

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

ŞALGAM SUYU FERMANTASYON SÜRECİNİN
MİKROBİYAL PROFİLİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine Sena KAFKASKIRAY

İstanbul
Ağustos, 2020

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ŞALGAM SUYU FERMANTASYON SÜRECİNİN MİKROBİYAL
PROFİLİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine Sena KAFKASKIRAY

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

İstanbul

Ağustos, 2020

TEZ ONAYI

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 Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Üye Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Ali Güneş

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Şalgam Suyu Fermantasyon Sürecinin Mikrobiyal Profilinin Moleküler Yöntemlerle 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.

Emine Sena KAFKASKIRAY

ÖNSÖZ

Araştırmamdaki her aşamada bana yardımcı olan değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN'e, eğitim alanında dersleriyle vizyon katan çok değerli hocamız Prof. Dr. Bülent NAZLI'ya, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU'na, Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN'e, kıymetli lisans ve yüksek lisans hocalarıma, çalışmalarım süresince manevi desteklerini esirgemeyen ve her daim yanımda olan kıymetli aileme ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Emine Sena KAFKASKIRAY
İstanbul – 2020

ÖZET

ŞALGAM SUYU FERMANTASYON SÜRECİNİN MİKROBİYAL PROFİLİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Emine Sena KAFKASKIRAY
Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği
Tez danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN
Ağustos-2020, 106 Sayfa

Fermente ürünler zengin tat ve aromaları ve sağlığa faydalı etkileri nedeniyle her geçen gün tüketiciler tarafından daha fazla talep görmektedir. Şalgam suyu ülkemize özgü, kırmızı renkli, ekşi ve bulanık olup, laktik asit fermantasyonu ile üretilen bir içecektir. Şalgam suyunda hammadde olarak bulgur unu, şalgam turbu, su, ekşi hamur, tuz ve kara havuç kullanılmaktadır. Şalgam suyu üretiminde fermantasyon, ilave edilen ekşi hamur ve sebzelerde bulunan mikroflora ile gerçekleşmektedir. Bu çalışmada şalgam suyunun fermantasyon sürecindeki mikrobiyal profilinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla iki aşamalı şalgam suyu üretim yöntemi kullanılmış olup, önce hamur fermantasyonu, ardından havuç fermantasyonu yapılmıştır. Fermantasyon süresince beş farklı zamanda; hamur fermantasyonunun sonunda ve havuç fermantasyonunun 3, 5, 7 ve 10. gününde örnekler alınmıştır. Fermantasyon boyunca pH hamurda 3,98'den, havuç fermantasyonunun 10. gününde, 3,28-3,23'e kademeli bir düşüş göstermiştir. Örneklerde toplam mezofilik aerobik bakteri, koliform, laktik asit bakterisi (LAB) ve küf-maya sayımı yapılmış, 110 bakteri ve 36 maya saflaştırılıp DNA izolasyonuna tabi tutulmuştur. Bunlar arasından 76 bakteri ve 30 maya rep-PCR ile gruplandırılmış, her gruptan bir örnek moleküler tanımlama için seçilmiştir. Bakteriler 16S rDNA, mayalar ise 26S rDNA bölgesinin dizilenmesiyle tanımlanmıştır. Tanımlanan LAB arasında *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactococcus lactis* yer alırken, LAB olmayan bakterilerden *Micrococcus yunnanensis*, *Bacillus circulans*, *Paenibacillus cucumis*,

Pantoea aglomerans, *Staphylococcus pasteurii* ve *Staphylococcus^[L1]hominis^[SEP]* gözlemlenmiştir. Mayalarda *Saccharomyces cerevisiae* dışında sadece *Pichia kudriavzevii* tespit edilmiştir. Fermantasyon sürecinde baskın laktik asit bakterisinin *L. plantarum*, baskın mayanın da *S. cerevisiae* olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Şalgam, siyah havuç, fermente içecek, mikrobiyal profil.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE MICROBIAL PROFILE OF SHALGAM BEVERAGE FERMENTATION PROCESS BY MOLECULAR METHODS

Emine Sena KAFKASKIRAY
Master of Science, Food Engineering
Thesis Advisor: Asist. Prof. Dr. Banu METİN
Agust-2020, 106 Pages

The consumer demand for fermented products has been increasing day by day because of their rich taste, aroma and beneficial health effects. Shalgam beverage is unique to our country, red in color, sour and cloudy, and is a drink produced by lactic acid fermentation. Bulgur flour, turnip, water, sourdough, salt and black carrot are used as raw materials in shalgam beverage. Fermentation is carried out by the microflora present in sourdough and on vegetables in shalgam beverage production. In this study, it was aimed to determine the microbial profile of shalgam beverage during the fermentation process by molecular methods. For this purpose, shalgam was produced following the two-stage production method, first dough fermentation and then carrot fermentation was carried out. Samples were taken at five different time-points; at the end of dough fermentation, on days 3, 5, 7, and 10 of the carrot fermentation. The pH showed a gradual decrease from 3,98 in the dough to 3,28-3,23 on day 10 of the carrot fermentation. Total mesophilic aerobic bacteria, coliforms, lactic acid bacteria (LAB) and mold-yeast counts were carried out in samples, 110 bacteria and 36 yeast were purified and subjected to DNA isolation. Among the isolates 76 bacterial and 30 yeasts were grouped by rep-PCR and one from each group was selected for molecular identification. Bacteria and yeasts were identified by sequencing of 16S rDNA and 26S rDNA, respectively. The identified LAB involve *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*, while non-LAB bacteria, such as *Micrococcus yunnanensis*,

Bacillus circulans, *Paenibacillus cucumis*, *Pantoea agglomerans*, *Staphylococcus pasteuri*, *Staphylococcus*^[1]_{SEP}*hominis* were also observed. Among yeasts, only *Pichia kudriavzevii* was detected other than *Saccharomyces cerevisiae*. While the dominant lactic acid bacterium was *L. plantarum*, the dominant yeast was determined to be *S. cerevisiae* during the fermentation period.

Keywords: Shalgam, black carrots, fermented beverage, microbial profile

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEZ ONAYI..... | i |
| BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ | ii |
| ÖNSÖZ..... | iii |
| ÖZET..... | iv |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER..... | viii |
| ŞEKİLLER..... | x |
| TABLolar..... | xi |
| SEMBOLLER VE KISALTMALAR..... | xii |
| GİRİŞ | 1 |
| BİRİNCİ BÖLÜM | 2 |
| LİTERATÜR TARAMASI | 2 |
| 1.1 Fermantasyon..... | 2 |
| 1.2. Fermente İçecekler | 3 |
| 1.3. Şalgam Suyu | 8 |
| 1.3.1. Şalgam Suyu Üretiminde Kullanılan Ham Maddeler..... | 9 |
| 1.3.2. Şalgam Suyu Üretimi..... | 12 |
| 1.3.3. Şalgam Suyunun Bileşimi ve Kimyasal Özellikleri | 15 |
| 1.3.4. Şalgam Suyunun Fonksiyonel Özellikleri | 17 |
| 1.3.5. Şalgam Suyunun Mikrobiyolojik Özellikleri | 18 |
| 1.4. Mikroorganizma Tanımlama Metotları | 22 |
| 1.4.1. Moleküler Barkodlama | 24 |
| 1.4.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) | 26 |
| 1.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi | 27 |
| 1.4.4. Rep-PCR (Tekrarlayan element sekansı temelli polimeraz zincir reaksiyonu) | 27 |
| İKİNCİ BÖLÜM..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| MATERYAL VE METOT | 29 |
| 2.1. Materyal..... | 29 |
| 2.2. Metot | 31 |
| 2.2.1. Şalgam Suyu Üretimi..... | 32 |
| 2.2.2. Numune Hazırlığı | 34 |
| 2.2.3. Şalgam Suyunun pH Değerinin Belirlenmesi | 34 |
| 2.2.4. Mikrobiyolojik Ekimler | 34 |
| 2.2.5. DNA İzolasyonu..... | 35 |
| 2.2.6. PCR..... | 37 |
| 2.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi | 39 |
| 2.2.8. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması..... | 41 |
| 2.2.9. Dizi Analizi | 41 |
| 2.2.10. İstatistiksel Analizler | 42 |
| ÜÇÜNCÜ BÖLÜM..... | 43 |
| BULGULAR VE TARTIŞMA | 43 |
| 3.1. Şalgam Örneklerinin pH Değerleri | 43 |
| 3.2. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları | 44 |
| 3.3. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonu | 50 |
| 3.4. Mayaların İdentifikasyonu..... | 64 |
| DÖRDÜNCÜ BÖLÜM | 69 |
| SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 69 |
| KAYNAKÇA..... | 72 |
| EKLER..... | 85 |

ŞEKİLLER

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1: Türkiye'ye Has Geleneksel Fermente İçecekler | 8 |
| Şekil 1.2: Geleneksel Metotla Şalgam Suyu Üretimi | 13 |
| Şekil 1.3: Direkt Metotla Şalgam Suyu Üretimi | 15 |
| Şekil 1.4: 16S rRNA (bir -1500-baz çifti geni) | 25 |
| Şekil 1.5: 26S rRNA ITS Bölgeleri | 25 |
| | |
| Şekil 2.1: Şalgam Suyunun Mikrobiyal Profilinin Tanımlama Safhaları | 31 |
| Şekil 2.2: Şalgam Suyunun Geleneksel Yöntemlerle Üretimi | 33 |
| Şekil 2.3: %1,5 Agaroz Jelde Yürütülmüş (a) λ DNA HindIII Markör & (b) Ladder | 40 |
| | |
| Şekil 3.1: MRS besiyerinden izole edilen LAB suşlarının rep-PCR jel görüntüleri . | 52 |
| Şekil 3.2: Şalgam Suyunda MRS İle Tespit Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Çeşitli Aşamalardaki % Dağılımları | 55 |
| Şekil 3.3: M17 Besiyerinden İzole Edilen Bakterilerin rep-PCR Jel Görüntüleri | 58 |
| Şekil 3.4: Şalgam Suyunda M17 ile Tespit Edilen Bakterilerinin Çeşitli Aşamalardaki % Dağılımları | 61 |
| Şekil 3.5: PDA Besiyerinden İzole Edilen Maya Suşlarının rep-PCR Jel Görüntüleri | 65 |
| Şekil 3.6: Şalgam Suyunda PDA ile Tespit Edilen Mayaların Çeşitli Aşamalardaki % Dağılımları..... | 68 |

TABLolar

| | |
|--|----|
| Tablo 1.1: Dünyadaki Bazı Geleneksel Fermente İçeceklerin Sınıflandırılması | 3 |
| Tablo 1.2: Türkiye'deki Geleneksel Fermente İçecekler Sınıflandırılması | 6 |
| Tablo 1.3: TS 11149 Standardına Göre Şalgam Suyu Değerleri | 16 |
| Tablo 1.4: Sebze Ve Meyve Fermantasyonlarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterisi Türleri | 21 |
| Tablo 2.1: Rep-PCR Koşulları | 38 |
| Tablo 2.2: 16S ve 26S PCR Koşulları | 38 |
| Tablo 2.3: Tanımlama PCR'ında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları | 39 |
| Tablo 2.4: Kullanılan İleri Ve Geri Primer Dizilimleri | 39 |
| Tablo 3.1: Hamur ve Şalgam Suyunun Fermantasyon Sürecindeki pH Değerleri | 44 |
| Tablo 3.2: Hamur Örneğinde Mikroorganizma Sayımı (log kob/g) | 44 |
| Tablo 3.3: Şalgam Örneklerinde LAB Sayımı (log kob/mL) | 45 |
| Tablo 3.4: Şalgam Örneklerinde M17'de Gelişen Bakterilerin Sayısı (log kob/mL) | 46 |
| Tablo 3.5: Şalgam Örneklerinde Maya Sayımı (log kob/mL) | 46 |
| Tablo 3.6: Şalgam Örneklerinde TMAB Sayımı (log kob/mL) | 47 |
| Tablo 3.7: Şalgam Örneklerinde Koliform Sayımı (log kob/mL) | 48 |
| Tablo 3.8: MRS Besiyerinden İzole Edilen LAB Suşlarının rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatlara Uygulanan 16S PCR ile İdentifikasyonu | 53 |
| Tablo 3.9: M17 Besiyerinden İzole Edilen Bakteri Suşlarının rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatlara Uygulanan 16S PCR ile İdentifikasyonu | 58 |
| Tablo 3.10: PDA Besiyerinden İzole Edilen Maya Suşlarının rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatlara Uygulanan 26S PCR ile İdentifikasyonu | 66 |

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|------|---------------------------|
| rpm | Revolution Per Minute |
| PCR | Polimerase Chain Reaction |
| RNA | Ribonükleik asit |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| mg | Miligram |
| g | Gram |
| ml | Mililitre |
| kob | Koloni Oluşturan Birim |
| me/L | Miliekivalan Litre |
| dk | Dakika |
| MRS | De Man RogosaSharp |
| Log | Logaritmik |
| M17 | M17 Agar |
| PCA | PlateCountAgar |
| pH | Power of Hydrogen |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |
| VRBA | Violet Red Bile Agar |
| NaOH | Sodyum Hidroksit |

| | |
|------|-------------------------------------|
| RAPD | Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA |
| °C | Santigrat Derece |
| Rep | Tekrarlayan Ekstrajenik Palindromik |
| TSE | Türk Standartları Enstitüsü |

GİRİŞ

Geleneksel fermente edilmiş bir içecek olan şalgam suyu, kırmızı renkli, bulanık ve ekşi bir meşrubattır. Mersin, Kahramanmaraş, Adana, İçel ve Hatay yörelerimizde üretilmekte ve yaygın olarak tüketilmekte olan serinletici bir içecektir. Kendine has lezzeti olan şalgam suyu, sindirim ve bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileri ile birlikte zamanla yöresel bir boyuttan çıkarak, çokça talep edilen ve tüketilen bir içecek haline almıştır. Şalgam suyu, siyah havuç, bulgur unu, şalgam, su, ekşi hamur, tuz ve su kullanılarak üretilen fermente bir içecektir. Şalgamın kendine has mor-kırmızı rengini oluşturan kara havuç *Apiaceae* familyasına ait olup, bilimsel adı *Daucus carota* L.'dir ve zengin antosiyanin içeriği ile bilinmektedir. Ana hammadde siyah havuç olmasına rağmen (%10-20), *Brassicaceae* familyasının *Brassica napus* L. türüne ait şalgam da yaklaşık % 2'lik bir konsantrasyonda şalgam suyu fermantasyonuna katılır ve duyu kaliteyi olumlu yönde etkiler. Şalgam suyu üretiminde genellikle ekşi hamur, fermantasyon için ana mikroorganizma kaynağı olarak kullanılır. Mikrobiyal gelişme, % 1-2'lik bir konsantrasyonda tuz ilavesi ile kontrol edilir. Şalgam suyu üretiminde geçmişten günümüze kadar çeşitli üretim yöntemleri denenmiş ve uygulanmış olup standart bir üretim şekli yoktur. Geleneksel yöntem ve direkt yöntem olmak üzere ikiye ayrılır. Geleneksel yöntem hamur fermantasyonu ve havuç fermantasyonu olarak iki aşamalı şekilde gerçekleştirilmektedir. Yapılan bu çalışmada, şalgam suyunun laboratuvar koşullarında ve geleneksel üretim yöntemi kullanılarak üretilip, fermantasyon sürecindeki mikrobiyal profilinin moleküler yöntemler vasıtasıyla tanımlanması amaçlanmıştır. Bu bağlamda MRS ile tespit edilemeyen laktik asit bakterilerinin M17 besiyeri kullanılarak tespit edilmesi, laktik asit bakterilerinin yanı sıra maya profilinin tanımlanması hedeflenmiştir. Geleneksel yöntemlerle üretilen şalgam suyunun, hamur fermantasyonu ve havuç fermantasyonundaki mikrobiyal profilinin moleküler yöntemlerle tespit edilmesi, tanımlama işlemini hem güncel hem etkin metotlarla sağlayarak, gelecek çalışmalar için literatüre katkı sağlayacaktır.

BİRİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

1.1 Fermantasyon

Fermantasyon, mikroorganizmalar tarafından asit üretimiyle pH'ın düşmesi veya alkol üretimi ile sonuçlanan, geniş bir substrat çeşitliliğine sahip biyokimyasal reaksiyonlar zinciridir (Kabak ve Dobson, 2011). Mikroorganizmaların görev alarak meydana getirdiği fermente ürünler, geçmişten günümüze kadar gelişim kaydederek, bireylerin kendine has üretim yöntem ve deneyimleri ile günümüz kültürü tarafından benimsenen ürünleri meydana getirmiştir (Pamir, 1985). Fermente gıdalar, yüksek mikroorganizma içeriğine ve uzun raf ömrüne sahip yiyecek ve içeceklerdir (Erkmen, 2011). Kurutma, tuzlama ve dumanlamanın da eşlik ettiği geleneksel fermantasyon yöntemleri dünyanın pek çok yerinde geçmişten günümüze kullanılmaktadır (Tamang ve Kailasapathy, 2010).

Dünyada birçok topluluk ve çeşitli kökene sahip milyarlarca insan tarafından yaygın olarak üretilen ve tüketilen fermente ürünler, fermente sebzeler, fermente soya ve diğer baklagiller, fermente tahıl ürünleri, fermente süt ürünleri, fermente balıklar, fermente içecekler ve fermente et ürünleri olarak gruplanabilir (Karaçil ve Acar, 2011). Fermente tahıl ürünlerine, tempeh, miso, boza, nohut mayası ekmeği, ekşi maya ekmekleri ve çeşitli tarhanalar örnek verilebilmektedir (Şimşekli ve Doğan, 2015; Wood, 1998). Fermente süt ürünlerine, yoğurt, fermente süt, yakult, kefir ve peynir gibi ürünler örnek olarak gösterilebilmektedir (Kosikowski, 1982; Seçkin ve Baladura, 2011). Fermente balık ve balık ürünlerine, balık sosu, patis (Filipinler), garum

(Avrupa), fermente balık ezmesi ve tuzlanmış balık örnek verilebilirken (Koffi-Nevry, vd., 2011; Wood, 2012), fermente sebze olarak turşu, kimchi, sauerkraut, gundruk ve sunki gibi ürünlerden söz edilmektedir (Karaçıl ve Acar, 2011). Tofu ise fermente soya ürünleri arasında yer almaktadır (Kiers, vd., 2000; Serrazanetti, vd., 2013). Fermente et ürünlerinde, sucuk, sosis, pastırma ön plana çıkarken (Kurt ve Zorba, 2008; Kaban, 2013), fermente içeceklere; boza, kefir, kımız, şalgam suyu ve fermente içkiler örnek teşkil edebilmektedir (Bilişli, 2013; Çelik, 1988).

1.2. Fermente İçecekler

Dünyada ve ülkemizde fermente içecek çeşitleri, her yaş grubundan bireylerin severek tükettiği ürünlerdir. Bununla birlikte binlerce yıldır bireylerin kendilerinin ürettikleri bu ürünler, zamanla artan nüfus ve keşfedilen yeni tekniklerle endüstriyel olarak üretilmeye başlanmıştır. Tablo 1.1 ve Tablo 1.2’de listelendiği üzere tüm dünyada ve ülkemizde, genel olarak fermente alkollü içecekler, çay ve kahve ortak olarak tüketilmektedir. Bununla birlikte dünyanın her köşesinde, her ülkenin kültürüne özgü, sevilerek tüketilen geleneksel içecekler mevcuttur.

Tablo 1.1: Dünyadaki Bazı Geleneksel Fermente İçeceklerin Sınıflandırılması

| Fermente İçecek Türleri | Ürünler | İçerik | Ülkeler | Referans |
|--------------------------------|---|---------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| Süt Ürünleri | Amasi, Garris, Nyarmie, Rob, Suusac, Kivuguto, Bushera, Kadam | Süt | Afrika | Marsh vd., 2014; Ender vd., 2006 |
| | Kefir | Süt | Doğu Avrupa (Kafkasya) | Marsh vd., 2014 |
| | Koumiss/Airag | Süt | Rusya | Marsh vd., 2014 |
| | Kumis | Süt | Güney Amerika | Marsh vd., 2014 |
| | Shubat | Süt | China | Marsh vd., 2014; Ender vd., 2006 |
| | Yakult | Süt | Japonya, Brezilya, Meksika, Singapur | Ender vd., 2006 |
| | Dahi (Dadli) | Süt | Hindistan | Ender vd., |

| | | | |
|--|---------------------|--|----------------------------------|
| | | | 2006 |
| | Chhaas (Mahi) | Süt | Nepal |
| | | | Ender vd., 2006 |
| | Ymer | Süt | Danimarka |
| | | | Ender vd., 2006 |
| | Bulgaricus Sütü | Süt | Bulgaristan |
| | | | Ender vd., 2006 |
| | Amazake | Pirinç | Japonya |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Boza | Arpa, yulaf, çavdar, mısır, buğday veya pirinç | Balkanlar (Bulgaristan, Türkiye) |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Soya Fasulyesi Sütü | Soya Fasülyesi | Çin, Japonya |
| | | | Çelik, 1988 |
| | Bushera | Sorgum, darı unu | Afrika |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Koko Sour Water | Tahıl (inci darı) | Afrika |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Mahewu | Mısır, darı | Afrika |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Togwa | Mısır unu, parmak darı maltı | Afrika |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Sorgum birası | Sorgum, mısır | Güney Afrika |
| | | | Çelik, 1988 |
| | Kvass | Çavdar ekmeği, çavdar ve arpa malt/un | Russia |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Pozol | Mısır | Mexico |
| | | | Marsh vd., 2014 |
| | Bagni | Darı | Kafkasya |
| | | | Çelik, 1988 |
| | Braga | Darı | Romanya |
| | | | Çelik, 1988 |
| | Busaa | Mısır, parmak darı maltı | Kenya |
| | | | Nout, 1980 |
| | Burukutu, Pito | Sorgum ve cassava, Gine darısı veya mısır | Nijerya |
| | | | Çelik, 1988 |
| | Drassum | Darı | Moğalistan |
| | | | Çelik, 1988 |
| | Li, Jiu (alkollü) | Pirinç ve darı | Çin |
| | | | McGovern |

| | | | | |
|---|--------------------------------|------------------------|--|-----------------------|
| | İçecekler) | | | vd., 2004 |
| | Bira | Tahıl | - | Wood, 2012 |
| | Saké | Pirinç | Japonya | Wood, 2012 |
| | Viski | Tahıl | İskoçya, İrlanda, Kuzey Amerika, Japonya | Wood, 2012 |
| | Kombucha | Çay | Çin | Marsh vd., 2014 |
| | Chang (şarap) | Bitki | Çin | McGovern vd., 2004 |
| | Kahve | Kahve çekirdekleri | Etiyopya, Afrika | Wood, 2012 |
| Meyve, Sebze ve Bitki Ürünleri | Çay Oolong Çay Yeşil Çay | Çay yaprağı | Doğu Asya (Çin, Vietnam), Türkiye, Hindistan, Sri Lanka, Kenya, Endonezya, Japonya, Bangladeş | Wood, 2012 |
| | Elma Şırası | Elma | BM, Fransa, Almanya, İspanya | Wood, 2012 |
| | Şarap | Üzüm | - | Wood, 2012 |
| | Rom | Şeker kamışı, melas | Batı Hint Adaları | Wood, 2012 |
| | Konyak | Meyve suyu | Fransa | Wood, 2012 |
| | Kanji | Kara havuç | Hindistan | Erten, 2008 |
| | Laktofermente havuç suyu | Havuç | - | Erten, 2008 |
| Diğer | Su Kefiri | Su/Sukroz | Meksika | Marsh vd., 2014 |

Tablo 1.2: Türkiye’deki Geleneksel Fermente İçecekler Sınıflandırılması

| Fermente İçecek Türleri | Ürünler | İçerik | Referans |
|---------------------------------------|----------------|--|-----------------------|
| Süt Ürünleri | Ayran | Süt (inek ve diğerleri) | Marsh vd., 2014 |
| | Kıymız | Süt | Kabak ve Dobson, 2011 |
| | Kefir | Süt | Kabak ve Dobson, 2011 |
| Tahıl ve Bakliyat Ürünleri | Boza | Arpa, yulaf, darı, mısır, buğday veya hububat unları | Pamir, 1961 |
| | Şalgam Suyu | Kara havuç, şalgam | Kabak ve Dobson, 2011 |
| Meyve, Sebze ve Bitki Ürünleri | Hardaliye | Üzüm, hardal tohumu, kiraz yaprağı | Marsh vd., 2014 |
| | Çay | Çay yaprağı | Wood, 2012 |

Şekil 1.1’de görüldüğü üzere Türkiye’ye has çeşitli geleneksel fermente içecekler bulunmakta ve ülkenin her bölgesinde sevilerek tüketilmektedir.

Ayran, Türkiye’de çok popüler olmasıyla birlikte insanlar tarafından özellikle yaz aylarında yaygın olarak tüketilen yoğurt kaynaklı bir içecektir (Altay vd., 2013). Ayran Anadolu’da geleneksel olarak yoğurt, su ve tuzun karıştırılmasıyla elde edilmektedir. Ancak günümüzde, endüstriyel olarak *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterileri vasıtasıyla süt fermantasyonu gerçekleştirilerek üretilmektedir (Kabak ve Dobson, 2011).

Kıymız, kısrak sütünden elde edilen, Orta Asya’da tüketilen eski, hafif alkol içeren fermente bir içecektir (Ender vd., 2006; Kabak ve Dobson, 2011). Tüketime hazır halde olan kıymız içeceğinde, fermantasyon devam ettiği için, içerik değerleri stabil olmadığından sertlik derecesi fermantasyon süresince değişiklik arz etmektedir (Karaçıl ve Acar, 2013).

Kefir, ilk olarak Kafkasya dağlarında ortaya çıkan ve günümüzde çoğu Avrupa ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de tüketilen, hafif alkollü fermente süt içeceğidir (Liu ve Lin, 2000; Ender vd., 2006). Kefir süte, 0.3-2 cm veya daha büyük boyutlu,

iri kümeleri karnabahar parçalarına benzeyen kefir taneleri katılmasıyla fermente edilir (Wood, 2012; Ender vd., 2006).

Boza, Türkiye'nin geleneksel fermente ürünlerinden biri olup arpa, yulaf, çavdar, darı, mısır ve buğday gibi çeşitli tahılların fermantasyonu ile üretilmektedir. Tatlı-ekşimsi bir tada ve açık sarı renge sahip olan boza, besinsel değeri sebebiyle geleneksel fermente içecekler kategorisinde önemli bir yere sahiptir (Levent ve Cavuldak, 2016; Marsh vd., 2014).

Hardaliye, Türkiye'nin Trakya bölgesine özgü geleneksel bir içecek olup, ezilmiş kırmızı üzüm, ezilmiş hardal tohumu ve vişne yaprağı kullanılarak elde edilen fermente bir üründür. Hardaliye rengi, üzümlerin orijinal rengini yansıtır, karakteristik bir aromaya sahiptir ve Trakya bölgesinde eski zamanlardan beri üretilmekte ve tüketilmektedir (Gucer vd., 2009; Aydoğdu vd., 2014).

Şalgam suyu, Türkiye'ye özgü geleneksel kırmızı renkli, bulanık ve ekşi lezzete sahip fermente bir içecektir. Hammadde olarak bulgur unu, ekşi hamur, su, tuz, kara havuç ve şalgam turbu kullanılmaktadır (Üçok ve Tosun, 2012). Adana-Çukurova'dan gelen ancak tüm Türkiye'de, özellikle kebapların yanında sevilerek tüketilen bir üründür (Altay vd., 2013).



