiştir. PCR reaksiyonu, rep-PCR ile aynı şekilde gerçekleştirilmiş, hazırlanan primerlerden her reaksiyon içerisinde 1'er µL kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, ön denatürasyon 94°C'de 7 dak. uzama 34 döngü 94°C'de 30 s. denatürasyon, 50°C'de 30 s. bağlanma ve 72°C 1 dak. ve son uzama 72°C'de 10 dak. olacak şekilde T100 Thermal Cycler (Biorad) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2: PCR İçin Kullanılan Primerler

Primer adı	Primer Dizilimi	Yapışma Sıcaklığı (Annealing)(°C)	Referans
1492R	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	50 °C	John Willey and Sons., 1991
27F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	50 °C	John Willey and Sons., 1991
630R	5'-CAK AAA GGA GGT GAT CC-3'	52 °C	Juretschko vd., 1998
616V	5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC-3'	52 °C	Juretschko vd., 1998
16SITS1	5'-ACC TGC GGC TGG ATC ACC TCC-3'	55 °C	Ruiz vd., 2000
23SITS2	5'-CCG AAT GCC CTT ATC GCG CTC-3'	55 °C	Ruiz vd., 2000
dnaK 1790R5	5'-GCT TGT CTT TTT GCT ACT TGA CC-3'	60°C	Selby vd., 2011
dnaK 500F3	5'-CAG TTA TGG AAG GTG GGG AAC-3'	60°C	Selby vd., 2011
rpoA23R	5'-ACH GTR TTR ATD CCD GCR CG-3'	50 °C	Nyanzi vd., 2013
rpoA21F	5'-ATG ATY GAR TTT GAA AAA CC-3'	50 °C	Nyanzi vd., 2013

d) Agaroz Jel Elektrofrez

DNA örneklerinin elektrofrez, rep-PCR için %1,5 agaroz içeren ve tanımlama PCR'ları için %0,8 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Meyers vd., 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz ve 100 mL 1xTAE (tris (Sigma-Aldrich)-EDTA (Sigma-Aldrich)-asetik asit (Sigma-Aldrich) 250 mL'lik cam şişe içerisinde mikrodalga fırında çözülmüştür. İçerisine 5 µL red-safe (Intron, Daejeon, South Korea) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulan solüsyon elektrofrez yeni kalıbına 100 mL olacak şekilde aktarılmış ve jel tarakları yerleştirilerek 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tampon çözelti, jeli kapatacak şekilde elektrofrez tanklarına dökülmüş ve jellerin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar çıkartılmıştır. PCR örneklerinden

10 µL alınarak temiz bir parafilm üzerinde yürütme boyasından 2 µL boya çözeltisi ile karıştırılmış ve mikropipet aracılığı ile jel kuyucuklarına yüklenmiştir. DNA'nın büyüklüğünü belirlemek amacıyla jelin bir kuyucuğuna da 6 µL XLarge DNA Ladder RTU marker (Gene Direx, St. Louis ABD) yüklenmiştir.

Elektroforez, 16S PCR'ları için 80- 95 voltta yaklaşık 45- 60 dak çalıştırılmıştır. Rep-PCR için ise 35 voltta 4,5- 5 saat DNA'ların yürümesi beklenmiştir. Yükleme boyası jelin 3/4 ve 4/5'lik kısmını geçtikten sonra elektroforez işlemi sona erdirilmiştir (Lee vd., 2012). İşlem sonunda jel, görüntüleme cihazında (Azure 300, ABD) incelenmiştir.

e) PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR'da çoğaltılan ve agaroz jelde görüntülenen PCR reaksiyonları (~ 75 µL) GeneJet PCR saflaştırma kiti (Thermo Scientific) kullanılarak kit el kitabında anlatıldığı şekilde saflaştırılmıştır. Mikrosantrifüj tüpe örneğin 5 katı kadar BNL buffer eklenip vorteksledikten sonra spin kolonlara aktarılmıştır. Santrifüj işleminden sonra 750 µL washing buffer eklenmiş ve kitapçığın belirlediği prosedür gereği santrifüjlenmiştir. Alttaki kolon atılarak steril mikrosantrifüj tüpü yerleştirilmiştir. Üstüne 40 µL elution buffer eklenmiş ve santrifüjlenmiştir. Saflaştırma işlemi tamamlandığında örneklerden 5 µL alınarak 1 µL boya ile karıştırılıp kuyucuklara yüklenip kontrol olarak jelde bakılmış, sonrasında her örnek son hacimde 30 µL olarak dizilim analizine gönderilmek üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

f) BLAST Tarama

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), aranan dizilimi (nükleotid veya amino asit) veri tabanında bulunan mikroorganizmaların dizileri ile karşılaştırarak, % benzerliği en yakın olan dizilimleri veren bir bilgisayar programıdır (Polat ve Karahan, 2009). Bu programda dizileme sonuçları (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) adresli internet sayfasında nükleotit blast kısmındaki bölüme girilerek diğer mikroorganizmaların dizilemlerini içeren veri tabanları ile karşılaştırılır. Tarama sonucu, aranan dizinin hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ile birlikte belirlenir (Altschul vd. 1997). Elde edilen dizilimler BLAST programına girilerek bakteri identifikasyonları yapılmıştır.

3.2.5. İzolatların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Sıvı içerisinde (submerged) sirke üretimlerinde yüksek sıcaklık toleransı, yüksek etanol ve asetik asit konsantrasyonlarına dayanıklılık tercih sebebidir (Ünal, 2007). Asetik asit bakterilerinden bakteriyel selüloz üretiminde de fayda sağlanmaktadır, bunun için selüloz ve biyofilm üretim kapasitesi yüksek izolatlar tercih edilir. Bu nedenle izolatların etanol ve sıcaklık toleransları ile selüloz üretim kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

g) Etanol Toleransı

Etanol toleransının belirlenmesi amacıyla izolatlar öncelikle 1 gün boyunca 180 rpm ve 30°C'de 50 mL'lik zenginleştirilmiş besiyerinde (%1 glukoz (Sigma-Aldrich), %1 maya ekstraktı (Biolife), %1 etanol (Merck), w/v) inkübe edilmişlerdir. Daha sonra, %0,1 peptonlu su içerisinde 10⁵ seviyesinde seyreltilip 100 µL alınarak paralel olacak şekilde değişik etanol konsantrasyonları (%4, %6, %8, %10) içeren (otoklavdan sonra eklenmiştir) GYEC besiyerinde (%1 glukoz (Sigma-Aldrich), %1 maya ekstraktı (Biolife), %2 kalsiyum karbonat (Sigma-Aldrich), %2 agar (Sigma-Aldrich), w/v) yayma plak metodu kullanılarak paralelli olarak ekilmiş ve 30°C'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Şeffaf zonla üreme görülenler, belirtilen konsantrasyonlara toleranslı olarak kabul edilmişlerdir (Chen vd., 2016).

h) Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatlar etanol toleransında anlatıldığı şekilde zenginleştirilmiş besiyerinde geliştirilip inkübe edildikten sonra dilüsyonlardan 100 µL alınarak 2 paralel olacak şekilde %4 etanol konsantrasyonu içeren GYEC besiyerine yayma plak metodu kullanılarak paralelli olarak ekilmiş ve 30°C, 35°C ve 38°C'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Yine etanol toleransında belirtildiği şekilde şeffaf zonla üreme gösterenler belirtilen sıcaklıklara toleranslı olarak kabul edilmişlerdir (Chen vd., 2016).

i) Selüloz Üretim Kapasitesinin Belirlenmesi

HS (Hestrin-Schramm, 1954) besiyerinde %2 glikoz (Sigma-Aldrich), % 0,5 maya ekstraktı (Biolife), % 0,5 pepton (Merck), % 0,27 Na₂HPO₄ (İsolab) ve % 0,115 C₆H₈O₇ (Sigma-Aldrich) bulunmaktadır. Selüloz üretimi için iki farklı pH, pH:5 ve pH:6 ve beş

farklı sıcaklık (26°C, 28°C, 30°C, 32°C ve 34°C) kullanılmıştır. Örneklerin pH'ı seyreltik HCl ile pH 5'e ayarlanmıştır (Gomes vd., 2013). Özellikle izolatlar 2 paralel olacak şekilde 30°C'de iki gün süreyle 5 mL'lik HS besiyerinde prekültür olarak üretilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda besiyeri-hava ara yüzeyinde biyofilm oluşturan izolatlar prekültürle birlikte 250 mL erlen içerisinde bulunan 45 mL HS besiyerine eklenmiş ve toplamda 50 mL kültür 7 gün statik şartlarda bekletilmiştir (Gomes vd., 2013). Selüloz tabakası olan biyofilm alınarak 80°C'de %2 NaOH (Sigma-Aldrich) çözeltisi içerisinde 45 dakika bekletilerek selüloz olmayan bileşenlerden arındırılmıştır. Distile su ile pH 7 olana kadar bolca yıkandıktan sonra 45°C'de inkübatörde sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulup ağırlığı belirlenmiştir (Aswini vd., 2020).



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu araştırmada asetik asit bakterilerini izole etmek 6 çeşit sirke (elma, ahlat armudu, erik, portakal, kırmızı ve beyaz üzüm) ve 2 çeşit Malatya kayısı (Hacıhaliloğlu ve Hasanbey) kullanılmıştır. İzolatlar moleküler yöntemlerle tanımlanmış, bazı teknolojik özellikleri (etanol ve sıcaklık toleransı ile selüloz üretimi) belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar bu bölümde alt başlıklar halinde sıralanmıştır.

4.1. Sirke Örneklerinin pH Değerleri

Bakteri izolasyonlarının yapıldığı sirke örneklerinin pH'ları Tablo 4.1'de verilmiştir. En düşük pH 3,11 ile beyaz üzüm sirkesinde ölçülürken, en yüksek pH değeri 3,62 ile ahlat armudu sirkesinde gözlenmiştir. Sirkelerin pH değerlerindeki farklılıkların sebebi kullanılan hammaddelerin içeriklerinden, olgunlaşma sıcaklığı ve sürelerinden kaynaklanabilir. Kullanılan hammaddeler içerisinde ahlat armudu ile diğer meyvelerden daha yüksek pH elde edilmiştir. Bunun sebebi sirkenin daha geç olgunlaşma süresi istemesinden olabilir. Bu sirke bakterileri hemen gelişmemiş, bu sebeple fermantasyon geç başlamış olabilir. Ayrıca ahlat armudu sirkesine eklenen tuz oranı diğerlerine göre daha fazla olmuş olabilir.

Tablo 4.1: Sirke Örneklerinin pH Değerleri

Sirke Örneği	pH
<i>Erik Sirkesi (ES)</i>	3.25 ±0.1
<i>Kırmızı Üzüm Sirkesi (AUS)</i>	3.17 ±0.1
<i>Portakal Sirkesi (PS)</i>	3.38 ±0.0
<i>Elma Sirkesi (ELS)</i>	3.21 ±0.1
<i>Ahlat Armudu Sirkesi (AAS)</i>	3.62 ±0.1
<i>Beyaz Üzüm Sirkesi (GUS)</i>	3,11 ±0.1

Gerbi vd., (1998) 65 farklı sirke örneğinin pH değerlerinin 2.36-3.0 arasında değiştiğini belirlemiştir. Aktaş ve Cabaroğlu'nun 2010'da yaptıkları araştırmada da 12 farklı marka üzüm sirkesi örneklerinde pH'ların 2.63 ile 3.27 değerleri arasında değiştiği belirtilmiştir. Öztürk vd., (2015) geleneksel ev yapımı Türk sirkesinin, farklı illerden temin edilmiş 8 farklı hammaddeden üretilen 25 sirkenin en yüksek pH'ını üzüm sirkesinde $3,90 \pm 0.02$ ile ölçerlerken, en düşük pH'ını 2.63 ± 0.02 ile limon sirkesinde ölçmüşlerdir.

4.2. Malatya Kayısı ve Sirke Örneklerinden Olası Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Malatya'ya ait Hacihaliloğlu kayısı cinsi ve Hasanbey kayısı cinslerinden 45 tane izolat elde edilmiştir. Doğal fermantasyon yoluyla üretilmiş ve benzer sirke analarıyla kurulmuş elma, beyaz üzüm, kırmızı üzüm, ahlat armudu, portakal ve kırmızı erikten yapılmış sirkelerden ise 24 izolat saflaştırılmıştır. Tablo 4.2'de elde edilen izolatların saflaştırıldıkları hammadde kaynakları ve besiyerleri ile birlikte verilmiştir.

Tablo 4.2: İzolatların Saflaştırıldıkları Besiyerleri

Kayı- Sirke Çeşitleri	Acetic Acid Medium Besiyeri (AAM)	Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Besiyeri (GYC)
<i>Hacihaliloğlu Kayısı İzolatları</i>	HFA1,HFA2,HFA3,HFA4,HFA5, HFA6,HFA7,HFA8,HFA9,HFA10, HFA11,HFA12,HFA13,HFA15	HFG1,HFG2,HFG3,HFG4,HFG5, HFG6,HFG7,HFG8,HFG9,HFG10, HFG11,HFG12,HFG13,HFG14, HFG15,HFG16,HFG17,HFG18
<i>Hasanbey Kayısı İzolatları</i>	BFA6,BFA7,BFA8,BFA9, BFA11,BFA13,BFA15,BFA16, BFA17	BFG1,BFG8,BFG9,BFG21
<i>Çeşitli Sirke İzolatları</i>	PS1,PS2,PS3,PS4 AUS1,AUS2,AUS3,AUS4 GUS1,GUS2,GUS3 AAS1,AAS2,AAS3,AAS4 ES1,ES2,ES3 ELS1,ELS2,ELS3,ELS4,ELS5,ELS6	-

*Kısaltmaların açılımı EK3'te verilmiştir.

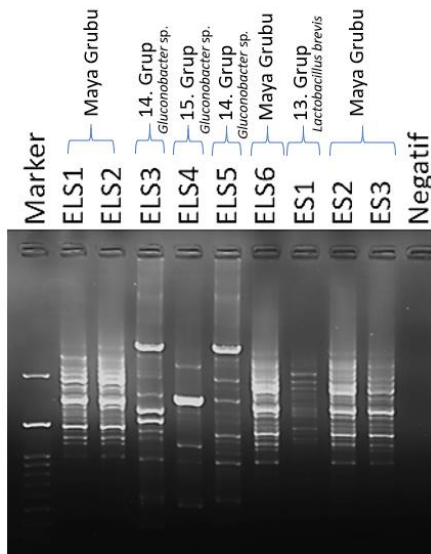
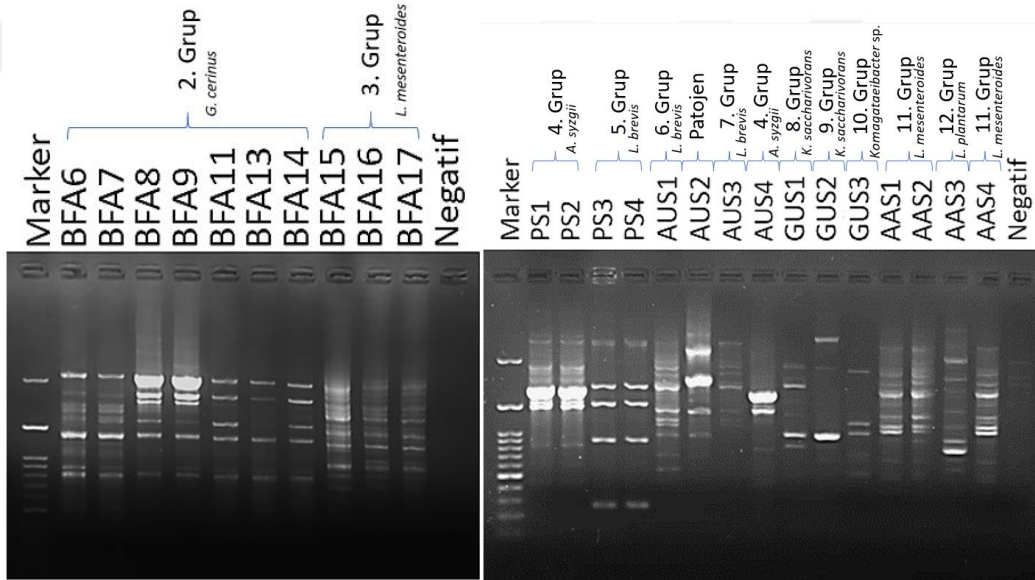
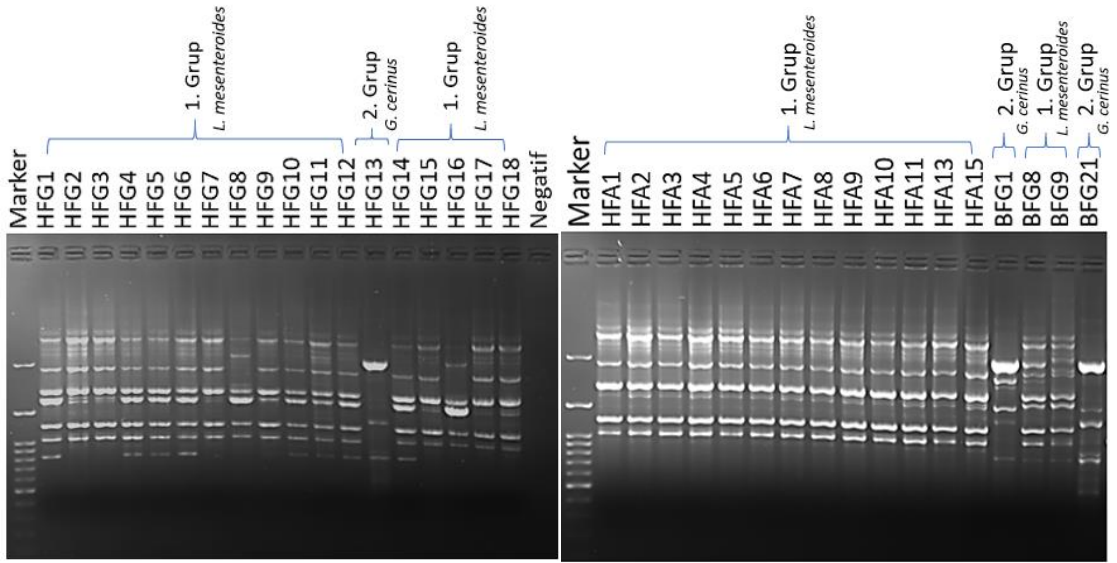
Kayısı izolatları AAM ve GYC besiyerlerinden izole edilirken, çeşitli sirke izolatları AAM besiyeri kullanılarak izole edilmiştir. Kayısı izolatlarının GYC besiyerinde koloni oluşturmaları zayıf olduğundan ve AAM besiyeri ile daha fazla koloni elde edildiğinden sirke izolatlarında yalnızca AAM tercih edilmiştir.

Perumpuli vd., 2014'te Hindistan cevizi sirkesiyle yaptıkları çalışmalarında asetik asit bakterileri için PDA (potato dextrose agar), YPG (yeast extract peptone glycerol) ve YPS/YPM (yeast extract peptone mannitol) besiyerlerini kullanmışlar, *Gluconobacter* ve *Acetobacter* türü suşlar tanımlamışlardır. Saeki vd. (1997) asetik asit bakterileri için potato medium kullandıklarından bahsetmişlerdir. Şengün ve Kılıç (2019) derleme makalelerinde genelde sirke AAB'lerinin izolasyonu amacıyla geliştirilen glucose yeast agar (GY), glucose yeast extract CaCO₃ agar (GYC) ve reinforced AE-medium (RAE) gibi besiyerlerinin kullanıldığını ancak bu besiyerlerinin dahi tüm türlerin gelişimi için yeterli olmadığını belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada AAB için ABS adı verilen daha spesifik bir besiyeri geliştirilmiş, bu besiyerini kullanarak 10 sirke ve 10 kimchi örneğinden toplamda 5 yeni AAB türü tanımlanmıştır (Kim vd., 2019). Araştırmacılar bu yeni türlerin GYC besiyerinde gelişmediğini, ABS besiyerinin AAB suşlarını izole etmede ve AAB'lere yönelik kontaminasyonları saptamada daha yararlı olduğunu belirtmişlerdir.

4.3. İzolatların Genotipik Çeşitliliği ve Tanımlanması

Rep-PCR (GTG5) analizi mikrobiyal çeşitliliğin sınıflandırılabilirdiği bir genomik parmak izi tekniğidir (Masco, 2003; Kayaşlı, 2019). Rep-PCR jel görüntüleri karşılaştırılarak izolatlar aralarında benzer olanların gruplandırılabilmesi mümkündür. Kayısı (45 izolat) ve sirkelerden (18 izolat) elde edilen bakteri izolatları DNA izolasyonlarının ardından rep-PCR analizine tabi tutulmuştur. Rep-PCR agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Profilleri benzer olanlar gruplandırıldığında 16 grup elde edilmiştir (Şekil 4.1). Her gruptan bir veya birkaç izolat dizilim analizi ile tanımlanmak üzere seçilmiştir ve 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS bölgeleri dizilerek tanımlanmıştır. Her iki besiyerinde de asetik asit bakterileri yanında laktik asit, maya vb. gibi mikroorganizmalara rastlanmıştır (Tablo 4.3 ve 4.4).



*Kısaltmaların açılımı EK3'te verilmiştir

Şekil 4.1: İzolatların Rep-PCR Jel Görüntüleri

İzole edilen 63 suşun 44 tanesi laktik asit bakterisi (5 *Lactobacillus brevis*, 1 *Lactobacillus plantarum* ve 38 *Leuconostoc mesenteroides*) olarak saptanırken, 19 tanesinin de AAB (3 *Gluconobacter* sp., 1 *Komagataeibacter* sp., 2 *Komagataeibacter saccharivorans*, 3 *Acetobacter syzgyi* ve 5 *Gluconobacter cerinus*) olduğu saptanmıştır. İzolatların benzerlik yüzdeleri ve GTG5 gruplaması dikkate alındığında 3 tanesinin (GUS3, ELS4 ve ELS5) mevcut olan AAB'lerden farklı olduğu ve tam benzerlik vermediği görülmüştür.

Kayisılardan Hacihaliloğlu ve Hasanbey türlerinde 1 AAB türü (*Gluconobacter cerinus*) ve 1 LAB türü (*Leuconostoc mesenteroides*) gözlenmiştir. Elma sirkesinde *Gluconobacter* sp.; erik sirkesinde *L. brevis*; portakal sirkesinde *L. brevis* ve *Acetobacter syzgyi*; kırmızı üzüm sirkesinde *L. brevis* ve *A. syzgyi*; beyaz üzüm sirkesinde *Komagataeibacter* sp. ve *K. saccharivorans*; ahlat armudu sirkesinde *Leu. mesenteroides* ve *L. plantarum* tespit edilmiştir (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4).

İzolatlardan 16S rRNA bölgesi ile tam ayrışma gözlenmeyen ya da kararsız kalınanların 16-23SITS rRNA *dnaK* veya *rpoA* bölgeleri de sekanslanmış ve elde edilen benzerlikler yüzdeleri Tablo 4.3'te verilmiştir. GUS3 izolatı 16S rRNA bölgesinde *Komagataeibacter intermedius* tip suşu ile %100 sonucunu verirken ve *Komagataeibacter oboediens* tip suşu ile %99.88 sonucunu vermektedir. Ancak 16S-23S ITS bölgesinde 16SITS1 primeri ile bakılan BLAST sonucunda %99.72 oranı ile *Komagataeibacter oboediens*, %96.72 ile *Komagataeibacter intermedius*'e yakınlık göstermiştir. Sonuçlara bakıldığında, 16S rRNA ile başka 16S-23S ITS rRNA ile başka türler öne çıkmıştır. Bu durumda GUS3 izolatının varolan türlerle tam ayrışamadığı belirlenmiştir. ELS3, ELS4 ve ELS5 izolatları da 16S rRNA bölgelerinde ayrımlarda %99.86 ile *Gluconobacter potus*, *Gluconobacter vitians*, *Gluconobacter roseus* ve *Gluconobacter oksidans*'a aynı benzerlik yüzdesini vermiştir. *DnaK* bölgelerinde de benzerlik oranları %77.33 gibi düşük bir benzerlik yüzdesi vermiştir. Var olan türlerle tam ayrışma sağlanamadığından bu izolatlarda yeni tür olarak tanımlanma potansiyeli taşımaktadır.

Tablo 4.3: Asetik Asit Bakterilerinin Rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatların İdentifikasyonları

N o	İzolat kodu	Kaynak	Saflaştırılan besiyeri	Rep-PCR grubu	Tanımlama	Benzerlik (%)	Referans Genbank no	İdentifikasyon markörü ve dizilim primeri
1	BFA6*	Hasanbey	AAM	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i> *	%99.92	NR_041048.1	16S rRNA
2	BFA7	Hasanbey	AAM	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i>	-		GTG5
3	BFA8	Hasanbey	AAM	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i>	-		GTG5
4	BFA9*	Hasanbey	AAM	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i> *	%100	NR_041048.1	16S rRNA
5	BFA11	Hasanbey	AAM	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i>	-		GTG5
6	BFA13*	Hasanbey	AAM	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i> *	%100	NR_041048.1	16S rRNA
7	BFA14	Hasanbey	AAM	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i>	-		GTG5
8	BFG1*	Hasanbey	GYC	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i> *	%100	NR_041048.1	16S rRNA
9	BFG21	Hasanbey	GYC	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i>	-		GTG5
10	HFG13*	Hacıhaliloğlu	GYC	2. Grup	<i>Gluconobacter cerinus</i> *	%100	NR_041048.1	16S rRNA
11	PS1*	Portakal Sirke	AAM	4. Grup	<i>Acetobacter syzgyi</i> *	%100 %94.57	NR_113850.1 FR716486.1	16S rRNA ve 16S-23S rRNA ITS (16SITS1)
12	PS2	Portakal Sirke	AAM	4. Grup	<i>Acetobacter syzgyi</i>	-		GTG5
13	AUS4*	Kırmızı üzüm sirke	AAM	4. Grup	<i>Acetobacter syzgyi</i>	-	-	16S-23S rRNA ITS (16SITS1)
14	GUS1*	Üzüm sirke	AAM	8. Grup	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i> *	%99.92 %99.39	NR_113398.1 FR716491.1	16S rRNA ve 16S-23S rRNA ITS (16SITS1)
15	GUS2*	Üzüm sirke	AAM	9. Grup	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i> *	%99.92	NR_113398.1	16S rRNA ve 16S-

						%99.85	FR71649 1.1	23S rRNA ITS (16SITS1)
16	GUS3*	Üzüm sirke	AAM	10. Grup	<i>Komagataeibacter</i> sp.*	%99.77 %99.72	NR_113 397.1 KC4784 56.1	16S rRNA ve 16S- 23S rRNA ITS (16SITS1)
17	ELS3*	Elma sirke	AAM	14. Grup	<i>Gluconobacter</i> sp.*	%99.93	NR_026 118.1	16S rRNA (27f, 1492r)
18	ELS4*	Elma sirke	AAM	15. Grup	<i>Gluconobacter</i> sp.*	%99.76 %77.33	MT3550 96.1 CP05821 4.1	16S rRNA ve DnaK
19	ELS5*	Elma sirke	AAM	14. Grup	<i>Gluconobacter</i> sp.*	%99.86 %77.33	MT3550 96.1 CP05821 4.1	16S rRNA (27f) ve DnaK

* İdentifikasyon dizilim analizi ile yapılmıştır ve kısaltmaların açılımı EK3'te verilmiştir.

Tablo 4.4: Laktik Asit Bakterilerinin Rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatların İdentifikasyonları

No	İzolat kodu	Origin	Safılaştırılan besiyeri	Rep-PCR grubu	Tanımlama	Benzerlik (%)	Referans	Dizilim primeri
1	HFA1	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
2	HFA2	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
3	HFA3	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
4	HFA4	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
5	HFA5*	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides*</i>	%100	NR_15760 2.1	16S rRNA (27f)
6	HFA6	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
7	HFA7	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
8	HFA8	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
9	HFA9	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
10	HFA10	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
11	HFA11	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
12	HFA13	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
13	HFA15	Hacıhaliloğlu	AAM	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
14	BFA15	Hasanbey	AAM	3. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
15	BFA16	Hasanbey	AAM	3. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
16	BFA17*	Hasanbey	AAM	3. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides*</i>	%99.19	NR_15760 2.1	16S rRNA (630R)
17	BFG8	Hasanbey	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5

18	BFG9*	Hasanbey	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	%99.83	NR_15760 2.1	16S rRNA (27f)
19	HFG1	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
20	HFG2	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
21	HFG3*	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	%100	NR_15760 2.1	16S rRNA (27f)
22	HFG4*	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	%100	KX886793, 1	16S rRNA (27f)
23	HFG5	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
24	HFG6	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
25	HFG7	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
26	HFG8*	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	%100	CP015247. 1	16S rRNA (27f)
27	HFG9*	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	%99.88	NR_15760 2.1	16S rRNA (27f)
28	HFG10	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
29	HFG11*	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	%84.85	NR_15760 2.1	16S rRNA (27f)
30	HFG12	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
31	HFG14	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
32	HFG15	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
33	HFG16*	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	%99.89	KX886793, 1	16S rRNA (27f)
34	HFG17	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
35	HFG18	Hacıhaliloğlu	GYC	1. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5

36	PS3*	Portakal Sirke	AAM	5. Grup	<i>Lactobacillus brevis*</i>	%99.87 %99.87	LS483405.1 LS483405.1	16S rRNA (27f) ve rpoA21f
37	PS4	Portakal Sirke	AAM	5. Grup	<i>Lactobacillus brevis</i>	-		GTG5
38	AUS1*	Kırmızı üzüm sirke	AAM	6. Grup	<i>Lactobacillus brevis*</i>	%99.88 %100	LS483405.1 MW866814.1	16S rRNA (630R), 16S-23S rRNA ITS (16SITS1)
39	AUS3*	Kırmızı üzüm sirke	AAM	7. Grup	<i>Lactobacillus brevis*</i>	%98.58	LS483405.1	16S rRNA (630R)
40	AAS1	Ahlat sirke	AAM	11. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
41	AAS2	Ahlat sirke	AAM	11. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-		GTG5
42	AAS3*	Ahlat sirke	AAM	12. Grup	<i>Lactobacillus plantarum*</i>	%100	NR_115605.1	16S rRNA (27f)
43	AAS4*	Ahlat sirke	AAM	11. Grup	<i>Leuconostoc mesenteroides*</i>	%99.64	NR_157602.1	16S rRNA (630R)
44	ES1*	Erik sirke	AAM	13. Grup	<i>Lactobacillus brevis*</i>	%99.26	LS483405.1	16S rRNA (630R)

* İdentifikasyon dizilim analizi ile yapılmıştır ve kısaltmaların açılımı EK3'te verilmiştir.

Literatüre bakıldığında sirke türlerinden LAB izolatlarının da elde edildiği görülmektedir. Arıcı (2017) *Leuconostoc* türlerinin çoğunlukla laktozu heterofermentatif yolla kullanarak laktik asit yanında, etil alkol ve karbondioksit üretiklerinden bahseder. Bu da sirkenin ilk aşamasında istenilen bir durumdur. Ayrıca *Leu. mesenteroides* türleri yüksek şeker ve tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olduklarından turşu fermentasyonlarında da önem arz ederler (Arıcı, 2017). Asya'daki tahıl ve pirinç sirkelerinde yapılan çalışmalarda, Çin'de üretilen tahıl sirkelerinde *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Streptococcus* gibi cinsler olduğu, pirinç sirkesinde ise LAB türleri olarak *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. brevis*'in izole edildiği bildirilmiştir (Haruta vd., 2006; Peng vd., 2015).

Geleneksel yöntemlerle üretilmiş ev sirkelerinde LAB, AAB, küf ve maya yükünün endüstriyel sirkelere nazaran daha fazla olduğu ortaya konmuştur (Öztürk vd., 2015). Kullanılan besi yerlerinde elde edilen LAB'nin de tanımlanması yapılmıştır. Perumpuli vd., (2014) Hindistan cevizi sirkesinden *Acetobacter pasteurianus* tanımlamışlardır. Wang vd. (2012) elma sirkesinde yaptıkları araştırmada *Gluconacetobacter europaeus* türü tanımlamışlardır. Şengün ve Kılıç (2019) farklı sirke çeşitlerinin mikroflora içeriklerine dair derlemelerinde, geleneksel Türk sirkelerinde; *A. okinawensis*, *A. persici*, *A. indonesiensis*, *A. syzygii*, *A. ghanensis*, *A. tropicalis*, *As. krungthepensis* *K. hansenii*, *K. europaeus*, *K. intermedius*, *K. xylinus*, *K. nataicola*, *K. oboediens*, *K. saccharivorans* türlerinin tanımlandığını bildirmişlerdir.