Şekil 1.1: Türkiye'ye Has Geleneksel Fermente İçecekler

A: Ayran, B: Kımız, C: Kefir, D: Boza, E: Şalgam suyu, F: Hardaliye

(Kaynak: <http://www.yasemin.com>, 2020; <https://www.turktoyu.com>, 2019; <http://www.selahattindonmez.com>, t.y; <https://www.birbes.com>, 2018; <http://www.kapca.com.tr>, t.y; <https://www.bitkicenter.com>, t.y.)

1.3. Şalgam Suyu

Geleneksel fermente edilmiş bir içecek olan şalgam suyu, kırmızı renkli, bulanık ve ekşi bir meşrubattır. Güney Türkiye'nin; Mersin, Kahramanmaraş ve özellikle Adana, İçel ve Hatay yörelerimizde; köylerde bireysel olarak ve endüstriyel şekilde üretilmekte ve yaygın olarak tüketilmekte olan serinletici bir içecektir. (Tanguler ve Erten, 2012; Özler ve Kılıç; 1996). Özellikle Adana'da çok fazla yaygın olmasının sebebi ise yöreye ait lezzetlerin, şalgam suyu ile bir uyum yakalaması ve tat anlamında birbirini tamamlaması olarak ifade edilmektedir (Ötleş ve Akçiçek, 2010). Şalgam suyu üretimi son yıllarda İstanbul, İzmir ve Ankara gibi illerimizde de gerçekleştirilmektedir (Bayram vd., 2014). Ayrıca şalgam suyunun günümüzde bazı Avrupa ülkelerinde pazarlarda satıldığı belirtilmektedir (Ağırman ve Erten, 2018). Kendine has bir lezzeti olan şalgam suyu, sindirim ve bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileri ile birlikte vücudun bazı minerallerden daha fazla istifade edilebilmesini sağlaması sebebiyle zamanla yöresel bir boyuttan çıkarak, çokça tüketilen bir içecek haline gelmiştir (Üçok ve Tosun, 2012; Canbaş ve Fenercioğlu, 1984). Bu fermente içeceğin ismi 'Şalgam Suyu' olmasına rağmen, başta maliyet

kaynaklı olarak ve her daim bulunamaması nedeniyle, üretiminde çoğunlukla şalgam kullanılmamaktadır (Ötleş ve Akçiçek, 2010). Şalgam suyu üretiminde hammadde olarak; bulgur unu, kara havuç, tuz, ekşi maya ve şalgam kullanılmakta olup şalgam suyunun morumsu kırmızı rengi, kara havuçta bulunan antosiyaninlerden gelmektedir (Kabak ve Dobson, 2011). Şalgam suyu kendine has rengini, kara havucun bileşiminde bulunan ve içeriğinin önemli bir kısmını oluşturan karotenoidler, klorojenik asitler ve antosiyaninlerden sağlamaktadır. Buna bağlı olarak sahip olduğu antioksidan potansiyeli sebebiyle, fermente bir içecek olmasının yanı sıra fonksiyonel bir içecek olarak da tanımlanmaktadır (Tanrıseven vd., 2018).

TS11149 şalgam suyu standardında “Şalgam suyu, bulgur unu, ekşi hamur, içme suyu ve yemeklik tuzun karıştırılıp laktik asit fermantasyonuna tabi tutulduktan sonra elde edilen özüte, kara havuç, şalgam ve istenirse acı toz biber ilave edilerek hazırlanan karışımın tekrar laktik asit fermantasyonuna tabi tutulması ile elde edilen ve istenildiğinde ısıtma işlemi ile dayanıklı hale getirilen bir ürün” olarak tanımlanmıştır (Anonim, 2003).

Şalgam suyunun tüm dünyada muadili olan ürünlere ise Kanji ve laktofermente havuç suyu örnek verilebilmektedir. Kanji, Hindistan'ın kuzey kesimlerinde, tuz, ezilmiş hardal ve kırmızı biber tozu ile siyah havucun doğal fermantasyonu ile elde edilmektedir. Laktofermente havuç suyu ise *Lactobacillus* suşları ile arzu edilen tat ve düşük pH oluşması amacıyla laktofermantasyona tabi tutulan bir ürün olarak ifade edilmektedir (Erten vd., 2008).

1.3.1. Şalgam Suyu Üretiminde Kullanılan Ham Maddeler

Şalgam suyu üretiminde, siyah havuç (mor havuç), şalgam, bulgur unu (tanenin %2–3'ü, ezme işlemi için haşlanmış kurutulmuş buğdayın dış kabuklarını kırıktan sonra elekte kalan kısımdır), maya, tuz ve su kullanılır, bununla birlikte bazı bölgelerde, şalgam üretiminde bu ham maddelere ek olarak kırmızı pancar da kullanılmaktadır (Coskun, 2017).

a) Şalgam

Brassicaceae familyasının *Brassica napus* L. türüne ait turp ailesinden olan şalgam, yumrusu ve tohumları için yetiştirilen bir tarım bitkisidir (Bilişli, 2013; Ötleş ve Akçiçek, 2010). Bu bitkiye ait adi ve yağ şalgamı olmak üzere iki alt tür bulunmaktadır. Adi şalgamın toprak altında meydana getirmiş olduğu etli yumrularından, sebze ve hayvan yemi olarak faydalanılmaktadır (Britannica, 1990). Şalgam suyunun üretiminde ise tat ve aromaya katkıda bulunarak, organoleptik özellikleri üzerinde etkili olmaktadır. (Canbaş ve Fenercioğlu, 1984). A, C ve B grubu vitaminlerince zengin olan şalgam, kalsiyum ve demir gibi mineralleri de ihtiva etmektedir (Oraman, 1968).

Şalgam ülkemizde özellikle iklimi soğuk olan Erzincan, Sivas ve Erzurum gibi bölgelerde yetiştirilir. Sivas'ta şifalı olarak bilinen şalgam bitkisi, romatizma hastalığında ağrıyan bölgelere dilimlenerek ve biber serpilerek bağlandığında etkili olduğu ifade edilmektedir (Canbaş ve Fenercioğlu, 1984; Üçer, 1984).

b) Kara Havuç

Apiaceae familyasına ait, bilimsel adı *Daucus carota* L. olan kara havuç, şalgam suyu üretiminde morumsu kırmızı rengi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Üçok ve Tosun, 2012; Agirman ve Erten, 2018). Ülkemizde nisan ve mayıs aylarında ekilip, eylül ve ekim aylarında hasat işlemi gerçekleştirilmekte ve muhafaza işlemi soğuk depolarda iyi bir şekilde sağlanarak yıl boyu kullanılabilir (Bilişli, 2013). Kara havuç iyi bir antosiyanin pigmenti kaynağıdır. Taze kara havuçta, antosiyonin içeriğinin 1750 mg kg⁻¹ olduğu bildirilmiştir (Kırca vd., 2005). Kara havuçta mevcut olan ana antosiyaninler; siyanidin glikoziti içermesinin yanı sıra malvidin ve peonidin glikozitlerini de ihtiva etmektedir (Bayram vd., 2014). Şalgam suyunun yüksek oranda ihtiva ettiği, kara havucun bileşiminde bulunan β-karotenin, kalp ve damar hastalıkları, katarakt ve bağışıklık sistemine faydaları, şalgam suyuna yararlı bir içecek vasfını kazandırmaktadır (Velioğlu, 2000). Şalgam suyunun toplam asitlik, kuru madde, kül, toplam fenol, toplam antosiyanin, renk yoğunluğu ve renk indisi değerlerinin, ilave edilen kara havuç miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir (Tanrıseven vd., 2018). Kara havuçta toplam şeker konsantrasyonu

5,12-6,45/100 g'dır. Türkiye'de yetiştirilen kara havucun ana çözümler fermente şekerleri; sükröz (1,2-3,31 g / 100 g), glikoz (1,1-5,6 g / 100 g) ve fruktozdur (1-4,36 g / 100 g) (Erten vd., 2008). Kara havuçta 142,3-159,6 g/kg arasında kuru madde, 7,0-13,8 g/kg arasında protein, mineral maddelerden demir, potasyum, fosfor, kalsiyum ve sodyum bulunmaktadır. Bunların yanı sıra içeriğinde p-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit gibi fenolik asitler yanında hidroksibenzoik asit türevlerine de rastlanmıştır (Okçu, 2011). Genel olarak şalgam suyu üretiminde kara havuç %10-20 oranında kullanılırken, uygun asitlik değerine ulaşması amacıyla bu oranın %15 ve üzeri olması beklenmektedir (Bilişli, 2013).

c) Bulgur ve bulgur unu

Bulgur unu, buğdayın (*Triticum aestivum* L.) kazanlarda kaynatılarak kurutulması ve dış kabuklarından ayrılarak kırma haline getirilmesi esnasında meydana gelen ve elek altında toplanan kısım olup, kırma haline getirilen buğday tanesinin %2-3 kısmını oluşturmaktadır. (Çankaya ve Tangüler, 2018; Canbaş ve Fenercioğlu, 1984). Bulgur unundaki toplam şeker ve nişasta miktarı sırasıyla 2,23-3,33 g/100 g ve 4,44-5,84 g/100 g arasında değişmektedir (Erten vd., 2008). Bununla birlikte kül miktarının 2,32-3,59 g/100 g, protein miktarının 12,4-17,6 g/100 g ve mineral maddelerin, demir 57,9-79,5 mg/kg, potasyum 2690-4550 mg/kg, kalsiyum 1395-1598 mg/kg ve sodyum 298-474 mg/kg şeklinde olduğu bildirilmiştir (Deryaoğlu, 1990). Bulgur unu, geleneksel ve direkt üretim yönteminde havuç fermantasyonu esnasında %3 oranında fermantasyona katılarak, mikroorganizmalar için besin kaynağı olmaktadır (Çankaya ve Tangüler, 2018; Bilişli, 2013).

d) Maya

Şalgam suyu üretiminde maya olarak ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) kullanılmakla birlikte genellikle ekşi hamur tercih edilmektedir. Üretim prosesinde; hamur bulgur ile yoğurulmasının ardından fermantasyona bırakılmaktadır (Bilişli, 2013; Tanrıseven vd., 2018). Melas gibi şekerli maddelerden elde edilen, *S. cerevisiae* türünün üst fermantasyon tipi kültür mayası olan ekmek mayası; preslenmiş, sıvı veya kuru formda elde edilmektedir (Üçok ve Tosun, 2012).

e) Tuz

Şalgam suyu üretiminde arıtılmamış kaya tuzu, patojen ve bozulma etmenine sahip mikroorganizmaların etkilerini önlemek, yani mikroorganizmaların kontrolünü sağlamak adına üretime katılmaktadır (Bilişli, 2013). Üretim prosesine bağlı değişiklik arz etmekle birlikte, şalgam suyundaki tuz miktarı 11.7-20.5 g/L aralığında değişim göstermektedir. Şalgam suyu, ihtiva ettiği maddelerden gelen sodyum miktarı haricinde, içerdiği tuz miktarına bağlı olarak 4.6-8.1 g/L oranında sodyum oranına sahiptir. Dolayısıyla, tüketim miktarına göre farklılık arz etse de, günlük diyetin içerisinde önemli bir sodyum kaynağı olduğu belirtilmektedir (Deryaoğlu, 2005).

f) Su

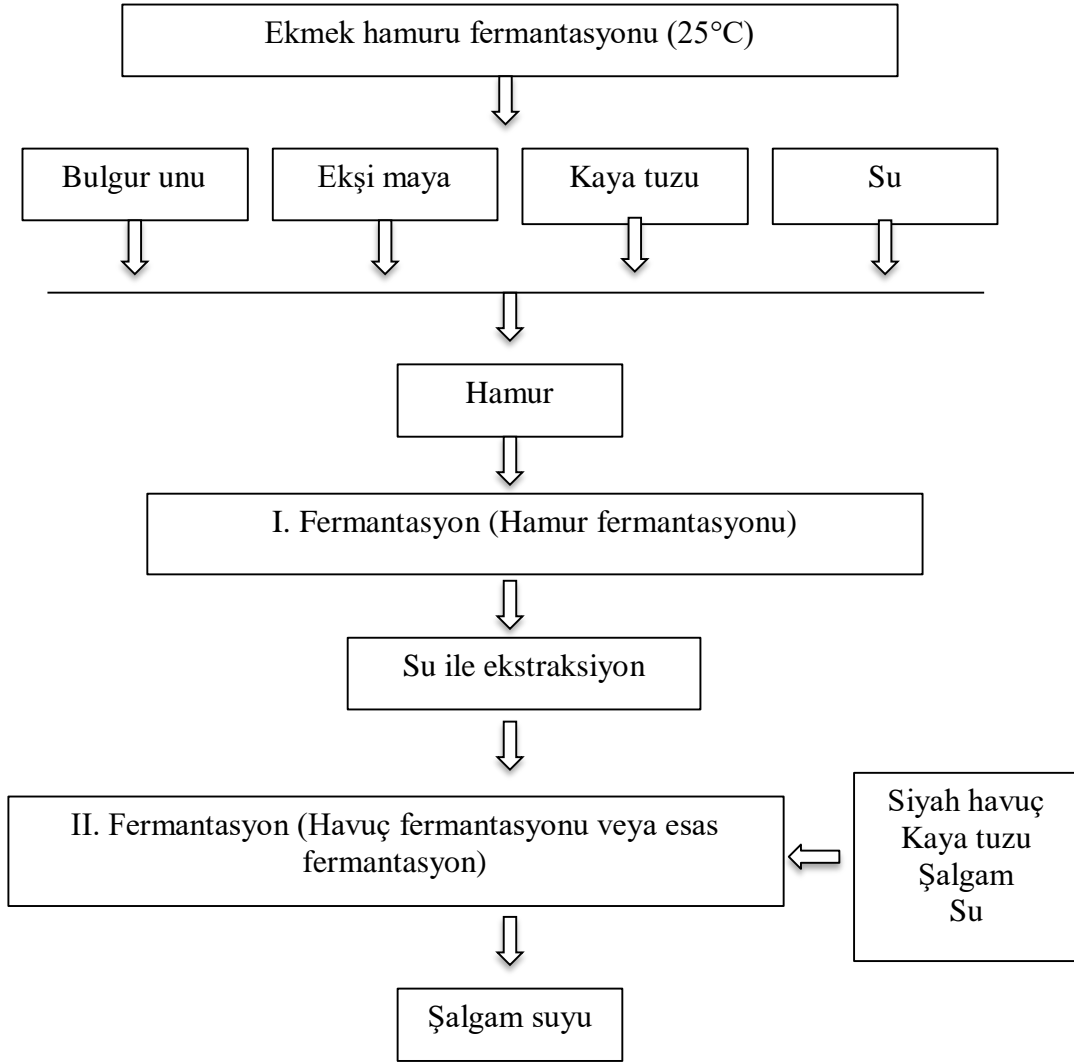
Şalgam suyu üretiminde su kaynağı olarak içme suyu kullanılmaktadır (Erten vd., 2008).

1.3.2. Şalgam Suyu Üretimi

Şalgam suyu ilk olarak ev ortamında üretilmiş olup içeriği, kişilerin damak zevkine ve kullanılan ham maddelerin miktar ve çeşitlerine göre geçmişten bugüne değişiklik gösterdiğinden, hem geleneksel hem de endüstriyel olarak net bir akım şemasına sahip değildir (Üçok ve Tosun, 2012). Şalgam suyunun iki farklı üretim yöntemi vardır. Bunlar, fermantasyonun iki aşamada gerçekleştirildiği geleneksel yöntem ve fermantasyonun tek aşamada sağlandığı hızlı (direkt veya doğrudan) yöntemdir (Tanrıseven vd., 2018).

a) Geleneksel yöntem ile şalgam suyu üretimi

Geleneksel şalgam hazırlama yöntemi Şekil 1.2’de gösterilmektedir.



(Tangüler, 2010; Çankaya ve Tangüler, 2018)

Şekil 1.2: Geleneksel Metotla Şalgam Suyu Üretimi

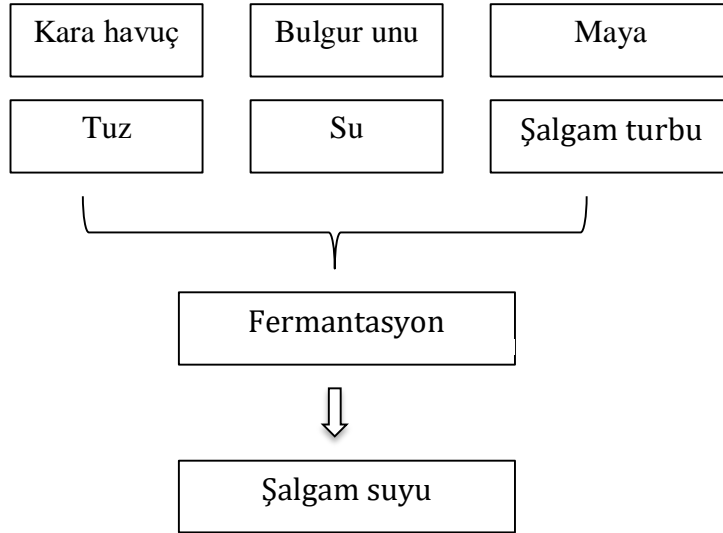
Geleneksel metot iki aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk fermantasyon yani hamur fermantasyonu olarak adlandırılan ilk aşama, bulgur unu (% 3), ekşi hamur (% 0,2) ve tuzun (% 0,2) su ile karıştırılmasını ve 3-5 gün boyunca oda sıcaklığında fermantasyona bırakılmasını içermektedir (Kabak ve Dobson, 2011). Eğer kış mevsiminde üretim gerçekleştiriliyor ise suyun ılık olması gerekmektedir (Canbaş ve Fenercioğlu, 1984). Fermantasyon sırasında laktik asit bakterileri ve mayalar görev almaktadırlar (Kabak ve Dobson, 2011). Bu ilk fermantasyon esnasında büyük ölçüde laktik asit bakterilerinin, daha düşük miktarlarda mayaların aktiviteleri

sonucunda asit miktarı artarak pH değerinde önemli bir düşüş görülmektedir (Coşkun, 2017). Fermantasyon esnasında hamurun kabarmasının ardından yüzeyinde çatlaklar meydana gelir, oluşan bu çatlaklar vesilesiyle ilk fermantasyonun gerçekleştiğine ve yeterli olduğuna kanaat getirilmektedir (Canbaş ve Fenercioğlu, 1984).

İkinci aşama havuç fermantasyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada bulgurunu ve ekşi maya ihtiva eden fermente hamur 3-5 defa gerekli miktarınca su ile kaptan kaba aktarılarak ekstrakte edilir (Okçu, 2011). Elde edilen ekstrakta yıkanmış, ayıklanmış ve doğranmış siyah havuç (%10-20), tuz (% 1-2) ve dilimlenmiş şalgam (% 1-2) ilave edilir. Geleneksel fermantasyon için genellikle ahşap kaplar; modern yöntemler için ise fiberglas, plastik veya paslanmaz çelik tanklar kullanılmaktadır (Erten vd., 2008). Fermantasyon esnasında şalgam suyunda arzu edilen renk maddeleri (antosiyeninler) havuçtan sıvıya geçerken, diğer yandan laktik asit bakterilerinin aktiviteleri ile asit oluşumu gözlenmektedir. Meydana gelen tüm olaylar vesilesi ile şalgam suyunun, kendine has ekşi lezzet, aroma ve rengini kazandığı gözlenmektedir (Say ve Ballı, 2012). 3-10 gün boyunca gerçekleştirilen ikinci fermantasyonun gidişatı asitlik tayini ile takip edilmektedir. Fermantasyonu son bulan şalgam suyu, uygun kaplarda filtre edilir. Şişeleme öncesi yüksek sıcaklık ve kısa süreli pastörizasyon işlemleri uygulanan şalgam suları, soğutma sıcaklığına kadar soğutulmaktadır. Ayrıca tüketici tercihinine bağlı olarak acı kırmızı toz biber bir lezzet verici madde olarak ilave edilebilir (Kabak ve Dobson, 2011; Tanrıseven vd., 2018).

b) Direkt yöntem ile şalgam suyu üretimi

Direkt yöntemde, geleneksel yöntemde gerçekleştirilen hamur fermantasyonu işlemi uygulanmamaktadır. Burada siyah havuç parçalara ayrılarak, tuz, dilimlenmiş şalgam, ekşi hamur ve su ham maddeleri kullanılır ve hepsi bir tank içerisine doldurularak karıştırılmasının ardından 10-35°C sıcaklıkta, 3-10 gün boyunca fermantasyona tabii tutulmaktadır (Bilişli, 2013). Fermantasyon nihayete erdiğinde tanklar içerisindeki sıvılar açık olarak veya hava almayacak şekilde şişe ve plastik kaplara doldurularak piyasaya verilmektedir (Say ve Ballı, 2012). Direkt yöntem Şekil 1.3'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmektedir.



Şekil 1.3: Direkt Metotla Şalgam Suyu Üretimi

(Tanrıseven vd., 2018)

Şalgam suyu üretiminde ticari ve geleneksel metotlara özgü standart bir yöntem yoktur ve şalgam fermantasyonu için kullanılacak kültürler ticari olarak mevcut olmadığından endüstriyel üretimde kullanılmayıp laboratuvar koşullarında, kontrollü üretim yapmak amacıyla kullanılmaktadır. Fermantasyonun kültür kullanılmadan, kontrolsüz bir şekilde gerçekleştirilmesi, şalgamın kalitesi ve stabilitesine olumlu etki sağlamasının yanı sıra, eğer kontrollü fermantasyon ile daha iyi bir ürün üretilmek isteniyorsa, başlangıç kültür seçimi oldukça önem arz etmektedir (Tangüler ve Erten, 2012). Şalgam suyu fermantasyonunda farklı bir seçenek olarak birtakım işletmeler, daha önce üretilmiş şalgam suyundan %15 oranında alınması ve üretime hazırlanan şalgam suyuna ilave edilmesi şeklinde üretim işlemini gerçekleştirmektedir (Tangüler, 2010). Özetle, piyasadaki ürünlerin çoğunda ürünün kalitesi ve stabilitesi açısından geleneksel üretim yapılmaktadır (Coskun, 2017).

1.3.3. Şalgam Suyunun Bileşimi ve Kimyasal Özellikleri

Şalgam suyu, sahip olduğu kendine has morumsu kırmızı rengini, kara havuçtan gelen antosiyenin pigmentlerinden sağlamakla birlikte içeriğinde çeşitli antosiyenin türlerini bulundurmaktadır (Ötleş ve Akçiçek, 2010). Mikroorganizmaları yok etmek veya çoğalmalarına engel olmak amacıyla antimikrobiyal olarak şalgam suyu üretiminde kullanılan benzoik asidin Türk Gıda Kodeksi Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği'ne göre şalgam suyuna en

fazla 200 mg/L ilave edilebileceği, ancak sorbik asidin ilave edilemeyeceği ifade edilmektedir (Anonim, 2011; Yentür ve Bayhan, 1990). Şalgam suyu kuru madde içeriği olarak değerlendirildiğinde; tuz, protein, organik asitler, mineral maddeler ve renk maddelerini içerdiği, bununla birlikte tuzun kuru maddenin yaklaşık %62'sini meydana getirdiği bilinmektedir (Ötleş ve Akçiçek, 2010). Canbaşı ve Fenercioğlu (1984), piyasada olan şalgam suları üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, yapmış oldukları analizler sonucu ortalama toplam asit miktarının 58 me/L, tuzun 15 g/L, kuru maddenin 28 g/L ve renk indisinin 60 olduğunu tespit etmişlerdir. Organik asitler, mineraller, karbonhidratlar ve tuz, şalgam suyunun suda çözünen maddelerini oluşturmaktadır. Şalgam suyu üretiminde kullanılan kara havuç, bulgur unu ve starter kültür miktarına göre kuru madde oranının değişebildiği ifade edilmektedir (Tanrıseven vd., 2018). Şalgam suyuna ait standart değerler Tablo 1.3'te belirtildiği gibidir.

Tablo 1.3: TS 11149 Standardına Göre Şalgam Suyu Değerleri

(Okçu, 2011; Çakır 2011)

| Şalgam Suyunun Bileşimi | Standart Değerler |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Toplam asitlik (g/L) | En düşük %6,0 g/L |
| Çözünür katı madde (kütle/kütle) | En düşük 2,5 (kütle/kütle) |
| pH | En düşük 3,3 – en yüksek 3,8 |
| Laktik asit | En düşük 4,5 g/L – en yüksek 5,5 g/L |
| Uçucu asit (Asetik asit cinsinden) | En düşük 0,7 g/L – en yüksek 1,2 g/L |
| Alkol | Belirtilmemiş |
| NaCl (%) | En yüksek %2 (kütle/kütle) |
| Kuru madde (g/L) | En düşük 25 g/L |
| Kül (g/L) | En fazla 15 g/L |
| Protein (g/L) | Belirtilmemiş |

| | |
|----------------------------------|----------------------|
| Antosiyanin (mg/L) | Belirtilmemiş |
| Karbondiyoksit (g/L) | Belirtilmemiş |
| Renk indeksi (D ₅₂₀) | Belirtilmemiş |
| Kimyasal koruyucu madde | En yüksek 0,5 g/L |
| Yapay boya maddesi | Bulunmamalı |
| Arsenik (As) | En yüksek 0,2 mg/kg |
| Bakır (Cu) | En yüksek 5,0 mg/kg |
| Çinko (Zn) | En yüksek 5,0 mg/kg |
| Demir (Fe) | En yüksek 15,0 mg/kg |
| Kalay (Sn) | En yüksek 200 mg/kg |
| Kurşun (Pb) | En yüksek 0,05 mg/kg |

1.3.4. Şalgam Suyunun Fonksiyonel Özellikleri

Bir gıdanın fonksiyonel gıda olarak kabul edilebilmesi için besleyici özelliğinin yanında, sağlığı iyi yönde etkileme ve hastalıkların meydana gelmesini önleme gibi sağlığa faydalı birtakım özelliklere sahip olması gerekmektedir (Fadhil ve Akın, 2016). Şalgam suyu son derece besleyici bir içecek olmasının yanında, sahip olduğu asitlik nedeni ile bu üründe patojenlerin gelişimi oldukça zordur, bu sebeple mikrobiyolojik anlamda da güvenli bir içecektir. Laktik asit, şalgam suyuna ekşi tadını vermesinin yanı sıra, sindirim sisteminin pH'ını düzenlemeye yardımcı olur. Şalgam suyunun laktik asit vesilesiyle sahip olduğu antiseptik ajanların, sindirim organlarını temizleme ve bağırsakları yatıştırma gibi etkilere sahip olduğu; hazmettirici ve iştah açıcı özelliklerinin bulunduğu bilinmektedir (Coskun, 2017; Canbaş ve Fenercioğlu, 1984). Şalgam suyu üretiminde oldukça fazla kullanılan kara havuç, içerdiği antosiyanin pigmentleri ile iyi bir renk verici olmasının yanında, coroner kalp hastalığı, kanser ve inme riskini azaltma gibi etkilere sahip olduğu

bilinmektedir (Kıca vd., 2006). Şalgam suyunun iyi bir besin kaynağı olması, aminoasitler, B ve C vitaminlerinin yanında potasyum, kalsiyum ve demir minerallerini içermesi sebebiyle kemik ve diş sağlığını da olumlu yönde etkilediği bilinmektedir (Say ve Ballı, 2012; Özler ve Kılıç, 1996). Şalgam suyu, idrar söktürücü, göğsü yumuşatıcı, böbrek taşları ve kumunun dökülmesi, ergenlikte oluşan sivilcelere, kan çıbanına, apseye, egzamaya ve dolamaya iyi gelmesinin yanı sıra, akciğerin ve bronşların temizlenmesi, toksinlerin vücuttan atılması gibi oldukça faydaları etkilere sahip olduğundan dolayı fonksiyonel gıda olarak kabul edilmektedir (Üçok ve Tosun, 2012). Toktas vd. (2018), yapmış oldukları çalışmada şalgam suyunun bileşiminde 16 adet fenolik bileşik tanımlamış ve bunlardan kafeik asidin en baskın bileşik olduğunu tespit etmişlerdir. Şalgam suyu üretiminde kullanılan kara havuç miktarının fenolik bileşik oranı ile doğru orantılı olduğu ve fermantasyon zamanına göre artış gösterdiği belirtilmektedir (Tanrıseven vd., 2018).