Yetiman (2012) çalışmasında elma ve üzüm sirke ve sirke analarında yaptığı tanımlamalarda; *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*, *Ga. sucrofermentans* olmak üzere 13 farklı bakteri türü tanımlamıştır.

4.4. Teknolojik Özellikler

4.4.1. İzolatların Etanol Toleransı

İzolatların etanol toleransları % 4, % 6, % 8 ve % 10 etanol içeren GYEC besiyerinde analiz edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: İzolatların Farklı Etanol Konsantrasyonlarında Gelişebilme Yeteneği

İzolat Kodları	Kaynaklar	Dilüsyon	Tür	%4	%6	%8	%10
BFA6	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	+	-	-
BFA9	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-	-
BFA13	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-	-
HFG13	Hacıhaliloğlu	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	+	-	-
BFG1	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	+	-	-
BFG21	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	+	-	-
BFA7	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-	-
BFA8	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-	-
BFA11	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-	-
BFA14	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-	-
GUS1	Üzüm sirke	10 ⁰	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	++	+	+	-
GUS2	Üzüm sirke	10 ⁰	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	+	+	+	-
GUS3	Üzüm sirke	10 ¹	<i>Komagataeibacter sp.</i>	++	+	+	-
PS1	Portakal sirke	10 ⁵	<i>Acetobacter syzgyi</i>	++	+	+	-
AUS4	Ahlat sirke	10 ⁵	<i>Acetobacter syzgyi</i>	+	+	+	-
PS2	Portakal sirke	10 ⁵	<i>Acetobacter syzgyi</i>	++	+	-	-
ELS3	Elma sirke	10 ⁰	<i>Gluconobacter sp.</i>	++	+	+	-
ELS4	Elma sirke	10 ¹	<i>Gluconobacter sp.</i>	+	+	-	-
ELS5	Elma sirke	10 ⁵	<i>Gluconobacter sp.</i>	+	+	+	-

+: 1~9 koloni, ++: 10~19 koloni, +++: >20 koloni

Tablo 4.5’de sirkelerden elde edilen izolatların etanol dayanıklılıklarının kayısı izolatlarından ayrıştığı görülmektedir. Kayısı izolatları *G. cerinus* %6’ya kadar etanol konsantrasyonuna dayanıklılık gösterirken sirke izolatlarının dayanıklılıkları genellikle %8’e kadar gözlenmiştir. Sirke izolatları asidik olan sirke ortamından izole edildikleri için etanol dayanımları yüksek çıkmış olabilir.

Asetik asit bakterilerinin uygun ortam şartları türler arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Belirli sıcaklık, pH ve oksijen koşullarından etkilenerek farklı oranlarda etanolü oksitleme kabiliyetine sahiptirler. Alkollü sıvılarda yaşadıkları ve kendilerine gerekli enerjiyi alkollü okside ederek sağladıkları halde, alkole dayanıklılıkları sınırlıdır ve bu türlere göre değişir. Şarap ortamından elde edilen asetik asit bakterilerinin % 10 ve % 14 (v / v) etanol konsantrasyonlarında etanol dayanımları belirlenmiştir (Gullo ve Giudici, 2008). Buna göre, *Gluconacetobacter hansenii*, *Acetobacter pasteurianus* ve *Gluconacetobacter europaeus* suşları, maya ekstraktlı ortamda etanol konsantrasyonu olarak % 5’den % 10’a kadar gelişme göstermiştir. Ayrıca aynı türün suşları arasında değişkenlik gözlenmiş, örneğin 25 *G. europaeus* suşunun 11’i % 5 etanol konsantrasyonunda gelişmiş ancak etanol konsantrasyonu % 10’a çıkarıldığında gelişme gözlenmemiştir.

Perumpuli vd. (2014) çalışmalarında etanolü YPGD ortamında (10 g/L maya özütü, 10 g/L polipepton, 20 g/L gliserol ve 5 g/L glukoz), AAB’nin etanol toleransı ve asetik asit üretme kapasitelerini incelemişler ve %4, %6, %8 ve %10 etanol konsantrasyonlarına dayanabilen türleri *Acetobacter pasteurianus* olarak belirlemişlerdir. *Acetobacter* suşlarında 37°C’de %6 etanol konsantrasyonunda en yüksek asetik asit verimini almışlardır.

Yapılan başka bir çalışmada, endüstriyel fermente sirke yapımı için spesifik etanole toleranslı AAB suşları izole edilmiştir. % 3’ten % 10’a kadar etanol içeren GYEC besiyerine sirke örnekleri ekilmiş, % 7 etanole dayanıklı AAB izolatları elde edilmiştir. İzolatların 16S rDNA dizileme analizi sonucunda *Acetobacter pasteurianus* olduğu saptanmıştır. Etanol toleransı ile endüstriyel asetik asit bakterilerinin daha kısa yoldan izolasyon yapılabileceğinden bahsedilmiştir (Yuan vd., 2013).

Chen vd. (2016) *Acetobacter pasteurianus*'un etanol toleransını %4- %13 etanol içeren besiyerinde incelemişler, izolatın alkol-asit dönüşüm oranları azalmasına rağmen % 13 etanol konsantrasyonunda % 0,9 asit üretebilecek kadar canlılığını koruduğundan bahsetmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada en fazla %8'e kadar etanol dayanıklılığı gözlenmiştir. Daha yüksek dayanıklılık göstermemeleri bakterilerin yapısıyla ilgili olabileceği gibi elde edilen ortamın zorluk koşullarına alışmalarıyla da ilişkilendirilebilir. Daha fazla etanol konsantrasyonlarının zorluk koşullarına uyum sağlamaları zamanla artabileceği gibi hiç artmayabilir. Daha yüksek dayanıklılık görmek için yüksek etanol içeren brothlar kullanılarak izolasyon yapılabilir ya da başka bir prosedür gereği farklı besiyerleri ve aşamaları uygulanabilir.

4.4.2. İzolatların Sıcaklık Toleransı

GYEC besiyerinde gelişebilen izolatların dayanıklılıkları sıcaklık konsantrasyonu 30°C, 35°C ve 38°C olarak ölçülmüştür (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: İzolatların Farklı Sıcaklıklarda Gelişebilme Yeteneği

İzolat Kodları	Kaynaklar	Dilüsyon	Tanımlama	30°C	35°C	38°C
BFA6	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-
BFA9	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-
BFA13	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-
HFG13	Hacıhaliloğlu	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	+	-
BFG1	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-
BFG21	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-
BFA7	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	+	-
BFA8	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	-
BFA11	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	+	-
BFA14	Hasanbey	10 ⁵	<i>Gluconobacter cerinus</i>	++	+	-
GUS1	Üzüm sirkesi	10 ⁰	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	+	+	-
GUS2	Üzüm sirkesi	10 ⁰	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	+	+	-
GUS3	Üzüm sirkesi	10 ¹	<i>Komagataeibacter sp.</i>	+	+	-
PS1	Portakal sirkesi	10 ⁵	<i>Acetobacter syzgiae</i>	+	-	-
AUS4	Ahlat sirke	10 ⁵	<i>Acetobacter syzgiae</i>	+	-	-
PS2	Portakal sirke	10 ⁵	<i>Acetobacter syzgiae</i>	++	-	-
ELS3	Elma sirke	10 ⁰	<i>Gluconobacter sp.</i>	++	-	-
ELS4	Elma sirke	10 ¹	<i>Gluconobacter sp.</i>	++	-	-
ELS5	Elma sirke	10 ⁵	<i>Gluconobacter sp.</i>	+	+	-

+: 1-9 koloni, ++: 10-19 koloni, +++: >20 koloni

Tabloya bakıldığında izolatlardan yalnızca 8'i 35°C'ye kadar üreme göstermiştir. *Komagataeibacter* suşlarının hepsinin 35°C'ye dayanıklı olduğu gözlenmiştir. *Gluconobacter cerinus* suşlarından yalnızca 2 izolat 35°C'ye dayanıklıdır. *Gluconobacter* sp. suşlarında da ELS5 izolatı 35°C'ye dayanıklı olup diğer ELS3 ve ELS4 suşlarından ayrılmıştır. Genel olarak *Komagataeibacter* türlerinin ve bazı *Gluconobacter* türlerinin 35°C'ye dayanıklı olduğu gözlenmiştir. *Acetobacter syzgiae* suşu ise 30°C'de sınırlı kalmıştır. Aynı türler arasında sıcaklık dereceleri açısından farklılık gözlenmesi, yapılan diğer çalışmalarda da görüldüğünden olağan bir durumdur ve bunu alt türler arasında bir farklılık olabileceğine ya da farklı ortamların şartlarına uyum sağlamış olduğuna yorumlayabiliriz. Daha sıcaklığa dayanıklı izolatlar elde etmek için ileriki çalışmalarda, izolasyon esnasında 35°C ve üstünde inkübasyonla canlı kalan mikroorganizmalar belirlenebilir. Bu sayede termofilik potansiyel taşıyan bakterilerle vakit kaybedilmeden çalışmalar denenebilir.

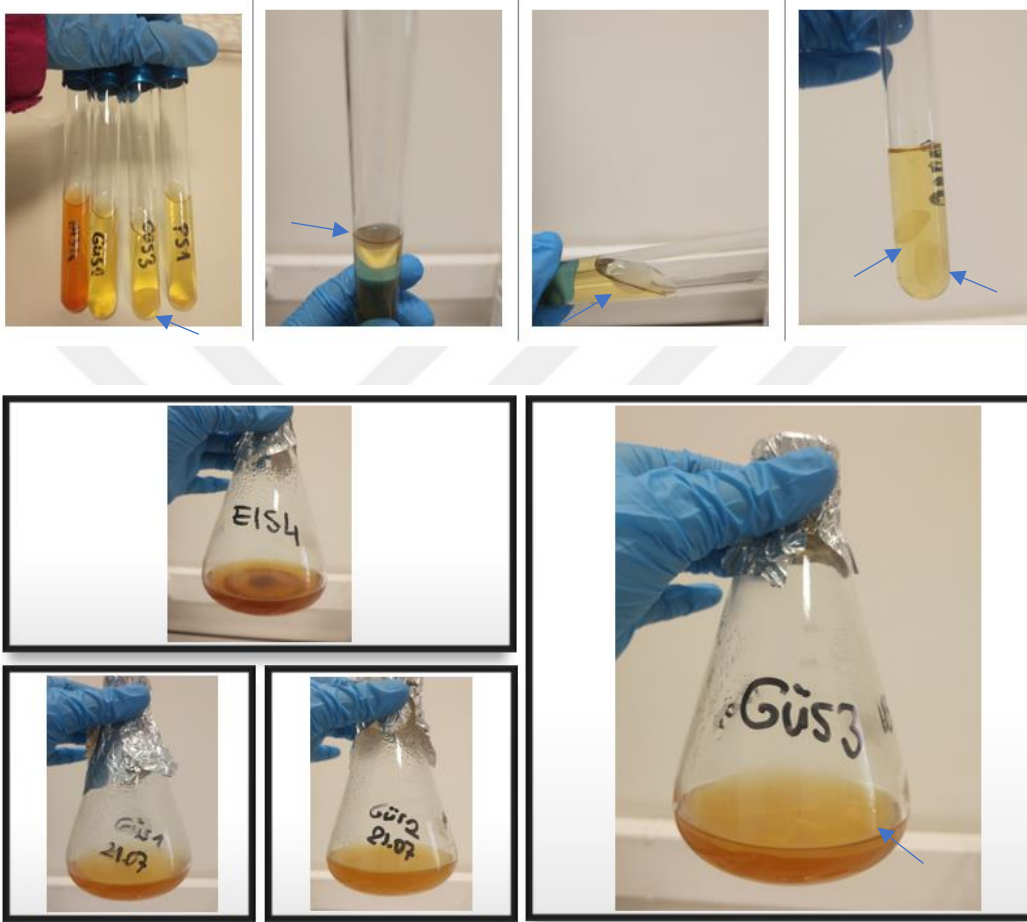
Perumpuli vd. (2014) Hindistan cevizi sirkesiyle yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri *Acetobacter* ve *Gluconobacter* suşları ile ısıya dayanıklı olarak belirledikleri Tayland'dan izole edilen referans suşu *Acetobacter pasteurianus*'la birlikte PDA besiyerinde 5 gün boyunca 30°C, 37°C, 40°C'lerin de sıcaklık toleranslarını incelemişlerdir. *A. pasteurianus* suşları 42°C'ye kadar üreyerek termotolerant özellik göstermiştir. İzole ettikleri 3 *Acetobacter pasteurianus* suşunun sıcaklık toleransını referans *A. pasteurianus* suşundan daha yüksek bulmuşlardır.

Ünal (2007) yaptığı çalışmada ısıya dayanıklı (termotolerant) asetik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen sirke fermantasyonu üzerine sıcaklığın etkisini incelemiş ve 90 saatlik süre sonunda asetik asit üretimi bakımından en uygun sıcaklığın 38°C olduğunu ve daha sonra bunu sırasıyla 39°C ve 40°C'nin izlediğini bildirmiştir. Ndoye vd. (2006) Afrika'da yetişen tropik bitkilerden asetik asit bakterisi izole etmiş ve endüstriyel sirke üretiminde kullanılmak üzere izole edilen AAB'nin termotolerant özelliklerini incelemiştir. İzole edilen AAB'lerin 40°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebildiklerini hatta asetik asit oluşturabildiklerini saptamışlardır (Ünal, 2007).

Chen vd. (2016) *Acetobacter pasteurianus* AAB4 suşunu değişik sıcaklıklarda test etmiş, alkol-asit dönüşüm oranlarının 41, 42, 43 ve 44°C'lere kadar çıktığında azaldığını ancak bakterinin canlılığını son sıcaklığa kadar koruyabildiğini bildirmişlerdir.

4.4.3 Selüloz üretimi

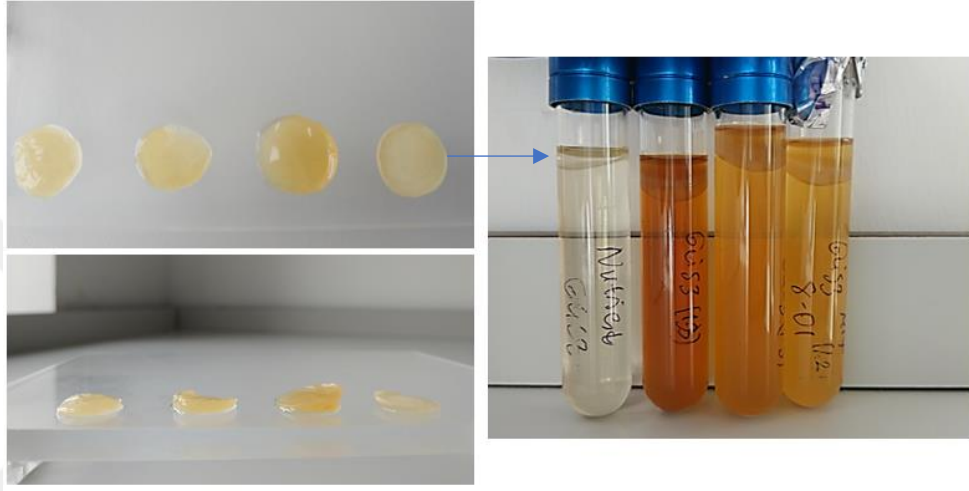
Selüloz aktivitesini ölçmek için 10 mL'lik HS sıvı besiyerine tek koloni şeklinde ekilen izolatların 30°C'de 3 gün inkübasyon sonucunda selüloz oluşumları kontrol edilmiş, bunlardan Şekil 4.2'deki resimde ok işaretiyle gösterilen GUS3 izolatının selüloz ürettiği gözlemlenmiştir.



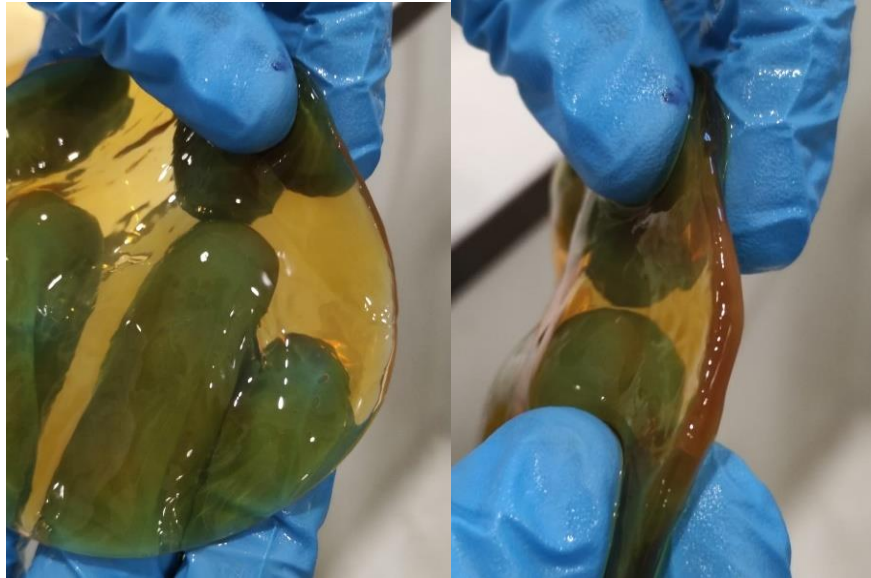
Şekil 4.2: HS Besiyerindeki 10 mL'lik Tüplerde ve 250 mL'lik Erlenlerde Selüloz Üretimi

Daha sonra bu besiyerlerinden 1 mL alınıp 250 mL'lik erlen içerisindeki 50 mL HS sıvı besiyerine ekilmiş ve 30°C'de 1 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Yine izolatlar içinde sadece GUS3'ün selüloz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.3'te 4 çeşit besiyerine (Nutrient broth, AAM broth, MRS broth ve FMRS (fructose, de man, rogosa and sharpe) broth) ekim yapılmış ve farklı besiyerleri içerisinde aynı koşullarda ekilen GUS3 suşunun en kalın selülozu FMRS broth'da verdiği, en ince selülozu ise nutrient broth'da verdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebi GUS3 izolatının, fruktoz ve glikoz gibi şekerli ortamlarda ürettiği selüloz, nutrient broth besiyerlerinde şeker olmadığından

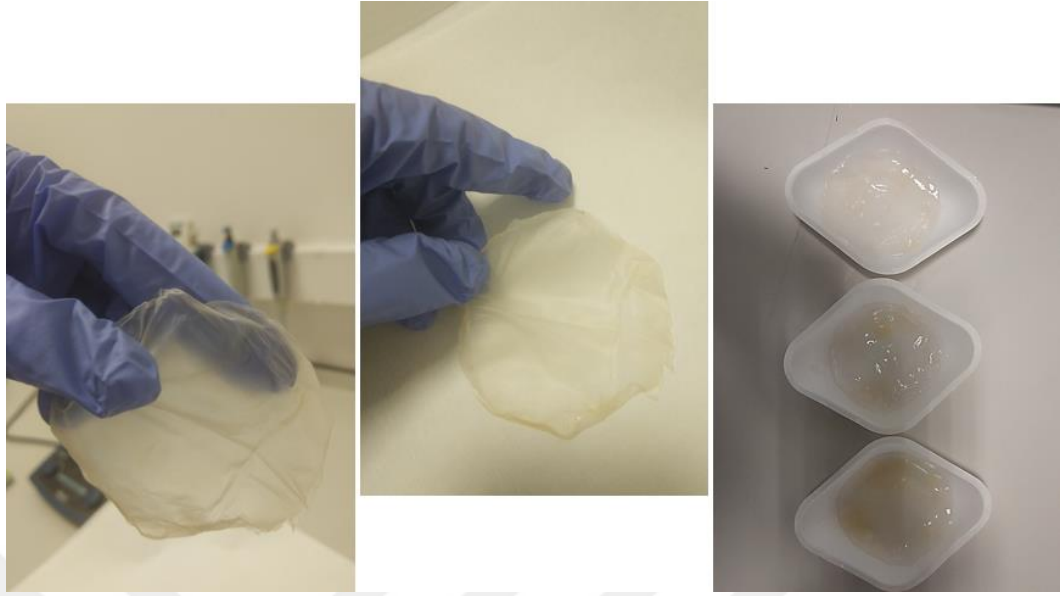
üretile selülozdan daha fazladır. Paralel olarak HS besiyerine ekilip elde edilen selüloza metotta belirtilen işlemler uygulanmıştır. Şekil 4.4'de yaş olarak elde edilen selülozlar saflaştırılarak kurutulmuştur (Şekil 4.5). Elde edilen selüloz filmlerin kuru ve ıslak ağırlıkları Tablo 4.7'de verilmiştir. İstatistiksel olarak farklılık içermemekle birlikte, GUS3 izolatının selüloz kapasitesi en yüksek pH 6 da gözlenirken en yüksek verimi de 28°C'de verdiği (1,644 g/L) belirlenmiştir. Bu dereceyi aynı pH değerinde 26°C izlemiştir. Şekil 4.5'de ağırlıkça ölçülen en yüksek selülozun görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4.3: 10 mL'lik Tüplerde Farklı Besiyerinde Selüloz Gösterimi



Şekil 4.4: En Kalın Yaş Selülozun görüntüsü



Şekil 4.5: Selülozların Kurutma Sonrası Görüntüleri

Tablo 4.7: Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde *Komagataeibacter* sp. GUS3 Tarafından Üretilen Selülozun Miktarı (g/L)

pH	26° C	28° C	30° C	32° C	34° C
pH:6	1,231 ±0,7509	1,644 ±0,4016	0,993 ±0,0070	0,810 ±0,4157	1,185 ±0,3379
pH:5	0,486 ±0,0509	0,337 ±0,0268	0,785 ±0,1145	0,446 ±0,2404	0,640 ±0,1414

Tablodaki sonuçlar karşılaştırıldığında pH 6'da elde edilen selüloz miktarının genel olarak sonuçları, aynı dereceler için pH 5'de elde edilenlere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. pH 5'te çeşitli sıcaklıklar kullanılarak elde edilen selüloz miktarları arasında en yüksek sonuç 30°C'de 0,785 ±0,1145 g/L olarak gözlenmiştir. Sıcaklıkların selüloz miktarları üzerine etkileri her iki pH derecelerinde farklılık göstermekle birlikte, miktarları aynı sıcaklıklar ve farklı pH'ta elde edilen sonuçlar da düzensizdir. Selüloz miktarlarında paralel bir artış ya da düşüş gözlenmemesinin nedeni olarak selüloz üretimi esnasında bazı erlenlerin hareket ettirilmesi ve oluşan biyofilmin bundan etkilenmesi gibi etkenler sayılabilir.

Komagataeibacter intermedius bakterisi ile Erçalışkan (2017) 100 mL'lik HS besiyerinde 10 gün içinde elde ettiği selülozun kuru madde miktarını 0,0526 g/L olarak ölçülmüştür. *Komagataeibacter xylinus* ile yaptığı çalışmada da kuru madde miktarı 0,0437 g/L olarak belirlenmiştir.

Güzel ve Akpınar (2017) *Komagataeibacter hansenii* bakterisiyle 1000 mL HS besiyerinde 21 gün boyunca oluşan yüzeydeki selülozun çökmesi beklenmiş ve saflaştırma sonucunda 7.44 g/L selüloz elde edilmiştir.

Verilen veriler ışığında denilebilir ki, her ne kadar bakteriden bakteriye selüloz üretme kapasitesi değişse de besiyeri miktarı ve bekletme süresi de selüloz üretiminde etkilidir. GUS3 izolatı için bulunan değer, *K. intermedius*'tan 31 ve *K. xylinus* izolatından 37 kat kadar fazladır. *K. hansenii*'den ise 4 kat azdır. Tabi bu değerler aynı koşullarda uygulandığında farklı sonuçlarla karşılaştırma durumu gözönünde bulundurulmalıdır.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Malatya kayısı ve geleneksel olarak üretilmiş ev sirkelerinden asetik asit bakteri izolasyonu yapılmış, izolatlar moleküler tekniklerle tanımlanmış ve bazı teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Kayısı numuneleri homojenize edilerek sabit ağırlığa gelene kadar fermantasyona bırakılmıştır. Çeşitli meyvelerden üretilmiş 6 adet ev sirkesi de doğal fermantasyon yöntemi ile 1,5-3 ay arası olgunlaştırılmıştır. Elde edilen izolatlar çeşitli analizlerden geçmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Sirke numunelerinin pH ölçümleri yapılmış ve en yüksek pH değeri 3.62 ± 0.1 ile ahlat armudu sirkesinde ölçülürken en düşük pH değeri $3,11 \pm 0.1$ ile beyaz üzüm sirkesinde ölçülmüştür.
2. Kayısı numunelerinden 45 ve 6 çeşit meyve sirkesinden 18 olmak üzere toplam 63 izolat saflaştırılmış ve moleküler identifikasyona tabi tutulmuştur.
3. PCR ile çoğaltılan 16S rRNA ve/veya 16S-23S rRNA ITS bölgesinin dizilim analizi sonuçlarına göre izolatların 19 tanesinin AAB, 44 tanesinin ise LAB olduğu belirlenmiştir. Kayısı çeşitlerinden *Gluconobacter cerinus* ve *Leuconostoc mesenteroides* izole edilirken, sirkelerden *Acetobacter syzggii*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Gluconobacter* sp., *Komagataeibacter* sp., *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* ve *Leu. mesenteroides* türleri elde edilmiştir.
4. Dizileme analiz sonuçları dikkate alındığında *Gluconobacter* sp. ELS3, ELS4 ve ELS5 ve *Komagataeibacter* sp. GUS3 izolatlarının var olan diğer türlerden farklılık göstermeleri sebebiyle yeni bir tür olma potansiyelleri vardır. Bunların tanımlanmasına yönelik çalışmalar ilerleyen zamanlarda yapılabilir. Çalışmamız sırasında sekans sonuçları 16S rRNA ve 16S ITS rRNA dizilimleri ile tam tanımlanamayan yeni tür potansiyelli izolatların aynı zamanda teknolojik özelliklerinin bazıları da belirlenmeye çalışılmış olup kayda değer selülozik

sonuçlar kaydedilmiştir. Bu kapsamda AAB'lerde yeni tür keşfetme potansiyellerinin olduğu ve bunlara yönelik tanımlama çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

5. Sirkelerden izole edilen AAB suşlarının hepsi %6'ya kadar etanol içeren besiyerinde gelişirken ELS4 ve PS2 dışında çoğunun %8'e kadar etanole dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Kayısıdan elde edilen AAB'lerden ise yalnızca 4 izolat %6 etanol içeren ortamda gelişebilmiştir.
6. Sirke ve kayısılardan elde edilen 19 AAB izolatının 8 tanesinin 35°C sıcaklığı tolere edebildiği belirlenmiştir.
7. Selüloz aktivitesine bakılan izolatlardan yalnızca *Komagataeibacter* sp. GUS3'n selüloz ürettiği belirlenmiştir. Selüloz retebilen GUS3 izolatının pH5 ve pH6 şartlarında 26°C, 28°C, 30°C, 32°C ve 34°C'lerdeki selüloz üretimlerine bakılmış ve bunların arasında en yüksek sonuç 28°C'de pH6'da 1,644 ±0,4016 g/L olarak elde edilmiştir.
8. Literatürle karşılaştırılabilir seviyede selüloz ürettiği saptanan *Komagataeibacter* sp. GUS3'n bakteriyel selüloz üretiminde kullanımına yönelik çalışmalar ilerde gerçekleştirilebilir.
9. Bu alışma ile coğrafi işarete sahip Malatya kayısının mikroflorasına yönelik bir çalışma ilk defa gerçekleştirilmiştir. Her iki kayısı cinsinde de *G. cerinus* ve *Leu. mesenteroides* türlerinin saptanması, bu türlerin Malatya kayısı mikrobiyotasının önemli yeleri olduğuna işaret etmektedir.
10. İleriki çalışmalarda başka besiyerlerinin kullanımı durumunda daha çeşitli AAB türlerinin elde edilebileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, sirke örneklerinden daha fazla sayıda bakteri izolasyonu ile elde edilen AAB türleri arttırılabilir. Gram boyama ile LAB türleri baştan ayrılarak daha ziyade AAB türlerinin izolasyonuna ağırlık verilebilir.

11. Ülkemizde bilhassa sirke ve meyvelerden AAB çalışmaları sınırlı sayıda gerçekleşmektedir. Başka milletlerin yanında özellikle Japon araştırmacıların ilgisini çeken AAB'lere yönelik çalışmalar, çok kapsamlı olup önemsenmektedir. Yeni keşfedilen bu bakterilerin filogenetik ağaçlarla gruplandırılmaları aktif olarak yenilenmektedir. Sağlığa faydalı yönleri de dikkatle araştırılan AAB'lerin üzerine gereken çalışmaların yapılması teşvik edilmelidir. Türkiye izolatlarının arasından da isimlendirilecek yeni türlerin çıkması, hem Türkiye'de yapılan bilimin, hem de Türk ürünlerinin uluslararası akademik camiada tanıtılmasına katkıda bulunacaktır.



KAYNAKÇA

- Abol-Fotouh, D., Hassan, MA., Shokry, H., Roig, A., Azab, MS. and Kashyout, B. (2020). Bacterial Nanocellulose From Agro-industrial Wastes: Low-cost and Enhanced Production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1. *Scientific Reports*. 10: 3491.
- Akbaş, M. ve Cabaroğlu, T. (2010). Ülkemizde Üretilen Bazı Üzüm Sirkelerinin Bileşimleri ve Gıda Mevzuatına Uygunlukları Üzerine Bir Araştırma. *GIDA*, 35(3): 183-188.
- Aktan, N. ve Kalkan, H. (1998). Sirke Teknolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 82s
- Alan, Y., Atalan, E., Erbil, N., Zorver, F., Kiyçak, G. ve Çiçek, A.i. (2013). Malatya Kayısı (Prunus armeniaca L.) ve Kayısı Çekirdeklerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 4 (2): 60-69.
- Allen, T. D. and Cowling, G. (2011). *The cell: a very short introduction*. Oxford: Oxford University Press.
- Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Ortega Pérez, R., Tonolla, M., Barja, F. (2013). Rapid Identification of Acetic Acid Bacteria Using MALDI-TOF Mass Spectrometry Fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 36: 75–81.
- Anonim. (2019). Ürün Masaları Kayısı Bülteni. Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Tarım Havzaları Genel Başkanlığı. *T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı*.
- Arıcı, M. (2017). Fermentasyon Teknolojisi; Bitkisel Fermentasyonlar. Kitap, İstanbul, Syf: 62-63 ve 152-160.
- Aswini, K., Gopal, N. O. and Uthandi, S. (2020). Optimized Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter senegalensis* MA1. *BMC Biotechnology*, 20: 46.

- Aydın, A. ve Aksoy, D. (2013). Çeşitli Gıda Atıklarından Selüloz Üreten Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43 (1): 26-35.
- Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N. and Shirai, M. vd. (2009). Whole-Genome Analyses Reveal Genetic Instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 37 (17): 5768-5783.
- Bae, S., Fleet, G.H. and Heard, G.M. (2006). Lactic Acid Bacteria Associated With Wine Grapes From Several Australian Vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 712–727.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012). Changes In Sour Rotten Grape Berry Microbiota During Ripening and Wine Fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 154: 152–161.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H. and Henschke, P.A. (2003). Spoilage of Bottled Red Wine by Acetic Acid Bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 307–314.
- Bilginer, Hafsa. (2018). *Geleneksel Yöntemlerle Üretilen Sirkelerin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Mikrobiyotasında Yer Alan Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Brighenti, F., Castellani, G., Benini, L., Casiraghi, M.C., Leopardi, E., Crovetti, R. and Testolin, G. (1995). Effect of Neutralized and Native Vinegar on Blood Glucose and Acetate Responses to a Mixed Meal in Healthy Subjects. *European Journal Clinical Nutrition*, 49 (4): 242-7.
- Budak, N.H., Aykin, E., Seydim, A.C., Greene, A.K. and Guzel-Seydim, Z.B. (2014). Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science*, 79 (5): R757-64.
- Camu, N., Gonzalez, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J.S., Addo, S.K. and De Vuyst, L. (2008). Influence of Turning and Environmental Contamination on the Dynamics of Populations of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Cocoa Bean Heap Fermentation in Ghana, *Applied and Environmental Microbiology*, syf: 86-98.