1.3.5. Şalgam Suyunun Mikrobiyolojik Özellikleri

Şalgam suyunda esas olarak laktik asit bakterileri önemli ölçüde rol oynarlar (Erten vd., 2008). Şalgam suyunun kalitesi, fermantasyonun mikrobiyal ekolojisine, özellikle de laktik asit bakterilerine bağlıdır (Tanguler vd., 2014). Şalgam suyunun fermantasyonu esnasında etanol, laktik asit ve muhtelif organik bileşiklerin üretilmesini sağlayan laktik asit bakterileri, aynı zamanda hammaddelerin bileşiminde bulunan maddelerin çözünmesini sağlayarak şalgam suyunun kendine has aroma ve tadını oluşturmaktadır (Tanrıseven vd., 2018). Erginkaya ve Hammes (1992), şalgam suyu üretiminde kullanılan ekşi mayanın mikroorganizma kaynağı sağlamakta olduğunu ve bunlardan bakterileri, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, mayaları ise: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis holmii*, *Pichia manshurica*, *Candida krusei* olarak tanımlandıklarını ifade etmektedirler. Şalgam suyu aynı zamanda *Lb. paracasei*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. pentosus*, *Lb. buchneri*, *Lb. helveticus*, *Lb. reuteri*, *S. cerevisiae*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* gibi probiyotik karakterde mikroorganizmaları içerdiği için probiyotik bir ürün olarak da kabul edilmektedir (Coskun, 2017).

a) Laktik asit bakterileri ve fermantasyonu

Laktobasiller meydana getirdikleri laktik asit vasıtasıyla pH değerini 3,5-3,2'ye düşürürler, laktik streptokoklar ise 4,5-4,3 aralığında bir değere düşürmektedirler; dolayısıyla laktobasiller, meydana getirdikleri daha fazla asitlik nedeniyle asitliğe, laktik streptokoklardan daha fazla dayanma gücü göstermektedirler (Yüksekdağ ve Beyathı, 2003). Laktik asit bakterilerinin bozulma mikroorganizmalarını ve gıda kaynaklı patojenleri; peptitler ve bakteriyosin metabolitleri, diasetil, asetoin, laktik ve asetik asit gibi organik asitler, alkol, CO₂, H₂O₂ metabolitleri ile inhibe ettiği, engellediği ifade edilmektedir (Dinçer vd, 2010; Çon ve Gökalp, 2000). Dolayısıyla laktik asit bakterileri, günümüzde tüketiciler tarafından kimyasal içermeyen, doğal ürünlere artan talep nedeniyle, sahip olduğu antimikrobiyal etki vasıtasıyla doğal bir koruyucu görevi gördüğünden üretim sahasında önemli bir yere sahiptir (Çon ve Gökalp, 2000).

Gıdaların ihtiva ettiği ve gıdalar ile bağlantılı olan laktik asit bakterilerinin, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Enterococcus* cinslerine ait türleri içerdiği yapılan araştırmalar sonucunda tespit edilmekle birlikte, son dönemlerde *Weissella* cinsinin gıda mikrobiyolojisinde oldukça önemli bir yer edindiği ifade edilmektedir (Stiles ve Holzapfel, 1997). Genellikle orijinal laktik asit bakterileri ile biyokimyasal ve fizyolojik bağlamda benzer özelliklere sahip olan *Bifidobacterium* cinsi, filogenetik olarak laktik asit bakterilerine yakın değildir, fakat taşıdığı benzer özellikler sebebi ile LAB kategorisinde yer almaktadır (Axelsson, 2004).

Prokaryotik, Gram (+), kok, basil veya kokobasil şeklinde, anaerobik veya mikroaerofilik, aside dayanıklı özellik gösteren, amonyum ya da glikoz haricinde birtakım vitamin ve aminoasitlere de gelişimleri için gereksinim duyan, karbonhidrat ve yüksek alkollerini fermente ederek laktik asit üreten laktik asit bakterileri; kimi zaman pseudo-katalaz olmalarının mukabilinde genel olarak katalaz (-), çoğunlukla hareketsiz ve sporsuz olarak bilinmektedirler (Tangüler, 2010). Solunum yapabilmeye yeteneğine sahip olmayan laktik asit bakterileri, karbonhidratların fosforilasyonu vasıtasıyla ATP üretmektedirler. Heksozların sahip olduğu metabolizmanın neticesinde; homofermentatif şekilde laktik asit meydana gelirken, heterofermentatif

durumda laktik asit ile birlikte CO₂, etanol ve asetik asit de üretilmektedir (Erkmen, 2011).

Laktik asit bakterilerinin farklı cinsler olarak sınıflandırılması; morfolojisine, glikoz fermantasyonuna, farklı sıcaklıklarda gelişmesine, üretilen laktik asidin konfigürasyonuna, yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme yeteneğine, asit veya alkali toleransına ve hepsinden önemlisi filogenetik pozisyonuna göre değişiklik arz etmektedir (Axelsson, 2004).

Sebze fermantasyonlarında bilhassa lahana, salatalık, muhtelif zeytin fermantasyonu ürünlerinin yanında, farklı sebzelerde endüstriyel olarak laktik asit fermantasyonu gerçekleştirilmektedir. Özellikle dünya çapında sofralık zeytin, ekonomik anlamda kıymetli ve talep gören fermente ürünlerden biri olmuştur (Okçu vd., 2011). Harris (1998), sebze fermantasyonları süresince etkisi gözlemlenen laktik asit bakterilerinin *Lb. brevis*, *Enterococcus faecalis*, *Lb. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. lactis*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. bavaricus* olduğundan; bunların yanında koliform bakteriler, mayalar ve mezofil aerob bakterilerin varlığından söz etmektedir. Sebze sularının fermantasyon işleminde starter kültür olarak en çok *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* kullanılmaktadır (Okçu, 2011). *Lactobacillus* cinsi içerisinde, ekonomik açıdan önem arz eden 30 alt tür tanımlanmıştır, bunlara *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* örnek olarak verilebilmektedir (Holzapfel ve Wood, 2014).

Heterofermentatif bir LAB olan ve bitkisel ürünlerin fermantasyon işlemini başlatma görevini üstlenen *Leu. mesenteroides*, fermantasyon esnasında meydana gelen asitlik artışı sebebiyle etkisini kaybeder ve yerine *Ped. pentosaceus*, *L. brevis*, *Lb. plantarum* bakterileri gelerek fermantasyon işlemi sağlanır. Yükselen asitlik sebebi ile *Ped. pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis*'in giderek etkisini kaybettiği ve yüksek asitliğe en dayanıklı, fermente sebze ürünlerinden ve şalgam suyundan en fazla izole edilen *Lactobacillus plantarum* aracılığı ile fermantasyonun devam ettirildiği ve sonlandığı gözlenmektedir (Üçok ve Tosun, 2012; Tanguler, 2010). Sebze ve meyve fermantasyonlarından izole edilen bazı laktik asit bakterileri Tablo 1.4'de görüldüğü gibidir.

Tablo 1.4: Sebze Ve Meyve Fermantasyonlarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterisi Türleri

(Tokatlı vd., 2012)

| Sebze ve Meyve | LAB |
|-----------------------|----------------------------------|
| Lahana | <i>L. paraplantarum</i> |
| | <i>L. brevis</i> |
| | <i>Pediococcus pentosaceus</i> |
| | <i>L. plantarum</i> |
| | <i>Leuconostoc citreum</i> |
| | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| Hıyar | <i>L. pentosus</i> |
| | <i>L. brevis</i> |
| | <i>L. plantarum</i> |
| | <i>Leuconostoc sp.</i> |
| | <i>Pediococcus sp.</i> |
| Patlıcan | <i>L. brevis</i> |
| | <i>L. fermentum</i> |
| | <i>L. pentosus</i> |
| | <i>L. plantarum</i> |
| Üzüm Şırası | <i>Oenococcus oeni</i> |
| | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| | <i>L. plantarum</i> |
| | <i>L. hilgardii</i> |
| Kapari | <i>L. brevis</i> |
| | <i>L. plantarum</i> |
| | <i>L. paraplantarum</i> |
| | <i>L. pentosus</i> |
| | <i>L. brevis</i> |
| <i>L. fermentum</i> | |

Şalgam suyu fermantasyonundan izole edilip tespit edilen baskın bakterilerin, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. brevis* ve *Lb. fermentum* olduğu ifade edilmesinin yanısıra *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Pe. pentosaceus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* bakterilerinin ise fermantasyon başlangıcında mevcut olduğu ancak fermantasyon son bulduğunda rastlanılmadığı ifade edilmektedir (Bircan ve Erten, 2018). Geleneksel yöntem kullanılarak üretimi gerçekleştirilen şalgam suyunun fermantasyonu esnasında baskın olan laktik asit bakterileri; *Lb. plantarum* subsp. *arabinosus*, *Lb. brevis* ve *Lb. paracasei* spp. *paracasei* olarak tespit edilmiştir (Tangüler, 2010).

Ekşi maya içeren ürünlerde 50'den fazla laktik asit bakterisi türü olduğu, özellikle de *Lactobacillus* cinsinin türlerini içerdiği yapılan son çalışmalar kapsamında tespit edilmiştir (Zhang ve Cai, 2014).

b) *Lactobacillus plantarum*

Tangüler (2010) yapmış olduğu çalışma neticesinde şalgam suyundan izole edilen ve tanımlanan en baskın laktik asit bakterisinin *Lb. plantarum* olduğunu ifade etmektedir.

Lactobacillus plantarum'un, laktoz, sükroz, glikoz ve fruktozun laktik aside dönüştürülmesi için kullanılan bakterilerden daha avantajlı olması; yalnızca yüksek dönüşüm oranına sahip şekerleri değil, bunların yanında bitkisel ürünlerin içinde mevcut olan pektin vb. çeşitli bileşikleri kullanabilme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Demir vd., 2006). Laktik asit bakterileri arasında bilinen en büyük genomlardan birine sahip olan *Lb. plantarum*, bazı süt ürünleri, et ve birçok sebze veya bitki fermantasyonu dahil olmak üzere çeşitli ürünlerde karşılaşılan bir türdür. *L. plantarum*'a insan ve hayvan gastrointestinal sisteminin doğal bir parçası olarak sıkça rastlanır. İnsan gastrointestinal sisteminde birkaç gün hayatta kalabilme yeteneği açısından umut vadeden bir probiyotiktir. Bu bağlamda *Lb. plantarum* 299v suşu probiyotik olarak pazarlanmaktadır (Andre vd., 2011; Kleerebezem vd., 2003). *Lactobacillus plantarum* çoğunlukla sosis, sucuk, salatalık turşusu ve silaj vb. fermente ürünlerin üretimi için başlangıç (starter) kültürü olarak kullanılmaktadır (Demir vd., 2006).

Lactobacillus plantarum grubu altı tür ve alttür içerir, bunlar: *L. paraplantarum*, *L. fabifermentans*, *L. xiangfangensis*, *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *L. pentosus*, *L. plantarum* subsp. *argentoratensis*. Bu gruplar metabolik özellikler açısından oldukça homojen özellik taşımaktadır (Zhang ve Cai, 2014).

1.4. Mikroorganizma Tanımlama Metotları

Mikrobiyolojik tanımlama yöntemleri geleneksel ve hızlı (moleküler) yöntemler olmak üzere iki yolla gerçekleştirilmektedir. Geleneksel yöntemlerde biyokimyasal testlerin ihtiyaç duyduğu süre oldukça fazla olmakla birlikte işgücü ve fazla miktarda

ayraç kullanımı gerekmektedir (Aras, 2011).

Spesifik mikrobiyal türlerin tanımlamasında kullanılan geleneksel yöntemler, organizmanın seçilmesiyle üretimini sağlayan birtakım özel kültür ortamlarına ekilmesi, gram boyama gibi fizyolojik özelliklerinin hedef alındığı boyama yöntemleri, morfolojik koloni özelliklerine bakılarak, farklı kültür ortamlarında üreme özellikleri ve organizmanın ürettiği veyahut tükettiği metabolit özelliklerine bakılmak vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir (Gürsoy ve Otlu, 2017).

Geleneksel yöntemler vasıtası ile mikroorganizmalar hakkında önemli bilgilere ulaşılmış, fakat günümüzde moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla birçok yanlış bilgi olduğu ve tespiti sağlanamamış mikroorganizmaların varlığı dikkat çekmiştir (Gürsoy ve Otlu, 2017). Bu yöntemlerin hata payı moleküler yöntemlere göre daha yüksek olmaktadır.

Moleküler yöntemler, gelişmiş teknolojinin sağladığı faydalarla birlikte bilimsel çalışmalarda bir çığır açmakta, kullanılan tekniklere her geçen gün yenisi eklenmektedir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). Moleküler yöntemler gıda, klinik ve çevresel numunelerde mevcut olan mikroorganizmaların sayımı, erken tanısı ve identifikasyon ile bunların metabolitlerinin izolasyonunda kullanılarak mikrobiyotanın birden fazla yönden araştırılmasına olanak sağlamaktadır (Aras, 2011; Gürsoy ve Otlu, 2017).

Moleküler yöntemler yüksek duyarlılıkta sonuçlar vermekle birlikte ucuz ve hızlı olmalıdır. Bu moleküler yöntemler şunlardır:

a) FT-IR (Fourier transform infrared) yöntemi ile mikroorganizmalar üzerinde yapılan sınıflandırma ve tanımlama çalışmaları Mariey vd. tarafından 2001'de bir makalede derlenmiştir.

b) MALDI-TOF MS (Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi) (Singhal vd., 2015).

c) REP-PCR (Tekrarlayan element sekansı temelli polimeraz zincir reaksiyonu) parmak izi yöntemi ile Gevers, Huys ve Swingd (2001) bir çeşit fermente sosisten izole edilen *Lactobacillus* türlerini tanımlamıştır.

d) PCR-RFLP (Restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi) ile Shokohi vd., (2010) kanser hastalarındaki *Candida* türlerini tanımlamıştır.

e) RAPD-PCR (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA – Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile Mohkam vd. 2016’da *Bacillus* izolatlarını tanımlamıştır.

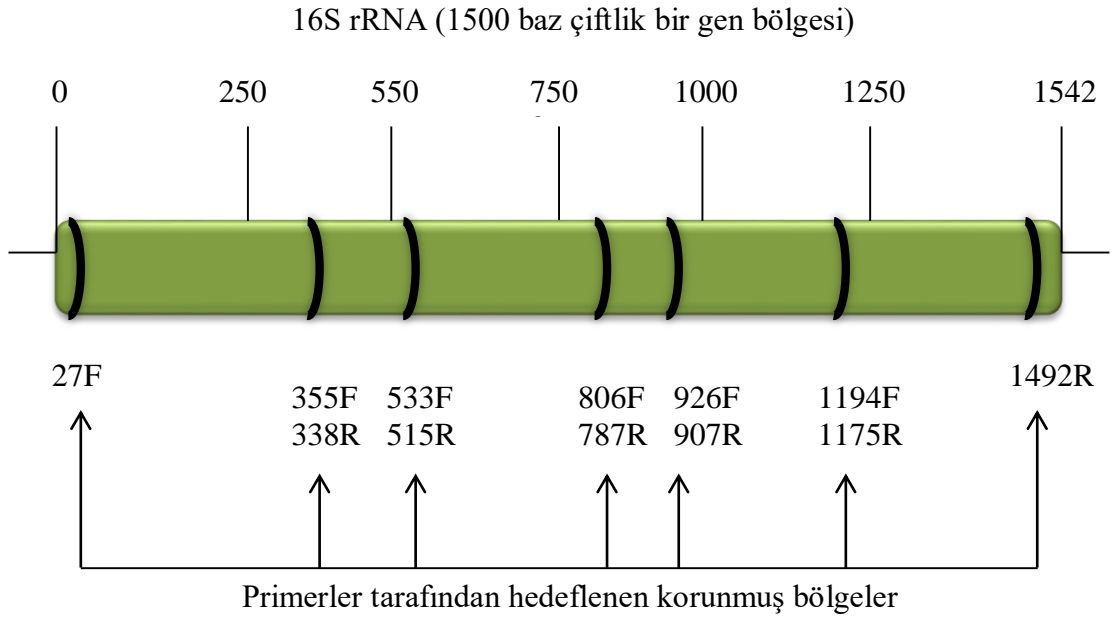
f) PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile Hong vd., (2014) tuzlu Çin lahanasındaki laktik asit bakterilerini tanımlamıştır.

e) Dizi Analizi Frederick Sanger tarafından 1977’de geliştirilmiş ve Sanger yöntemi adı altında kullanılmaktadır (Thieman ve Palladino, 2013).

1.4.1. Moleküler Barkodlama

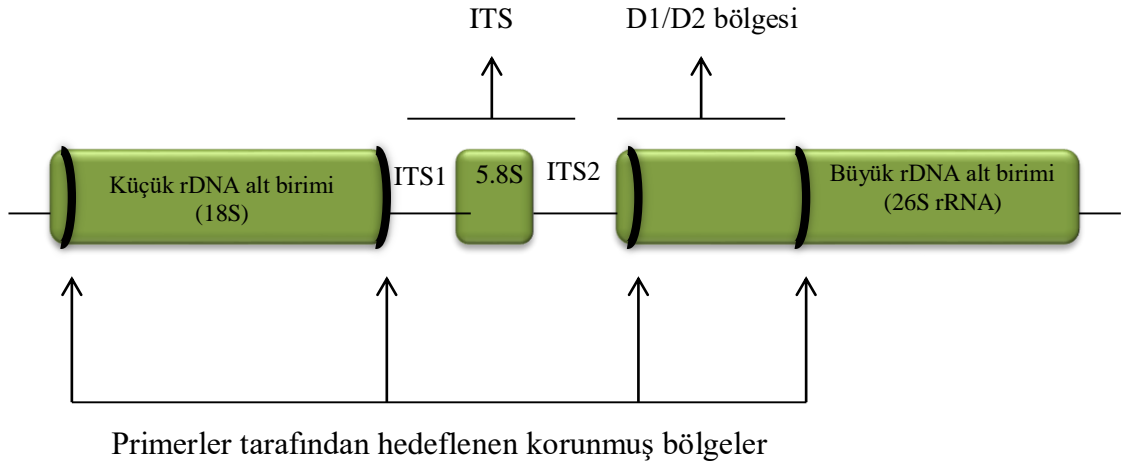
Tanımlama için bir genin kısa bir fragmanının amplifikasyonu ile DNA bazlı bir tanımlamayı sağlayan yöntem DNA barkodlama olarak adlandırılmaktadır (Sanchez vd., 2016). Teknolojik ilerlemeler vasıtasıyla genom düzeyinde, çok sayıda örnek için birkaç barkod geninin sekanslanması hızlı ve ucuz bir şekilde gerçekleştirilebilir (Blaxter, 2003). Seçilmiş spesifik bir DNA dizisi, bir organizmanın hem tanımlanması hem sınıflandırılması için kullanılabilir (Kaczmarek, Reid ve Moniz, 2017).

Bakterilerde ribozomal RNA (5S, 16S ve 23S) genleri içerisinde; korunmuş bölgelere sahip olduğu için PCR primerlerine en elverişli kombinasyonları oluşturabilen, değişken bölgeler içeren 16S rRNA geni, diğer iki rRNA genine göre filogenetik identifikasyon için daha fazla talep görmektedir. Bir bakteri hücresinin binlerce 16S rRNA kopyası içermesi sebebiyle, bu gen bölgesini temel alan yöntemlerin yüksek duyarlılığa sahip olduğu ifade edilmektedir (Gürsoy ve Otlu, 2017). Kusmiyati, Hidayat ve Fatchiyah (2014), Praet vd., (2015), Triana ve Nurhidayat (2019) ve Olofsson vd., (2014) yapmış oldukları çalışmalarda laktik asit bakterilerini 16S rRNA bölgesi ile tanımlamışlardır. Tüm bu çalışmalar LAB tanımlanmasında 16S rRNA bölgesinin sıkça kullanıldığını göstermektedir (Şekil 1.4). Tanımlama gerçekleştirilirken güvenilirlik esas alındığı için tanıya uygun genetik bölgelerin sekanslanması önem taşımaktadır. Bu doğrultuda bakterilerde 16S rDNA bölgeleri kullanılırken, mayalarda ise ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) ve 26S rDNA D1/D2 bölgeleri (Şekil 1.5) kullanılmaktadır (Deak, 2008).



Şekil 1.4: 16S rRNA (bir -1500-baz çifti geni)

(Reller, Weinstein ve Petti, 2007)



Şekil 1.5: 26S rRNA ITS Bölgeleri

(Reller, Weinstein ve Petti, 2007)

1.4.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

1980'li yıllarda Kary Mullis tarafından tanımlanan PCR (Polymerase Chain Reaction) canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonunun bir tüp içinde taklit edilmesi amacıyla nükleik asitlerin çoğaltılmasında görev alan enzimlerin işlevlerine göre farklı sıcaklıklar kullanılarak meydana getirilen bir dizi işlemler bütünüdür (Wassouf, 2014). Kısa bir süre dahilinde, bir DNA dizisinin çoğaltılması ve kopyalanmasını sağlayan PCR'ın temel ilkesi; çoğaltılması hedeflenen DNA, deoksiribonükleotidler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampon sıvı, DNA polimeraz ve bir primer çiftinin ince duvarlı bir tüpe ilave edilmesi ve reaksiyonun bir ısı döngüleyici içinde sıcaklık-zaman değişimleri ile gerçekleşmesine dayanmaktadır (Thieman ve Palladino, 2013). PCR'da replikasyon işleminin gerçekleşmesi için ilk adım denatürasyon olarak isimlendirilen, DNA zincirinin 90-95°C'de 1 dk süre ile birbirinden ayrılması şeklinde gerçekleşmektedir (Wassouf, 2014). İkinci aşama olan bağlanmada (annealing), zincirlerin ayrılması sonucunda tek iplik olarak kalan DNA dizilimlerinin 3' uçlarındaki nükleotidlere 50-70°C'de 30 saniye ile 1 dk arasında primer bağlanması gerçekleşir (Akdoğan, 2013). Son aşama olan uzama (extension) işleminde, sıcaklık 70-75°C'ye yükseltilerek, polimeraz enzimi vasıtasıyla primerlerin 3' ucuna nükleotidleri ekleyerek çift iplikli DNA zincirinin sentezlenmesi sağlanmaktadır (Thieman ve Palladino, 2013).

PCR analizinin gerçekleşmesinde görev alan materyaller aşağıda ifade edildiği gibidir.

Kalıp DNA: Çoğaltılacak olan hedef baz dizisine sahip, genetik materyaldir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 4 nükleotid de aynı oranda bulunmalı, primerler vasıtasıyla hedef bölgeye tutunarak DNA sentezlenmesinde görev alır (Kahya, Büyükcangaz ve Carlı, 2013).

Polimeraz enzimleri; primerlerin bağlanması için gerekli olan yüksek sıcaklığa dirençli olup *Thermus aquaticus*'tan elde edilir. Taq polimeraz enzimi, her denatürasyon döngüsünde yeniden enzim ilavesi gerektirmemesiyle en yaygın olarak kullanılan enzimdir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

Primer; Hedef DNA'ya özgü, 4-10 işaretlenmiş nükleotitten oluşan, sentez aşamasında DNA'yı çoğaltma görevi alan kısa ve tek zincirli DNA molekülleridir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

Tampon Çözelti: Çoğaltılacak hedef DNA, deoksiribonükleotidler, DNA polimeraz ve primerlerin ilave edildiği tüpün içerisinde PCR işleminin gerçekleşmesi için eklenen tampon sıvıdır (Thieman ve Palladino, 2013).

PCR işleminden sonra çoğaltılmış hedef DNA'lar jel elektroforez ile görüntülenir.

1.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez yöntemi uygun pH değerindeki tampon çözeltide aminoasitlerin, proteinlerin, nükleik asit ve nükleotidlerin, elektrik alan içerisinde, elektrik yüküne, molekül büyüklüğüne ve şekillerine göre göç ettirilerek ayrılmasında kullanılan bir tekniktir (Nenni, 2019). Bu metoda göre negatife yüklü DNA molekülü, zincire bağlanan kimyasallar yardımı ile görünür hale getirilerek, uygun bir destek sistem (jel, polimer) içerisinde ve elektrik akımı yardımıyla negatif kutuptan pozitif kutuba doğru hareket etmektedir (Aşıcıoğlu vd., 2002). Bu hareket mesafesi, DNA molekülünün büyüklüğü ile ters orantılıdır. Yani, molekül boyutu küçük ise mesafe daha uzun, büyük ise daha kısadır. Etidyum bromid ile boyanan DNA parçacıkları ultraviyole ışığın altında bant görünümleri verir ve λ DNA *HindIII* gibi markerlar ile bu bantların yaklaşık boyutları (baz çifti/bp) tespit edilebilmektedir (Thieman ve Palladino, 2013). Agaroz; *Gelidium* ve *Gracillaria* gibi deniz yosunu türlerinden elde edilen polimerlerden meydana getirilmektedir (Koç ve Boz, 2011).

1.4.4. Rep-PCR (Tekrarlayan element sekansı temelli polimeraz zincir reaksiyonu)

Bakteri DNA'sı içinde değişken sayıda sürekli tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda rep olarak isimlendirilen korunmuş palindromik yapıya sahip elementler bulunmaktadır (Akkaya, 2009). Versalovic vd., (1994) bakteriyel parmak izi için bu tekrarlanan DNA elementlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu neticesinde elde edilen özel bantları inceleyerek bir tiplendirme yöntemi geliştirmişlerdir. Tekrarlanan element sekansına dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (rep-PCR) parmak izi, bu elemanlar arasında bulunan farklı boyutlu DNA fragmanlarının amplifikasyonunu sağlamak için oligonükleotid PCR primerlerini

kullanarak serpiştirilmiş tekrarlanan bölgeleri tanımlayan bir genotipik tekniktir. Çok çeşitli Gram-negatif ve birkaç Gram-pozitif suşları sınıflandırmak ve tiplendirmek için değerli bir araç olduğu düşünülen rep-PCR tekniğinde kullanılan korunmuş tekrarlayan dizilerin örnekleri arasında BOX, ERIC, REP ve (GTG)₅ bulunmaktadır (Masco vd., 2003).

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Şalgam suyu üretiminde bulgur unu, ekşi maya, tuz, kara havuç ve şalgam kullanılmıştır. Kullanılan bulgur unu, yemeklik tuz ve ekmek hamuru Başakşehir'de (İstanbul) bulunan yerel bir satıcıdan, havuç ve şalgam ise Başak Pazar'dan 2018 yılının Eylül ayında temin edilmiştir.

Yapılan analizler esnasında kullanılan materyallerin listesi aşağıdaki gibidir.

Laboratuvar Malzemeleri:

- ✓ Kryo tüp (IsoLab, 2 ml, steril)
- ✓ Santrifüj tüp (IsoLab 1,5 ml, 2 ml)
- ✓ PCR tüp (IsoLab)
- ✓ Cam boncuk (NextAdvance Gp01)
- ✓ Pipet (Eppendorf (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Axygen (20-200 µl)
- ✓ Pipet ucu (Sarstedt 2-200 µl filtreli, IsoLab (10 µl, 200 µl, 1000 µl) filtresiz)
- ✓ Parafilm (Bemis)
- ✓ Petri kabı (IsoLab)

Besiyeri:

- ✓ PDA (Potato dextrose agar) (Biolife)
- ✓ MRS (de Man rogosa and sharpe) (Merck)
- ✓ M17 (Biolife)
- ✓ PCA (Plate count agar) (Biolife)

- ✓ Bakto maya ekstraktı (Sigma Aldrich)
- ✓ Baktopepton (Merk)
- ✓ VRBA (Violet red bile agar) (Merck)

Kitler:

- ✓ GeneJet PCR saflaştırma kiti (Thermo Scientific)

Kimyasal Malzeme:

- ✓ Agaroz (Sigma)
- ✓ Dekstroz (Sigma-Aldrich)
- ✓ Tris HCl
- ✓ EDTA
- ✓ NaCl (IsoLab)
- ✓ SDS (Merck)
- ✓ 50x TAE (Tris-EDTA-Asetik asit) (Bio-Rad)
- ✓ Ladder (100 bp, Gene Direx)
- ✓ λ /HindIII (0.5 μ g/ μ L, GeneDirex)
- ✓ İzopropanol (Sigma)

Enzim:

- ✓ Proteinaz K (Thermo Scientific)
- ✓ RNase A (Invitrogen)
- ✓ Dream Taq polimeraz (5 U/ μ L, Thermo Scientific)

Cihazlar:

- ✓ Cam elektrotlu pH metre (Hanna, HI 2211, ABD)
- ✓ Homojenizatör (Interscience, 400 P & BagMixer)
- ✓ Otoklav (Selecta)
- ✓ Vorteks (Scientific Industries Vortex-Genie2)
- ✓ Tissue Lyser (Qiagen)
- ✓ Çalkalayıcı (Thermo Shaker Incubator - Hangzhou Miu, MTH-100)
- ✓ Santrifüj (HITACHI, CR22N, Japonya)
- ✓ Santrifüj (BeckmanCoulter Microfuge 20R)
- ✓ Spektrofotometre (Biospec Nano - Shimadzu Biotech)
- ✓ Isı döngüleyici (PCR ThermalCycler - Bio-Rad, T100)

- ✓ Jel elektroforez (Bio-Rad, ReadySub-Cell GT, ABD)
- ✓ Hassas terazi (Radwag, AS 220.R2)
- ✓ Yatay elektroforez tankı (Major Science Mini-300)
- ✓ Jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad Gel Doc EZ Imager)

Primerler:

- ✓ GTG(5) (Macrogen)
- ✓ 27F (Medsantek)
- ✓ 1492R (Medsantek)
- ✓ NL1 (Macrogen)
- ✓ NL4 (Macrogen)

2.2. Metot



Şekil 2.1: Şalgam Suyunun Mikrobiyal Profilinin Tanımlama Safhaları

Şalgam suyunun mikrobiyal profilinin bulunması amacıyla önce geleneksel yöntemlerle şalgam suyu üretilmiş, üretim sürecinin belirli günlerinden alınan örneklere pH ve mikroorganizma takibi yapılmıştır. Ekimler neticesinde elde edilen laktik asit bakterileri ve mayaların moleküler yöntemlerle tanımlanması amacıyla DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, izolatlar rep-PCR ile gruplandırılmış ve her bir gruptan seçilen izolatlar bakteriler için 16S, mayalar için 26S PCR ürünleri dizilim analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen dizilimler gen bankası üzerinden benzerlik oranlarına göre karşılaştırılarak (BLAST), maya ve bakterilerin cins ve türleri tespit edilmiştir (Şekil 2.1).

2.2.1. Şalgam Suyu Üretimi

Erginkaya ve Hammes, (1992), Üçok ve Tosun, (2012), Özer ve Çoksöyler, (2015) tarafından yapılan çalışmalardan derlenerek hazırlanan şalgam suyu üretim prosedürü için ilk olarak temin edilen 200 g ekmek hamuru 30°C'lik etüvde 5-6 saat ekşitilmeye bırakılmıştır. Ardından iki ayrı büyük bidona 2 paralel olacak şekilde, her birine 1 kg bulgur unu, 100 g ekşi hamur ve 100 g tuz, içerisine su katılarak hamur haline getirilmiş ve ardından 10 litrelik plastik bidonlar içerisine konulmuş, bidonların ağzı tülbent ile kapatılarak 20°C'de 5 gün fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon esnasında hamur kabarmış ve bir süre sonra yüzeyde çatlaklar oluşmaya başladığı zaman fermantasyonun yeterli olduğu anlaşılmıştır. Ardından bidonlar ağzına kadar su ile doldurulmuş, karıştırılmış ve katı fazın çökmesi için bekletilerek ekstraksiyon ile sıvı kısım ayrılmıştır. Ekstraksiyon sonucu elde edilmiş 2 sıvının her birine ayrı ayrı 1,5 kg yıkanmış, kabuklarından arındırılmış ve dilimlenmiş kara havuç, 100 g tuz ve 200 g dilimlenmiş şalgam ilave edilmiştir. Son olarak örnekler İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarında, oda sıcaklığında (20-25°C) 10 gün fermantasyona bırakılmıştır. Hamur fermantasyonunun 5. günü ve havuç fermantasyonunun 3., 5., 7., ve 10. günlerinde her iki paralelden de örnek alınmış ve İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerekli analizler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu üretime ait akım şeması Şekil 2.2'de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.2: Şalgam Suyunun Geleneksel Yöntemlerle Üretimi

2.2.2. Numune Hazırlığı

Stomacher poşetinin içerisinde 90 ml fizyolojik su ile 10 g hamur örneği veya 90 mL distile su ile 10 mL şalgam suyu örneği konularak homojenizatör (Interscience, 400 P & BagMixer) ile homojenize edilmiştir.

2.2.3. Şalgam Suyunun pH Değerinin Belirlenmesi

Kalibre edildikten sonra örneklerin pH değeri, pH metre (Hanna, HI 2211, ABD) ile 2 tekrar halinde belirlenmiştir (Anonim, 2001).

2.2.4. Mikrobiyolojik Ekimler

Yapılmış olan analizlerde kullanılan besiyerlerinin, hazırlama esaslarına uygun şekilde hazırlanmasının ardından 121°C'de 15 dk otoklav işlemi ile (Selecta, Presoclave II, İngiltere) steril hâle getirilip bir süre soğutulmak üzere bekletilmiştir. Daha sonra aseptik koşullarda petrilere aktarılarak oda sıcaklığında katı bir kıvam alana kadar bekletilmiştir.

Dilüsyonlar aseptik koşullarda hazırlanmış olup 1 mL numunedan alınmış ve 9 mL distile su ile seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi tekrarlanarak 10^{-1} - 10^{-6} dilüsyonları elde edilmiştir. Seyreltmenin ardından her bir dilüsyondan 2 paralel olacak şekilde 0,1 mL alınmış ve yayma yöntemi ile petriye ekimi gerçekleştiriltilirip mikrobiyolojik analize tabii tutulmuştur.

Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımı yapılması amacıyla Plate Count Agar'da (PCA) (Biolife) ekim gerçekleştirilmiş, örnekler 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Tangüler, 2010). Laktik asit bakterilerinin sayımında ise MRS (De Man, Ragosa, Sharpe) (Merck) agarda petrilere anaerobik koşullarda 30°C'de 2-3 gün inkübasyonu sağlanmıştır (Agirman ve Erten, 2018). Koliform sayımı için Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck) kullanılarak petrilere 30°C'de 1 gün inkübasyona tabii tutulmuştur (Tangüler, 2010). Maya sayımı yapılması amacıyla da Potato Dextrose Agar'a (PDA) (Biolife) ekim yapılarak örnekler 25°C'de 5 gün inkübe edilmiştir (Çakır, 2011). MRS agarda gelişim gösteren laktik asit bakterileri haricindeki LAB'ları gözlemlemek amacıyla M17 agar (Biolife) kullanılmış ve

anaerobik ortamda 3-5 gün 30°C'de inkübasyona tabi tutulmuştur (Agirman ve Erten, 2018).

Saflaştırma işleminin gerçekleştirilmesi amacıyla mayalarda ve laktik asit bakterilerinde mikroorganizmanın karekökü kadar, görünüşü diğerlerinden farklılık arz eden koloniler seçilmiş, üç çizgi ekim ile tek koloniye düşürme yöntemi uygulanmıştır.

2.2.5. DNA İzolasyonu

Laktik asit bakterileri için DNA izolasyonu Martín-Platero ve arkadaşlarının kullanmış olduğu metot vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir (Martín-Platero vd., 2009). Maya örneklerinde DNA izolasyon işlemi ise litikaz yöntemi ile başlayıp ardından hücrelerin parçalanmasını sağlamak amacıyla cam boncuk yöntemi ile modifiye edilmiş ve devamında litikaz metodu ile sonlandırılmıştır (Müller vd., 1998; Van Burik vd., 1998). Kullanılan her iki yöntemin de ardından elde edilmiş olan nükleik asit konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla spektrofotometre (Shimadzu Biotech, Biospec Nano, ABD) cihazı kullanılmış olup analiz edilecek örnekten 2 µl koyularak her bir örneğin konsantrasyonu belirlenmiştir. Kör analiz için DNA örneklerinin içinde çözüldüğü çözücü kullanılmıştır.

a) Laktik asit bakterilerinde DNA izolasyonu

Hazırlama talimatına uygun olarak hazırlanan MRS Broth, M17 izolatlar için ise Nutrient Broth cam tüplere 10'ar mL doldurulup 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril hale ve ardından oda sıcaklığına getirilmiştir. Tek koloniye düşürülerek saflaştırılmış olan mikroorganizma, steril koşullar altında, steril öze ile alınmış, cam tüpte bulunan 10 mL sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen MSR Broth içindeki mikroorganizma örnekleri 30°C'lik etüvde 1 gün inkübe edilmiştir. Ardından 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj (Hitachi, CR22N, Japonya) edilmiş ve süpernatant dökülmüştür. Elde edilen pellet 1 mL 30 mM NaCl (IsoLab) - 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich) ile yıkanarak 5 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüjün edilmiş, süpernatant dökülmüştür. Geriye kalan pellet, 100 µL TES (25 mM Tris-HCl (pH:8), 10 mM EDTA, %10 Sükroz) Buffer, 100 µL lizozim (10 µg/µl) (Thermo Scientific) ve 1 µL RNase (40 mg/mL)

(Thermo Scientific) içerisinde çözülmesi sağlanarak pipet yardımı ile 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hazırlanan çözelti termomikserde (Hangzhou Miu, MTH-100) 37°C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 600 µL lizis buffer (100 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH:8), 10 mM NaCl, %1'lik SDS çözeltisi) ilave edilerek mikrosantrifüj tüpler, karışma işleminin gerçekleşmesi amacıyla alt üst edilmiştir. Tüpler yaklaşık 20-25°C'de yani oda sıcaklığında 15 dakika; sonrasında 10 µL proteinaz K (600 u/mL, 20mg/ml) (Thermo Scientific) eklenerek yeniden oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Termomikserde 80°C'de 5 dakika inkübasyon işlemine tabi tutulup tekrar oda sıcaklığında 10 dakika daha bekletilen örnekler, 200 µL 3 M sodyum asetat (pH: 5.2) (Sigma-Aldrich) eklenip tüplerin alt üst edilerek karıştırılması sağlanmıştır. Örnekler 15 dakika buzda bekletilerek 5 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj (BeckmanCoulter, Microfuge 20R) edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 600 µL alınarak başka bir tüpe aktarılmış, ardından üzerine 600 µL soğuk isopropanol eklenmiş, karışması amacıyla birkaç kez alt üst edilmiştir. Bu tüpler 5 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edilmesinin hemen ardından süpernatant dökülmüş, geriye kalan pellete 1 mL %70 etanol (Merck) çözeltisi eklenerek tüpler yatay vaziyette tutulup hafifçe sallanmış, pellet etanol çözeltisi ile yıkanmıştır. Örnekler 5 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edilmesinin ardından süpernatant dökülmüş ve yeniden 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek kalan süpernatantın pipet ile çekilip atılması sağlanmıştır. Tüpler eğik bir biçimde yaklaşık 10 dakika steril bir zemin üzerine bekletilerek içerisinde kalan alkol uçurulmuş ve pelletin 50 µL TE Buffer (Sigma-Aldrich)'da çözülmesi sağlanmıştır.

b) Mayalarda DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla hazırlama talimatına uygun olarak hazırlanan YPD Broth (10g/L Bacto yeast extract (Sigma-Aldrich), 20 g/L Bacto pepton (Merck), 20 g/L Dextrose (Sigma-Aldrich)), cam tüplere 10'ar mL doldurulup 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril hale getirilmesinin ardından oda sıcaklığına gelmesi beklenilmiştir. Ardından tek koloniye düşürülerek saflaştırılmış olan mikroorganizma, steril koşullar altında, steril öze ile alınmış olup cam tüpte bulunan 10 mL sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen YPD Broth 25°C'lik etüvde 5 gün inkübe edilerek gelişimi sağlanan mikroorganizmalar vortekslenip 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj işlemi 13.000

rpm'de 10 dk gerçekleştirilmiş, süpernatant dökülmüştür. Elde edilen pelletin üzerine 400 µL TEN (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) Buffer eklenmiş, çözülmesi sağlanarak 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Ardından çözeltinin üzerine yaklaşık olarak 200 mg cam boncuk ilave edilerek 50 Hz'de 2 dk. TissueLyser'da (Qiagen, LT, Almanya) sonra da 2 dk. buzda bekletilmesi sağlanmıştır. Bu işlemin 3 kez tekrarlanması ardından 10 µL proteinaz K, 100 µL %10 SDS (Merck) çözeltisi eklenerek vortekslenmiş, ardından elde edilen çözelti önceden 55°C'ye ısıtılan termomikserde (Hangzhou Miu, MTH-100) 60 dk. inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilen inkübasyon işleminin ardından tüplere 600 µL kloroform (Sigma-Aldrich) izoamil alkol (Sigma-Aldrich) (24:1) eklenerek 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj tüpünde 3 ayrı faz elde edilmiş, en üstte bulunan fazın (yaklaşık 600 µL) pipet yardımı ile ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılması sağlanmıştır. Ardından üzerine 600 µL buzda bekletilerek soğuması sağlanan izopropil alkol eklenmiştir. Karışması sağlanan çözeltiye 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant dökülerek üzerine 600 µL %70'lik etil alkol çözeltisi eklenmiş, pelletin alkol ile yıkanmasını sağlamak amacı ile tüp alt üst edilerek hafifçe sallanmıştır. Ardından 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş, süpernatant dökülmüştür. Son olarak tekrar 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş, kalan süpernatantın pipet yardımı ile çekilerek atılması sağlanmıştır. Tüpler eğik bir biçimde steril bir zemin üzerine konularak içerisinde kalan alkolün uçmasının ardından elde edilen pellet 100 µL saf suda çözülmüştür (Müller vd., 1998; Van Burik vd., 1998).

2.2.6. PCR

a) REP-PCR (GTG5) Analizi

DNA'da parmak izi analizi rep-PCR tekniği, Versalovic ve arkadaşlarının (1994), Masco (2003) ve Akkaya (2009) tarafından yapılan çalışmalarda belirtilen yöntem ile 25 µl hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR analizinde primer olarak ise GTG5 (Macrogen) (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') kullanılmıştır. DNA amplifikasyonu PCR Thermal Cycler'da (Bio-Rad, T 100, ABD); 2 µL dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (2,5 mM) (Thermo Scientific), 2 µL GTG5 primer (10 pmaol/ µL), 0,25 µL Dream Taq polimeraz (25µmol, 100mM) (Thermo Scientific), 2,5 µL 10x Dream

Buffer (Thermo Scientific), 16,75 µL distile su ve 1,5 µL DNA barındıran 25 µL PCR karışımı ile sağlanmıştır. PCR Thermal Cycler’da gerçekleşen döngünün koşulları Tablo 2.1’de ifade edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.1: Rep-PCR Koşulları

| PCR aşamaları | Sıcaklık | Süre |
|------------------|----------|-------|
| İlk denatürasyon | 95°C | 7 dk |
| Denatürasyon | 90°C | 30 sn |
| Yapışma | 40°C | 1 dk |
| Uzama | 65°C | 8 dk |
| Son uzama | 65°C | 16 dk |
| Döngü sayısı | 30 | |

b) Tanımlama PCR’ları

GTG5 rep-PCR analizi ile gruplandırma işlemi gerçekleştirilen laktik asit bakterilerinin ve mayaların tanımlanması amacıyla 25µL hacminde 16S PCR ve 26S PCR uygulanmıştır. Bakterilerin tanımlanması için kullanılan 16S PCR’da primer olarak 27F (Medsantek) ve 1492R (Medsantek) kullanılmıştır (Frank vd., 2008). Mayaların tanımlanması amacıyla kullanılan 26S PCR’da primer olarak ise NL1 (Macrogen) ve NL4 (Macrogen) kullanılmıştır (Marshall vd., 2003). PCR koşulları Tablo 2.2’de, kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 2.3, primerlerin dizilimleri Tablo 2.4’de, gösterilmiştir.

Tablo 2.2: 16S ve 26S PCR Koşulları

| PCR aşamaları | Sıcaklık | Süre |
|------------------|-----------------------|--------|
| İlk denatürasyon | 94°C | 1 dk |
| Denatürasyon | 94°C | 30 sn |
| Yapışma | 48°C (16S) 52°C (ITS) | 30 sn |
| Uzama | 72°C | 1,5 dk |
| Son uzama | 72°C | 10 dk |
| Döngü sayısı | 34 | |

Tablo 2.3: Tanımlama PCR’ında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

| Bileşenler | 25 µL karışım için kullanılan miktar |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 10xDream Buffer (20 mM) | 2,5 µL |
| dNTP (2,5 mM) | 2 µL |
| İleri Primer (10 µM) | 1 µL |
| Geri Primer (10 µM) | 1 µL |
| DNA | 1,5 µL |
| Dream Taq polimeraz (25µmol, 100mM) | 0,25 µL |
| dH ₂ O | 16,75 µL |

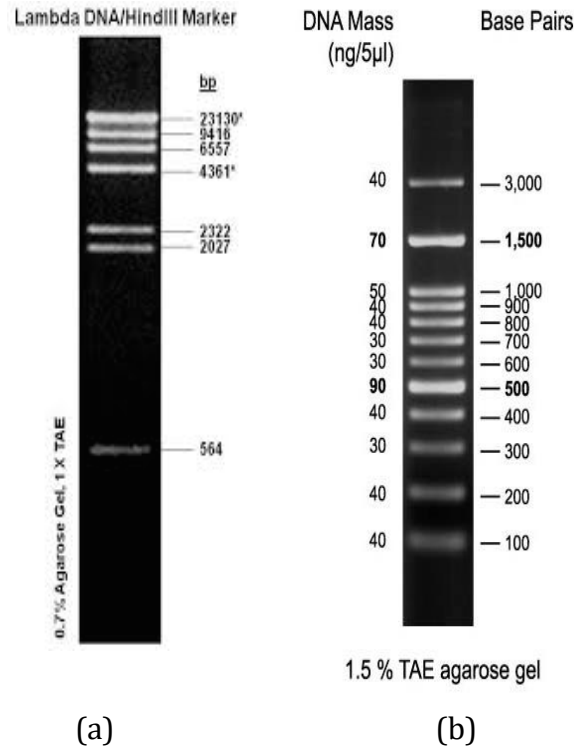
Tablo 2.4: Kullanılan İleri Ve Geri Primer Dizilimleri

| İleri Primer | Geri Primer |
|---|---|
| 16S PCR 27F (Medsantek) (5’AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3’) | 1492R (Medsantek) (5’TACCTTGTTACGACTT3’) |
| 26S PCR NL1 (Macrogen) (5’GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG’ 3) | NL4 (Macrogen) (5’GGTCCGTGTTTCAAGACGG’ 3) |

2.2.7. Agaroz Jel Elektrofrez

Rep-PCR vasıtası ile çoğaltılan DNA bölgelerinin boyutlarına göre ayrılması işlemi agaroz jel elektrofrezinde (Bio-Rad, ReadySub-Cell GT, ABD) gerçekleştirilmiştir (Lee vd. 2012; Helling, Goodman ve Boyer, 1974). Jelde yürütmenin gerçekleştirilmesi amacı ile rep-PCR için %1,5’luk, 16S ve 26S PCR için %0,8’lik agaroz (Sigma) jel kullanılmıştır (Cerit, 2003). Bu bağlamda agaroz hassas terazide 1,5 g tartılmasının ardından 50x TAE (Tris-EDTA- asetik asit) (Bio-Rad)’den seyreltilmesi ile hazırlanan 100 mL 1xTAE çözeltisi ilave edilmiştir. Elde edilen karışım mikrodalga fırında homojen hale gelene kadar (yaklaşık olarak 2 dak.) ısıtılmış, ardından 55-60°‘ye kadar soğutulmuş içine 5 µL nükleik asit boyası Safe-Red (Intron) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında bekleterek soğutulması sağlanan jel, elektrofrez kabına dökülerek kuyucukların oluşması amacıyla taraklar üzerine yerleştirilmiştir. Katılaşması için yaklaşık 25-30 dakika bekletilmesinin ardından

kuyucukları oluşan jel, yatay elektroforez tankına (Major Science Mini-300) alınarak 1x TAE çözeltisiyle doldurulmuştur. Parafilm üzerine PCR örneklerinden 10 µL, boyadan 2 µL olacak şekilde karışımlar hazırlanmış, her biri mikropipet yardımıyla kuyucuklara aktarılmıştır. DNA izolat bant boyları ve doğruluğunu tespit edebilmek adına jelin en baştaki kuyucuğuna markör olarak 1 µL λ/HindIII (0.5 µg/µL, GeneDirex), 1 µL 6x DNA Loading Dye (GeneDirex) ve 4 µL dH₂O karıştırılarak yüklenmiş, en son kuyucuğa ise Ladder'dan (100bp, Gene Direx) 6 µL olacak şekilde yüklenmiştir (Şekil 2.3). Yükleme işleminin gerçekleştirilmesinin ardından elektroforez güç tankına bağlanarak rep-PCR için 45 Volt'ta yaklaşık 4 saat, 16S ve 26S PCR'ları için 100 Voltta 45 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütülen jel, görüntüleme cihazında (Bio-Rad Gel Doc EZ Imager) Etidyum Bromid tablada görüntülenmiştir. Elde edilen bantlar gruplandırma işleminin gerçekleştirilmesi amacıyla markörler vasıtası ile incelenmiş, DNA izolatların her biri gruplandırılmıştır. GTG5 ile gruplandırılmış, ardından 16S ve 26S tanımlama PCR'ına tabi tutulan izolatlara, agaroz jel elektroforezinde agaroz miktarı %0,8 olacak şekilde jelde 100 Voltta 45 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir (Theiman ve Palladino, 2013; Sambrook, vd., 1989).



Şekil 2.3: %1,5 Agaroz Jelde Yürütülmüş (a) λ DNA HindIII Markör & (b) Ladder

2.2.8. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Jel yürütme işlemi sonucunda bant oluşumu gözlenen örnekler tespit edilmiş ve tanımlama işleminin gerçekleştirilmesi amacıyla, aynı koşullarda 50 µL PCR uygulanmış ve saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. PCR ürünlerinin saflaştırma işlemini gerçekleştirmek amacıyla GeneJet PCR saflaştırma kiti (Thermo Scientific) kullanım klavuzunda bulunan yönergeler doğrultusunda kullanılmıştır (Anonim, ThermoScientific, User guide, 2016). Her örnek başına toplamda 65 µL PCR ürünü 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmış, üzerlerine 65 µL kit içerisinde bulunan Binding Buffer ilave edilmiştir. Bu esnada sarı rengin gözlemlendiği örnekler 65 µL isopropanol (Sigma-Aldrich) ilavesi ile birkaç saniye vortex işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen karışım kit içerisinde bulunan kolonlara pipet yardımıyla aktararak 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı dökülmüştür. Yine kit içerisinde mevcut olan Wash Buffer'dan 700 µL pipet yardımıyla kolonlara ilave edilerek tekrardan 13.000 rpm'de 1 dk santrifüje tabi tutulmuştur. Altta kalan sıvı atıldıktan sonra 13.000 rpm'de 1 dk bu defa boş santrifüj yapılmış kolonlar yeni steril santrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve üzerlerine kit içinde mevcut olan Elution Buffer'dan 50 µL ilave edilerek 13.000 rpm'de 1 dk yeniden santrifüj edilmiştir. Ardından kolonlar atılarak tüplerin ağzı kapatılıp kalan sıvı -20°de muhafaza edilmek üzere kaldırılmıştır. Saflaştırma işleminin sonucunu görmek için elde edilen örnekler yeniden jelde yürütülmüştür. Bu defa örneklerden 5 µL alınarak 1 µL boya ile karıştırılıp jele yüklenmiş ve 80 – 95 voltta yaklaşık 45 – 60 dk yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Jel Etidyum bromid tablaya alınarak jel görüntüleme cihazında gözlemlenmiştir

2.2.9. Dizi Analizi

Bant gözlemlenen saflaştırma ürünlerinden dizilim analizine gönderilmek üzere 20 µL ve kullanılan PCR primerlerinden de her örnek için 2 µL ayrı ayrı steril tüplere aktarılmıştır. Sekanslama işlemi MedSantek firmasında gerçekleştirilmiştir. Sanger Sekans yöntemiyle sekanslama yapılan örneklerin kromatogramları CLC Main Workbench 8 programı yardımıyla görüntülenerek DNA dizilimleri BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerlik programında karşılaştırılmıştır (Armani vd, 2015). %100 benzerlik gözlemlenemeyen suşlarda tip suş dizilimleri Clustal Omega (<http://www.clustal.org>) programında karşılaştırılarak en benzer sonuç veren suşlar kabul edilmiştir.