- Charee, P., Tanamool, V., Toyama, H. and Soemphol, W. (2020.) Characterization of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated from Various Plant Beverages in Thailand. *Applied Food Biotechnology*, 7 (2): 61-72.
- Chen, Y., Bai, Y, Li, D, Wang, C, Xu, N, Hu, Y. (2016). Screening and Characterization of Ethanol-Tolerant and Thermotolerant Acetic Acid Bacteria From Chinese Vinegar Pei. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32: 14.
- Chou C., Liu C., Yang D., Wu Y. and Chen Y. (2015). Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of black vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects in vivo. *Food Chemistry*, 168: 63-69.
- Cleenwerk, I. De. ve Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (1): 2-14.
- Coelho, E., Genisheva, Z., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A. and Domingues, L. (2017). Vinegar Production From Fruit Concentrates: Effect on Volatile Composition and Antioxidant Activity. *Journal of Food Science and Technology*, 54 (12): 4112–4122.
- Çelik, E. (2019). *Pankreatik Beta Hücre Farklılaşmasında Moleküler Enerji Algılayıcıları ve Metabolik Değişimlerin Rolü* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). T.C. İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- De, Vuyst L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van, de Perre V., Vancanneyt, M., De, Vos, P. and Cleenwerk, I. (2006). Validation of The (GTG)5-PCR Fingerprinting Technique for Rapid Classification and Identification of Acetic Acid Bacteria, with a Focus on Isolates From Ghanaian Fermented Cocoa Beans. *International Journal of Food Microbiology*.
- Deppenmeier, U. and Ehrenreich, A. (2008). Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16: 69–80.
- Drysdale, GS. and Fleet, GH. (1985). Acetic Acid Bacteria in Some Australian Wines. *Food Technology*, 37: 17–20.

- Elhan, Servet. (2014). *Farklı Sirke Çeşitleri ve Konsantrasyonlarının Salata Bileşenlerinin Dezenfeksiyonunda Kullanım İmkanlarının Araştırılması* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Erçalışkan, Kübra. (2017). *Çeşitli Kaynaklardan Bakteriyal Selüloz Üreten Bakterilerin İzolasyon ve Karakterizasyonu* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik.
- Fricke, P.M., Klemm, A., Bott, M. and Polen, T. (2021). On The Way Toward Regulatable Expression Systems in Acetic Acid Bacteria: Target Gene Expression and Use Cases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105: 3423–3456.
- Gerbi V., Zeppa G., Beltramo R., Carnacini A., Antonelli A. (1998). Characterization of White Vinegars of Different Sources With Artificial Neural Networks, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78: 415-425.
- Ghoss S., Chakraborty R. and Raychaudhuri U. (2015). *Fermentation of Palm Vinegar and its Nutraceutical value*. Moldova, LAP Lambert Academic Publishing.
- Gomes RJ., Borges FM., Rosa MF., Castro-Gómez RJH., ve Spinosa WA. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (2): 139–151.
- Gonzales, Á. and Mas, A. (2011). Differentiation of Acetic Acid Bacteria Based on Sequence Analysis of 16S–23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *International Journal of Food Microbiology*, 147 (3): 217-222.
- González A, Guillamon JM, Mas A, Poblet M. (2006). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 141–146.
- González A, Hierro N, Poblet M, Mas A, Guillamon JM. (2005). Application of Molecular Methods to Demonstrate Species and Strain Evolution of Acetic Acid Bacteria Population During Wine Production. *International Journal of Food Microbiology*, 102:295–304.

- González A, Hierro N, Poblet M, Mas A, Guillamon JM. (2006). Enumeration and Detection of Acetic Acid Bacteria by Real-time and Nested Polymerase Chain Reactions. *FEMS Microbiology Letters*, 254:123–128.
- González A, Hierro N, Poblet M, Rozes N, Mas A, Guillamon JM. (2004). Application of Molecular Methods for the Differentiation of Acetic Acid Bacteria in a Red Wine Fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 96:853–860.
- González A, Mas A. (2011). Differentiation of Acetic Acid Bacteria Based on Sequence Analysis of 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 217–222.
- Goranovič D. and Raspor P. (2008). Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, Volume 28, Issue 2, Pages 101-124.
- Gökırmaklı Ç. ve Guzel-Seydim Z.B. (2019). Sirkenin Sağlık Üzerine Etkileri. *Gıda*, 44 (6): 1042 – 1058.
- Guillamon JM, González A, Poblet M, Mas A. (2002). Development of Molecular Techniques for the Analysis of Acetic Acid Bacteria in Winemaking. In: Yeast-Bacteria Interactions. Lallemand Technical Meetings, 10. *Lallemand*, pp: 45–49.
- 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.
- Gullo M. ve Giudici P. (2008). Acetic acid bacteria in Traditional Balsamic Vinegar: Phenotypic Traits Relevant for Starter Cultures Selection. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 46–53.
- Gullo M., Caggia C., Vero L., Giudici P. (2006). Characterization of Acetic Acid Bacteria in “Traditional Balsamic Vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 209 – 212.
- Güçlü K., Altun M., Özyürek M., Karademir S.E., ve Apak R. (2006). Antioxidant Capacity of Fresh, Sun- and Sulphited-Dried Malatya Apricot (*Prunus*

- armeniaca*) Assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin Methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 76–85.
- Gündüz, G., Aşık, N., Aydemir, D. ve Kılıç, A. (2015). Bakteriye Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu. *Ormancılık Dergisi*. 10 (2): 1-10.
- Güzel M. ve Akpınar Ö. (2017). *Komagataeibacter hansenii* GA2016 ile Bakteriye Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu. *GIDA*, 42 (5): 620 – 633.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y. (2006). Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 79-87.
- Ho, C.W., Lazim, A., Fazry, S., Zaki, H. and Lim, S. (2017). Varieties, Production, Composition and Health Benefits of Vinegars: A Review. *Food Chemistry*, 221: 1621-1630.
- Hu Y., Wan H., Li J., & Zhou J. (2015). Enhanced Production of L-sorbose in an Industrial *Gluconobacter oxydans* Strain By Identification of a Strong Promoter Based on Proteomics Analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42 (7): 1039-1047.
- Jonhston C.S and Gaas C.A. (2006). Vinegar: Medicinal Uses and Antiglycemic Effect. *Medscape General Medicine*, 8 (2): 61.
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer K-H, Pommerening-Röser A, Koops H-P, et al. (1998). Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and Nitrospira -Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology Journal Homepage*, 64 (8): 3042.
- Kayaşlı K. (2019). *Lactobacillus İzolatlarının Probiyotik Fonksiyonları Referans Alınarak Rapd-pcr ile Ayrımının Yapılması* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Kırcı Hande. (2017). *Güvem (Prunus spinosa) Meyvesinden Fonksiyonel Sirke Üretimi* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.

- Kızılkaya ve Dinçer. (2019). Doğal *Aspergillus sp.* İzolatları Kullanılarak Glukonik Asit Üretim ve Optimizasyonu. *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 38-3.
- Kim D., Chon J., Kim H. and Seo K. (2019). Development of a Novel Selective Medium For the Isolation and Enumeration of Acetic Acid Bacteria From Various Foods. *Food Control*, 106: 106717.
- Kim D., Lim H., Kim S. and Seo K. (2019). Development of a Real-time PCR Assay for Rapid Screening of Acetic Acid Bacteria as a Group in Food Products. *Food Control*. 100: 78-82.
- Komagata K., Lino T. and Yamada Y. (2014). The Family *Acetobacteraceae*. *The Prokaryotes*, pp 3-78.
- Kondo T., Kishi M., Fushimi T., Uganjin S. and Kaga T. (2009). Vinegar Intake Reduces Body Weight, Body Fat Mass, and Serum Triglyceride Levels in Obese Japanese Subjects. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, (8): 1837-43.
- Koyama M., Ogasawara Y., Endou K., Akano H., Nakajima T., Aoyama T. and Nakamura K. (2016). Fermentation-induced changes in the concentrations of organic acids, amino acids, sugars, and minerals and superoxide dismutase-like activity in tomato vinegar. *International Journal of Food Properties*, 20 (4): 888-898.
- Kulka G. (1956). Colorimetric Estimation of Ketopentoses and Ketoheoses. *Biochemical Journal*, 63 (4): 542-8.
- Lane J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In; Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York, NY: John Willey and Sons, pp: 115- 75.
- Lhotta K., Höfle G., Gasser R. and Finkenstedt G. (1998). Hypokalemia, Hyperreninemia and Osteoporosis in a Patient Ingesting Large Amounts of Cider Vinegar. *Nephron*, 80: 242–243.
- Liu L., Liu S., Wang Y., Bi J., Chen H., Deng J., Zhang C., Hu Q. and Li C. (2018). *Komagataeibacter cocois* sp. nov., a Novel Cellulose-producing Strain Isolated

- From Coconut Milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 68 (10): 3125-3131.
- Lynch K., Zannini E., Wilkinson S., Daenen L. and Arendt E.K. (2019). Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 18, Issue 3, p. 587-625.
- Marič L., Cleenwerck I., Accetto T., Vandamme P. and Trček J. (2020). Description of *Komagataeibacter melaceti* sp. nov. and *Komagataeibacter melomenusus* sp. nov. Isolated From Apple Cider Vinegar. *Microorganisms*, 8(8): 1178.
- Mas A. and Guillamón J.M. (2017). Acetic Acid Bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes*, pp. 43-64.
- Masco L., Huys ve diğerleri. (2003). Identification of *Bifidobacterium* Species Using rep-PCR Fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (4): 557-563.
- Mateo E, Torija M, Mas A, Bartowsky E. (2014). Acetic Acid Bacteria Isolated From Grapes of South Australian Vineyards. *International Journal Food Microbiology*, 178: 98–106.
- Mathew B., Agrawal S., Nashikkar N., Bundale S. and Upadhyay A. (2019). Isolation of Acetic Acid Bacteria and Preparation of Starter Culture for Apple Cider Vinegar Fermentation. *Advances in Microbiology*, 9: 6.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A. (2000). The Viable But Non-culturable State of Wine Microorganisms During Storage. *Letters in Applied Microbiology*, (30): 126-141.
- Müller, V. (2001). *Bacterial Fermentation*. Encyclopedia of Life Science, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany, 10.
- Naloka K., Yukphan P., Matsutani M., Matsushita K. and Theeragool G. (2020). *Komagataeibacter diospyri* sp. nov., a Novel Species of Thermotolerant Bacterial Nanocellulose-producing Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70: 1.

- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Toumkara, L., Guiro, A. T., Kere, C., Diawara, B., Thonart, P. (2006). Thermoresistant Properties of Acetic Acids Bacteria Isolated from Tropical Products of SubSaharan Africa and Destined to Industrial Vinegar. *Enzyme And Microbial Technology*, 39: 916-923.
- Nielsen D.S., Teniola O.D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T.S. & Holzapfel W.H. (2007). The Microbiology of Ghanaian Cocoa Fermentations Analysed Using Culture-Dependent and Culture Independent Methods, *International Journal of Food Microbiology*, 114: 168-186.
- Nyanzi R., Jooste P., Cameron M. and Witthuhn C. (2013). Comparison of rpoA and pheS Gene Sequencing to 16S rRNA Gene Sequencing in Identification and Phylogenetic Analysis of LAB from Probiotic Food Products and Supplements, *Food Biotechnology*, 27 (4): 303-327.
- Okabe S., Kodama Y., Cao H., Johannessen H., Zhao C.M., Wnag T.C., Takahashi R. and Chena D. (2012). Topical Application of Acetic Acid in Cyto-reduction of Gastric Cancer. A Technical Report Using Mouse Model. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 3: 40-8.
- Özen Merve. (2018). *Vişne Sirkesinin Üretim Aşamalarında Antioksidan ve Biyoaktif Bileşenlerin* (Yayınlanmış Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Öztürk İ., Çalışkan O., Tornuk F., Ozcan N., Yalcin H., Baslar M and Sagdic O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT - Food Science and Technology*, 1: 8.
- Pamir, H. (1985). *Fermantasyon Mikrobiyolojisi*. Ankara Üniversitesi Ziraat fakültesi yayınları, 936 :267.
- Paneque P., Morales M., Burgos P., Ponce L. and Callejón R. (2017). Elemental characterisation of Andalusian wine vinegars with protected designation of origin by ICP-OES and chemometric approach. *Food Control*, 75: 203-210.
- Papalexandratou Z., Cleenwerck I., De Vos P. and De Vuyst L. (2009). (GTG)5-PCR Reference Framework For Acetic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 301: 44-49.

- Peng, Q., Yang, Y., Guo, Y., Han, Y. (2015). Analysis of bacterial diversity during acetic acid fermentation of tianjin duliu aged vinegar by 454 pyrosequencing. *Current Microbiology* 71 (2): 195- 203.
- Peng, Q., Yang, Y., Guo, Y., Han, Y., 2015. Analysis of bacterial diversity during acetic acid fermentation of tianjin duliu aged vinegar by 454 pyrosequencing. *Current Microbiology* 71 (2): 195- 203.
- Perumpuli PABN, Watanabe T. and Toyama H. (2014). Identification and Characterization of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Strains Isolated From Coconut Water Vinegar in Sri Lanka. (2014). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78 (3): 533–541.
- Petsiou E., Mitrou P., Raptis S.A. and Dimitriadis G. (2014). Effect and Mechanisms of Action of Vinegar on Glucose Metabolism, Lipid Profile, and Body Weight. *Nutrition Reviews*, 72 (10): 651-61.
- Polat M. ve Karahan A.G. (2009). Multidisipliner Yeni Bir Bilim Dalı: Biyoinformatik ve Tıpta Uygulamaları. *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 16 (3): 41-50.
- Ray AK., Bairagi A., Sarkar Ghosh K., Şen SK. (2007). Optimization of Fermentation Conditions For Cellulase Production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 İsolated From Fish Gut. *Açta Ichthyologica et Piscatoria*, 37 (1): 47-53.
- Ruiz A, Poblet M, Mas A, Guillamon JM. (2000). Identification of Acetic Acid Bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA Intergenic Spacer. *International Journal of Systematic and Evolutinary Microbiology*, 50: 1981–1987.
- Ryngajłło M., Kubiak K., Jędrzejczak - Krzepakowska M., Jacek P. and Bielecki S. (2019). Comparative Genomics of the *Komagataeibacter* Strains—Efficient Bionanocellulose Producers. *Microbiologyopen*, 8 (5): e00731.
- Saichana N., Matsushita K., Adachi O., Frébort I. and Frébortová J. (2014). Acetic Acid Bacteria: A Group of Bacteria with Versatile Biotechnological Applications. *Biotechnology Advances*, 1(33): 1260-71.

- Sainz F., Torija M.J., Matsutani M., Kataoka N., Yakushi T., Matsushita K. and Mas A. (2016). Determination of Dehydrogenase Activities Involved in D-Glucose Oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1358.
- Saravanan V., Madhaiyan M., Osborne J., Thangaraju M. and Sa T. (2008). Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. *Microbial Ecology*. 55: 130–140.
- Selby K., Lindström M., Somervuo P., Heap J., Minton N. and Korkeala H. (2011). Important Role of Class I Heat Shock Genes *hrcA* and *dnaK* in the Heat Shock Response and the Response to pH and NaCl Stress of Group I *Clostridium botulinum* Strain ATCC 3502. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (9): 2823–2830.
- Sengun İ (editor). (2017). Acetic Acid Bacteria; Fundamentals and Food Applications. Food Biology Series. A Science Publishers Publishers Book. Ege University Engineering Faculty, Food Engineering Department Izmir, Turkey.
- Shafiei R., Delvigne F., Babanezhad M. and Thonart P. (2013). Evaluation of viability and growth of *Acetobacter senegalensis* under different stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 163 (2–3): 204–213.
- Sharafi S.M., Rasooli I. and Beheshti-Maal K. (2010). Isolation, Characterization and Optimization of Indigenous Acetic Acid Bacteria and Evaluation of Their Preservation Methods, *Iranian Journal of Microbiology*, 2 (1): 38–45.
- Shurtleff W., Aoyagi A. (2020). History of Tempeh and Tempeh Products (1815–2020): *Bibliography and Sourcebook*. Soyinfo center, pp: 978.
- Sievers M., Ludwig. and Teuber M. (1994). Phylogenetic Positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* Species as a Branch of Acidophilic Bacteria in the α-subclass of Proteobacteria Based on 16S Ribosomal DNA Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, 17: 189–196.
- Soemphol W, Deeraksa A, Matsutani M, Yakushi T, Toyama H, Adachi O, Yamada M, Matsushita K. (2011). Global analysis of the genes involved in the

- thermotolerance mechanism of thermotolerant *Acetobacter tropicalis* SKU1100. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75 (10): 1921-1928.
- Son vd. (2002). Isolation and Cultivation Characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 Producing Bacterial Cellulose in Shaking Cultures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12 (5): 722-728.
- Swings. (1992). The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *The Prokaryotes, a Handbook on The Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications'*; 2nd Edition, 3 (111): 2268-2286.
- Şengün İ. ve Kılıç G. (2019). Farklı Sirke Çeşitlerinin Mikroflorası, Biyoaktif Bileşenleri ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, 17 (1): 89-101.
- Trček J, Mahnič A, Rupnik M. (2016). Diversity of The Microbiota Involved in Wine and Organic Apple Cider Submerged Vinegar Production as Revealed by DHPLC Analysis and Next-generation Sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 223: 57–62.
- Türker. (1963). Sirke Teknolojisi ve Teknikte Laktik Asit Fermantasyonları. *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı*. No: 209, Ankara Üniversitesi Basımevi, 181s.
- Türkyılmaz, S., Yıldız, O., Oryasin, E., Kaynarca, S. and Bozdoğan, B. (2010). Molecular Identification of Bacteria Isolated from Dairy Herds with Mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16: 1025-1032.
- Ünal Emel. (2007). *Dimrit Üzümünden Değişik Yöntemlerle Sirke Üretimi Üzerinde Bir Araştırma (Yayınlanmış Yüksek lisans Tezi)*. Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Ünal, M.R. (2010). Kayısı araştırma raporu. *T.C. Fırat Kalkınma Ajansı*.
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (2003). *Gıda Mikrobiyolojisi*. 3: 606.
- Valera MJ, Torija MJ, Mas A, Mateo E. (2015). Acetic Acid Bacteria From Biofilm of Strawberry Vinegar Visualized by Microscopy and Detected by Complementing Culture-dependent and Culture-independent Techniques. *Food Microbiology*, 46: 452–462.