2.2.10. İstatistiksel Analizler

Yapılan analizler neticesinde elde edilen veriler, JMP 14.1 programı kullanılarak sonuçlar arasında farkın bulunup bulunmadığı tek yönlü varyans analizi vasıtasıyla test edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık, %95 güven aralığında ($p < 0,05$), Tukey-Kramer HSD testi ile belirlenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Şalgam Örneklerinin pH Değerleri

Hamur fermantasyonunun 5. günü, havuç fermantasyonunun 3., 5., 7., 10., günü değerleri Tablo 3.1’de belirtildiği gibidir. pH değerlerinin fermantasyon süresince giderek düştüğü gözlemlenmiştir. Özler ve Kılıç (1996) farklı yöntemlerle üretilen şalgam örnekleri üzerine yaptıkları analizlerde pH değerlerinin 3,34 ile 3,37 arasında değiştiğini görmüşlerdir. Bir başka çalışmada ise Canbaş ve Fenercioğlu (1984) şalgam sularının pH değerlerinin 3,50 ile 3,78 arasında değiştiği sonucuna ulaşmışlardır. Canbaş ve Deryaoğlu, (1993) fermantasyonunu tamamlamış bir şalgam suyunun pH’ının 3.33-3.67 arasında olduğunu belirtmiştir. Erginkaya ve Turhan (2016) yapmış oldukları çalışmada, hamur fermantasyonunun son gününde pH’ın 3,90, şalgam suyu fermantasyonunun 8. gününde ise pH değerinin 3,26 olduğunu tespit etmişlerdir. Tangüler (2010) farklı işletmelerden temin ettiği şalgam sularının başlangıçta pH değerlerinin 2,76-6,86 aralığında, fermantasyon sona erip satışa hazır hale gelen şalgam sularının pH değerinin ise 3,28-3,48 aralığında olduğunu ifade etmiştir. TSE ise satışa hazır şalgam suyunun pH değerinin 3.3-3.8 arasında olması gerektiğini belirtmiştir (Anonim, 2003). Şalgam suyunun ortalama fermantasyon süreci bitişini 7. gün olarak baz alırsak, tespit edilmiş olan 3,55(±0,01) - 3,56(±0,01) pH değer aralığı hem yapılan çalışmalarla hem de TSE’nin belirlemiş olduğu standartlarla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Fermantasyonun 10. gününde meydana gelen yıkım reaksiyonları sebebiyle laktik asit açığa çıktığından pH’da giderek bir düşüş yaşandığı düşünülmüştür. Şalgam suyunun hem fermantasyon sürecindeki değişimleri hem de iki şalgam suyu örneğinin arasındaki istatistiksel

veriler göz önünde bulundurulduğunda aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Hamur ve Şalgam Suyunun Fermantasyon Sürecindeki pH Değerleri

| pH | | |
|---------|--------------------------|-------------------------|
| | Şalgam A | Şalgam B |
| Hamur | 3,98±0,005 ^{Aa} | |
| 3. Gün | 3,73±0,00 ^{Ba} | 3,70±0,00 ^{Ba} |
| 5. Gün | 3,66±0,01 ^{Ba} | 3,63±0,01 ^{Ca} |
| 7. Gün | 3,55±0,01 ^{Ca} | 3,56±0,01 ^{Da} |
| 10. Gün | 3,28±0,01 ^{Da} | 3,23±0,01 ^{Ea} |

($p<0,05$)

Büyük harfler farklı fermantasyon günlerinin, küçük harfler ise iki şalgam suyu örneğinin karşılaştırmasını göstermektedir.

3.2. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Şalgam suyu üretiminde üretimin ilk safhası olan hamur fermantasyonu işleminde kullanılan hamurun bakteri sayımı değerleri Tablo 3.2’de gösterildiği gibidir. Hamurun mikrobiyal profilinin belirlenmesi amacıyla TMAB için PCA, LAB sayımı için MRS ve M17, maya sayımı yapmak üzere PDA ve koliform tespiti için VRBA besiyerlerine ekim yapılmıştır. Hamurda hiç koliform bakteri gözlemlenmemekle birlikte, en düşük değer LAB (MRS) 6,57(±0,02) log kob/g ve en yüksek değer M17’de gelişen bakteriler 7,44(±0,01) log kob/g olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Hamur Örneğinde Mikroorganizma Sayımı (log kob/g)

| Mikrobiyal yük (log kob/g) | |
|----------------------------|-----------|
| TMAB | 7,34±0,08 |
| LAB (MRS) | 6,57±0,02 |
| M17’de gelişen bakteriler | 7,44±0,01 |
| Maya | 6,91±0,02 |
| Koliform | 0±0 |

Her iki şalgam suyu örneğinin fermantasyon sürecindeki laktik asit bakterilerini tespit etmek amacıyla MRS besiyerine ekim yapılmıştır. Bu doğrultuda Şalgam A örneğindeki en düşük değerin 10. günde $7,81(\pm 0,0)$ log kob/mL olduğu ve en yüksek değerin 5. günde $7,88(\pm 0,01)$ log kob/mL olduğu gözlemlenmiştir. Fakat istatistiksel olarak örnekler arasında bir fark bulunmamıştır (Tablo 3.3). Şalgam B örneğinde ise 3. ve 5. gün değerleri ($7,93(\pm 0,02)$ ve $8,04(\pm 0,06)$), 7. Ve 10. gün değerlerinden ($7,89(\pm 0,04)$ ve $7,68(\pm 0,02)$) daha yüksek bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler neticesinde iki şalgam suyu arasında bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Şalgam Örneklerinde LAB Sayımı (log kob/mL)

| LAB (MRS) (log kob/mL) | | |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| | Şalgam A | Şalgam B |
| 3. gün | $7,83\pm 0,00^{Aa}$ | $7,93\pm 0,02^{Aa}$ |
| 5. gün | $7,88\pm 0,01^{Aa}$ | $8,04\pm 0,06^{Aa}$ |
| 7. gün | $7,80\pm 0,00^{Aa}$ | $7,89\pm 0,04^{ABa}$ |
| 10. gün | $7,81\pm 0,04^{Aa}$ | $7,68\pm 0,02^{Ba}$ |

Büyük harfler farklı fermantasyon günlerinin, küçük harfler ise iki şalgam suyu örneğinin karşılaştırmasını göstermektedir.

Şalgam A ve Şalgam B örneklerinde fermantasyon sürecindeki laktik streptokokların daha detaylı analizi için M17 besiyerine ekim yapılmıştır. Şalgam A örneğinde en düşük bakteri sayısının 3. günde $7,08(\pm 0,90)$ log kob/mL ve en yüksek 10. günde $7,89(\pm 0,00)$ log kob/mL olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.4). Şalgam B örneğinde ise en düşük değerin $7,085(\pm 0,9)$ log kob/mL ve en yüksek değerin 7. günde $7,89(\pm 0,01)$ log kob/mL olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber her iki paralel için de 5., 7. ve 10. günler arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamaktadır. İki şalgam suyu örneğinde M17’de gelişen bakteri sayıları istatistiksel olarak ele alındığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlenmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 3.4: Şalgam Örneklerinde M17’de Gelişen Bakterilerin Sayısı (log kob/mL)

| M17 besiyeri ile saptanan bakteri sayısı (log kob/mL) | | |
|---|-------------------------|-------------------------|
| | Şalgam A | Şalgam B |
| 3. gün | 7,08±0,90 ^{Ca} | 7,08±0,90 ^{Ca} |
| 5. gün | 7,77±0,03 ^{Aa} | 7,77±0,03 ^{Aa} |
| 7. gün | 7,80±0,05 ^{Aa} | 7,89±0,01 ^{Aa} |
| 10. gün | 7,89±0,00 ^{Aa} | 7,81±0,05 ^{Aa} |

Büyük harfler farklı fermantasyon günlerinin, küçük harfler ise iki şalgam suyu örneğinin karşılaştırmasını göstermektedir.

Şalgam suyu örneklerinin fermantasyon sürecindeki maya sayısının tespit edilmesi için PDA besiyerine ekim yapılmıştır. Şalgam A örneğinde en yüksek maya sayısına 5. günde rastlanmıştır (6,24±0,00), diğer günler arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Şalgam B örneğinin en düşük 10. günde 5,84(±0,02) log kob/mL ve en yüksek değerinin 3. günde 6,24(±0,00) log kob/mL olduğu gözlenmektedir. Günler arasında istatistiksel olarak fark bulunduğu görülmektedir. Her iki şalgam arasındaki maya sayımı farkına bakıldığında anlamlı bir fark olmadığı (p<0,05) görülmektedir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: Şalgam Örneklerinde Maya Sayımı (log kob/mL)

| Maya sayısı (log kob/mL) | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Şalgam A | Şalgam B |
| 3. gün | 5,78±0,26 ^{Ba} | 5,92±0,15 ^{BCa} |
| 5. gün | 6,24±0,00 ^{ABa} | 6,24±0,00 ^{Ba} |
| 7. gün | 5,92±0,00 ^{Ba} | 5,92±0,00 ^{BCa} |
| 10. gün | 5,84±0,02 ^{Ba} | 5,84±0,02 ^{Ca} |

Büyük harfler farklı fermantasyon günlerinin, küçük harfler ise iki şalgam suyu örneğinin karşılaştırmasını göstermektedir.

Şalgam suyunun fermantasyon sürecindeki TMAB sayısını tespit etmek amacıyla PCA besiyerine ekim yapılmıştır. Yapılan ekim sonucu elde edilen bakteri sayımları Şalgam A örneğinde en düşük 7. ve 10. günde $7,90(\pm 0,02)$ ve $7,92(\pm 0,01)$ log kob/mL ve en yüksek 5. günde $8,35(\pm 0,07)$ log kob/mL olduğu görülmektedir. Şalgam B örneğinde ise 3. ve 5. gün değerleri ($8,39(\pm 0,01)$ ve $8,33(\pm 0,12)$) en yüksek, 10. gün değeri ($7,71(\pm 0,00)$) en düşük bulunmuştur. İki şalgam suyu örneği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmektedir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6: Şalgam Örneklerinde TMAB Sayımı (log kob/mL)

| | TMAB (log kob/mL) | |
|---------|-----------------------|-----------------------|
| | Şalgam A | Şalgam B |
| 3. gün | $8,17 \pm 0,02^{ABa}$ | $8,39 \pm 0,01^{Aa}$ |
| 5. gün | $8,35 \pm 0,07^{Aa}$ | $8,33 \pm 0,12^{Aa}$ |
| 7. gün | $7,90 \pm 0,02^{Ba}$ | $8,05 \pm 0,10^{ABa}$ |
| 10. gün | $7,92 \pm 0,01^{Ba}$ | $7,71 \pm 0,00^{BCa}$ |

Büyük harfler farklı fermantasyon günlerinin, küçük harfler ise iki şalgam suyu örneğinin karşılaştırmasını göstermektedir.

Şalgam suyu fermantasyon sürecindeki koliform sayımı için VRBA besiyeri kullanılmıştır. Bu doğrultuda Şalgam A ve B örneklerinin 3. günü haricindeki fermantasyon süreçlerinde koliform gözlemlenmemiştir. İstatistiksel olarak örnekler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bu durumun fermantasyonun asitlik değerinin gün geçtikçe düşüş göstermesinden ve koliform varlığının bu asitlik değerlerinde gözlenememesinden kaynaklandığı ifade edilebilir (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: Şalgam Örneklerinde Koliform Sayımı (log kob/mL)

| Koliform sayısı (log kob/mL) | | |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Şalgam A | Şalgam B |
| 3. gün | 4,53±0,06 ^{Aa} | 4,73±0,26 ^{Aa} |
| 5. gün | 0±0 ^{Ba} | 0±0 ^{Ba} |
| 7. gün | 0±0 ^{Ba} | 0±0 ^{Ba} |
| 10. gün | 0±0 ^{Ba} | 0±0 ^{Ba} |

Büyük harfler farklı fermantasyon günlerinin, küçük harfler ise iki şalgam suyu örneğinin karşılaştırmasını göstermektedir.

Erginkaya ve Turhan (2016) şalgam suyu fermantasyonunun sonunda laktik asit bakterilerinin 8,13 log kob/mL, mayanın ise 7,46 log kob/mL'ye ulaştığını ifade etmiştir.

Utuş (2008) şalgam suyu fermantasyonunun bitiminde LAB sayısını 7,49 log kob/mL; Güneş (2008) 8,95 log kob/mL olarak tespit etmiştir.

Agirman ve Erten (2018) tarafından yapılan çalışmada fermantasyonun başında LAB, TMAB, toplam maya, *Saccharomyces* olmayan maya ve koliform bakteri sayılarının sırayla 8,45 - 8,73 log kob/mL, 8,34 - 8,63 log kob/mL, 8,33 - 8,56 log kob/mL, 6,45 - 6,80 log kob/mL, 3,45 - 4,52 log kob/mL olduğu bildirilmiştir. Mikroorganizma sayısının, hamur fermantasyonu esnasında arttığı ifade edilmiştir. Fermantasyon sonunda çalışmada LAB, TMAB, toplam maya ve *Saccharomyces* olmayan maya ve koliform bakteri sayıları 10,27 - 10,50 log kob/mL, 9,97 - 10,18 log kob/mL, 9,70 - 9,90 log kob/mL, 9,35 - 9,77 log kob/mL, ve 4,24 - 5,00 log kob/mL olarak belirtilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde mikrobiyal sayılardaki hızlı artışın, hamur fermantasyonunun ana maddesi olan setikteki yüksek besin içeriği ve mikroorganizmaların fermantasyon ortamına hızlı adaptasyonundan kaynaklandığı ifade edilmektedir.

Tangüler ve Erten (2012) ticari olarak üretimi sağlanan şalgam sularından yapmış oldukları bakteri sayımı neticesinde laktik asit bakterilerini 6,97 log kob/mL, mezofilik aerobik bakterileri 6,72 log kob/mL, mayaları 5,64 log kob/mL,

Saccharomyces olmayan mayaları ise 4,47 log kob/mL ve koliform bakterileri ise 1,49 log kob/mL olarak tespit etmişlerdir.

Tangüler, Saris ve Erten (2015) mikroorganizma sayımları sonucunda laktik asit bakterilerini 7.43-7.74 log kob/mL, toplam mezofilik aerobik bakteri sayısını 7.03-7.46 log kob/mL, maya sayısını 6.96-7.50 log kob/mL ve *Saccharomyces* olmayan mayaların sayısını ise 4.21 - 5.19 log kob/mL olarak tespit etmişlerdir.

Çakır (2011) yüksek lisans tezinde şalgam suyu örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri sayısını $3,0 \times 10^3$ - $8,86 \times 10^6$ kob/mL olarak bulmuştur. Arıcı (2004) ise yapmış olduğu çalışmada toplam mezofilik aerobik bakteri sayısını $8,0 \times 10^5$ - $6,1 \times 10^7$ kob/mL arasında bulmuştur. Çakır (2011) yapmış olduğu analizler neticesinde koliform bakteri sayısını 10 kob/mL'nin altında tespit etmiş yahut hiç gözlemlememiştir.

Bu çalışmada laktik asit bakterilerinin sayısı fermantasyonun sonunda 7,80 - 7,89 log kob/mL olarak bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda laktik asit bakterileri sayısı en yüksek 10,50 log kob/mL (Agirman ve Erten, 2018) ile en düşük 6,97 log kob/mL (Tangüler ve Erten, 2012) arasında bulunmuştur. Bu doğrultuda elde ettiğimiz verinin diğer çalışmalarla benzerlik arz ettiği görülmektedir.

Yapılan bu çalışma neticesinde TMAB sayısı 7,90- 8,05 log kob/mL olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalarda ise TMAB sayısı 10,18 log kob/mL (Agirman ve Erten, 2018) ve 6,72 log kob/mL (Tangüler ve Erten, 2012) aralığında bulunmuştur. Bu bağlamda elde ettiğimiz verinin yapılan diğer çalışmalarla benzerlik arz ettiği gözlenmektedir.

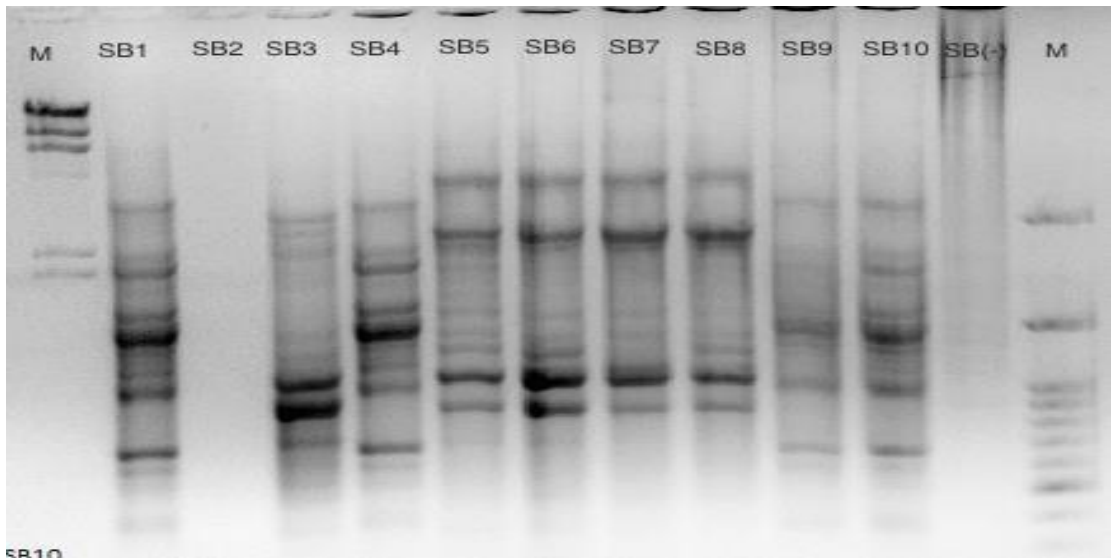
Bu çalışmada fermantasyonun sonunda elde edilen veriler neticesinde maya sayısı 5,92 log kob/mL olarak bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda ise 9,90 log kob/mL (Agirman ve Erten, 2018) ve 5,64 log kob/mL (Tangüler ve Erten, 2012) aralığında tespit edilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen veri diğer çalışmalarla uyum sağlamaktadır.

Bu çalışmada fermantasyonun 3. günü hariç, koliform bakteriye rastlanmamıştır. Yapılan diğer çalışmalarda en yüksek 5.00 log kob/mL (Agirman ve Erten, 2018) sayısına sahip koliform bakteri, Çakır (2011)'ın yapmış olduğu çalışmada 10 kob/mL'nin altında tespit etmiş yahut hiç gözlemlememiştir.

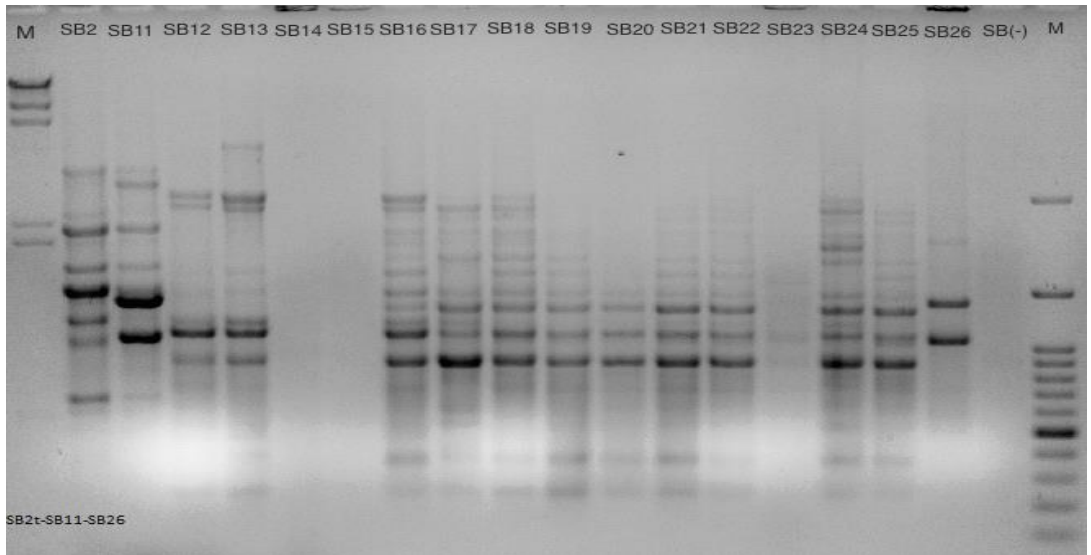
3.3. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonu

Yapılan analizler ve ekimler sonucunda identifikasyonu hedeflenen mikroorganizmalardan 110 bakteri ve 36 adet maya seçilerek DNA izolasyonu sağlanmış, ardından elde edilen izolatları gruplandırmak amacıyla rep-PCR yapılmıştır. Parmak izi görüntülerini belirlemek amacıyla elektroforez uygulanmış ve elde edilen jel görüntüleri sonucunda benzer profile sahip izolatlar gruplandırılmıştır. Benzer bant profiline sahip izolatlar bakteriler için 34, mayalar için ise 6 grup dahilinde incelenmiştir.

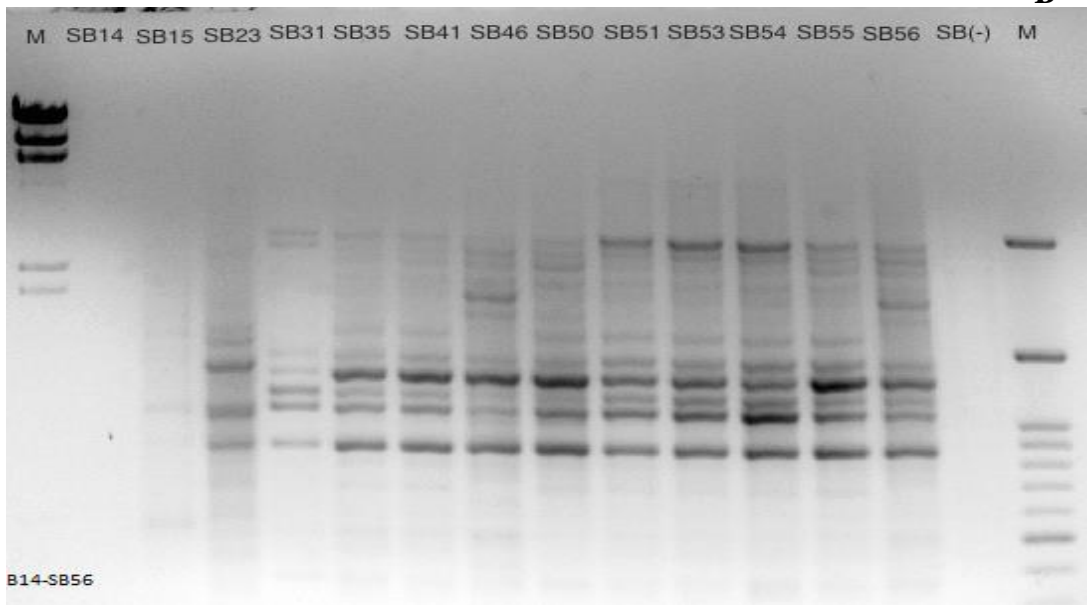
MRS agar ile elde edilen laktik asit bakterilerinden toplamda 56 bakterinin DNA izolasyonu sağlanmış, rep-PCR sonrası parmak izi belirlemek amacı ile uygulanan elektroforez sonucunda 16 örnek bant görüntüsü vermemiştir. Bant görüntüsü veren 40 örnek 10 grup altında toplanmıştır (Şekil 3.1).



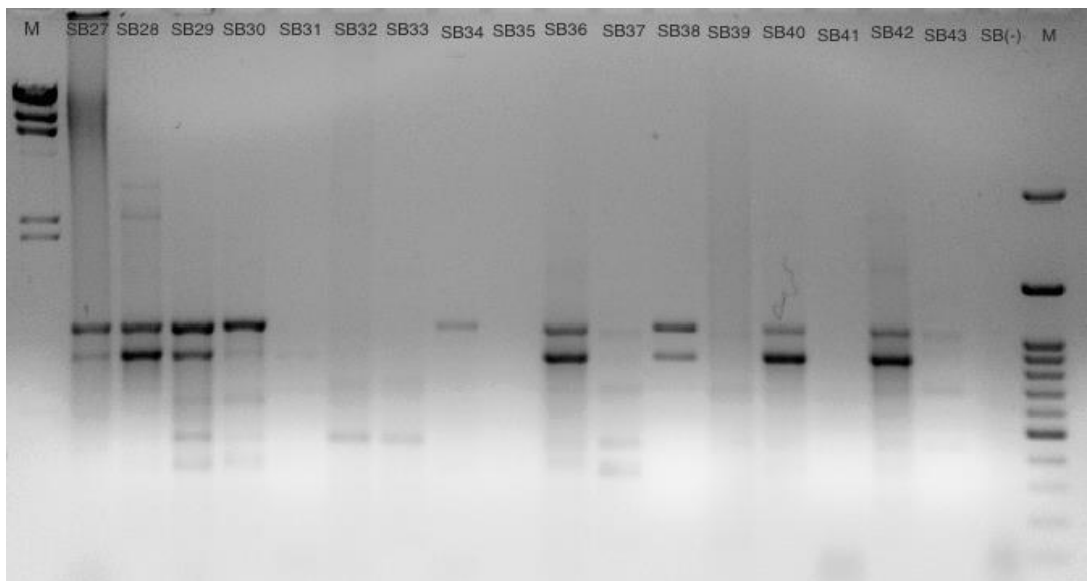
A



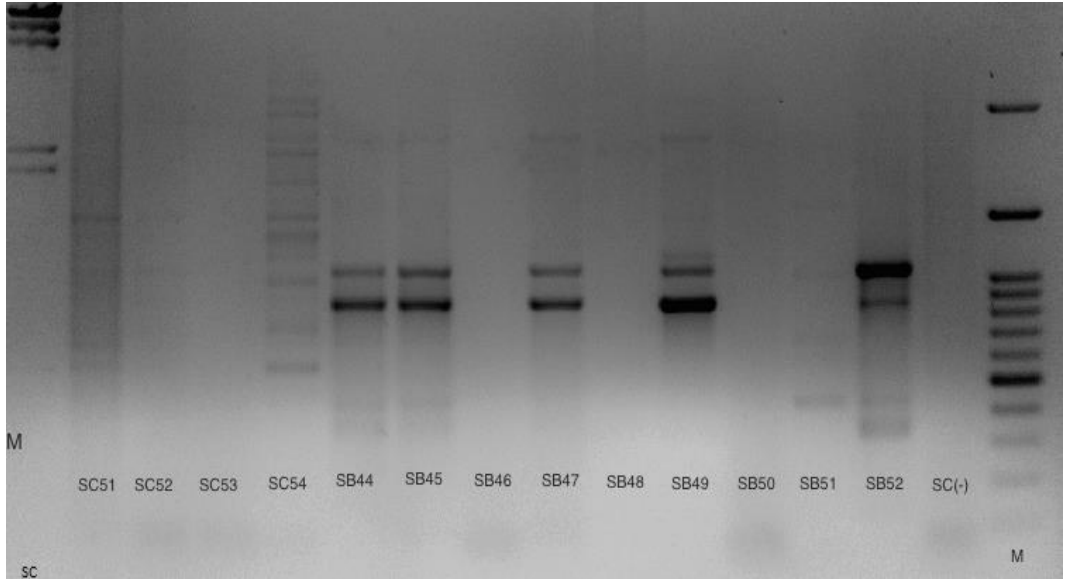
B



C



D



E

Şekil 3.1: MRS besiyerinden izole edilen LAB suşlarının rep-PCR jel görüntüleri

A: SB1, SB2, SB3, SB4, SB5, SB6, SB7, SB8, SB9, SB10; **B:** SB2, SB11, SB12, SB13, SB14, SB15, SB16, SB17, SB18, SB19, SB20, SB21, SB22, SB23, SB24, SB25, SB26; **C:** SB14, SB15, SB23, SB31, SB35, SB41, SB46, SB50, SB51, SB53, SB54, SB55, SB56; **D:** SB27, SB28, SB29, SB30, SB31, SB32, SB33, SB34, SB35, SB36, SB37, SB38, SB39, SB40, SB41, SB42, SB43; **E:** SC51, SC52, SC53, SC54, SB44, SB45, SB46, SB47, SB48, SB49, SB50, SB51, SB52 izolatlarına ait UV altındaki jel görüntüleridir. SB(-) ve SC(-) negatif kontroldür. Baştaki M λ /HindIII Markör, sondaki M Ladder'a ait ifadelerdir. Markör büyüklükleri Şekil 2.3'de görüldüğü gibidir.

Ardından belirlenen grupların her biri için, elektroforezde en parlak ve belirgin görüntü veren örnekler grubu temsilen seçilerek 16S PCR uygulanmıştır (Ek1). Bu doğrultuda 16S PCR uygulanan grup örneklerinin DNA kalitesini öğrenmek amacıyla elektroforezde bakılmış ve hepsinde arzu edilen parlaklığın olduğu gözlemlenmiştir (Ek1). Örneklerin dizilimi 1492R primeri (geri primer) ile belirlendiği için gelen sonuçlar ilk olarak Reverse Complement yardımı ile düze çevrilmiş, ardından BLAST ve Clustal Omega ile baz dizilimleri karşılaştırılarak hangi laktik asit bakterisi olduğu tespit edilmiştir. İlgili kütüphane ile karşılaştırılan SBK-SBL-SBI gruplarının *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus pentosus* bakterilerinin ikisine de benzerlik gösterdiği görülmüştür. Net bir sonuca varmak

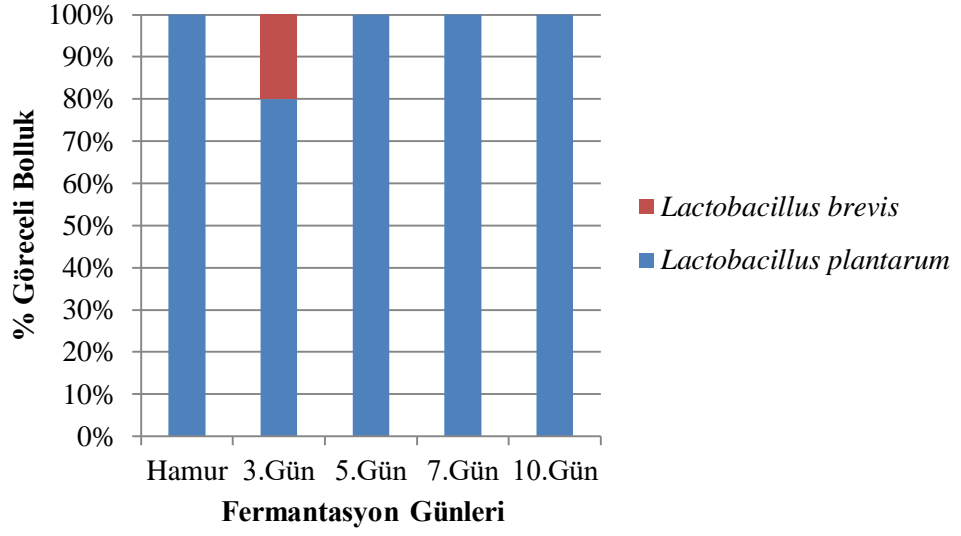
amacıyla SBK-SBL-SBI gruplarını temsil eden laktik asit bakterilerin dizilimi 27F (ileri primer) ile tekrar belirlenmiş ve her birinin *L. plantarum* olduğu kesinlik kazanmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda fermantasyon süresince izole edilen 10 gruptan 8 tanesinin *L. plantarum*, 2 tanesinin *Lactobacillus brevis* olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla 38 suşun *L. plantarum*, 2 suşun ise *L. brevis* olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.8). Bu zamana kadar şalgam suyundan izole edilen bakteriler göz önüne alındığında en baskın laktik asit bakterisinin *Lactobacillus plantarum* olduğu tespit edilmiş, Şekil 3.2’de görüldüğü üzere yapmış olduğumuz çalışmada da aynı sonuç elde edilmiştir .

Tablo 3.8: MRS Besiyerinden İzole Edilen LAB Suşlarının rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatlara Uygulanan 16S PCR ile İdentifikasyonu

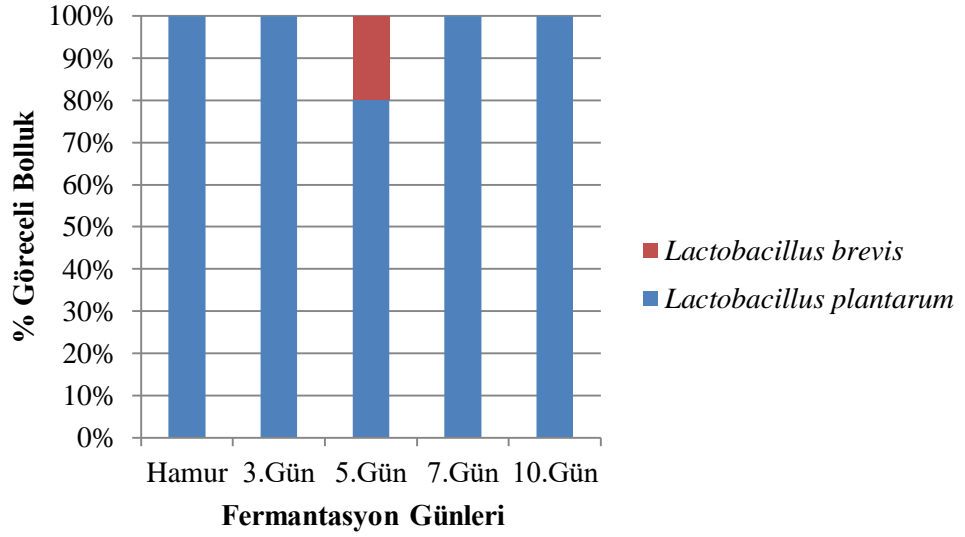
| İzolat Grupları | İzolat Kodu | BLAST Benzerlik Oranı | Fermantasyon Günleri | Tanı Sonucu |
|-----------------|-------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| SBA | SB6 | %100 | Hamur | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | SB5 | | | |
| | SB7 | | | |
| | SB8 | | | |
| SBF | SB11 | %99.77 | Şalgam 1 - Fermantasyon 3. Gün | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| SBE | SB13 | %99.76 | Şalgam 1 - Fermantasyon 3. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | SB12 | | | |
| SBG | SB26 | %100 | Şalgam 2 – Fermantasyon 5. Gün | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| SBJ | SB28 | %99.76 | Şalgam 2 - Fermantasyon 5. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | SB45 | | Şalgam 2 Fermantasyon | |
| | SB47 | | 10. Gün | |
| | SB52 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 10. Gün | |
| SBK | SB29 | %99 | Şalgam 2 - Fermantasyon 5. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | SB30 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 5. Gün | |
| SBN | SB34 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| SBI | SB36 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | SB27 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 5. Gün | |
| | SB38 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | |

| | | | | |
|------------|-------------|--------|------------------------------------|------------------------------------|
| | SB40 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | |
| | SB42 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | |
| | SB44 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | |
| | SB55 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 10. Gün | |
| | SB31 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 5. Gün | |
| | SB35 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | |
| | SB41 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | |
| SBL | SB46 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | SB50 | | | |
| | SB51 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 10. Gün | |
| | SB53 | | | |
| | SB54 | | | |
| | SB56 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | |
| | SB17 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | |
| | SB22 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 3. Gün | |
| | SB16 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | |
| | SB18 | %99.78 | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | |
| SBD | SB19 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | SB20 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | |
| | SB21 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 3. Gün | |
| | SB24 | %99.57 | Şalgam 2 - Fermantasyon 5. Gün | |
| | SB25 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 5. Gün | |

*16S rRNA dizilim analizi ile tanımlanan suşlar koyu renklidir.



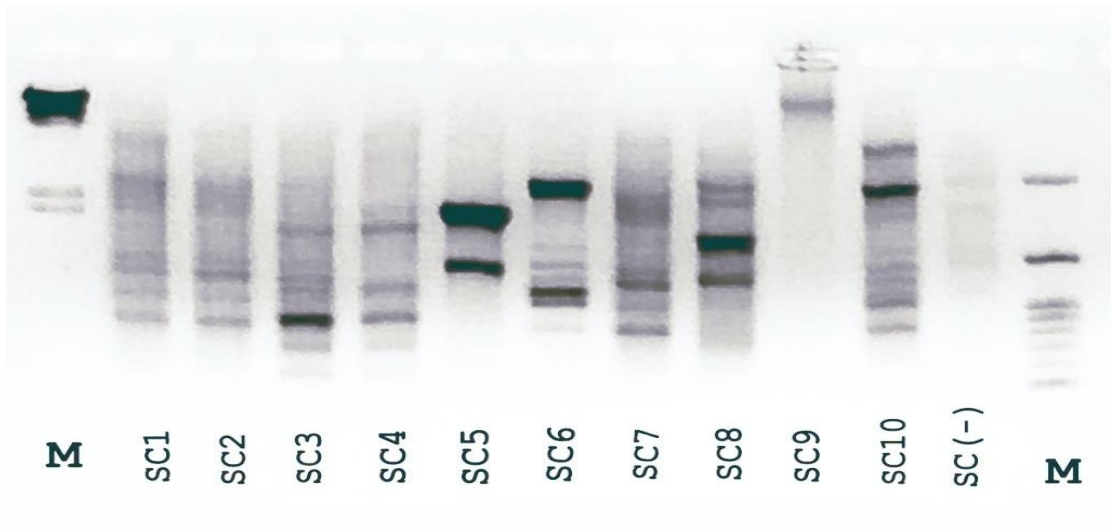
(a) Şalgam 1



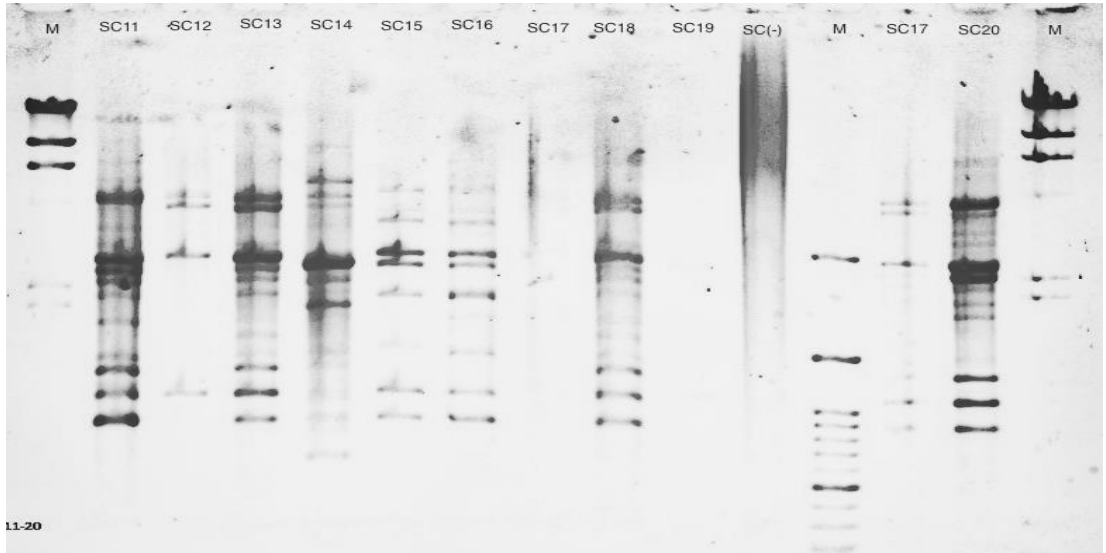
(b) Şalgam 2

Şekil 3.2: Şalgam Suyunda MRS İle Tespit Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Çeşitli Aşamalardaki % Dağılımları

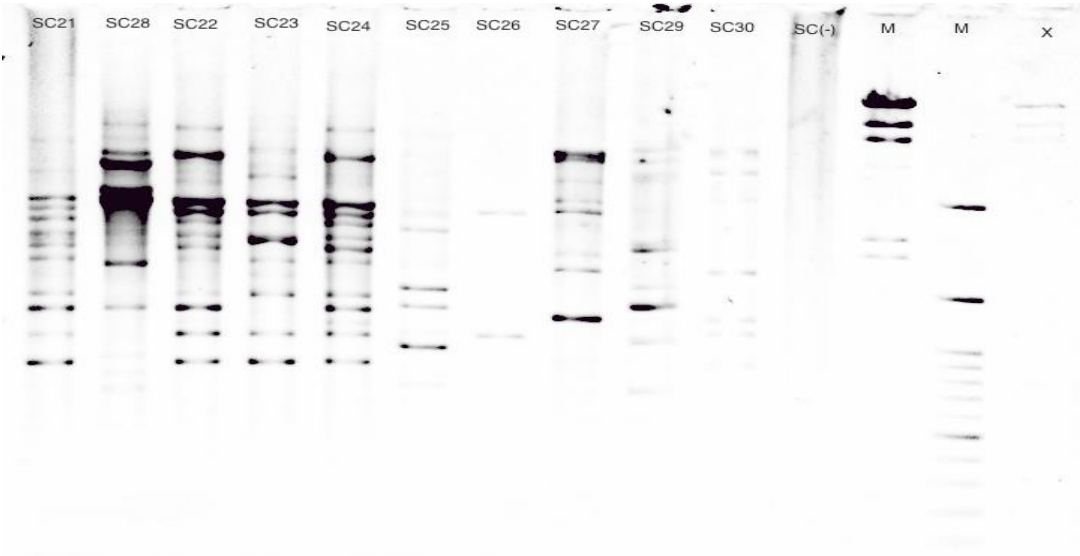
Laktik asit bakterileri ve onların haricinde çeşitli takım ve familyalara ait bakterileri de tanımlamamızı sağlayan M17 besiyerinden toplamda 54 bakterinin DNA izolasyonu sağlanmış, rep-PCR sonrası parmak izi belirlemek amacı ile uygulanan elektroforez sonucunda bant görüntüsü alınan örneklerden, 36 örnek kendi içerisinde gruplandırılmıştır (Şekil 3.3). 18 adet M17 besiyerinden izole edilen bakteri agaroz jel elektroforezde görüntü vermemiştir. 36 örneğin profillerinin birbirinden oldukça farklı olduğu gözlemlenmiş ve bu doğrultuda 24 farklı grup oluşturulmuştur (Şekil 3.3, Tablo 3.9).



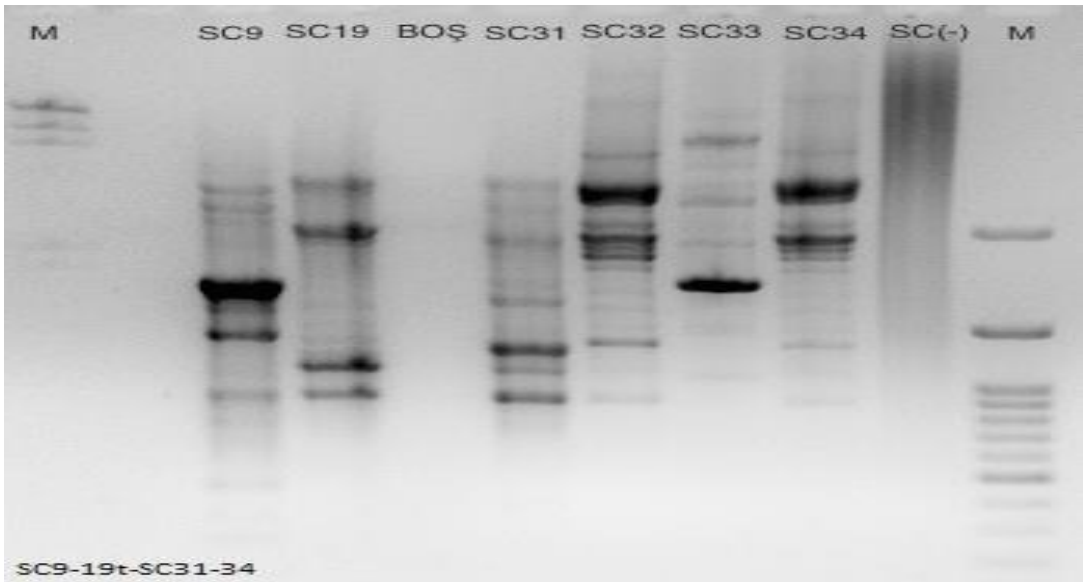
F



G

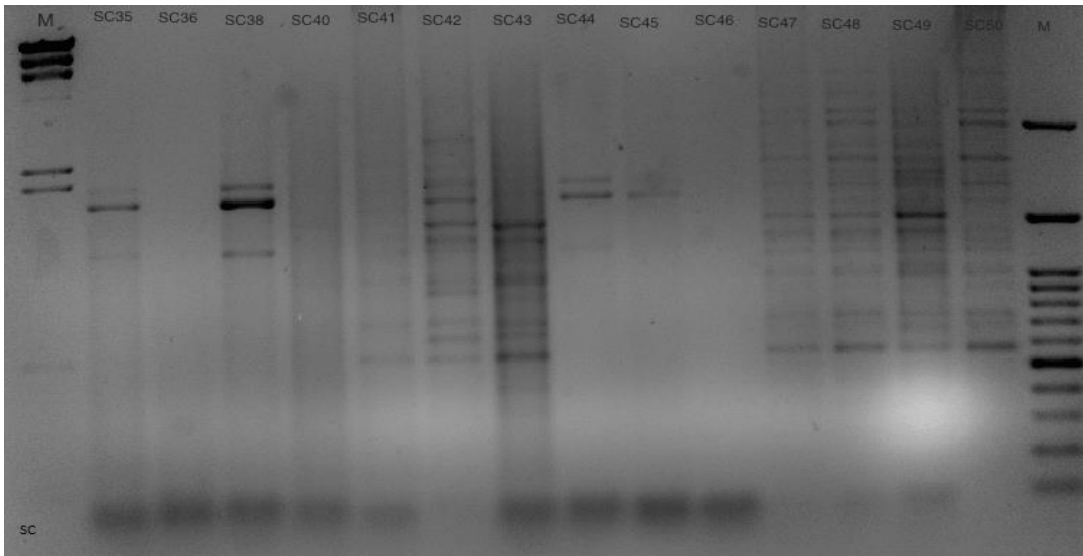


H



SC9-19t-SC31-34

I



SC

J

Şekil 3.3: M17 Besiyerinden İzole Edilen Bakterilerin rep-PCR Jel Görüntüleri

F: SC1, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8, SC9, SC10; **G:** SC11, SC12, SC13, SC14, SC15, SC16, SC17, SC18, SC19, SC20; **H:** SC21, SC28, SC22, SC23, SC24, SC25, SC26, SC27, SC29, SC30; **I:** SC9, SC19, SC31, SC32, SC33, SC34; **J:** SC35, SC36, SC38, SC40, SC41, SC42, SC43, SC44, SC45, SC46, SC47, SC48, SC49, SC50 izolatlarına ait UV altındaki jel görüntüleridir. SB(-) ve SC(-) negatif kontroldür. Baştaki M λ HindIII Markör, sondaki M Ladder'a ait ifadelerdir. Markör büyüklükleri Şekil 2.3'de görüldüğü gibidir.

Belirlenen grupların her biri için, elektroforezde en parlak ve belirgin görüntü veren örnekler, grubu temsilen seçilerek 16S PCR yani tanımlama PCR'ı gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda 16S PCR uygulanan grup örneklerinin DNA kalitesini öğrenmek amacıyla jel elektroforeze bakılmış ve hepsinde arzu edilen parlaklığın olduğu gözlemlenmiştir. Örneklerin dizilimi 1492R primeri (geri primer) ile belirlenmiş ve daha önce anlatıldığı şekilde tanımlanmıştır (Şekil 3.3, Tablo 3.9).

Tablo 3.9: M17 Besiyerinden İzole Edilen Bakteri Suşlarının rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatlara Uygulanan 16S PCR ile İdentifikasyonu

| İzolat Grupları | İzolat Kodu | BLAST Benzerlik Oranları | Fermantasyon Günleri | Tanı Sonucu | Katalaz |
|-----------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------|
| SCZ | SC3 | %99,22 | Şalgam 2 - Fermantasyon 5. Gün | <i>Lactococcus lactis</i> | - |
| | SC5 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 5.Gün | | |
| SCA | SC15 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Bacillus circulans</i> | + |
| | SC16 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | | |
| SCQ | SC6 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 5. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCX | SC8 | %100 | Şalgam 1 - | <i>Pantoea</i> | + |

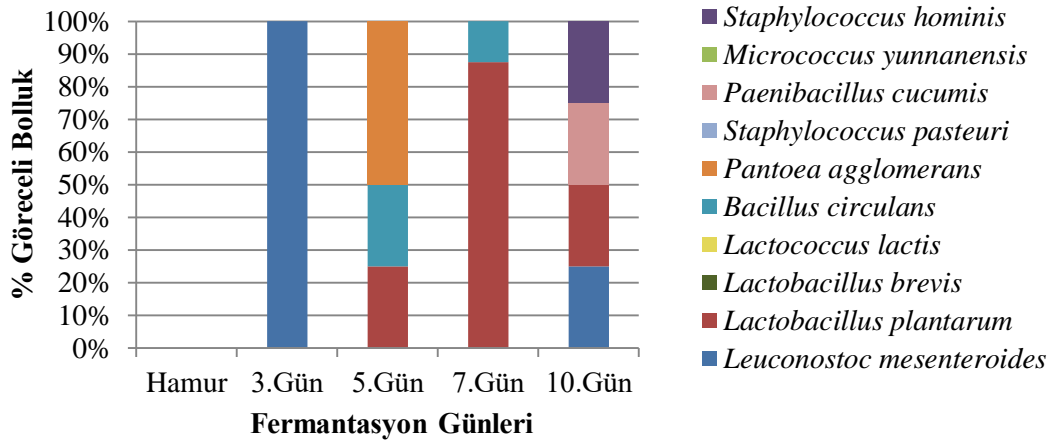
| | | | | | |
|------------|-------------|--------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | | | Fermantasyon 5. Gün | <i>agglomerans</i> | |
| SCP | SC9 | %99,37 | Şalgam 1 - Fermantasyon 5. Gün | <i>Pantoea agglomerans</i> | + |
| SCW | SC10 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 5. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCC | SC11 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCF | SC12 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCB | SC13 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| | SC18 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | | |
| | SC17 | | | | |
| SCD | SC14 | %99 | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Staphylacoccus pasteuri</i> | + |
| SCE | SC19 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCR | SC20 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCH | SC21 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCG | SC22 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| | SC24 | | | | |
| SCJ | SC23 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| SCK | SC26 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| | SC25 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | | |
| SCL | SC27 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | - |
| SCI | SC28 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon | <i>Paenibacillus cucumis</i> | + |

| 10. Gün | | | | | |
|---------|------|--------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| SCM | SC29 | %99,75 | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Lactobacillus brevis</i> | - |
| SCN | SC30 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Micrococcus yunnanensis</i> | + |
| SCO | SC32 | %100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Lactobacillus plantarum</i> | - |
| | SC34 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 10. Gün | | |
| SCT | SC33 | %100 | Şalgam 1 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Staphylococcus hominis</i> | + |
| SCS | SC37 | %99 | Şalgam 1 - Fermantasyon 3. Gün | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | - |
| | SC36 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | | |
| | SC31 | | | | |
| SCV | SC38 | %100 | Şalgam 2 – Fermantasyon 3. Gün | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | - |
| | SC35 | | | | |
| | SC44 | | | | |
| | SC45 | | | | |

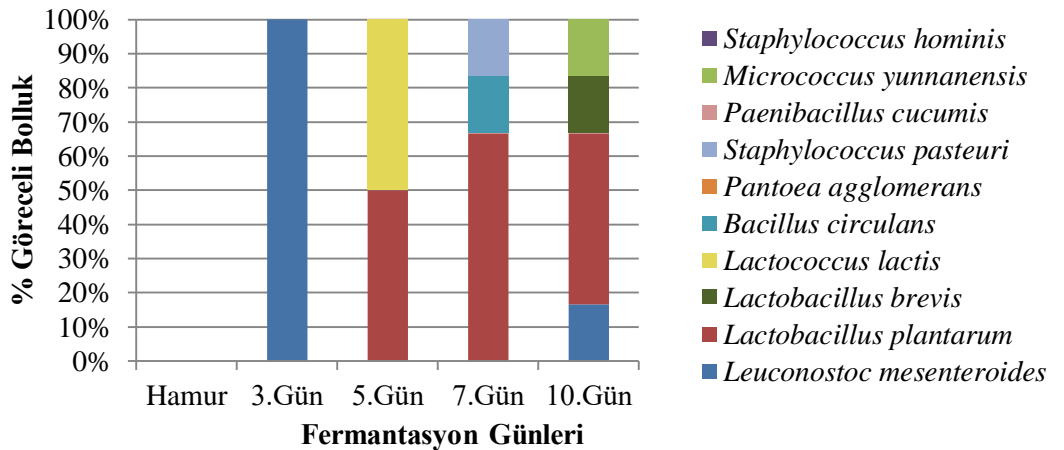
- 16S rRNA dizilim analizi ile tanımlanan suşlar koyu renklidir.

Gerçekleştirilen identifikasyon sonucunda LAB haricinde birtakım bakterilerin de fermantasyona katıldığı gözlemlenmiştir. Yapılan tanımlama işlemi sonucunda 12 grup, 17 izolatın *L. plantarum*, 3 grup, 8 izolatın *Leuconostoc mesenteroides*; 2 grup, 2 izolatın *Pantoea agglomerans*; 1 grup, 1 izolatın *Lactococcus lactis*; 1 grup, 3 izolatın *Bacillus circulans*; 1 grup, 1 izolatın *Staphylococcus pasteurii*; 1 grup, 1 izolatın *Paenibacillus cucumis*; 1 grup, 1 izolatın *Lactobacillus brevis*; 1 grup, 1 izolatın *Staphylococcus hominis*; 1 grup 1 izolatın ise *Micrococcus yunnanensis* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4, Tablo 3.9) Yapılan diğer araştırma ve çalışmalarda M17 besiyerine ekimi gerçekleştirilen bakterilerin sayımı yapılmış ancak bakteriler izole edilip tanımlanmaları sağlanmamıştır. Bu vesileyle M17 besiyeri, şalgam suyunun bakteriyel profilinin daha detaylı belirlenmesi amacıyla kullanılmış ve fermantasyon süresince oldukça geniş yelpazeye sahip mikrobiyotaya sahip olduğunu gözlemlememizi sağlamıştır. M17 besiyerinde gelişimi sağlanan bakteriler içinde en baskın olanın *L. plantarum* olduğu tespit edilmiştir. Katalaz

negatif özellik gösteren laktik asit bakterilerinin haricinde katalaz pozitif özellik gösteren bakterilere de rastlanmıştır. M17 besiyeri kullanarak MRS’de tespit edilememiş laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* tespit edilmiş, bununla birlikte MRS’de tespit edilen *L. plantarum* ve *L. brevis*’e de rastlanmıştır. Bunlar haricinde katalaz (+) olup laktik asit bakterisi olmayan *Bacillus circulans*, *Pantoea agglomerans*, *Staphylococcus pasteurii*, *Paenibacillus cucumis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Staphylococcus hominis* türleri de tanımlanmıştır. M17 besiyeri MRS’de elde edemediğimiz laktik asit bakterilerinin de tanımlanması için fayda sağlamıştır.



(a) Şalgam 1



(b) Şalgam 2

Şekil 3.4: Şalgam Suyunda M17 ile Tespit Edilen Bakterilerinin Çeşitli Aşamalardaki % Dağılımları

Erginkaya ve Hammes (1992), geleneksel yolla, ekşi hamur ile üretilen şalgamın fermantasyon sürecini izleyerek, fermantasyonda etkin olan laktik asit bakterilerini, *L. plantarum* subsp. *arabinosus*, *L. fermentum* ve *L. brevis* olarak tanımlamışlardır.

Tangüler (2010) tarafından yapılan çalışmada, farklı işletmelerden temin edilen şalgam sularının mikrobiyolojik ekimleri MRS besiyerine gerçekleştirilmiş, mikroflorasının geleneksel yöntemlerle tanımlanması sonucunda, en baskın laktik asit bakterisinin *L. plantarum* olduğu, onu takip eden bakterilerin ise *L. brevis* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* olduğu ifade edilmektedir. Bu baskın bakterilerin yanı sıra *L. fermentum*, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. pentosus*, *Lb. buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *P. pentosaceus* da geleneksel yöntemler vasıtası tanımlanmıştır.