- Versalovic J., Schneider G.M., De Bruijn F. and Lupski J.R. (1994). Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25-40.
- Villarreal-Soto vd. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83 (3): 580-588.
- Wang Y., Nie Z., Zheng., Wang M. and Wang J. (2013). Isolation, Identification of Strains Producing Membranes from the Contaminated Apple Vinegar and Analysis of the Membranes. *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*, pp: 575-583.
- Wu J, Gullo M, Chen F, Giudici P. (2010). Diversity of *Acetobacter pasteurianus* Strains Isolated From Solid-state Fermentation of Cereal Vinegars. *Current Microbiology*, 60: 280–286.
- Wu Q., Min Y., Xiao J., Feng N., Chen Y., Luo Q., Zhou M., Li D., Hu Z. and Wang C. (2019). Liquid State Fermentation Vinegar Enriched with Catechin as an Antigliyative Food Product. *Food and Function*, 10 (8): 4877-4887.
- Xia T., Zhang B., Duan W., Zhang J. and Wang M. (2020). Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food. *Journal of Functional Foods*, 64: 103681.
- Yamada Y. (2016). Systematics of Acetic Acid Bacteria. *Acetic Acid Bacteria*. pp 1-50.
- Yamada Y. and Yukphan P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (1): 15-24.
- Yamada Y., Hosono R., Lisdyanti P., Widyastuti Y., Saono S., Uchimura T. and Komagata K. (1999). Identification of Acetic Acid Bacteria Isolated From Indonesian Sources, Especially of Isolates Classified in The Genus *Gluconobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45: 23–28.
- Yamada Y., Katsura K., Kawasaki H., Widyastuti Y., Saono S., Seki T., Uchimura. and Komagata K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an Unusual Acetic Acid Bacterium in The Alpha-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (2).

- Yamada Y., Yukphan P., Vu H., Muramatsu Y., Ochaikul D., Tanasupawat S. and Nakagawa Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., With Proposals of New Combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiolog*, 58 (5): 397-404.
- Yetiman A.E. (2012). *Sirke Mikroflorasındaki Asetik Asit Bakterilerinin Moleküler Teknikler İle Tanımlanması* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
- Yetiman A.ve Kesmen Z. (2015). Identification of Acetic Acid Bacteria in Traditionally Produced Vinegar and Mother of Vinegar by Using Different Molecular Techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 204: 9-16.
- Yıldırım, H., Onay, A., Tilkat, E. and Aktürk, Z. (2011). Micropropagation of the Apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Hacıhaliloğlu by Means of Single Node Culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35: 55-64.
- Yılmaz, K.U., Paydaş-Kargı, S. ve Kafkas, S. (2012). Morphological Diversity of The Turkish Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Germplasm in The Irano-Caucasian Ecogeographical Group. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36: 688-694.
- Yuan Y., Feng F., Chen L., Yao Q. and Chen K. (2013). Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar. *European Food Research and Technology*, 236: 573–578.
- Yurdakul, Ö., Keyvan, E. ve Kahraman, H.A. (2017). Gıda Endüstrisinde Fermentasyon. *Türkiye Klinikleri Food Sciences-Special Topics*, 3 (2): 83-8.
- Zhang X., Zhenh Y., Xia M., Wu Y., Liu X., Xie s., Wu Y. and Wang M. (2020). Knowledge Domain and Emerging Trends in Vinegar Research: A Bibliometric Review of the Literature from WoSCC. *Foods*, 9 (2): 166.
- Yetişmeyen, A. (1995). *Süt Teknolojisi*, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 1420: 229.
- Halkman, K. (1991). *Tarım Mikrobiyolojisi*, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 1214: 82.
- Drinan, D.F., Tobin, S. and Cogan, T.M. (1976). Citric acid metabolism in hetero and

homofermentative lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 31 (4): 481-486.

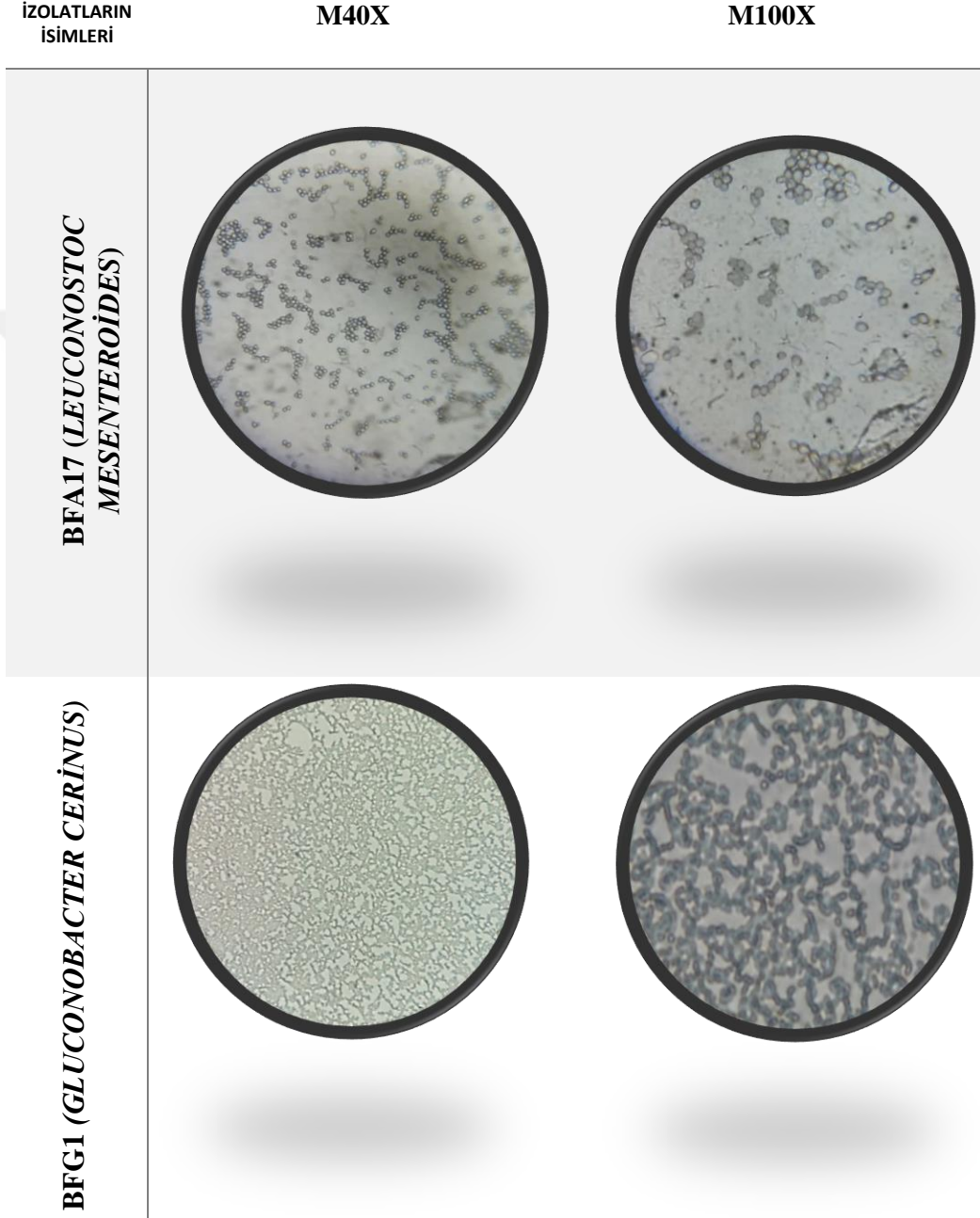
Prescott, C.S. and Dunn, G.C. (1987). *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, pp.882.

Yüksekdağ, Z. ve Beyatlı, Y. (2003). Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (2): 49-69.

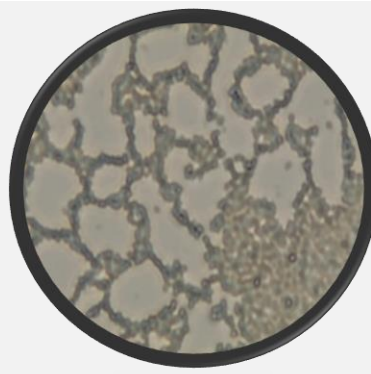
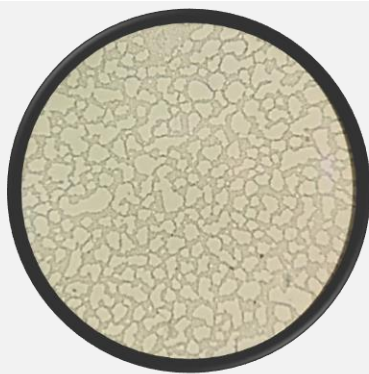


EKLER

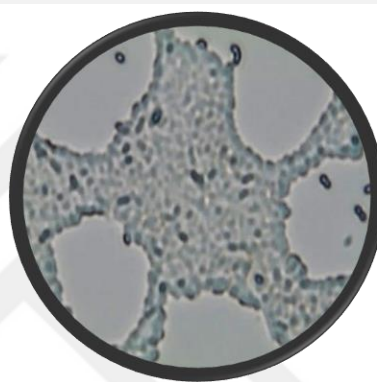
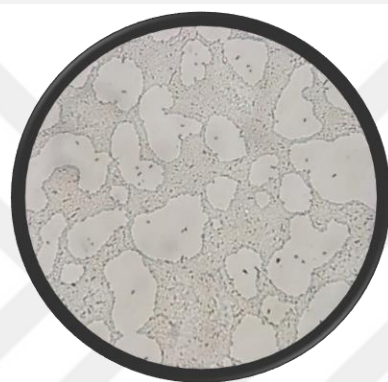
EK-1: Malatya Kayısı ve Sirke Bakteri İzolatlarından Bazılarının Mikroskop Görüntüleri



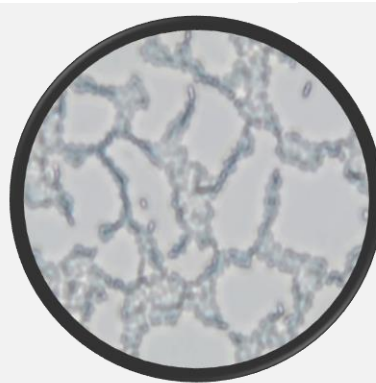
BFA9 (GLUCONOBACTER CERINUS)



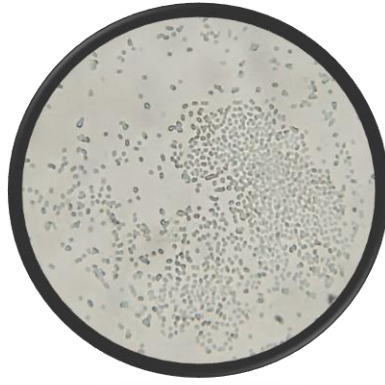
ELS3 (GLUCONOBACTER OXYDANS)



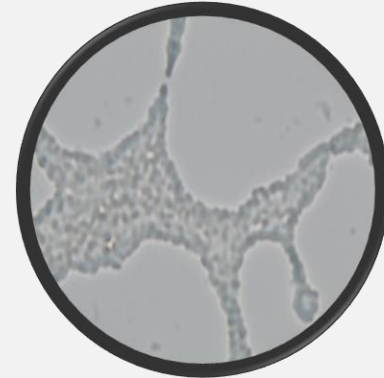
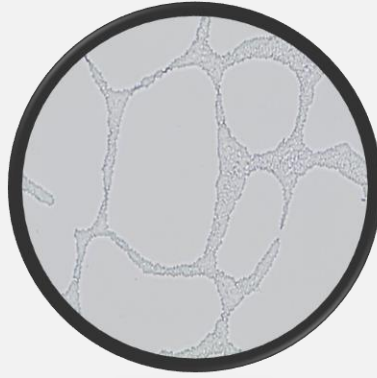
ELS4 (GLUCONOBACTER OXYDANS)



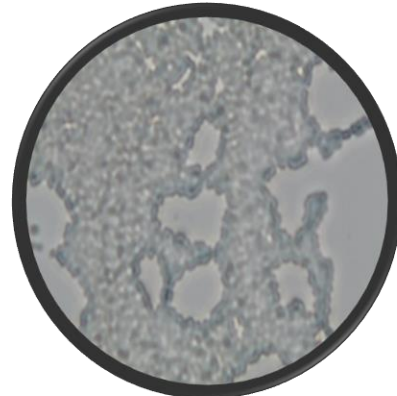
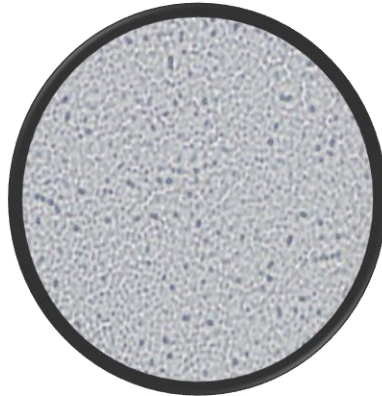
**GÜS3 (KOMAGATAEIBACTER
OBOEDIENS)**



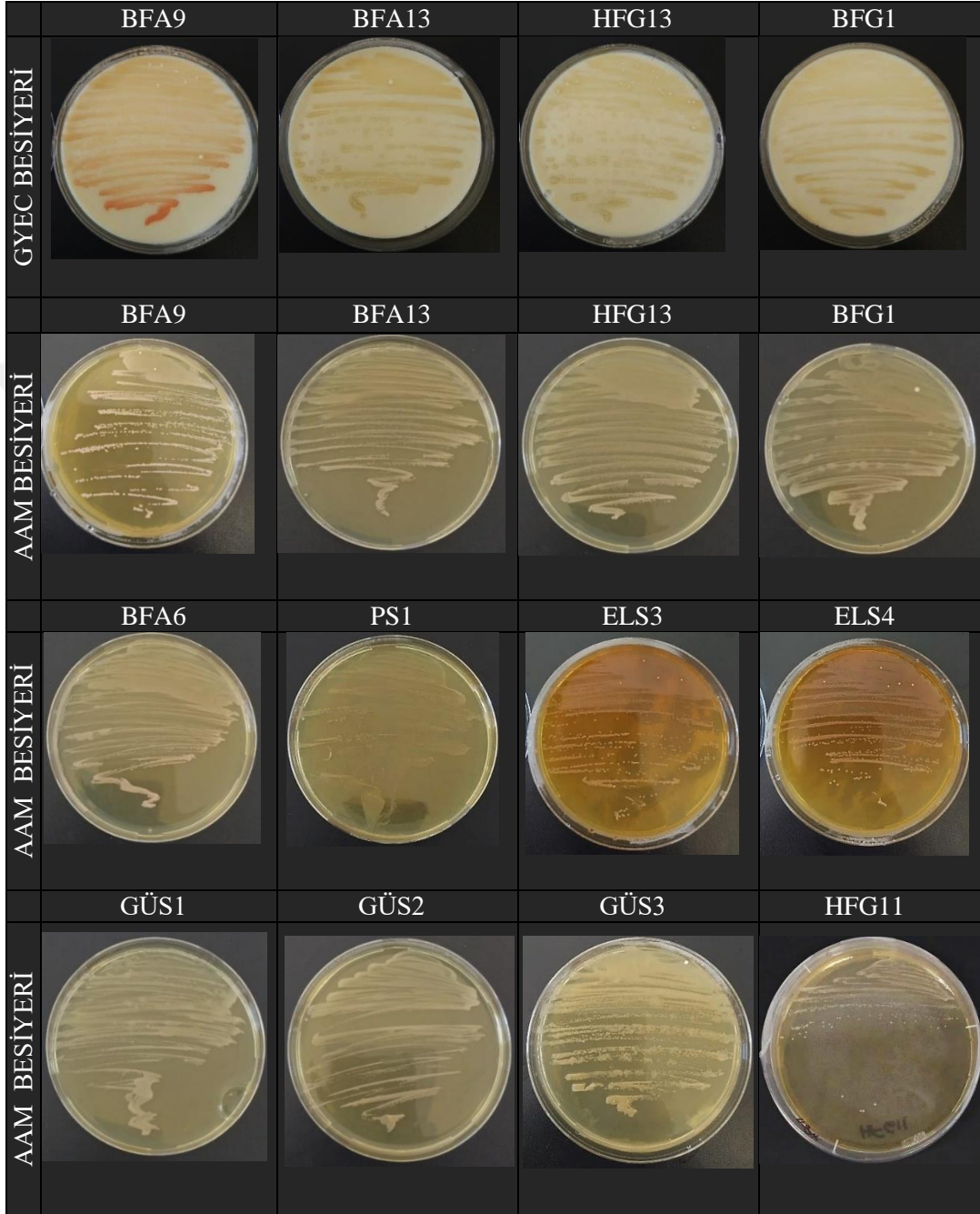
PS1 (ACETOBACTER SYZGII)



BFA6 (GLUCONOBACTER CERINUS)



EK 2: Malatya Kayısı ve Sirke Bakteri İzolatlarından Bazılarının Morfolojik Özellikleri



EK 3: Kısaltma Kodlarının Açılımları

İzolat Kodları	İzolatların Açılımı	Kaynaklar	Besiyeri- Açılımı
BFA	Hasanbey-AAM	Hasanbey	AAM- Acetic Acid Medium
BFG	Hasanbey-GYC	Hasanbey	GYC- Glucose Yeast Extract CaCO ₃ Agar
HFA	Hacıhaliloğlu- AAM	Hacıhaliloğlu	AAM- Acetic Acid Medium
HFG	Hacıhaliloğlu- GYC	Hacıhaliloğlu	GYC- Glucose Yeast Extract CaCO ₃ Agar
PS	Portakal Sirkesi	Portakal	AAM- Acetic Acid Medium
ELS	Elma Sirkesi	Yeşil Elma	AAM- Acetic Acid Medium
ES	Erik Sirkesi	Kırmızı Erik	AAM- Acetic Acid Medium
GUS	Göl Üzümü Sirkesi	Beyaz Üzüm	AAM- Acetic Acid Medium
AUS	Adapazarı Üzüm Sirkesi	Kırmızı Üzüm	AAM- Acetic Acid Medium
AAS	Ahlat Armudu Sirkesi	Ahlat Armudu	AAM- Acetic Acid Medium

EK 4: BLAST DNA dizileme sonuçları

BFG1- 16S rRNA

CTTTCGGGATCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCATGGGTGGGGGACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATAC
CGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA
AGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTTCGACGG
GGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC
GGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGTTTATGCAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGGAACCTGCATTGAGA
CGCATAGACTAGAGGTCGAGAGAGGGTTTGGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGA
AGGCGGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTTAGTTACTCAGTGTGCAAGCTAACCGCGCTAAGCACACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCGCAGAACCTTACCAG
GACTTGCATGGGAGGACGTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGGAGTTGGT
TCGACCTTAAAGCCGGTGAGCGAACCAGCAAGGACGCA

BFA13- 16S rRNA

CTTTCGGGATCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCATGGGTGGGGGACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATAC
CGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA
AGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTTCGACGG
GGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC
GGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGTTTATGCAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGGAACCTGCATTGAGA
CGCATAGACTAGAGGTCGAGAGAGGGTTTGGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGA
AGGCGGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTTAGTTACTCAGTGTGCAAGCTAACCGCGCTAAGCACACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCGCAGAACCTTACCAG
GACTTGCATGGGAGGACGTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACATGGCGGTGAC
AGTGGGAAGCTACATGGCGACATGGTGTGATCTCTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGGAGTTGGT
TCTAC

BFA9- 16S rRNA

GGATCTTTCGGGATCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCATGGGTGGGGGACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTA
ATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA
CCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTTCGAC
GGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC
TCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGTTTATGCAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGGAACCTGCATTGAG
ACGCATAGACTAGAGGTCGAGAGAGGGTTTGGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCG
AAGGCGGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGT
AAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTTAGTTACTCAGTGTGCAAGCTAACCGCGTAAAGCACACCCGCTGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCGCAGAACCTTACCAG
GGACTTGCATGGGAGGACGTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GGTGAACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGCGGTGA
CAGTGGGAAGCTACATGGCGACATGGTGTGATCTCTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGGAGTTGG
TTCGACCTTAAAGCCGGTGAGCGAACCAGCAAGGACGCA

BFA6- 16S rRN

TCTTTCGGGATCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCATGGGTGGGGGACAACCTCCGGGAAACTGGAGCTAATA
CCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA
AGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTTCGACGG
GGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC
GGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGTTTATGCAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGGAACCTGCATTGAG
ACGCATAGACTAGAGGTCGAGAGAGGGTTTGGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCG
AAGGCGGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGT
AAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTTAGTTACTCAGTGTGCAAGCTAACCGCGTAAAGCACACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCGCAGAACCTTACCAG
GGACTTGCATGGGAGGACGTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GGTGAACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGCGGTGA
CAGTGGGAAGCTACATGGCGACATGGTGTGATCTCTAAAGGCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTG
GGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCATGGGAGTTGG
TTCGACCTTAAAGCCGGTGAGCGAACCAGCAAGGACGCA

HF13- 16S rRNA

CAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGGATCTATCCATGGGTGGGGGACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATAC
CTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGATGAT
CGATAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
GACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGTCCTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGAT
GACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAATTCTGTCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTG
GGCGTAAAGGGCGCTAGGCGGTTTATGCAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAGACGCATAGACTA
GAGGTCGAGAGAGGGTTGTGAATTTCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCAGCGTGGCGAAGGCGGCAACC
TGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTGTG
CTGGATGTGGGTAACCTAGTTACTCAGTGTGGAAGCTAACCGCTAAGCACACCGCTGGGAGTACGGCCCAAGGTTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCCTTACCAGGACTTGCATGG
GGAGGACCTACTCAGAGATGGGTATTTCTCGGACCTCCCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTGG
GTTAAGTCCCGCAACGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACTTTCAGGTGGGCACTTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCG
GAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTATGTCTGGGCTACACACGTCGTAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCT
ACATGGCGACATGGTGTGATCTCTAAAAGCCGCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTTGACCTTAAG
CCGGTGAAGCAACCGCAAGGACGCA

ELS4-16S rRNA

AGGGATCTATCCACGGGTGGGGGACAACCTTCGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCT
GTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCA
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
AATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGTTCTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGG
CTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTCTGGAAATGACTGGGGCTAAAGGGCGCGTAGGCCGTTGT
TACAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGATACGTGACGAACTAGAGTTCGAGAGAGGGTTGTGGAATT
TCCAGTGTAGAGGTAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCAGCGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGGC
CGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTGTGCTGGATGTGGGAACTTAGTTTT
CAGTGTGGAAGCTAACCGCGTAAGCACACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAC
AAGCGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCCTTACCAGGGCTTGCATGGGGAGGACCGGTTACAGAGATGGAC
TTTCTCGGACCTCCCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGTCTTATGTTGCCAGCACTTTCAGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGT
CCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTCGTAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTACATGGTGACATGGTGTGATCTCTA
AAAGCCGCTCAGTTCGGATTGACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGCC

GUS1-16S rRNA

GGATCTGTCCATGGGTGGGGGATAAATTGGGAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGT
GGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAA
TGCCCGCTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCGAGAAGAAGCCCGGCT
AATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGTTTAA
CAGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACTGGGGCTGCATTTGATACGTTGAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTTCC
AGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCAGCGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGGCA
AAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTGGGTGACTTTGTCAATCAG
TGTGCTAGTTAACCGGATAAGCACACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCCTTACCAGGGCTTGCATGCGGAGGCCGTGTCCAGAGATGGGCAATT
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGTTTAA
CCCTCGCTTATGTTGCCATCAGCTTTGGGTGGGCACTCTAGAGGAACCTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTCGTAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCAGGTAGCGATACCGAGCCGATCTC
TAAAGCCGCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGT
GAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCCGCTCACACCAT

GUS2-16S rRNA

ATCTGTCCATGGGTGGGGGATAAATTGGGAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGG
AGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCGAGAAGAAGCCCGGCTAA
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGTTTAA
GTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACTGGGGCTGCATTTGATACGTTGAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTTCCAG
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCAGCGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGGAAAG
CGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTGGGTGACTTTGTCAATCAGTGT
CGTAGTTAACCGGATAAGCACACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCCTTACCAGGGCTTGCATGCGGAGGCCGTGTCCAGAGATGGGCAATTCTC
GCAAGAGACTCCAGCACAGGTGCTGACCTGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TCGCCCTTATGTTGCCATCAGCTTTGGGTGGGCACTCTAGAGGAACCTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGT
CTCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTCGTAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCAGGTAGCGATACCGAGCCGATCTCTAA
AAGCCGCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAA
TACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCCGCTCACACCAAAAAA

GUS3-16S rRNA

GGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGGATCTATCCACGGGTGGGGGATAAATTGGGAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGA
GGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGATGATCGAT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA

ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAGCACTTTCAGCGGGGACGATGATGACG
GTACCCGAGAAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCG
TAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGACACAGTCAGATGTGAAATTCGCGGGCTAACCTGGGGGCTGCATTGTATACGTGGCGACTAGAGT
GTGAGAGAGGGTGTGGAAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGGCGCAACCTGG
CTCATGACTAGCCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG
GATGTTGGGTGACTTTGTCATTTCAGTGTCTGATTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGCGCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGGTTGACATGCGG
AGGCCGTGTCAGAGATGGGCATTTCGCAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTCGCCTTTAGTTGCCATCAGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGC
CGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAG
CCAGGTGGTACACCGGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTA
GTAATCGGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTG

ELS3-16S rRNA

GTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCACGGGTGGGGGACAACCTCGGGAACT
GGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGTA
AAGGCCCTACCAAGCGATGATCGATAGCTGGTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTCGGATTGTAAGC
ACTTTCGACGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGCG
TAGCGTTGTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTAACCTGGGAACT
GCATTTGATACGTGACGACTAGAGTTCGAGAGAGGGTGTGGAAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACA
CCGGTGGCAAGCGGCAACCTGGCTCGATACGCTGAGGCGCAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGT
CCACGCTGTAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGAAACTTAGTTTTTCAGTGTGCAAGCTAACGCGCTAAGCACACCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCGAGA
ACCTTACCAGGCTTGCATGGGAGGACCGGTTAGAGATGGACTTTCTTCGACCTCCCGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCA
GCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCTTTAGTTGCCAGCACTTTCAGGTGGGCACTCTAGAG
AGACTGCCGGTACAAGCCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGTACAATG
CGGTTGACAGTGGGAAGTACATGGTGACATGGTGCTATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTGACTCTGCAACTCGAGTACA
TGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATG
GAGTTGGTTGACCTAAGCCGGTGGGCAACCGCAAG

PS1-16S rRNA

CGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACTCTGGGAACTGGAGCT
AATACCCGATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCTGTGGAGGAGCCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCT
ACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGC
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTCGGATTGTAAGCACTTTCGA
CGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGTACGGTTG
CTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGCGGTGATGGCGGTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTAACCTGGGAGCTGCATTGTA
TACGTACAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTGTGGAATTCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGC
GAAGGCGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTG
TAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTTGTCATTCAGTGTGCGAGTTAACGCGTTAAGCACACCGCCTGGGAGTACGGCCG
AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCGCAGAACCTTACC
AGGCTTGAATGTAGAGGCTGTATTCAGAGATGGATATTTCCCGCAAGGGACCTTAAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTAGCT
GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTCAGTTGCCAGCATGTTGGGTGGGCACTCTAGAGAGA
CTGCCGGTACAAAGCCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGTACAATGGG
GTGACAGTGGGAAGTACATGGTGACATCGTGTGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCCGATTGCACTTGAACCTCGAGTGCATGA
AGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAG
TTGGTTGACCTT

ELS5- Primer: 27F

AGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCACGGGTGGGGGACAACCTCGGGAACTGGAGCTAAT
ACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACC
AAGGCGATGATCGATAGCTGGTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTCGGATTGTAAGCACTTTCGACG
GGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTGCTG
CGGAATGACTGGGCGTAAAGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTAACCTGGGAACTGCATTGATA
CGTGACGACTAGAGTTCGAGAGAGGGTGTGGAATTCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGA
AGGCGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGATGTGTGCTGGATGTTGGGAACTTAGTTTTTCAGTGT

HFG16- Primer: 27F

AAGGTGCTTGACCTTCAAGTGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAGCTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTGGAAA
CAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAAGGGCGCTTCGGCGTACCTAGAGATGGATCCGCGGTGC
ATTAGTTAGTTGGGTAAGGCCTAACAGCAATGATCATTACCGGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGCCAGACTGAGAG
ACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCCAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACCGCGGTGTGTGATGA
AGGCTTTCGGGTGTAAGCACTGTTGATGGGAAGAAGCAGTGAAGTAAAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTACCATAACCAGAAAGG
GACGGCTAAACTGTCAGCAGCAGCCGCGTAACTAGTATGTCAGTATGTCAGGCTTATCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGGAGAGC
GTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCACTGGAAACTGGTTAACTTGGAGTGCAGTAGAGTAAAGTGG
AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTATAGATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAG
GCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTCCCGC
TCTTAGTCCGAAGTTAACGCATTAAGTGTCCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACC

HFG9- Primer: 27F

AAGGTGCTTGACCTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAGCTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTGGAAA
CAGATGCTAATACCGAATAAAAACCTTAGTGTGCGCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTG
CATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATG
AAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTACCATACCAGAAAG
GGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGAC
GGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTG
GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGA
GGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTCCGC
CTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG

HFG16- Primer: 27F

AAGGTGCTTGACCTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAGCTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTGGAAA
CAGATGCTAATACCGAATAAAAACCTTAGTGTGCGCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTG
ATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGA
AGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTACCATACCAGAAAGG
GACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACG
GTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTG
AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAG
GCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTCCGCC
TCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCAAGCAACCGGAAGAACCTTACC

HFG3- Primer: 27F

GGTGTGCTTGACCTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAGCTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTGGAAA
GATGCTAATACCGAATAAAAACCTTAGTGTGCGCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTG
TAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
GGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGAAG
GCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGA
CGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACG
TATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAA
TCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCT
CGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGT

HFG4- Primer: 27F

AAGGTGCTTGACCTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAGCTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTGGAAA
CAGATGCTAATACCGAATAAAAACCTTAGTGTGCGCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTG
ATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGA
AGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTGACGGTACCATACCAGAAAGG
GACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACG
GTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTG
AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAG
GCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGT

HFG11- Primer: 27F

CTAATACCGAATAAAAACCTTAGTGTGCGCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTG
AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCCATACGATGATGTTCTTAGCAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
AACTCCTACGGGAGGCTGCATTATGGAATCTTCCCAATGGGCGAAGGCCCCATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGAAGGCTTCTG
GTCTTATAACTGTTGTATGGGAAAAAACCTATAACATGATATGATGTTGTTTCGAGGGTACCATACCAGAAAGGACCGCTAAA
AACATGCCCCACCCCGGTAATACCTATGTCTCGAACGTTTCCCGATTTTATGGGCGTAAACCGCGCAGACGGTTTATTTATTC
TGATGTGAGAACCCTGCTCAACTCCGAAAGGCATTGTAACCTGGTTAACTTTAGAGCGCTAAAGATAAGTGGAAATCCCTGTG
ATCGCTGGAATGCGTAGATAAAT

BFG9- Primer: 27F

GTTGGGGATAACATTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAAACCTTAGTGTGCGCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCAC
CTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGAT
CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGA
GCAACGCCCGGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTT
GACGGTACCATACCAGAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGG
CGGTAAGCGAGCCGAGCGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTG
AGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACA

PS3- Primer: 27F

CGAGCTCCGTTGAATGACGTGCTTGCCTGACTGATTTTAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCCA
GAAGCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGGTTGAAAGGTGGCTTCGGCT
ATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAGGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGG
TAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGA
TGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAG
GGTTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGGAGA
CTTGTAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAGTGGCGAAGGGCGGT
GTCTAGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGATGAG
TGCTAAGTGTGG

PS3- Primer: RPOA-21F

GTTTATGTGCAACCGTTGGAACGTGGTTACGGGACACGCTAGGAAATTCCTTACGGCGGATCTTACTTTCTTATTACCTGGTGCA
GCTGTTACCAGCATTCAAATCGACGGGGTCTGCATGAATTTTCGACTGTGCAAGGTGTCGTTGAAGATGTCACGCAAAATCATCTTAA
ATGTTAAGAAGATTGCGTTGAAGCTTAATGGCTCTGATGATCAGGAAGAAACGATGGAGATCAACGTTAAGGGTCTGCTCAAATCA
CCGCTGGTGATATTGTTGCCGGAGCCGACGTTGATATCTTGAACCCAGATCTGTACATTGCAACAGTTGCGGATGGTGCAACGTTCCA
TATGCGGATGACAGCTGATAAAGGGCCGGGGCTATGTTTCTGACGAGAACAAAACCTCGCAACACCGACATGCCAATTGGCGTTTT
AGCTGTGGATTCTATTTACCCCAATCGAACGGGTTAACTACCAAGTAGAGAATGCACGGGTTGGCCACGAGCTGACTACGATAA
ATTGACCTGGATGTTTGGACAAACGGTTCAATTAATCCAAGCGAAGCCATTGCTCTGGCTGCTAAGATCTTGACTGAACATCTGGC
AATGTTTGTGATTGACGGACGAAGTAAGAATGCAGAAATCATGGTTGAAAAAGAAGAACAACGCATAAGGAAAAGATGCTTGAGA
TGACCATCGAAGAGCTGACTTATCCGTTCTTACAACCTGTTTGAAGCGCGCC

GUS1- Primer: 16SITS1

GGTTTTGGAATGCTTCTGATATAAAGTCCTGTCTGCAGGATCGGGAAGGCACAGCCAGAGAGGCTGCCTGCACTACGGTGTAACGC
GCCGTCAACATATCCCTTCCAGCGACAATCAATGGACCCTTTTGGGGCTAGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGT
GGGGTCGGAGGTTCAAGTCTCCCTGGCCACCAGTTCTGCTGCGTGTCCGTTCTGGGCTGCATTATGCGGTTTCATGAGGTCATGCA
CTGATGGGGCGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCTGCGTTTCGATCCCGTCCGCTCCACCATTTACT
GGTGTGAGAGGCTGGGTTCTGGCCGTGAATGATTGTCGCCGGAAGATAATGGAGATCGGACGATATCCTGTGGAACCGCGTTGG
CGGTGCATGGGGTGTGGCGTCTGGTGAGTTTGTCTTTGATAATGTGAATAGGTTGGTGCCTTTGTGGACGTGCCTTTGTACGGGT
TGGTCTGACCCGTGGATGGTCCGGGACGCCGAGTATCCATGCTAGGTGACCGAGGCGTAAGCGTTTCATAAACAGAGTTAAGTGTGA
ATTGTGCGATGCACTGCACTTTCTCTGTGCGGGTGTGTTGCTCGATCT

GUS2- Primer: 16SITS1

GTCTGGATGGTTTTGGAATGCTTCTGATATAAAGTCCTTCTGCAAGGATCGGGAAGGCACAGCCAGAGAGGCTGCCTGCACTACGGT
GTAACGCGCCGTAACATATCCCTTCCAGCGACAATCAATGGACCCTTTTGGGGCTAGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTTGA
TAAGCGTGGGGTCGGAGGTTCAAGTCTCCCTGGCCACCAGTTCTGCTGCGTGTCCGTTCTGGGCTGCATTTATGCGGTTTCATGAGG
TCATGCACTGATGGGGCGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCTGCGTTTCGATCCCGTCCGCTCCACC
ATTTACTGGTGTGAGAGGCTGGGTTCTGGCCGTGAATGATTGTCGCCGGAAGATAATGGAGATCGGACGATATCCTGTGGAACC
CGGTTGGCGGTCATGGGGTGTGGCGTCTGGTGAGTTTGTCTTTGATAATGTGAATAGGTTGGTGCCTTTGTGGACGTGCCTTTGT
CACGGGTTGGTCTGACCCGTGGATGGTCCGGGACGCCGAGTATCCATGCTAAGTGACGGAGGCGTAAGCGTTTCATAAGCGAGTTA
AGTGTGAATGTGCGATGCACTGCACTTTCTCTGTGCGGGTGTGTTGCTCGATCTGCCGTTATCTGACTGGTGGCTTGAAGTGGAT
GGCTCTGTGCATGTGTGGGCAATG

GUS3- Primer: 16SITS1

GCTTGGTCTGGATGGTTTTGGAATGCTTCTGACATAAAGTCCTTACCTGCAAGGATCGGGAAGGCACAGCCAGGTAAGGCTGCCTGC
ACTTCCGGTGAACGCGCCGTAACATATCCCTTCCAGCGACAATCAATGGACCCTTTTGGGGCTAGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAC
ACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGGAGGTTCAAGTCTCCCTGGCCACCAGTTCTGCTGCGTGTCCATGTTTATGGTCACTGACTGAT
GGGGCGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCTGCGTTTCGATCCCGTCCGCTCCACCAGAACTGGTGT
TGAGAGGTTGGGAATGATTGTCGCCGGAAGATAATGGAGATCGGACGGATACCTTGTGGAACCGGTTGGCGGTGCATGGGGTGT
TGCGGCTGGTAAAGTTTGTCTTTGATAATGTGAATAGGTTGGTGCCTTTGTGGACGTGCCTTTGTACGGGTTGGTCTGACCCGTGG
ATGGTCCGAGCAGTCCGGGTATCCACGCTAGGTGACGGAGGCGTATGCGTTTCATAAACAGGTTAAGTGTGAAATGTGCGATGCACT
GCACTTCTGTGCGGGTGTGTTGCTCGATCTGCCGTTGGTTATCTGACGGGTGGCTTGAAGTGGATGGCTCCTGTGCATGTGTGG
GCAATGAG

PS1- Primer: 16SITS1

TGGTTGATTTGGGATGTTCTAAAAAATAAGTCCCTGCACTTAGGATCAAGTGTAGGCATCTGTCAGTCTGGTTTTAGGACCGGGCGC
GCCGTCAACATATCCCTTCTACAACAGATGCTGGATAATGAAGATTATTCAGTCCGGTTTTGGGCTAGTAGCTCAGTTGGTTAGAGC
ACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGGAGGTTCAAGTCTCCCTGGCCACCAGTTTATGTTAGCCGTTTCCAAAGGGGGCGTAGCTCA
GCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCTGCGTTTCGAACCCGTCCTCCACCAGGGAAGGTTAGATTGAGACTTGGTG
TTGAGAGTATCTGTTGGGGAGGTTAGTGATCGGACTTCTGCGCATAGCGGGGTGCTGAGGGAACCTGCGTGT

TGATCTTTGTCAGTGTGAATCGGTTGGTGCCTTCTGGGCGTGCTGAGAGCTGTGGGTTGGTCTGACCCATATGATCTGGGGTTTATC
TCTGGGTTATATGTTAAGCAGTTTTTAGCGTGAGCGTTTAAAGTGTGACGTGCTCGGATGCGTTCATGCTTAGAGCT
GTTTGTATCGTAAGGTATGGATGGTTTCTGTGCATGGGGCGAGTGA

AUS4- Primer: 16SITS1

GTTCTAAAAAATAAGTCTGCCTTACCTGACTTAGGATCAAGTGTAGGCATCTGTGCTGAGTCTGGTTTTAGGACCGGGCGCGCCGCAACATATCC
CTTTCTACAACAGATGCTGGATAATGAAGATTATTCAGTCGGGTTTTGGGCTAGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAGACCGTTGATAAAG
GTGGGGTCGGAGGTTCAAGTCCCTCCCTGGCCACCATGTTTTAGTTAGCCGTTTCTAAGGGGGCGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACC
TGCTTTGCAAGCAGGGGTCGTCGGTTGCAACCCGTCCTCCACCAGGGAAGGTTAGATTGAGACTTGGTGTGAGAGTATCTGT
TGTGGGGAGTTAGTGATCGGACTTCTTGGGCATGTTCTGCGATAGCGGGGGTGTGAGGGAACCTGGTGTGATCTTTGTCAGTG
TGAATCGGTTGGTGCCTTCTGGGCGTGCTGAGAGCTGTGGGTTGGTCTGACCCATATGATCTGGGGTTATCTCTGGGTTATATGTT
AAGCAGTTTTAGCGTGAGCGTTCAGAAGCGTTTTAAAGTGTGACGTGCTCGGATGCGTTCATGCTTAGAGCTGTTTGTATCGTAAGG
TATGGATGGTTTCTGTGCATGGGGCGAGTGA

HFA5- Primer: 27F

GCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTG
GAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACAAAAAGTTAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGC
GGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACT
GAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGT
GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTGTGACGGTACCATAACCAG
AAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTATGTCGGAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
AGACGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTAACTTGAAGTGCAGTAGAGGTA
AGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACG
TTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGT
TTCCGCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACGGG
GACCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT

HFG8- Primer: 27F

ACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACAAAAAGTTAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGT
GCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAG
ACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGAT
GAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTGTGACGGTACCATAACCAGAAA
GGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTATGTCGGAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGA
CGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACCTGGTAACTTGAAGTGCAGTAGAGGTAAGT
GGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTG
A

AAS3- Primer: 27F

CGAACTCGGTATTGATTGGTGTTCGCATCATGATTACATTTGAGTGAAGTGGCGAACTGGTGAAGTAAACACGTGGGAAACCTGCCCA
GAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGC
TATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGGTAAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACTGAGAGG
GTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTG
ATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAATATCTGAGAGTAACTGTTCCAG
GTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTT
ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA
AACTTGAAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG
CTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATG
AATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAAGTGTGACGCTAACGC

AUS2- Primer: 27F

TTTTTGGGAGGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCC
TTTTCTACACATGTAGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAA
CGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCCGCTGAGTGTGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACT
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCCTTAAAGTCTGATGTGAAA
GCCCACGGCTCAACCTGGAGGGTCAATTGGAACCTGGGGGACTTGAAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGTCAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTGTGCTGACGAAACG
CATAAGCACTCCGCC

BFA9- Primer: 27F

GGATCTTTCGGGATCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTATCCATGGGTGGGGGACAACTCCGGAACTGGAGCTA
ATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA
CCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGAC
GGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGC
TCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTATGTCAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACTGGGAACTGCATTGAG
ACGCATAGACTAGAGGTCGAGAGAGGGTTGTGGAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCG
AAGGCGCAACCTGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGT
AAACGATGTGTGGATGTTGGGTAACCTAGTTACTCAGTGTGCAAGCTAACGCGCTAAGCACACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGA

ELS5- Primer: DNAK

GCAAAGCCGTTTCGCCAATCCCCGCAACGCCGCGCAGGGTCCCTGCGTCAGCTGGATGCGGAAATTACCCGAGCCGACCGCTGTCC
CTTTCGCCTATGCGCAGGGGTACACGTCTCACCCGTTGCGACGACACACTGGGATTATCTGGAAAAACTGCGGCAGTGGGGTTCA
ACGGTCAATCCGCTCTCCAGATGATTGCCATGCCCGGACATCCCGGCTATGTGGACAGGCTGGCCCGGAGCGCTCGGAACTG
GATTATGACATCGACGGCATCTATTCAAACCTGGACGATCTGAGCCTTACAGACCCGCTTGGCTTTGCCGGCCGTGCGCCCGCTGG
GCCATCGCGTGAAGTTTCCGGCCGAACAGGCCATCACGCGCTTGGGGAGATCGAGATCCAGGTCGGCCGACGCGGCGCCCTGAC
CCCCGTCGCGCATCTGGAACCCGGTGAATGTGCGCGGCGTCATCGTCTCGCGGCCACTCTGCACAACGAGGACGAAATCGCCCGCAA
GGACGTGCGCGTCGGTGATCTGGTGCCTGACGCGCGCGGAGACGTGATCCCGCAGATCCTCGGCCCGTCCCCAGCGAGGAGCC
CCGTTTCGGAGCCTTTCGTCTATCCCGACCACTGCCCGTCTGCGGATCGCTCGCCGAGCGCGTGCATGGTGAAGCCGTCGCCCGTGC
ACAGGTGGCCTGACCTGCGAAGCGCAGATCGTGGAGCGCTGATCCACATGGTGTACGCAACGCATT

ELS4- Primer: DNAK

CAAAGCCGTTTCGCCAATCCCCGCAACGCCGCGCAGGGTCCCTGCGTCAGCTGGATGCGGAAATTACCCGAGCCGACCGCTGTCC
TCTTCGCCTATGCGCAGGGGTACACGTCTCACCCGTTGCGACGACACACTGGGATTATCTGGAAAAACTGCGGCAGTGGGGTTCA
CGGTCAATCCGCTCTCCAGATGATTGCCATGCCCGGACATCCCGGCTATGTGGACAGGCTGGCCCGGAGCGCTCGGAACTGG
ATTATGACATCGACGGCATCTATTCAAACCTGGACGATCTGAGCCTTACAGACCCGCTTGGCTTTGCCGGCCGTGCGCCCGCTGGG
CCATCGCGTGAAGTTTCCGGCCGAACAGGCCATCACGCGCTTGGGGAGATCGAGATCCAGGTCGGCCGACGCGGCGCCCTGACC
CCGGTTCGCGCATCTGGAACCCGGTGAATGTGCGCGGCGTCATCGTCTCGCGCGCCACTCTGCACAACGAGGACGAAATCGCCCGCAA
GACGTGCGCGTCGGTGATCTGGTGCCTGACGCGCGCGGAGACGTGATCCCGCAGATCCTCGGCCCGTCCCCAGCGAGGAGCCC
CGTTCGGAGCCTTTCGTCTATCCCGACCACTGCCCGTCTGCGGATCGCTCGCCGAGCGCGTGCATGGTGAAGCCGTCGCCCGTGC
CAGGTGGCCTGACCTGCGAAGCGCAGATCGTGGAGCGCTGATCCACATGGTGTACGCAACGCATT

ÖZGEÇMİŞ

Eda Büyükduman

Medeni Durumu: Bekâr

Ehliyet: B sınıfı

A. EĞİTİM

Yüksek Lisans: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Bölümü, 2021, İstanbul

Lisans: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 2017, İstanbul

Lisans: Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi, Gençlik ve Spor Bakanlığı Temel Antrenörlük Eğitimi, 2021.

Lisans: İstanbul Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi, Tarih, 2018-

B. MESLEKİ DENEYİM

2015- Yaz Sezonu Villa İşletme

Haziran 2016 - Ağustos 2016: İstanbul Halk Ekmek, Stajyer

Eylül 2019 – Haziran 2021: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı Bursiyer

Temmuz 2021- Geleneksel Türk Okçuluğu 1. Kademe Antrenör

C. PROJELERİ

1- Lisans Tezi

Proje Adı: *PALIURUS SPİNA- CHRISTİ MİLL.* (KARAÇALI) BİTKİ MEYVELERİNİN OPTİMUM EKSTRAKSİYON PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ

Yazarlar: Eda BÜYÜKDUMAN, Büşra BEKDAŞ, Büşra CEYLAN, (2017).

2- 1190314 No'lu Tübitak Projesi Bursiyeri;

Proje Adı: Türkiye Küflü Peynirlerine Has Küflerin Genetik Özelliklerinin ve *Penicillium roqueforti* Suşlarının Morfolojik ve Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi

Yazarlar: Banu METİN, H.Ebrar KIRTIL, (2019- 2021).

3- BAP-1000-42 No'lu Proje;

Proje adı: *Komagataeibacter* sp. GUS3 izolatının selüloz üretiminin optimizasyonu ve moleküler karakterizasyonu

YABANCI DİL

İngilizce: Orta

Osmanlı Türkçesi: İyi

Sertifikalar:

- 18001 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetimi (İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, 2017),
- 22000 Gıda Güvenliği Yönetimi (İstanbul Sanahattin Zaim Üniversitesi, 2017),
- 9001 Kalite Yönetimi (İstanbul Sanahattin Zaim Üniversitesi, 2017),
- Temel Hijyen Eğitimi (İstanbul Sanahattin Zaim Üniversitesi, 2017),
- İç Denetçi (İstanbul Sanahattin Zaim Üniversitesi, 2017).