Tangüler ve Erten (2011) ticari olarak üretimi sağlanan şalgam sularının mikrobiyotasında baskın olan laktik asit bakterisinin *L. plantarum* olduğunu tespit etmiş ve bunu takiben *L. brevis*, *Lb. del-brueckii* subsp. *delbrueckii* ve *Lactobacillus fermentum* bulunduğunu belirtmişlerdir.

Okçu (2011) hem geleneksel hem de direkt şalgam suyu üretimi yapan firmalardan fermantasyon süreci boyunca alınan örnekler sonucunda en fazla izole edilen LAB türünün *L. plantarum* olduğu ve bunu *Leu. mesenteroides* takip ettiğini ifade etmiştir.

Tangüler ve Erten (2012) ticari olarak üretimi sağlanan şalgam sularının laktik asit bakterilerini, fermantasyon süresince geleneksel yöntemlerle tanımlamışlardır. Mikrobiyotasında baskın olan laktik asit bakterisinin *L. plantarum* olduğunu tespit etmiş ve bunu *L. brevis* ve *Lactobacillus fermentum* takip ettiğini gözlemişlerdir. Fermantasyon süresince *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus delbrueckii* de gözlemlendiği ancak yine fermantasyon esnasında öldüklerini ifade etmişlerdir.

Başer vd. (2012) yapmış olduğu çalışmada 16S rRNA-PCR yöntemi kullanılarak şalgamın mikrobiyal profili belirlenmiştir. Sekanslama sonuçları neticesinde baskın türlerin; *L. casei*, *L. plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *Lactobacillus*

helveticus, *L. paracasei*, *Lactobacillus parabrevis*, *Lactobacillus reuteri*, *L. delbrueckii*, *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus sharpeae* olduğu tanımlanmış ve bu sonuçlar doğrultusunda şalgam suyunun potansiyel bir LAB kaynağı olduğu ifade edilmiştir.

Tangüler, Erten ve Saris (2015), tarafından yapılan çalışmada direkt, geleneksel ve starter kültür ilavesiyle (*Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* ve *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) şalgam suyu üretilmiş, bunların hem duyuşal özellikleri değerlendirilip hem de mikrobiyolojik analizleri moleküler yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. 3 üretim yönteminin de fermantasyon başlangıcı ve sonundaki laktik asit bakterileri tanımlanmıştır. Üç tip fermantasyon çeşidinden bakteriler *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. pentosus*, *Lactobacillus* subsp., *Lb. brevis*, *Lb. parabuchneri* olarak tespit edilmiştir. Fermantasyonun başından sonuna kadar tüm örneklerden izole edilen türlerin *Lb. plantarum* ve *Lb. buchneri* olduğu ifade edilmiştir. Şalgam suyu fermantasyonun sonunda *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. brevis* bakterilerinin baskın bulunma sebebinin aside karşı dirençli olmalarından kaynaklandığı ifade edilmiştir.

Erginkaya ve Turhan (2016) tarafından yapılan araştırmalar sonucunda fermantasyon süreci esnasında küçük ölçekli işletmelerden temin edilen şalgam sularından izole edilen en baskın iki mikroorganizmanın *L. plantarum* ve takiben daha düşük oranda *L. pentosus* olduğu gözlemlenmiştir.

Ekinci vd. (2016), tarafından yapılan çalışmada şalgam suyunun antioksidan kapasitesi ve mikrobiyotasının belirlenmesi; şalgam suyunun mikrobiyal profilinin kanser hücrelerine olan etkileri *in vitro* yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Moleküler yöntemler kullanılarak MRS besiyerinden izole edilen laktik asit bakterileri tanımlanmış, toplamda 21 adet *Lactobacillus* türü tespit edilmiştir. Tanımlananlar arasında en çok *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis* ve *L. delbrueckii* türü ve alt türü tespit edilmiştir.

Bircan ve Erten (2018) yapmış oldukları çalışmada Tangüler (2010) tarafından farklı işletmelerden temin edilen ve geleneksel yöntemlerle izole edilen laktik asit

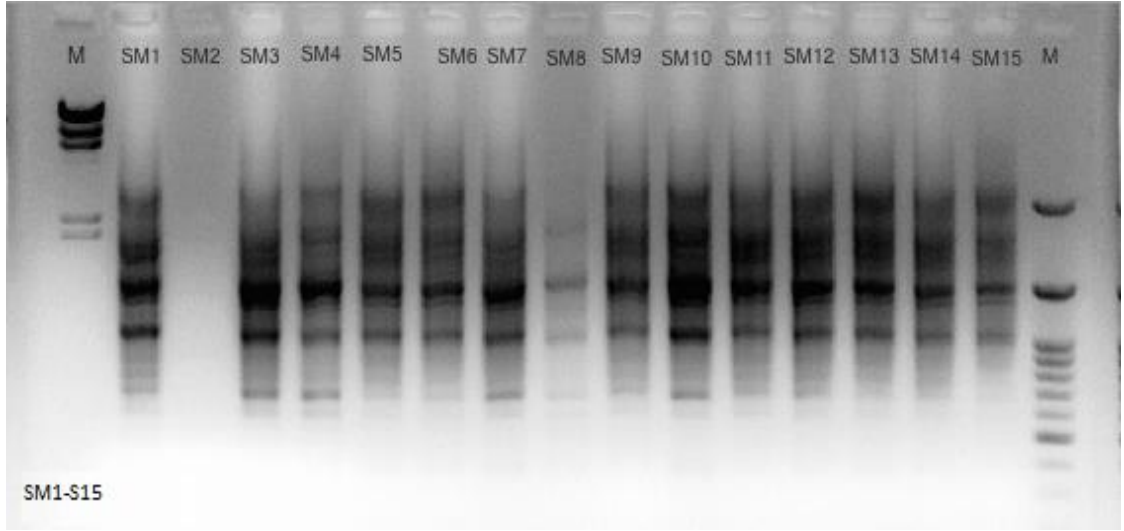
bakterilerinin starter kültür olma potansiyeli ve bunun için gerekli teknolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla moleküler yöntemler ile tanımlama işlemi gerçekleştirmişlerdir. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda tanımlanan 72 suşun *L. brevis* (18), *L. fermentum* (11), *L. plantarum* (13), *L. buchneri* (16), *Lactobacillus casei* (5), *Leu. mesenteroides* (6), *Lactobacillus paralimentarius* (2), *Lactobacillus casei/paracasei* olduğu ifade edilmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmalar neticesinde MRS besiyerinden izole edilen laktik asit bakterileri *L. plantarum* ve *L. brevis* olarak tanımlanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda da şalgam suyunda en baskın olan bakterinin *L. plantarum* olduğu ifade edilmektedir. Bu bağlamda elde edilen veriler diğer çalışmalarla uyum sağlamaktadır.

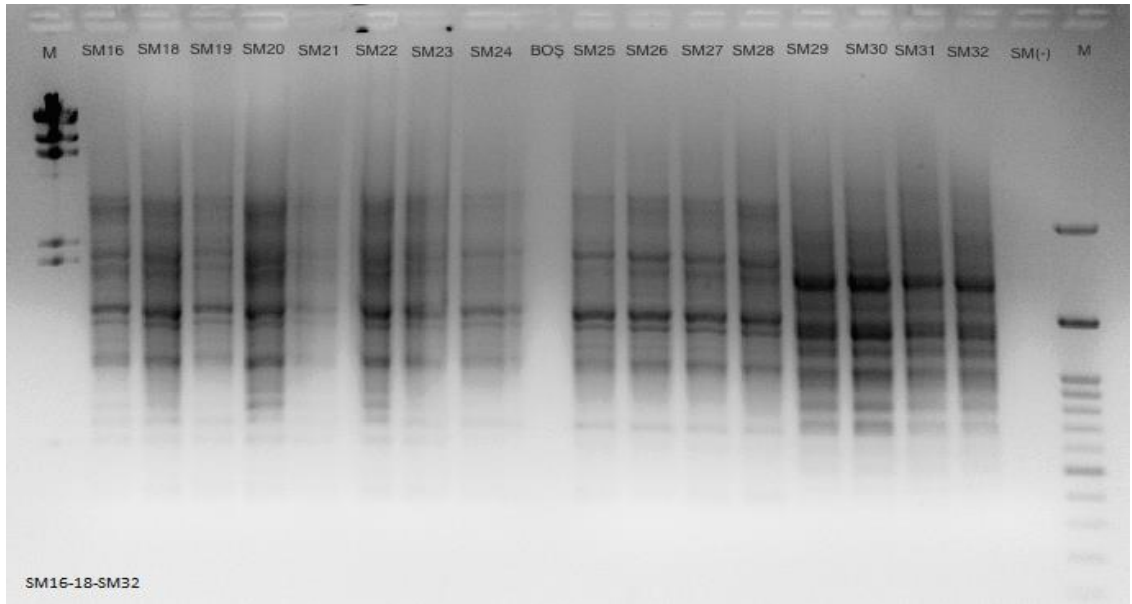
M17 besiyerinin kullanımı ile laktik asit bakterilerinin haricinde ortamda farklı bakterilerin bulunduğu da gözlemlenmiştir. Bu bağlamda diğer çalışmalardan farklı olarak katalaz (+) özellik gösteren *Pantoea agglomerans*, *Bacillus circulans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Paenibacillus cucumis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus hominis* bakterileri, moleküler yöntemler ile tespit edilmiştir. Hamur fermantasyonu esnasında baskın *L. plantarum* ve *S. cerevisiae* varlığı gözlemlendiğinden sebep, oluşan mikrofloranın yani tanımlanan diğer bakterilerin sebzelerden veya ortamdaki geldiği düşünülmektedir.

3.4. Mayaların İdentifikasyonu

Mayalardan toplamda 36 tanesinin DNA izolasyonu sağlanmış, rep-PCR sonrası parmak izi belirlemek amacı ile uygulanan elektroforez sonucunda bant profili alınan örneklerden bant görüntüsü veren 30 izolat 6 grup altında toplanmıştır (Şekil 3.5, Tablo 3.10).



K



L

Şekil 3.5: PDA Besiyerinden İzole Edilen Maya Suşlarının rep-PCR Jel Görüntüleri

K: SM1, SM2, SM3, SM4, SM5, SM6, SM7, SM8, SM9, M10, SM11, SM12, SM13, SM14, SM15; **L:** SM16, SM18, SM19, SM20, SM21, SM22, SM23, SM24, SM25, SM26, SM27, SM28, SM29, SM30, SM31, SM32 izolatlarına ait UV altındaki jel görüntüleridir. SM(-) ve S(-) negatif kontroldür. Baştaki M λ /HindIII Markör, sondaki M Ladder'a ait ifadelerdir. Markör büyüklükleri Şekil 2.3'de görüldüğü gibidir.

Tablo 3.10: PDA Besiyerinden İzole Edilen Maya Suşlarının rep-PCR Grupları ve Seçilen İzolatlara Uygulanan 26S PCR ile İdentifikasyonu

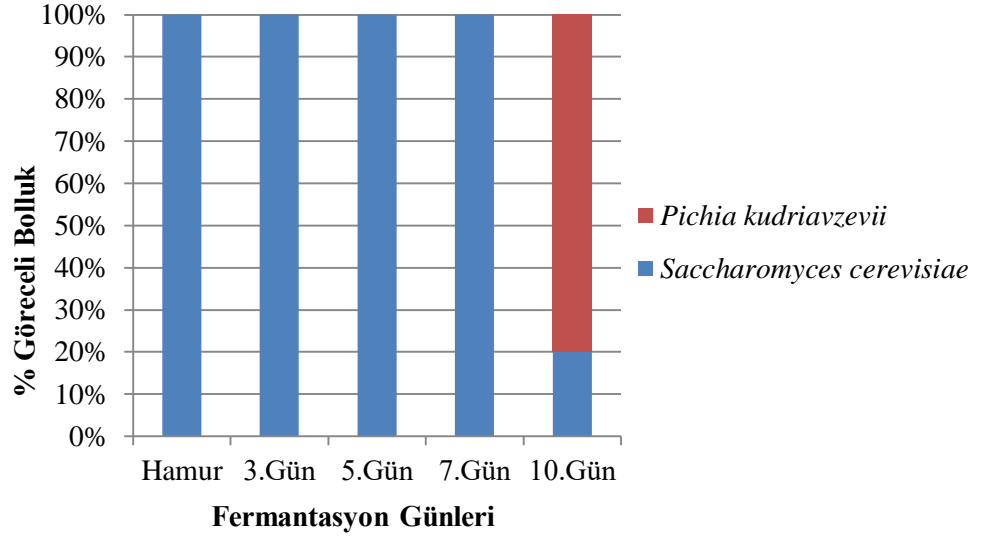
| İzolat Grupları | İzolat Kodlu | BLAST Benzerlik Oranları | Fermantasyon Günleri | Tanı Sonucu |
|-----------------|--------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| SMC | SM8 | % 100 | Hamur | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SMA | SM10 | % 100 | Hamur | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | SM3 | | | |
| | SM4 | | | |
| | SM7 | | | |
| SMB | SM12 | % 100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | SM5 | | | |
| | SM6 | | Hamur | |
| | SM9 | | | |
| | SM11 | | | |
| | SM13 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | |
| | SM14 | | | |
| | SM15 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 3. Gün | |
| | SM1 | | Hamur | |
| | SM33 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 10. Gün | |
| SME | SM18 | % 100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 3. Gün | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | SM19 | | | |
| | SM21 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 5. Gün | |
| SMD | SM26 | % 100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 7. Gün | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | SM24 | | | |
| | SM25 | | Şalgam 1 - Fermantasyon 7. Gün | |
| | SM27 | | | |
| | SM28 | | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | |
| | SM30 | % 100 | Şalgam 2 - Fermantasyon 10. Gün | <i>Pichia kudriavzevii</i> |
| | SM29 | | | |
| | SM31 | | | |
| | SM32 | | Şalgam 1 - | |

| | | |
|------------|------|-------------------------|
| SMF | SM34 | Fermantasyon 10. Gün |
| | SM35 | |
| | SM36 | |

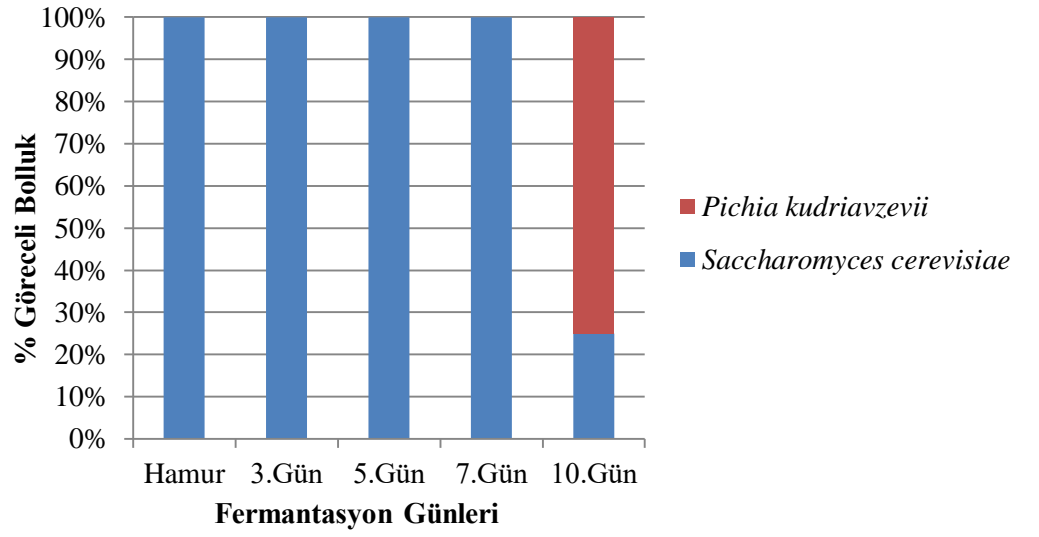
Ardından belirlenen grupların her biri için, elektroforezde en parlak ve belirgin görüntü veren örnekler grubu temsilen seçilerek NL-1 ve NL-4 primerleri kullanılarak 26S rRNA PCR uygulanmıştır. 26S rRNA PCR uygulanan grup örneklerinin DNA kalitesini öğrenmek amacıyla elektroforez bakılmış ve hepsinde arzu edilen parlaklığın olduğu gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda örneklerin dizilimi NL-4 primeri (geri primer) ile daha önce anlatılan şekilde belirlenmiş ve maya profili tespit edilmiştir. 5 grubun *Saccharomyces cerevisiae*, 1 grubun ise *Pichia kudriavzevii* olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla 30 izolattan 23'ünün *S. cerevisiae*, 7'sinin ise *P. kudriavzevii* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.6, Tablo 3.10).

Erginkaya ve Turhan (2016) tarafından yapılan araştırmalar sonucunda fermantasyon süreci esnasında küçük ölçekli işletmelerden temin edilen şalgam sularından izole edilen en baskın mayanın *S. cerevisiae* olduğu tespit edilmiş, takiben daha düşük oranda *Candida krusei* tanımlanmıştır.

Bu çalışmada maya olarak ise en baskın mikroorganizmanın *S. cerevisiae* olmakla birlikte diğer çalışmalardan farklı olarak mikrobiyotada *P. kudriavzevii* 'e rastlanmıştır.



(a) Şalgam 1



(b) Şalgam 2

Şekil 3.6: Şalgam Suyunda PDA ile Tespit Edilen Mayaların Çeşitli Aşamalarda % Dağılımları

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada şalgam suyunun geleneksel yöntemlerle üretilip, fermantasyon sürecindeki mikrobiyotasının moleküler yöntemler vasıtası ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Uygulanan pH analizi neticesinde ve fermantasyonun sonu olarak kabul edilen 7. gününde şalgam suyu örneklerinin pH'ı 3,55 - 3,56 olarak bulunmuştur. Elde edilen pH değer aralığının yapılan diğer çalışmalarla ve TSE'nin belirlemiş olduğu standartlarla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan bakteri sayımları neticesinde (fermantasyonun 7. günde sonlandığı kabul edilerek) LAB 7,80-7,89 log kob/mL, TMAB 7,90-8,05 log kob/mL, M17'de gelişen bakteriler 7,80-7,89 log kob/mL, mayalar ise 5,92 log kob/mL düzeyinde olduğu gözlenmiş, koliform bakterilere ise rastlanmamıştır. Elde edilen bu veriler, yapılan diğer çalışmalar ile uyum sağlamaktadır.

Bu çalışmada geleneksel metotla üretilen şalgam suyunun mikrobiyal profilinin tanımlanması amacıyla hamur, 3., 5., 7., ve 10. günlere ait fermantasyon sürecinden örnekler alınarak LAB'lar için MRS ve M17, mayalar için PDA besiyeri kullanılmış ve moleküler yöntemler vasıtasıyla çeşitli mikroorganizmalar tespit edilmiştir.

Yapılan moleküler analizler neticesinde 76 bakteri ve 30 maya rep-PCR ile gruplandırılmış, her gruptan bir örnek moleküler tanımlama için seçilmiştir. Bakteriler 16S rDNA, mayalar ise 26S rDNA bölgesinin dizilenmesiyle identifiye edilmiştir. MRS besiyerinden izole edilmiş 40 LAB suşunun 38'inin *L. plantarum*,

2'sinin ise *L.brevis* olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler yapılan diğer çalışmalar ile uygunluk göstermektedir. M17 besiyerinden izole edilen 36 izolattan 27 tanesinin laktik asit bakterisi olduğu tanımlanmış ve bunlardan 17 izolatin *L. plantarum*, 8 izolatin *Leuconostoc mesenteroides*, 1 izolatin *Lactobacillus brevis*, 1 izolatin *Lactococcus lactis* olduğu tespit edilmiştir. Bunlar haricinde katalaz (+) olup laktik asit bakterisi olmayan 9 izolat tanımlanmış ve bunlardan 2 izolatin *Pantoea agglomerans*, 3 izolatin *Bacillus circulans*, 1 izolatin *Staphylacoccus pasteurii*, 1 izolatin *Paenibacillus cucumis*, 1 izolatin *Staphylacoccus hominis*, 1 izolatin ise *Micrococcus yunnanensis* olduğu tespit edilmiştir. MRS ve M17 besiyerlerinde gelişim gösteren bakteriler içinde en baskın *Lactobacillus plantarum* olduğu tespit edilmiştir.

PDA besiyerinden izole edilen 30 maya izolatından 23'ünün *S. cerevisiae*, 7'sinin ise *P. kudriavzevii* olduğu tespit edilmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak mikrobiyotada *P. kudriavzevii* 'e rastlanmıştır.

Yapılan bu çalışma nihayetinde, diğer çalışmalardan farklı olarak, geleneksel yöntemlerle üretilen şalgam suyu fermantasyonuna katılan laktik asit bakterilerini tespit etmek için M17 besiyeri kullanılmıştır. Bu vesileyle MRS besiyeri ile tespit edemediğimiz *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactococcus lactis* laktik asit bakterileri M17 besiyeri ile tespit edilmiş olup, bunun yanında LAB olmayan, katalaz (+) özellik gösteren bakterilerin de tanımlanması sağlanmıştır. Hamur fermantasyonu esnasında baskın olarak gözlenen mikroorganizmaların *L. plantarum* ve *S. cerevisiae* olmasından dolayı, gözlemlenen bu bakterilerin, havuç fermantasyonu esnasında sebzelerden veya ortamdan geldiği düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada moleküler tanımlama yöntemlerinden PCR kullanılarak etkin sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ileride yapılacak birçok çalışma için temel oluşturarak literatüre katkı sağlayacak ve bir yol gösterici olacaktır. Geleneksel şalgam suyu üretiminde ekşi maya kullanıldığından, daha sonraki yapılacak çalışmalarda *S. cerevisiae* olmayan mayaların tespiti için L-lysine agar kullanılarak moleküler yöntemlerle tanımlama sağlanabilir. Geleneksel yöntemlerle üretilen şalgam suyu, farklı ekşi maya türleri kullanılarak üretilip, oluşan mikroorganizmalar moleküler yöntemlerle incelenebilir. Kültüre dayalı olmayan yöntemlerle şalgam suyunun mikrobiyotasının daha detaylı bir şekilde tanımlanması sağlanabilir. Şalgam

suyunun kontrolsüz olarak üretilmesiyle meydana gelen farklı mikroorganizma profillerinin, aromada ne gibi değişiklikler meydana getirdiği ile ilgili duyu analizler gerçekleştirilebilir. Şalgam suyunun içeriğindeki mikroorganizmaların, probiyotik özellik taşıyıp taşımadığı ve sağlık üzerindeki etkileri ile ilgili kapsamlı çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKÇA

- Agirman, B., & Erten, H. (2018). The Influence of Various Chloride Salts to Reduce Sodium Content on the Quality Parameters of Şalgam (Shalgam): A Traditional Turkish Beverage Based on Black Carrot. *Journal of Food Quality*, 2018.
- Akkaya, D. Y., & Osmanağaoğlu, Ö. T. D. (2009). *Laktik asit bakterilerine (lab) ait çeşitli suşların rapid-pcr (rastgele çoğaltılmış polimorfik dna-polimeraz zincir reaksiyonu) ile karakterizasyonu ve genetik çeşitliliğin incelenmesi* (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı).
- Akın, M., & Fadhil, Z. H. F. (2016). Probiyotik Bakteri İle Fermente Edilen Sebze Suları. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 42(1), 1-9.
- Altay, F., Karbancıoğlu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., & Heperkan, D. (2013). A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 44-56.
- Ana Britannica Genel Kültür Ansiklopedisi, Şalgam Maddesi, fasikül no.194, 16 Temmuz 1990, AnaYayıncılık İstanbul, s.227
- Andre, G., Deghorain, M., Bron, P. A., van Swam, I. I., Kleerebezem, M., Hols, P., & Dufrene, Y. F. (2011). Fluorescence and atomic force microscopy imaging of wall teichoic acids in *Lactobacillus plantarum*. *ACS Chemical Biology*, 6(4), 366-376.
- Anonim (2001). TS 1728 ISO 1842 Meyve ve Sebze Ürünleri-pH Tayini, Türk Standardları Enstitüsü, Ankara.
- Anonim, 2003. TS 11149 Şalgam Suyu Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

- Anonim, 2011. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Ek 1. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Yetki Kanunu: 5996, Yayımlandığı Resmi Gazete: 29.12.2011-28157.
- Anonim, ThermoScientific, User guide, Pub. No. MAN0012663, Rev. Date 12 October 2016.
- Aras, Z. (2011). Mikrobiyolojide Kullanılan Hızlı Tanı Yöntemleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 97-104.
- Arııcı, M (2004). Mikrobiologische Und Chemische Eigenschaften Von Salgam. *Ernährungs-Umschau*, 51(1):10-11.
- Armani, A., Tinacci, L., Xiong, X., Castigliego, L., Gianfaldoni, D., & Guidi, A. (2015). Fish species identification in canned pet food by BLAST and Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) analysis of short fragments of the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA). *Food Control*, 50, 821-830.
- Aşcıoğlu, F., Koluçak, T., Çetinkaya, Ü., & Akyüz, F. (2002). Kapiller elektroforez teknolojisinin klinik ve adli amaçlı DNA analizlerinde kullanımı: geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma. *Adli Tıp Der*, 16(2-4), 88-93.
- Aydoğdu, H., Yıldırım, Ş., Halkman, A. K., & Durgun, T. (2014). A Study On Production And Quality Criteria Of Hardaliye; A Traditional Drink From Thrace Region Of Turkey. *Gıda*, 39, 139-145.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification And Physiology. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker*, 139, 1-66.
- Baser, M., Sofu, A., Ozcan, E., Korachi, M., & Ekinçi, F. Y. (2012). Characterization of dominant microbial populations in shalgam juice using 16S rRNA. *New Biotechnology*, (29), S118.

- Bayram, M., Erdoğan, S., Esin, Y., Saraçoğlu, O., & Kaya, C. (2014). Farklı Siyah Havuç Miktarlarının Şalgam Suyunun Bileşimine Ve Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi. *Akademik Gıda*, 12(1), 29-34.
- Bilişli, A., (2013). *Özel Gıdalar*. Sidas Medya Ltd. Şti., Çanakkale, 120-128.
- Bircan, S., & Erten, H. (2010). Şalgam Suyundan İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Bunların Starter Kültür Olarak Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi. *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 35-6.
- Blaxter, M. (2003). Counting angels with DNA. *Nature*, 421(6919), 122-123.
- Canbaş, A., & Fenercioğlu, H. (1984). Şalgam suyu üzerinde bir araştırma. *Gıda*, 9(5).
- Canbaş, A., Deryaoğlu, A., 1993. Şalgam suyunun üretim tekniği ve bileşimi üzerine bir araştırma, *Doğa*, 17:119-129.
- Cerit, H. (2003). Determination of the allele frequency of some genomic loci in a Holstein cattle population and its importance in individual identification. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(1), 81-91.
- Coskun, F. (2017). A traditional Turkish fermented non-alcoholic beverage, "Shalgam". *Beverages*, 3(4), 49.
- Çakır, P. (2011). *Ülkemizde üretilen şalgam sularının bileşimleri ve gıda mevzuatına uygunlukları üzerine bir araştırma* (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- Çankaya, A., & Tangüler, H. (2018). Effect of Temperature on Microbial Change during Carrot Fermentation in Shalgam Beverage Production. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(6), 749-755.
- Çelik, S. (1988). Geleneksel Fermente Ürünler. *Gıda*, 13(4).

- Çetinkaya, E., & Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2(1), 53-62.
- Çon, A. H., & Gökalp, H. Y. (2000). Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30: 180-190.
- Deak, T. (2008). *Handbook Food Spoilage Yeasts* (2. Baskı). USA: CRC Press.
- Demir, N., Bahçeci, K. S., & Acar, J. (2006). The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(3), 352-363.
- Deryaoğlu, A., 1990. Şalgam Suyu Üretimi ve Bileşimi Üzerinde Bir Araştırma, (Yüksek Lisans Tezi), Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 57 s.
- Deryaoğlu, A. (2005). Şalgam Suyu Üretiminde NaCl Yerine KCl Kullanarak Sodyum Miktarını Azaltma Olanakları. *Gıda*, 30(5).
- Diñçer, E., Kıvanç, M., & Karaca, H. (2010). Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri. *Gıda*, 35(1), 1-8.
- Ekinci, F. Y., Baser, G. M., Özcan, E., Üstündağ, Ö. G., Korachi, M., Sofu, A., ... & Chen, C. Y. O. (2016). Characterization of chemical, biological, and antiproliferative properties of fermented black carrot juice, shalgam. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1355-1368.
- Ender, G., Karagözlü, C., Yerlikaya, O., & Akbulut, N. (2006). Dünyada ve Türkiye’de Tüketimi Artan Fermente Süt İçecekleri. *Türkiye*, 9, 24-26.
- Erginkaya, Z., & Hammes, W. P. (1992). Şalgam Suyu Fermentasyonu Sırasında Mikroorganizmaların Gelişimi ve İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları Üzerine bir Araştırma. *Gıda*, 17(5).

- Erginkaya, Z., & Turhan, E. Ü. (2016). Enumeration and Identification of Dominant Microflora during the Fermentation of Shalgam. *Academic Food Journal/Akademik Gıda*, 14(2).
- Erkmen, O. (2011). *Gıda Mikrobiyolojisi*. Ayrıntı Basımevi, Ankara, 107.
- Erten, H., Tanguler, H., & Canbaş, A. (2008). A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: Shalgam (Salgam). *Food Reviews International*, 24(3), 352-359.
- Evren, M., Albayram, C., & Apan, M. (2006). Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler. *Türkiye*, 9, 24-26.
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 31-36.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470.
- Gucer, Y., Aydogdu, H., & Durgun, T. (2009). A traditional Thracian beverage: 'hardaliye'. *Trakia Journal Sciences*, 7, 208-210.
- Güneş, G. (2008). Şalgam suyu üretiminde en uygun siyah havuç (Daucus carota) miktarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. *ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü Yüksek Lisans Tezi*.
- Gürsoy, N. C., & Barış, O. T. L. U. Mikrobiyota Çalışmalarında Moleküler Tanı Yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 56-67.
- Harris, L. J. (1998). The microbiology of vegetable fermentations. In *Microbiology of Fermented Foods* (45-72). Springer, Boston, MA.

- Helling, R. B., Goodman, H. M., & Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R· EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *Journal of Virology*, 14(5), 1235-1244.
- Holzapel H. W., Wood J.B. B. (2014). *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*. Wiley Blackwell, USA.
- Hong, Y., Yang, H. S., Li, J., Han, S. K., Chang, H. C., & Kim, H. Y. (2014). Identification of lactic acid bacteria in salted Chinese cabbage by SDS-PAGE and PCR-DGGE. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 296-300.
- Kaczmarska, I., Reid, C., & Moniz, M. (2007). Diatom taxonomy: morphology, molecules and barcodes. In *Proceedings of the 1st Central-European Diatom meeting* (pp. 69-72). FU-Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem.
- Kabak B ve Dobson AD. 2011. An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 248-260.
- Kaban, G. (2013). Sucuk and pastırma: Microbiological changes and formation of volatile compounds. *Meat Science*, 95(4), 912-918.
- Kahya, S., Buyukcangaz, E., & Carlı, K. T. (2013). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine/Veteriner Fakultesi Dergisi*, 32(1).
- Kılıç, S., 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 451 s.
- Kırca, A., Özkan, M., & Cemeroglu, B. (2006). Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97(4), 598-605.
- Kiers, J. L., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2000). In vitro digestibility of Bacillus fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 163-169.

- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... & Stiekema, W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1990-1995.
- Koç, F., & Boz, P. B. (2011). Herediter Ataksiler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(3), 171-226.
- Koffi-Nevry, R., Ouina, T. S. T., Koussemon, M., & Brou, K. (2011). Chemical composition and lactic microflora of adjuvan, a traditional Ivorian fermented fish condiment. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(4), 332-337.
- Kosikowski, F. V. (1982). Cheddar cheese and related types. *Cheese and fermented milk foods*. 317.
- Kurt, Ş., & Zorba, Ö. (2008). Et ve fermente et ürünlerinde biyojen aminler. *Türkiye*, 10, 21-23.
- Kusmiyati, N., Hidayat, N., & Fatchiyah, F. (2014). Partial Analysis 16S rRNA Gene in *Lactobacillus* spp. from Natural Fermented Milk. *Cukurova Medical Journal*, 39(1), 99-104.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
- Liu, J. R., & Lin, C. W. (2000). Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*, 65(4), 716-719.
- Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., & Travert, J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26(2), 151-159.

- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113-124.
- Marshall, M. N., Cocolin, L., Mills, D. A., & VanderGheynst, J. S. (2003). Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 934-948.
- Martín-Platero, A. M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J., Martínez-Bueno, M. (2009). Polyphasic Study of Microbial Communities of Two Spanish Farmhouse Goats' Milk Cheeses From Sierra De Aracena. *Food Microbiology*, 26 (3), 294-304.
- Masco, L., Huys, G., Gevers, D., Verbruggen, L., & Swings, J. (2003). Identification of Bifidobacterium species using rep-PCR fingerprinting. *Systematic and applied microbiology*, 26(4), 557-563.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., ... & Cheng, G. (2004). Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), 17593-17598.
- Mohkam, M., Nezafat, N., Berenjian, A., Mobasher, M. A., & Ghasemi, Y. (2016). Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, recA, rpoB gene sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1), 8-18.
- Müller, F. M. C., Werner, K. E., Kasai, M., Francesconi, A., Chanock, S. J., Walsh, T. J. (1998). Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), 1625-1629.
- Nenni, M. (2019). HepG2, Caco-2 ve HT-29 Kanser Hücrelerinde 2D Jel Elektroferez ve MALDI-TOF/TOF-MS) ile Ankaferd Hemostat'ın in-Vitro Antineoplastik Etkisinin Proteomik Açısından Araştırılması. (Doktora Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

- Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., & Hautvast, G. J. (1989). Accelerated natural lactic fermentation of infant food formulations. *Food and Nutrition Bulletin*, 11(1), 1-10.
- Nur Akdoğan, F. (2013). *Mycobacterium Tuberculosis Klinik İzolatlarında İlaç Direncinin Multipleks Real-Time PCR Yöntemiyle Saptanması* (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Okcu, G. Y., & Ayhan, K. T. D. *Geleneksel olarak üretilen şalgam suyundan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve fenolik asit dekarboksilaz enzim üreten suşların seçimi* (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı).
- Okcu, G. C. U., Altuntaş, E. G., & Ayhan, K. (2011). Laktik Asit Fermentasyonunda Fenolik Bileşikler ve Önemi. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1(1), 51-64.
- Olofsson, T. C., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, È., & Vásquez, A. (2014). *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 9), 3109.
- Oraman, N., (1968). *Sebze İlimi*. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 323.
- Özer, N., & Çoksöyler, F. N. (2015). Şalgam Suyunun Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri. *Gıda*, 40(1), 31-38.
- Özler, N., & Kılıç, O. (1996). Şalgam suyu üretimi üzerinde araştırmalar. *Gıda*, 21(5).
- Ötleş, S., & Akçiçek, E. (2010). *İçecekler, Beslenme ve Sağlık*. Palme Yayıncılık., Ankara, 235.
- Pamir, M. H. (1961). Boza Üzerinde Mikrobiyolojik ve Kimyasal Araştırmalar. *AÜ Ziraat Fakültesi Yayınları*, (176).

- Pamir, M. H. (1985). *Fermantasyon mikrobiyolojisi*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:936, Ankara, 1.
- Praet, J., Meeus, I., Cnockaert, M., Houf, K., Smagghe, G., & Vandamme, P. (2015). Novel lactic acid bacteria isolated from the bumble bee gut: *Convivina intestini* gen. nov., sp. nov., *Lactobacillus bombicola* sp. nov., and *Weissella bombi* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(5), 1337-1349.
- Reller, LB, Weinstein, MP ve Petti, CA (2007). Mikroorganizmaların gen amplifikasyonu ve sekanslanması ile saptanması ve tanımlanması. *Klinik Bulaşıcı Hastalıklar*, 44 (8), 1108-1114.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second Edition. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1-1, 86.
- Sanchez, G., Tomano, S., Umino, T., Wakabayashi, T., & Sakai, M. (2016). Evaluation of the 5' end of the 16S rRNA gene as a DNA barcode marker for the Cephalopoda. *Fisheries science*, 82(2), 279-288.
- Say, D., & Ballı, E. (2012). Şalgam suyunun (şalgam) özellikleri ve Adana Bölgesi'nin gastronomi turizmindeki önemi, II. *Disiplinlerarası Turizm Araştırmaları Kongresi*, 612-620.
- Seçkin, A. K., & Baladura, E. (2011). Süt ve süt ürünlerinin fonksiyonel özellikleri-functional properties of milk and dairy products. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1), 27-38.
- Serrazanetti, D. I., Ndagijimana, M., Miserochi, C., Perillo, L., & Guerzoni, M. E. (2013). Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties. *Food Control*, 34(2), 336-346.

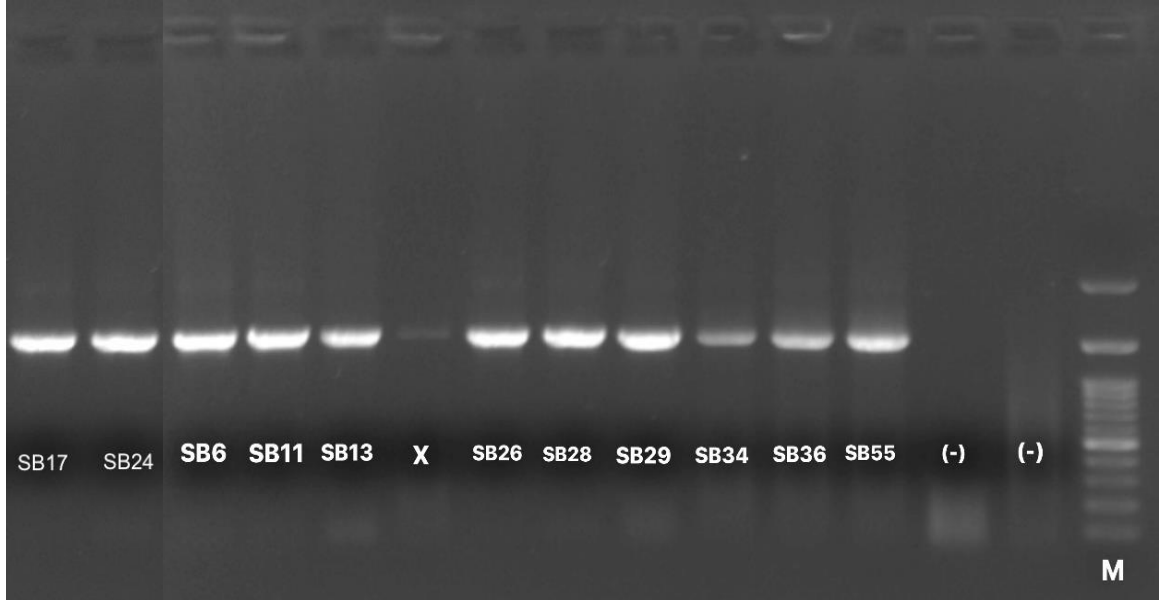
- Shokohi, T., Soteh, M. H., Pouri, Z. S., Hedayati, M. T., & Mayahi, S. (2010). Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian journal of Medical Microbiology*, 28(2), 147.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Şimşekli, N., & Doğan, İ. S. (2015). Geleneksel ve fonksiyonel ürün olarak Maraş tarhanası. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(4), 33-40.
- Tamang, J. P., & Kailasapathy, K. (Eds.). (2010). *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC press, VII.
- Tangüler, H. (2010). Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi*.
- Tanguler, H., & Erten, H. (2012). Chemical and microbiological characteristics of shalgam (şalgam): a traditional turkish lactic acid fermented beverage. *Journal of Food Quality*, 35(4), 298-306.
- Tanguler, H., & Erten, H. (2012). Occurrence and growth of lactic acid bacteria species during the fermentation of shalgam (salgam), a traditional Turkish fermented beverage. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 36-41.
- Tanguler, H., Saris, P. E., & Erten, H. (2015). Microbial, chemical and sensory properties of shalgams made using different production methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1008-1015.

- Tanrıseven, D., Dıblan, S., Selli, S., & Kelebek, H. (2018). Şalgam suyunun üretim yöntemleri ve biyoaktif bileşenleri. *Artıbilim: Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(1), 38-45.
- Tokatlı, M., Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P., & Özçelik, F. (2012). Turşu Üretiminde Laktik Asit Bakterilerinin Önemi. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*.
- Toktaş, B., Bildik, F., & Özçelik, B. (2018). Effect of fermentation on anthocyanin stability and in vitro bioaccessibility during shalgam (şalgam) beverage production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(8), 3066-3075.
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2013). *Biyoteknolojiye giriş*. Palme, Ankara.
- Triana, E., & Nurhidayat, N. (2019). Seleksi dan identifikasi Lactobacillus kandidat probiotik penurun kolesterol berdasarkan analisis sekuen 16S RNA. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 12(1), 55-60.
- Utuş, D. (2008). Şalgam suyu üretiminde kullanılan siyah havuç (Daucus Carota) boyutunun şalgam suyu kalitesi üzerine etkisi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana*.
- Üçer, M. (1984). Sivas' ta Geleneksel Mutfak Kültürü. *Türk Folkloru*, 5(54), 5-8.
- Üçok, E. F., & Tosun, H. (2012). Şalgam suyu üretimi ve fonksiyonel özellikleri. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 17-26.
- Van Burik, J. A., Schreckhise, R. W., White, T. C., Bowden, R. A., & Myerson, D. (1998). Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*, 36(5), 299-303.
- Velioğlu, S. (2000). Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. *Gıda*, 25(3).

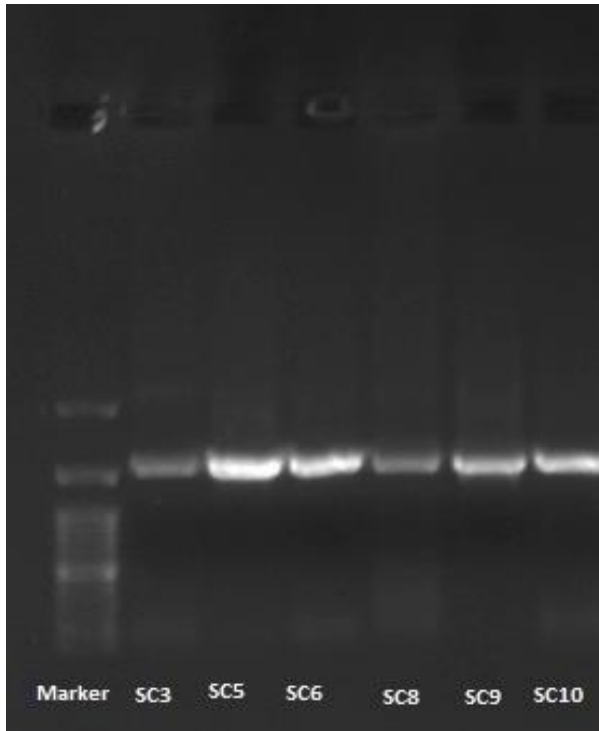
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.
- Yentür, G., & Bayhan, A. (1990). Bazı Gıda Maddelerinde Sorbik Asit ve Benzoik Asit Miktarlarının Araştırılması. *Gıda*, 15(2).
- Yörük, G., & Güner, A. (2011). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve Weissella türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.
- Yüksekdağ, Z. N., & Beyatlı, Y. (2003). Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2), 49-69.
- Zhang, H., & Cai, Y. (2014). *Lactic Acid Bacteria*. Springer, London.
- Wassouf, N. (2014). Açıkta satılan baharatların gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile mikrobiyolojik yönden incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Wood, B. J. B. (2012). *Microbiology of Fermented Foods*. Spinger Sciene & Business Media, Glasgow/UK, 45.

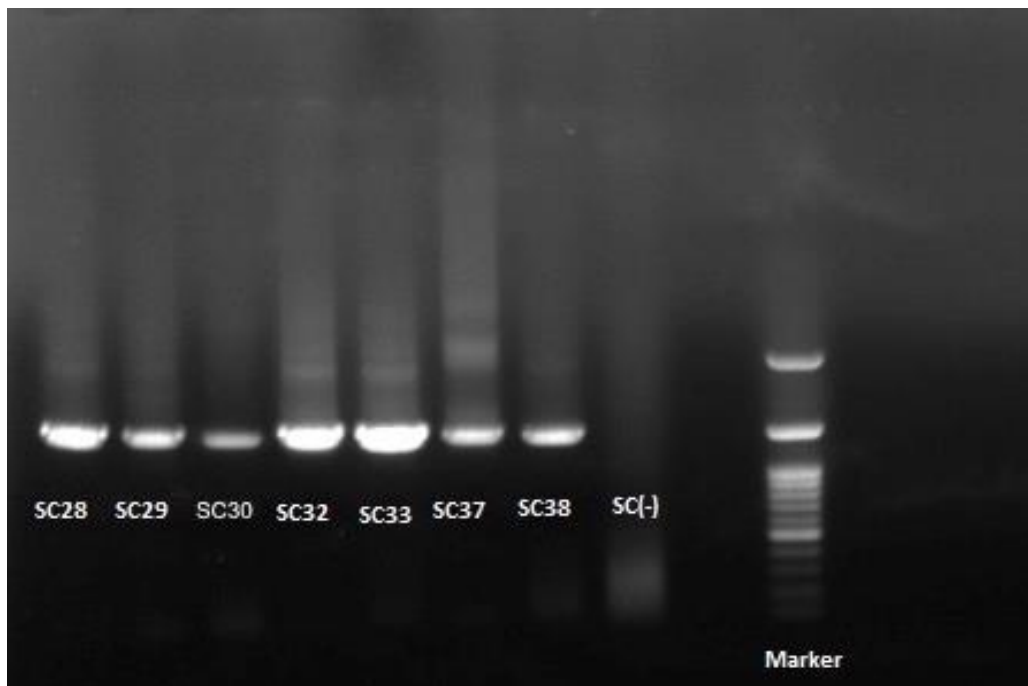
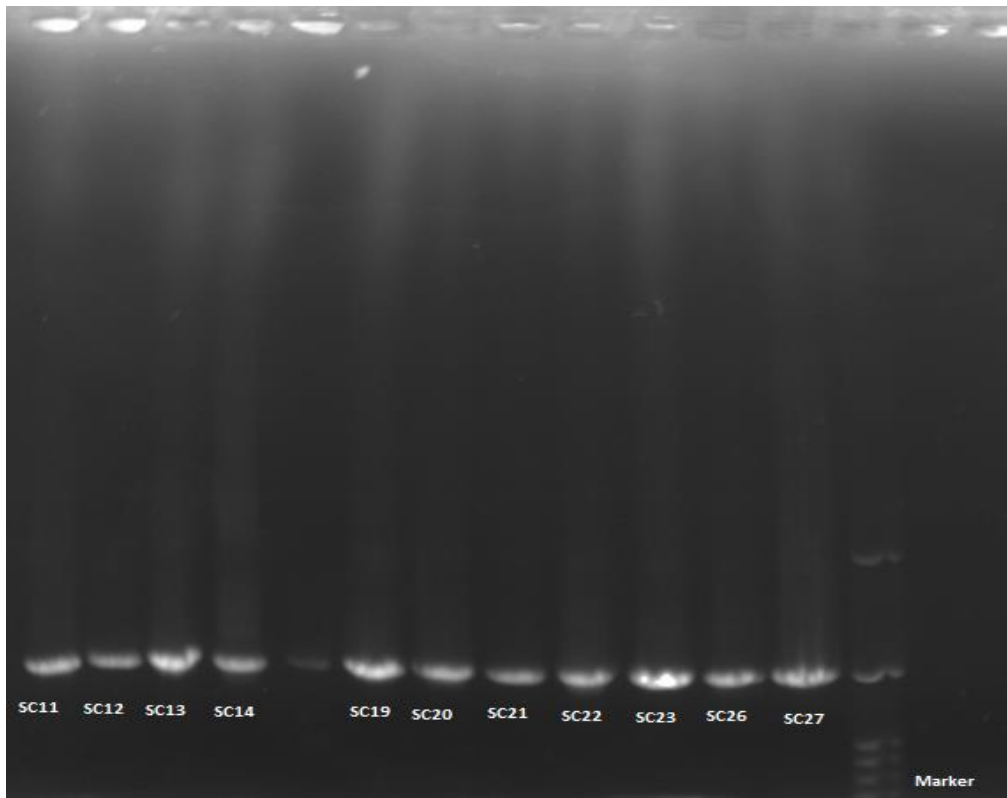
EKLER

EK1: MRS izolatlarının 16S PCR jel elektroforez görüntüleri

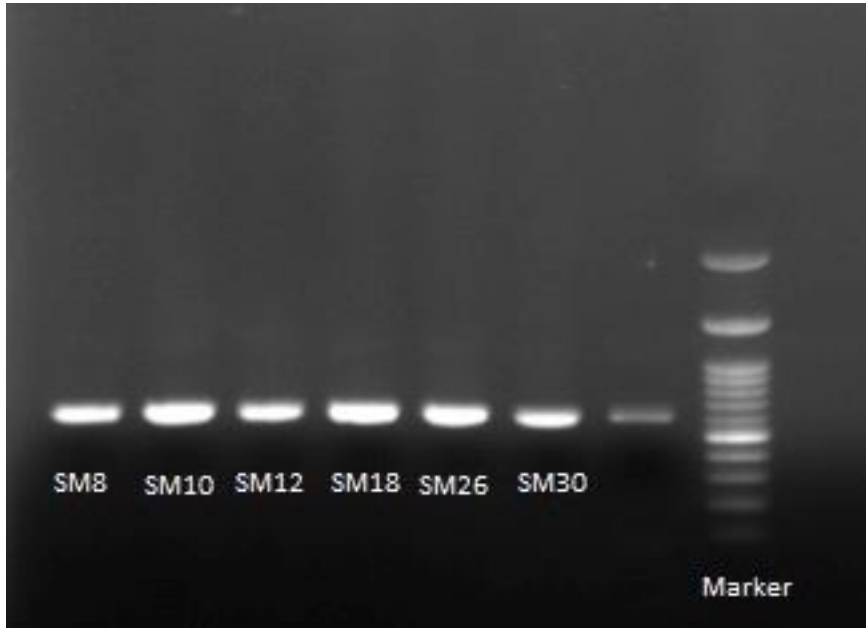


EK2: M17 izolatlarının 16S PCR jel elektroforez görüntüleri





EK3: PDA izolatlarının 16S PCR jel elektroforez görüntüleri



CV

EMİNE SENA KAFKASKIRAY

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad: Emine Sena KAFKASKIRAY

Doğum Tarihi: 09.03.1995

Doğum Yeri: Eminönü/İSTANBUL

Uyruğu: T.C

Medeni Durumu: Bekar

Ehliyet/Veriliş Tarihi: B sınıfı/26.12.2013

Sigara Kullanımı: Yok

Seyahat: Seyahat Engeli Yok

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres: Anafartalar Cad. Oyakkent Sitesi 2. Kısım C-1 Blok Daire: 34,
Başakşehir/İSTANBUL

Cep Telefonu: 0534 363 61 73

E-posta: senakafkaskiray@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2009 - 2013 : Özel MEV Basıncıköy Anadolu Lisesi

2013 - 2017 : İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi / Matematik ve Doğa Bilimleri

Fakültesi / Gıda Mühendisliği Bölümü (Lisans Eğitimi) 2.68/4.00

2017 - 2020 : İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi / Matematik ve Doğa Bilimleri
Fakültesi / Gıda Mühendisliği Bölümü (Yüksek Lisans Eğitimi) 4.00/4.00

PROJELER:

LİSANS TEZİ: Pikan Cevizi Ezmeli Pikan Cevizi Parçalı Çikolatalı Gofret

Tez Tarihi: Mart - Haziran, 2017^[L]_[SEP]

POSTER: Ottoman Sherbets and Their Importance in Terms of Health

Yayınlandığı Yer: IV. International Symposium on Traditional Foods From Adriatic to Caucasus (KKTC)

Yayın Tarihi: Nisan, 2018^[L]_[SEP]

POSTER: Determination of the Microbial Profile of the Traditional Turkish

Fermented Beverage Shalgam During the Fermentation Period

Yayınlandığı yer: FoodMicro Conference Berlin

Yayın Tarihi: Eylül, 2018

Çalışılan Analiz ve Cihazlar: Bakteride DNA izolasyonu, BioRad PCR, BioRad Jel Elektroforez, Nanodropt

YÜKSEK LİSANS TEZİ: Şalgam Suyu Fermantasyon Sürecinin Mikrobiyal Profilinin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi

Çalışılan Analiz ve Cihazlar: Bakteri ve Mayada DNA izolasyonu, BioRad PCR ve Rep-PCR, BioRad Jel Elektroforez, Nanodropt, DNA Saflaştırma

POSTER: Determination of the Microbial Profile of the Traditional Turkish Fermented Beverage Shalgam During the Fermentation Period

Yayınlandığı Yer: 11. Ulusal/1. Uluslararası Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya

Yayın Tarihi: 7-9 Kasım, 2019

İŞ DENEYİMİ

Temmuz 2016 - Ağustos 2016 : Elvan Gıda San. ve Tic. A.Ş.

Pozisyon: Stajyer

Staj İçeriği: Elvan Akademi Proje kapsamında gerçekleştirilen staj, toplamda 5 grup tarafından; her grubun yeni bir ürün tasarlaması ve 2 hafta boyunca Ar-Ge laboratuvarında tasarlanan ürünün, oluşturulan reçete doğrultusunda üretilmesi; pazarlama, satış, maliyet hesaplamalarının yapılması, ambalaj tasarımı da dahil olmak üzere her adım ve aşamanın gruplar tarafından düşünülmesi ve hesap edilmesi ile bunların sunum formatına dönüştürülmesi, ardından jüriye sunulması ve sunum esnasında hazırlanan ürünlerin jüriler tarafından tadılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Akademinin şeker/çikolata/gofret/kek vs. gibi ürünlerin gerçekleştirilmiştir.

Kasım 2017 : İstanbul Halk Ekmek

Pozisyon: Gönüllü Stajyer

YETKİNLİKLER

Bilgisayar: Microsoft Office Programları (İyi Düzeyde)

Sertifikalar:

- OHSAS 18001: İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetimi
- ISO 22000: Gıda Güvenliği Yönetimi
- ISO 9001: Kalite Yönetimi
- ISO 14001: Çevre Yönetim Sistemi
- Temel Hijyen Eğitimi ve Sanitasyon
- KOSGEB Girişimcilik
- İÇ DENETÇİSİ
- İç Denetçi
- Pedagojik Formasyon

Sertifikaları veren kurum: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi