



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ADANA ALPARSLAN TÜRKES BİLİM VE TEKNOLOJİ**  
**ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**ŞALGAM SULARININ AROMASI ÜZERİNE ETKİLİ**  
**MİKROFLORANIN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE**  
**BELİRLENMESİ VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ**

**HALİL EKİCİ**  
**YÜKSEK LİSANS**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ADANA ALPARSLAN TüRKEş BİLİM VE TEKNOLOJİ**  
**ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**şALGAM SULARININ AROMASI ÜZERİNE ETKİLİ**  
**MİKROFLORANIN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE**  
**BELİRLENMESİ VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ**

**HALİL EKİCİ**  
**YÜKSEK LİSANS**

**DANIşMAN**  
**DR. ÖĞR. ÜYESİ PINAR KADİROĞLU KELEBEK**

**ADANA 2019**

**ŞALGAM SULARININ AROMASI ÜZERİNE ETKİLİ MİKROFLORANIN  
YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ VE İSTATİSTİKSEL  
DEĞERLENDİRMESİ**

**Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda  
Mühendisliği Anabilim Dalında Halil EKİCİ tarafından tamamlanan Yüksek Lisans Tezi  
onaylanmıştır.**



Doç. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŞİNT  
Enstitü Müdürü



Prof. Dr. Haşim KELEBEK  
Anabilim Dalı Başkanı



Dr. Öğr. Üyesi Pınar KADİROĞLU KELEBEK  
Danışman

**Tez Jürisi**



Dr. Öğr. Üyesi Pınar KADİROĞLU KELEBEK  
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve  
Teknoloji Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Hande DEMİR  
Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Ali Emrah ÇETİN  
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve  
Teknoloji Üniversitesi

**Tez Savunma Tarihi**

13/06/2019



Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Halil EKİCİ

# ÖZET

## ŞALGAM SULARININ AROMASI ÜZERİNE ETKİLİ MİKROFLORANIN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

Halil EKİCİ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pınar KADİROĞLU KELEBEK

Haziran 2019, 60 sayfa

Şalgam suyu, evlerde, küçük işletmelerde ve endüstriyel düzeyde üretilen kırmızı renkli, ekşi tatta fermente bir içecektir ve siyah havucun laktik asit fermantasyonu sonucunda elde edilmektedir. Bu çalışmada, fermantasyon süresi (20 gün) boyunca belirli aralıklarla alınan şalgam suyu örneklerinde renk, pH, titrasyon asitliği, suda çözünen katı madde miktarı ve mikrobiyolojik sayım analizleri yapılmış ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca, fermantasyon sürecindeki baskın laktik asit bakterisi ve maya-küf tür ve kompozisyonları yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve uçucu aroma bileşikleri profili analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sonucunda pH değerinin ve titrasyon asitliği değerinin sırasıyla 4,24-3,82 ve 4,03-8,33 g/L arasında değiştiği görülmüş, briks değerleri ise süreç boyunca 2,7 olarak ölçülmüştür. Süreç boyunca toplam bakteri sayısının giderek azaldığı, LAB ve maya-küf sayısının ise giderek arttığı görülmüştür. Fermantasyon sürecinde baskın LAB türleri *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* ve *Leuconostoc pseudomesenteroides*; baskın maya-küf türleri ise *S. cerevisiae* ve *C. boidinii* olarak tespit edilmiştir. Uçucu aroma bileşikleri içinde etil alkol en yüksek, fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletıl) ise en düşük konsantrasyona sahiptir.

**Anahtar Sözcükler:** şalgam, yeni nesil dizileme, gerçek zamanlı PZR, uçucu aroma bileşikleri.

# ABSTRACT

## EXPLORING AROMA PRODUCING MICROFLORA IN SHALGAM USING NEXT GENERATION SEQUENCING AND STATISTICAL EVALUATION

Halil EKİCİ

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK

June 2019, 60 pages

Shalgam is a red fermented sour beverage produced in homes, small facilities and industrial plants and obtained by lactic acid fermentation of black carrots. In this study, color, pH, titration acidity, brix, and microbial counts of the shalgam samples were determined and real-time polymerase chain reaction (PCR) method was applied to shalgam samples taken from an industrial şalgam production plant where fermentation process is determined as 20 days. Dominant lactic acid bacteria and yeast-mold species and their composition were determined using next generation sequencing methods and volatile compounds profiles analyses of industrially produced shalgams were performed during fermentation process.

The pH and the titratable acidity values were found to be between 4.24-3.82 and 4.03-8.33 g / L respectively and the brix value was found to be 2.7 throughout the fermentation. It was observed that the total number of bacteria decreased gradually and the number of LAB and fungi increased gradually. The dominant types of LAB in the fermentation process were determined as *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* and dominant fungi species were determined as *S. cerevisiae* and *C. boidinii*. The highest and lowest concentrations in volatile compounds belong to ethyl alcohol and phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) respectively.

**Keywords:** Shalgam, next generation sequencing, real time PCR, volatile flavour compounds.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamda benden bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, ihtiyacım olan her türlü imkan ve kolaylığı sağlayan, sayesinde bir çok yeni şey öğrendiğim ve bana yeni bakış açıları kazandıran danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pınar KADİROĞLU KELEBEK'e;

Ayrıca benden bilgisini, tecrübesini ve maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ali Emrah ÇETİN'e;

Tez çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Kilis 7 Aralık Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölüm başkanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Filiz UÇAN TÜRKMEN'e;

Bütün eğitim ve tez çalışması sürecinde bana her türlü yardımcı olan Arş. Gör. Semih Latif İPEK'e;

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez 17303008 numaralı lisansüstü tez projesi ve 18103017 numaralı bireysel araştırma projesi ile Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Şalgam Suyu.....	4
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	9
2.2.1. PZR Tekniğinin Temel Prensibi.....	10
2.2.2. PZR’da Temel Aşamalar.....	11
2.2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	13
2.3. Yeni Nesil Dizileme (YND).....	15
2.3.1. Illumina platformu.....	16
2.4. Uçucu Aroma Bileşikleri.....	19
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	21
3.1. Şalgam Suyu Üretimi.....	21
3.2. Örneklerin Alınması.....	21
3.3. pH ve Toplam Asitlik Tayini.....	21
3.4. Suda Çözünür Kuru Madde Tayini.....	21
3.5. Renk Ölçümleri.....	21
3.6. Mikroorganizma Sayımı Analizleri.....	22
3.6.1. Koliform Bakteri Sayımı.....	22
3.6.2. Toplam Canlı Bakteri Sayımı.....	22
3.6.3. Laktik Asit Bakterisi Sayımı.....	22
3.6.4. Toplam Maya-Küf Sayımı.....	22
3.7. Örneklerden DNA İzolasyonu.....	22
3.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi.....	23
3.8.1. Gerçek zamanlı PZR analizleri.....	23
3.9. Yeni Nesil Dizileme Analizi.....	25
3.10. Biyoinformatik Analizi.....	25
3.11. Uçucu Aroma Bileşikleri Analizi.....	27

<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	28
<b>4.1. pH, Titrasyon asitliği ve Briks Sonuçları:</b> .....	28
<b>4.2. Şalgam Suyunda Renk Değişimi:</b> .....	28
<b>4.3. Mikroorganizma Sayım Sonuçları:</b> .....	29
<b>4.4. Gerçek Zamanlı PZR Analizi Sonuçları:</b> .....	30
<b>4.5. Biyoinformatik Analiz Sonuçları:</b> .....	34
<b>4.6. Şalgam Suyu Örneklerinin Biyoinformatik Analiz Sonuçlarına Göre İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi:</b> .....	40
<b>4.7. Uçucu Aroma Bileşikleri Analizi Sonuçları:</b> .....	45
<b>5. SONUÇLAR</b> .....	51
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	53
<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	61

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Geleneksel şalgam suyu üretim akış şeması .....	6
Şekil 2.2. Doğrudan şalgam suyu üretimi .....	6
Şekil 2.3. PZR aşamaları .....	10
Şekil 2.4. DNA'nın üstel amplifikasyonu .....	12
Şekil 2.5. Sybr green kullanılarak primer tespiti .....	15
Şekil 2.6. DNA dizileme yöntemleri .....	17
Şekil 2.7. Katı Faz Köprü Amplifikasyonu .....	18
Şekil 2.8. Sentezleme ile Dizileme .....	18
Şekil 4.1. Gen Kopya sayısı formülü .....	30
Şekil 4.2. Toplam Bakteri Gen Kopya Sayısı Değişimi .....	31
Şekil 4.3. Laktik Asit Bakterisi Gen Kopya Sayısı Değişimi .....	32
Şekil 4.4. Küf-Maya Gen Kopya Sayısı Değişimi .....	33
Şekil 4.5. Bakteri popülasyonları Bray-Curtis farklılığı .....	40
Şekil 4.6. Küf-maya popülasyonları Bray-Curtis farklılığı .....	40
Şekil 4.7. Bakteri popülasyonları Jaccard Mesafesi .....	41
Şekil 4.8. Küf-maya popülasyonları Jaccard Mesafesi .....	42
Şekil 4.9. Bakteri Ağırlıksız (Unweighted) Unifrac mesafesi .....	43
Şekil 4.10. Küf-maya Ağırlıksız (Unweighted) Unifrac mesafesi .....	43
Şekil 4.11. Bakteri Ağırlıklı (Weighed) Unifrac mesafesi .....	44
Şekil 4.12. Küf-maya Ağırlıklı (Weighed) Unifrac mesafesi .....	44
Şekil 4.13. 3.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu .....	46
Şekil 4.14. 7.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu .....	46
Şekil 4.15. 10.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu .....	47
Şekil 4.16. 13.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu .....	47
Şekil 4.17. 17.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu .....	48
Şekil 4.18. 20.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu .....	48

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Şalgam Suyunun Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	9
<b>Tablo 2.2.</b> Termostabil DNA Polimeraz ve Kaynakları .....	11
<b>Tablo 4.1.</b> pH, Laktik Asit Cinsinden Titrasyon Asitliği ve Briks Sonuçları.....	28
<b>Tablo 4.2.</b> Renk Ölçümü Sonuçları .....	29
<b>Tablo 4.3.</b> Canlı Mikrorganizma Sayım Sonuçları (log KOB/mL).....	30
<b>Tablo 4.4.</b> Küf-Maya Dağılımı 3-7.Gün.....	34
<b>Tablo 4.5.</b> Küf-Maya Dağılımı 10-13.Gün.....	35
<b>Tablo 4.6.</b> Küf-Maya Dağılımı 17-20.Gün.....	36
<b>Tablo 4.7.</b> Bakteri Dağılımı 3-7.Gün.....	37
<b>Tablo 4.8.</b> Bakteri Dağılımı 10-13.Gün.....	38
<b>Tablo 4.9.</b> Bakteri Dağılımı 17-20.Gün.....	39
<b>Tablo 4.10.</b> Uçucu Aroma Bileşiklerinin Günlere Göre Değişimi .....	50

## KISALTMALAR

$\mu\text{g}$	: mikrogram
ng	: nanogram
$\mu\text{L}$	: mikrolitre
gz-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
YND	: Yeni Nesil Dizileme
SPME	: Katı Faz Mikroekstraksiyon (Solid Phase Microextraction)
GC	: Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)
MS	: Kütle Spektrometrisi (Mass Spectrometry)
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
LAB	: Laktik Asit Bakterisi
Bp	: Baz çifti (Base pair)
HS-SPME	: Üst Boşluklu Katı Faz Mikroekstraksiyon (Headspace Solid-phase Microextraction)
DI-SPME	: Doğrudan Enjeksiyonlu Katı Faz Mikroekstraksiyon (Direct Injection Solid-phase Microextraction)

# 1. GİRİŞ

Gıdalar bakteri, maya-küf ve virüslerden oluşan karmaşık mikrobiyal topluluklara sahiptir. Bu mikroorganizmaların bazıları gıdanın reolojik ve duyuşal yapısını etkilemek suretiyle teknolojik öneme sahiptir. Gıda ile ilişkili mikroflora kompozisyonunun belirlenmesinde genel olarak kültürel yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler mikroorganizmaların tanımlaması öncesinde geliştirilmesi ve izolasyonuna dayanmaktadır. Fakat bu yöntemlerle gıdalar dâhil birçok mikrobiyal ekosistemin doğru tanımlanabilmesi mümkün olmamaktadır. Mikroorganizmaların seçici izolasyonu laboratuvar ortamında bilinmeyen büyüme faktörleri ve-veya büyüme koşulları gerektirebilmektedir. Gıdaların ayrıca düşük pH ve su aktivitesine sahip olması, uygun olmayan koşullar altında saklanması gibi mikroorganizmaların fizyolojik olarak canlı ancak kültür edilemeyecek durumda olmasına sebep olabilirler. Ayrıca mikroorganizmaların gelişiminin yavaş olması ortamda baskın mikroorganizmalar tarafından baskılanmasına neden olabilir ve bu da kültürel yöntemlerle tespit edilmesini zorlaştırabilir. İşte bu gibi sebeplerden dolayı kültürel yöntemler ile mikrofloranın doğru olarak tanımlanması güçtür (Smit ve Smit, 2005).

Kültürel olmayan yöntemler ise genellikle mikrobiyal nükleik asit dizilerinin analizini temel almaktadır. Bu yöntemler nükleik asitlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ilkesine dayanmaktadır. Bu amplifikasyon yöntemlerinin önemli bir kısmı rRNA gen bölgesini hedef almaktadır. Elde edilen dizilerin birbirleri ile veya veri tabanları ile karşılaştırılması mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişkinin ortaya çıkarılmasına olanak sağlamaktadır. PZR tabanlı yöntemlere gerçek zamanlı nitel PZR yöntemi, denature gradient jel elektroforezi, sıcaklık gradient jel elektroforezi gibi yöntemler örnek gösterilebilir. Yeni nesil dizileme (YND) yöntemleri ise çok sayıda çıktıya sahip, genomik, metagenomik, transkriptomik ve metatranskriptomik gibi yeni teknolojilerin gelişmesine olanak sağlamıştır. YND yöntemleri diğer nükleik asit temelli yöntemlere oranla çok daha fazla sayıda dizinin daha kısa sürede analiz edilmesine ve böylece mikrobiyal ekosistemlerin derinlemesine incelenmesine imkân sağlamaktadır. YND yöntemi başlıca iki farklı yolla kullanılmaktadır; Bunlar, toplam mikrobiyal nükleik asitin dizilenmesi (shotgun sequencing) ve gen-spesifik dizilemedir (target-sequencing) (Mayo ve ark., 2014).

Şalgam suyu, kırmızı renkli, ekşi tatta, istenirse acı olarak da hazırlanabilen ülkemize özgü ve Türkiye'nin her tarafında tüketilen bir içecektir ve siyah havucun laktik asit fermantasyonu sonucunda elde edilmektedir. Şalgam suyu evlerde, küçük işletmelerde ve endüstriyel düzeyde üretilmektedir. Şalgam suyunun endüstriyel üretimi olmakla birlikte, işletmelerde standart bir üretim tekniği bulunmamaktadır. Ticari olarak şalgam suyu üretimi geleneksel üretim (hamur fermantasyonu ve havuç fermantasyonu) ve hamur fermantasyonu uygulanmadan yapılan doğrudan üretim olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır (Üçok ve Tosun, 2012).

Şalgam suyunun başlıca hammaddesi siyah havuç (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens*) olup, bununla birlikte ekşi hamur, bulgur unu, kaya tuzu ve içme suyu kullanılmaktadır. Şalgamın kendine has rengi, başlıca hammaddesi olan kırmızı havuçta bulunan antosiyanin maddeleri tarafından verilmektedir (Canbaş ve ark., 2008). Üretimde kullanılan ekşi hamur, ekme mayasının bir süre oda sıcaklığında bekletilmesi ile elde edilmektedir. Bulgur unu ise, bulgur üretim sürecinde kaynatılmış, kurutulmuş ve dış kabukları ayrılmış buğdayın kırılması esnasında oluşan kısmıdır (Necla Aran, 2012). İçeceği adını veren şalgam (*Brassica rapa*) isteğe bağlı olarak katılabilmektedir.

Şalgam suyuna baskın ekşi tadını fermantasyon sürecinde laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit vermektedir. Laktik asit bakterilerini, morfolojik, metabolik ve fizyolojik yönden benzerlik gösteren gram pozitif bakteriler oluşturmaktadır. Bunlar spor oluşturmeyen, respirasyon yapmayan ancak oksijene toleranslı, yuvarlak (cocci) veya çubuk (rod) şekilli, karbonhidratların fermantasyonu sonucunda laktik asit oluşturan bakterilerdir. Kendilerine has katalaz enzimine ve sitokroma sahip değildirler. Mevcut taksonomik sınıflandırmaya göre *Firmicutes* filumu, *Bacilli* sınıfı *Lactobacillales* grubuna aittirler. Farklı familyalar *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* ve *Streptococcaceae* gruplarını içermektedir (Lahtinen ve ark., 2011). Şalgam suyunda baskın laktik asit bakterileri ise *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* olarak belirlenmiştir (Tangüler ve Erten, 2012b). Şalgam fermantasyonu sürecinde laktik asit bakterilerinin yanı sıra mayalar da rol oynamaktadır; ancak mayaların rolü tam olarak incelenmemiştir.

Son yıllarda, gıdalarda bulunan mikrofloranın belirlenmesinde, moleküler yöntemler giderek geliştirilmiş ve hızlı sonuç elde etme gereksiniminden dolayı tercih edilir hale gelmişlerdir. Bu yöntemler genel olarak hedefe ait spesifik DNA veya RNA diziliminin çoğaltılması (amplification) işlemine dayanmaktadır. PZR nükleik asit temelli yöntemler arasında en yaygın kullanılan yöntemdir (Ceuppens ve ark., 2014). PZR, DNA kompleks havuzundan spesifik bir DNA parçasını çoğaltmaya olanak sağlayan basit, etkin ve özellikle moleküler biyoloji alanında sıklıkla kullanılan enzimatik bir yöntemdir. Kısaca, bu yöntem hedef bir gen ya da DNA bölgesinin, uç bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığıyla bir dizi replikasyon geçirerek çoğaltılması (amplifikasyon) esasına dayanır. Bu çalışmada Şalgam suyu üretim sürecinde gelişen mikroorganizmaların 16S rRNA gen bölgesini çoğaltan universal bakteri ve küf-maya spesifik primerler kullanılarak mikroorganizmaların tanımlamaları yapılmış ve fermantasyon süresindeki gelişimleri izlenmiştir.

Bu çalışmada, endüstriyel olarak üretilen şalgam suyunda aroma üreten mikrobiyotanın incelenmesi; yani aromatik bileşiklerin üretimi ile fermantasyon süreci içerisinde şalgam suyunda gelişen mikroorganizmalar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaçla endüstriyel olarak üretilen şalgam suyundan fermantasyon sürecinde belirli aralıklarla örnekler alınmış ve bu örneklerin mikroflora analizi GZ-PZR ve YND ile birlikte 16S rRNA metagenomik analizi kullanılarak yapılmıştır. Bununla birlikte bu örneklerin uçucu aroma profilleri de SPME GC-MS yöntemiyle belirlenmiştir. 16S rRNA metagenomik analizi ve endüstriyel olarak üretilen şalgam sularından numune alınarak yapılmış aroma profili ve mikrobiyolojik analizlerin yer aldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma ile endüstriyel şalgam suyu üretiminde fermantasyon sürecinde rol oynayan mikroflora ve aroma bileşikleri oluşumu arasındaki ilişki kapsamlı olarak ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Şalgam Suyu

Fermantasyon terimi, İngilizce “fermentation” sözcüğünden dilimize geçmiş olup, “fermentation” ise Latince fervere; kaynamak fiilinden türetilmiş ve bu fiil mayaların meyve ekstraktları ve tahıl maltı üzerindeki aktivitesini tarif etmektedir. Fermantasyonun biyokimya tanımı organik bileşiklerin katabolizması sonucu enerji açığa çıkması ile ilişkilidir (Stanbury ve ark., 2016).

Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit fermantasyonu ile heksozlar için iki temel fermentatif yol bulunmaktadır. Homofermentatif yol glikolize bağlı olup son ürün olarak sadece laktik asit üretilmektedir. Heterofermentatif veya heterolaktik fermentasyon sonucunda laktik asitin yanısıra önemli miktarda etanol, karbondioksit ve asetat üretilmektedir. (Lahtinen ve ark., 2011).

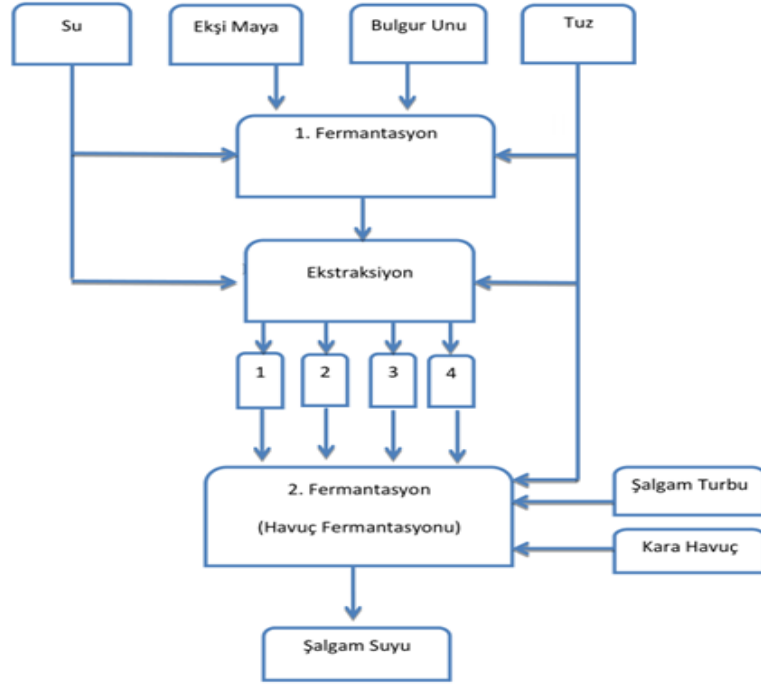
Şalgam suyu laktik asit fermantasyonu ile elde edilen, kırmızı renkli ekşi veya acı tatta tüketilen ülkemize özgü bir içecektir. Başta Adana olmak üzere, Mersin, Hatay, Osmaniye ve Kahramanmaraş illerinde ve bu illere bağlı ilçelerde yaygın olarak tüketilmektedir. Ayrıca İstanbul, Ankara ve İzmir gibi büyük şehirlerde de tüketilmeye başlamıştır. Şalgam suyu üretiminde kullanılan hammaddeler siyah havuç, ekşi hamur, bulgur unu, tuz, şalgam ve sudur (Erten ve ark., 2008). Toplam fermantasyon süresi yaklaşık 2-4 hafta sürmektedir. (Üçok ve Tosun, 2012).

Siyah havuç (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* alef.) şalgam suyu üretiminde kullanılan başlıca hammaddedir. Şalgam suyunun kırmızı rengini siyah havuçta bulunan antosiyanin maddeleri oluşturmaktadır (Erten ve ark., 2008). Siyah havuçta fermente olabilir şeker miktarı % 5,1 ile % 6,5 arasında değişmektedir. Bu şekerler sakkaroz, glikoz ve früktozdur (Kammerer ve ark., 2004).

Genel olarak şalgam suyu üretiminde fermantasyon, sebzelerde bulunan doğal mikroflora kullanılarak spontane olarak veya starter kültür ilave edilerek kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Şalgam suyu üretiminde kullanılan ekşi hamur, ekme mayasının

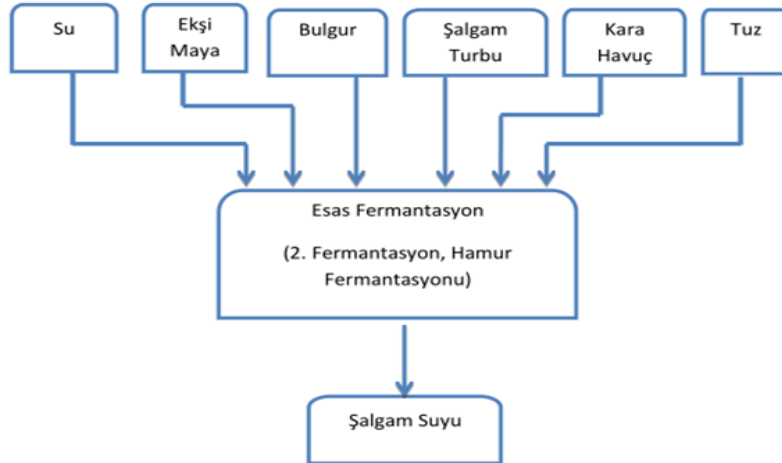
(*Saccharomyces cerevisiae*) oda sıcaklığında birkaç saat veya bir gece kadar bekletilmesi ile elde edilir. Bulgur unu, bulgur üretimi esnasında işlenmek üzere kaynatılmış ve kurutulmuş buğdayın dış kabukları ayrıldıktan sonra kırma haline getirilmesi sırasında oluşan ve elek altındaki kısmı olup kırma haline getirilen tanenin % 2-3'lük kısmını oluşturur. Bulgur unu ağırlıkça % 4,4-5,8 oranında nişasta içerir. Üretimde rafine edilmemiş kaya tuzu kullanılır. Temin edilebilirliğine bağlı olarak diğer hammaddelerden şalgam turpu da bazı işletmeler tarafından şalgam suyu üretiminde kullanılmaktadır. Şalgam (*Brassica tupa*) turpgiller (*Brassicaceae*) familyasına ait bir bitki türüdür. Şalgamda fermente olabilir şekerlerden glikoz % 1,41, früktoz % 1,10, sakkaroz ise % 0,21 oranında bulunmaktadır. (Necla Aran, 2012).

Şalgam suyu evlerde, küçük işletmelerde ve endüstriyel düzeyde üretilmektedir. Ancak büyük işletmelerde standart bir üretim tekniği bulunmamaktadır. Ticari olarak şalgam suyu üretimi geleneksel üretim (hamur fermantasyonu ve havuç fermantasyonu) ve hamur fermantasyonu uygulanmadan yapılan doğrudan üretim olmak üzere iki şekilde olmaktadır. Geleneksel yöntem I. fermantasyon ve II. fermantasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilir (Şekil 2.1). İlk aşamada % 3 bulgur unu, % 0,2 ekşitilmiş maya karışımı, üzerlerine su ilave edilerek yoğrulur ve hamur kıvamına getirilir. Bu karışım oda koşullarında 3-5 gün süre ile fermantasyona bırakılır, bu süre sonunda hamur su ile birkaç kez ekstrakte edilir. I. fermantasyondan elde edilen ekstrat, II. Fermantasyonu gerçekleştirmek için fermantasyon tankına aktarılır ve tanka ayrıca %10-20 oranında temizlenmiş ve doğranmış siyah havuç, yaklaşık % 1 oranında tuz ve arzu edilirse doğranmış şalgam ilave edilerek tank dolum seviyesine gelene kadar su eklenir ve oda koşullarında fermantasyona bırakılır. Fermantasyon sıcaklığı mevsime göre 10-35°C'ler arasında değişir. Fermantasyon sırasında, renk maddeleri, antosiyaninler, şalgam suyuna geçerler ve ürünün kendine has kırmızı rengini verirler. Şalgam suyunun ekşi tadını fermantasyon sonucu oluşan laktik asit vermektedir. Fermantasyon sonunda acı biber eklenerek acı şalgam elde edilebilir. Şalgam suyuna genelde süzme uygulanmaz, tortusundan uzaklaştırılan ürün plastik ve cam şişelerde satışı sunulur (Canbaş ve Deryaoğlu, 1993).



**Şekil 2.1.** Geleneksel yöntemle, 4 kez ekstrakte edilerek üretilen şalgam suyu üretim akış şeması (Üçok ve Tosun, 2012)

Doğrudan şalgam suyu üretiminin (Şekil 2.2) geleneksel yöntemden farkı, I. fermentasyonun yapılmamasıdır (hamur fermentasyonu). Bu üretimde sadece II. fermentasyon yani havuç fermentasyonu veya esas fermentasyon söz konusudur. Fermantasyon tankına % 10-20 oranında doğranmış siyah havuç, % 3 bulgur unu, % 1,2 tuz, % 1 doğranmış şalgam ve % 0,2 ekme mayası veya ekşi hamur ve su ilave edilerek oda sıcaklığında fermentasyona bırakılır (Erten ve ark., 2008).



**Şekil 2.2.** Doğrudan şalgam suyu üretimi (Üçok ve Tosun, 2012)

Şalgam suyunun mikrobiyolojisi karmaşık olup detaylı olarak bilinmemektedir. Fermentasyon doğal olarak gerçekleşmekte ve ağırlıklı olarak laktik asit bakterileri ve maya içermektedir. Şalgam suyu fermentasyonu hammaddelerde bulunan, şalgam suyunun üretilip bekletildiği tanklar üzerinde bulunan ve ekşi hamur ile gelen mikrofloraya bağlıdır (Tangüler ve Erten, 2012a).

Tangüler ve Erten (2012a) bazı ticari şalgam sularının mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerini belirledikleri çalışmada şalgam suyunun fermantasyonunun başlangıcında baskın mikroflorayı laktik asit bakterilerinin oluşturduğu sonucuna ulaşmış ve toplamda 135 farklı izolat elde etmiştir. Bu çalışma sonucunda tespit edilen türler *Lactobacillus Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. pentosus*, *Lb. buchneri*, *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*; *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*; *Lb. fermentum*; *Pediococcus* spp.; *Leuconostoc* (*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*; *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*; *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Lb. plantarum*; *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* ve *Lb. delbrueckii* olup bu izolatlardan 121 tanesi çubuk şekilli, 63 izolat glukozdan gaz üreten, 49 izolat arjinini hidroliz eden, 6 izolat nitrat kullanan, 59 izolat asetonin pozitif, 98 izolat MR-VP pozitif, 100 izolat % 6,5 NaCl konsantrasyonu içinde büyüeyebilen ve hiçbirisi % 18 NaCl konsantrasyonu içinde büyüemeyen olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada laktik asit bakterilerinin % 89,63'ünün *Lactobacillus*, % 9,63'ünün *Leuconostoc*, % 0,74'ünün ise *Pediococcus* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Tangüler ve Erten (2012b) diğer çalışmada ise LAB arasında *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*'nin baskın türler olduğunu belirlemiştir. *L. plantarum*, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. brevis*, *Lactobacillus buchneri* ve *Pediococcus pentosaceus* suşlarının ise fermantasyon sürecinin her aşamasında şalgam türüne bağlı olarak belirlendiğini göstermiştir. Öbür taraftan *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ve *P. pentosaceus* türleri ise ikinci fermantasyonun başlangıcında tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin yanı sıra mayaların da fermantasyon sürecinde rol aldığı bilinmektedir. Ancak *Saccharomyces* ve *Saccharomyces* olmayan türlerinin sürece olan katkısı tam olarak açığa kavuşturulmamıştır. Tangüler ve Erten (2012b) farklı üretim teknikleri ile üretilen şalgam suyu örneklerini değerlendirdikleri çalışmada en fazla izole edilen suşlar sırası ile *Lactobacillus plantarum* ve *Lb. buchneri*'dir. Diğer izole edilen suşlar ise şunlardır: *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*; *P. pentosaceus*; *Lb. casei*; *Lb. pentosus*; *Lb. brevis* ve *Lb. parabuchneri*'dir.

Başer ve arkadaşları (2012) şalgam suyundaki baskın mikroflorayı 16S rRNA yöntemi ile belirledikleri çalışma sonucunda birçok suş tanımlamışlardır. Bunlar: *L. casei* ATCC 334, *L. casei*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. plantarum plantarum* ATCC 14917, *Lactobacillus plantarum* ssp. *plantarum* ST-III chromosome, *L. plantarum* JDM1, *L. plantarum* ssp., *L. plantarum* ssp. *argenteratensis*, *L. acidophilus*, *L. brevis* ATCC 367, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. helveticus* DSM 20075, *Lactobacillus helveticus* DPC 4571, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. paracasei* ssp. *tolerans*, *L. parabrevis*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *indicus*, *L. gasseri* ve *L. sharpeae*'dir.

Bircan (2013) şalgam suyundan izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin RAPD-PCR ve jel agaroz elektroforezi kullanılarak karakterizasyonu ve bunların starter kültür olarak kullanılma potansiyellerini belirlediği çalışmasında 72 izolat elde etmiş ve bu 72 adet LAB'ın % 25' i *Lb. brevis*, % 23' ü *Lb. buhneri*, % 18'i *Lb. plantarum*, % 15 i *Lb. fermentum*, % 8'i *Leu. mesenteroides*, % 7'si *Lb. casei*, % 3'ü *Lb. paralimentarius* ve % 1'i *Lb. casei/paracasei* olarak tanımlamıştır.

Samantır (2014) şalgam suyundan izole ettiği laktik asit bakterilerinden elde ettiği DNA örneklerinin 16S rRNA gen bölgesini spesifik primerler kullanılarak PZR ile çoğalttığı ve Sanger dizileme ile tanımlama yaptığı çalışmasında *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* suşlarını tanımlamıştır.

Okçu ve arkadaşlarının (2016) şalgam suyundaki LAB tarafından üretilen fenolik asit ve dekarboksilaz bileşiklerini inceledikleri çalışmada izole ettikleri 21 LAB suşunun 4 tanesini *Leuconostoc mesenteroides*, 6 tanesini *Lb. plantarum*, bir tanesini *Lactobacillus helveticus-Lactobacillus acidophilus*, bir tanesini *Lb. plantarum-Lb. acidophilus* ve bir tanesini *Lactobacillus casei-Lactobacillus paracasei* olarak tanımlamışlardır.

Şalgam suyu hem homofermantatif hem heterofermantatif laktik asit bakterileri içermektedir. Mikrobiyotaya bağlı olarak, fermantasyonun ana ürünleri laktik asit, asetik asit, etanol (az miktarda) ve uçucu asitler, yüksek alkoller, esterler, terpenoller, norisoprenoidler, laktonlar ve uçucu fenoller gibi uçucu aroma bileşikleridir (Canbaş ve Deryaoğlu, 1993; Tangüler ve Erten

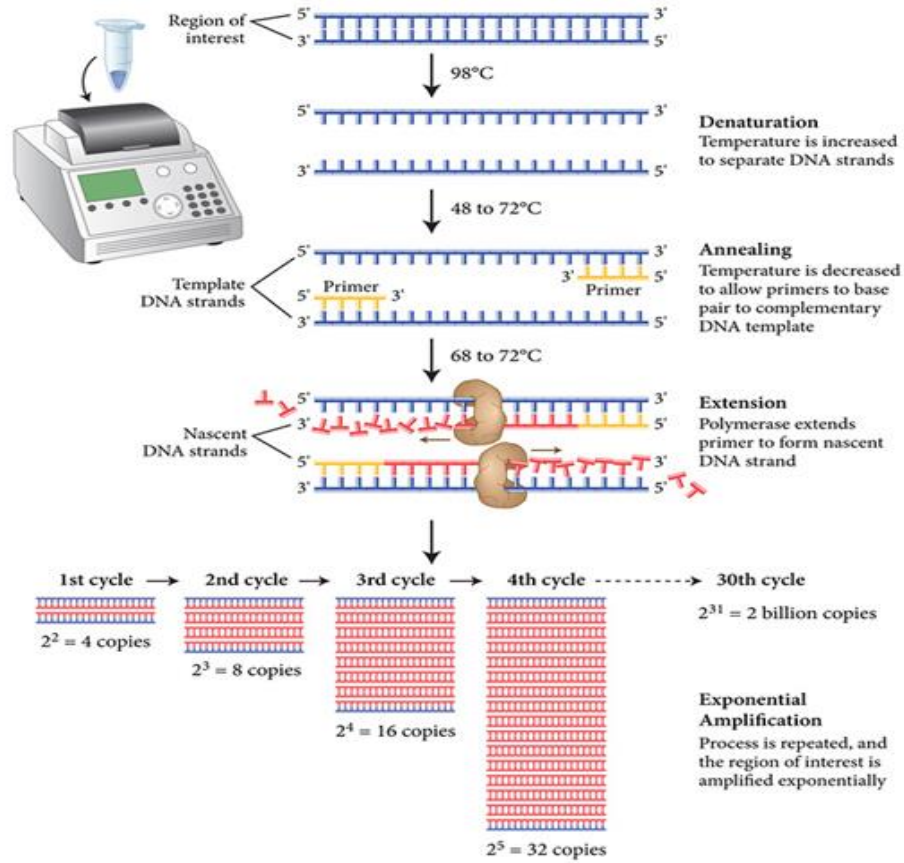
2012c). Erten ve arkadaşlarının şalgam suyu ve üretimi hakkında yaptıkları çalışmada belirttikleri şalgam suyunun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Şalgam Suyunun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Erten ve ark., 2008)

	<b>En Düşük</b>	<b>En Yüksek</b>	<b>Ortalama</b>
<b>Laktik asit cinsinden toplam asitlik (g/L)</b>	5,94	8,91	7,11
<b>pH</b>	3,33	3,67	3,49
<b>Asetik asit cinsinden uçucu asitlik (g/L)</b>	0,57	1,16	0,89
<b>Alkol (g/L)</b>	1,32	6,41	3,64
<b>Toplam Katı Madde (g/L)</b>	22,9	29,2	26,0
<b>Protein (g/L)</b>	0,88	1,83	1,25
<b>Kül (g/L)</b>	14,6	20,65	17,25
<b>Tuz (%)</b>	1,37	1,97	1,63
<b>Karbondioksit (g/L)</b>	0,44	0,79	0,74
<b>Renk İndeksi</b>	71	131	102
<b>Syanidin-3-glikozit cinsinden antosiyanin (mg/L)</b>	88,3	134,6	114,1

## 2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), DNA havuzundan istenilen hedef bir parçayı çoğaltmaya yarayan enzimatik bir işlemdir. PZR işlemi bir DNA parçasının üstel olarak çoğaltılmasından oluşmaktadır ve prensibi *in vivo* DNA replikasyonuna dayanmaktadır. Bu işlem sırasında çift sarmallı DNA denature edilerek tek iplikçikler haline getirilmekte, enzimatik olarak çoğaltılmakta ve bu işlem döngü halinde sürdürülmektedir. İlk aşamada yani denatürasyon aşamasında çift sarmallı DNA iplikçikleri birbirinden ayrılmaktadır. Denatürasyon işlemi için sıcaklık genellikle 93-96 °C’ye yükseltilerek hidrojen bağlarının kırılması sağlanarak baz çiftleri birbirinden ayrılır. İkinci aşamada (annealing) sıcaklık 37-65°C’ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye bağlanması sağlanır. Üçüncü aşamada sıcaklık 72°C’ye yükseltilerek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi kullanılarak primerlerin bağlanmış olduğu noktadan DNA zincirinin uzaması sağlanır (Lázaro ve ark., 2013).



Şekil 2.3. PZR aşamaları (Lazaro ve ark., 2013)

### 2.2.1. PZR Tekniğinin Temel Prensipleri

PZR tekniği, ilk olarak 1980'li yıllarda Cetus firması araştırmacıları tarafından genetik hastalıkların teşhisi için kullanılmıştır. Bu teknikte kalıp olarak kullanılan tek ya da çift zincirli DNA molekülüne ilave olarak, iki oligonükleotid primer, dNTP (deoksiribonükleozidtrifosfat), ısıya dayanıklı polimeraz enzimi ve tampon içerisindeki magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyulur (Ma ve ark., 2006). Primerler, hedef DNA'nın bilinen sekanslarına komplementer olarak önceden sentezlenmiş ortalama 20 baz çifti (bp) uzunluğunda olan spesifik oligonükleotid zincirleridir. Bu primerler ampifikasyon sırasında DNA dizisine bağlanmaktadır. dNTP olarak dATP (deoksiadenozintrifosfat), dGTP (deoksiguanozintrifosfat), dCTP (deoksisitozintrifosfat), ve dTTPm (deoksitimidintrifosfat) kullanılır. DNA polimeraz enzimi olarak *Thermus aquaticus* adı verilen bir termofilik bakteri türünden elde edilen *Taq* polimeraz kullanılmaktadır. Bu enzimin özelliği termostabil olmasıdır. Bu durum, enzimin her döngüde eklenme gereğini ortadan kaldırarak reaksiyonun otomasyonunu kolaylaştırmıştır. Böylece tekniğin, spesifitesi, hassasiyeti ve verimi yüksek

oranda artırılabilmiştir. Ayrıca, *Taq* DNA polimeraz enzimi, önceden kullanılan termostabil enzimlere oranla daha uzun DNA fragmanlarının amplifikasyonuna izin vermektedir (Eisenstein, 1990). Tablo 2.2.'de farklı kaynaklardan elde edilen doğal veya rekombinant DNA polimeraz enzimleri verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Termostabil DNA polimeraz ve kaynakları (Kubista ve ark., 2006)

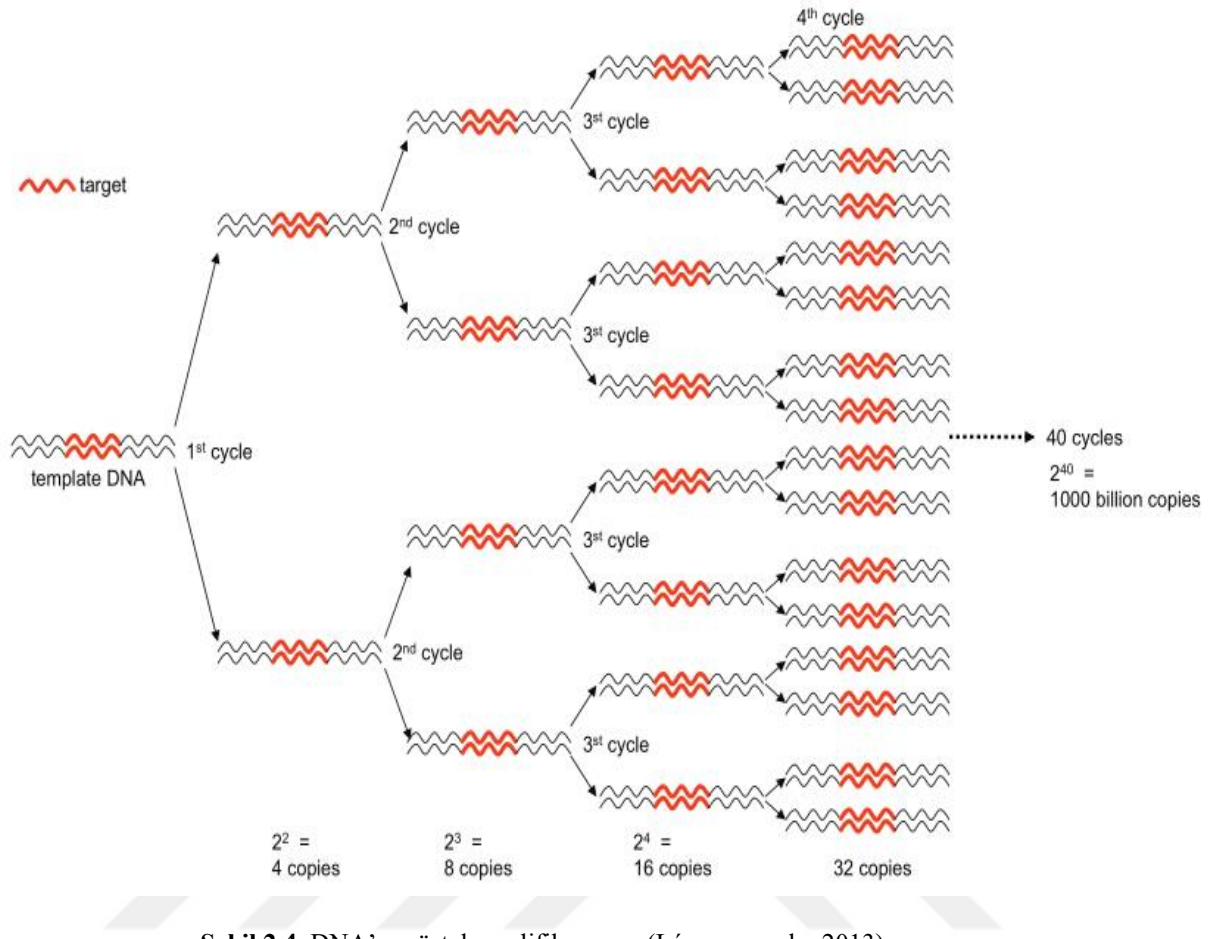
DNA Polimeraz	Doğal / Rekombinant	Kaynak
<i>Taq</i>	Doğal	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Amplitaq</i>	Rekombinant	<i>T. aquaticus</i>
<i>Amplitaq (stoffel fragment)</i>	Rekombinant	<i>T. aquaticus</i>
<i>Hottub</i>	Doğal	<i>Thermus flavis</i>
<i>Pyrostase</i>	Doğal	<i>T. flavis</i>
<i>Vent</i>	Rekombinant	<i>Thermococcus litoralis</i>
<i>DeepVent</i>	Rekombinant	<i>Pyrococcus GB-D</i>
<i>Tth</i>	Rekombinant	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Pfu</i>	Doğal	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>UITma</i>	Rekombinant	<i>Thermotoga maritima</i>

PZR yöntemi, kısaca hedef bir gen ya da DNA bölgesinin, uç bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığıyla bir dizi replikasyon geçirerek çoğaltılması (amplifikasyon) esasına dayanır. PZR için mutlaka saf DNA gerekli değildir. Hücre özütü, toplam DNA preparatı hatta bir kan damlası bile başarılı bir PZR için başlangıç materyali olabilir. Bir döngü sonucunda ilk başta “n” sayıdaki DNA zincir sayısı  $2n$ 'e yükselir. Döngüler arka arkaya birçok kez tekrarlanırken her bir döngüde ortaya çıkan ürün, bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanıldığı için her döngüde hedef DNA parçasının miktarı ikiye katlanır. Böylece çok az miktarda DNA'nın kısa zamanda milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını elde etmek mümkün olur (Gut ve ark., 1999).

## 2.2.2. PZR'da Temel Aşamalar

### 2.2.2.1. Denatürasyon

Çift zincirli DNA molekülünün yapısının yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrıldığı aşamadır. İlk denatürasyon aşaması tek döngü olarak 15 dakikaya kadar uygulanır. Bu aşamada PZR reaksiyonu içinde yer alan DNA'nın zincirlerinin birbirinden ayrılması sağlanır. Daha sonraki döngülerde genellikle 94-95°C'de 0.5-2 dakika denatürasyon yeterlidir (Lázaro ve ark., 2013).



Şekil 2.4. DNA'nın üstel amplifikasyonu (Lázaro ve ark., 2013).

### 2.2.2.2. Bağlanma (annealing)

Denatürasyonu takiben daha düşük sıcaklıklarda oligonükleotid primerlerin (ileri ve geri primerler), ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlandığı aşamadır. Söz konusu primerler hedef DNA'nın her iki zincirinde spesifik bir bölgenin komplementeridir. Bağlanma çoğunlukla 47°C-60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleşir. Bağlanma sıcaklığı primerlere bağlı olarak değişmektedir.

Uygun olan bağlanma sıcaklığı, amplifikasyon primerlerinin erime sıcaklığı (melting temperature–T<sub>m</sub>) dikkate alınarak hesaplanır. Erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>), çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya dönüşümünün % 50'sinin tamamlandığı sıcaklık noktası olarak tanımlanır. Erime sıcaklığını etkileyen faktörler esas olarak analiz edilen örnekte bulunan DNA'nın toplam kütlesi ve konsantrasyonudur. T<sub>m</sub> için önerilen pek çok hesaplama metodu mevcut olmakla birlikte optimal T<sub>m</sub> değeri, en iyi deneysel olarak belirlenebilir. Yine T<sub>m</sub> değeri hesaplama metodu seçilirken primerin baz büyüklüğü de dikkate alınır. Teorik olarak

primerlerin hedef zincirlere bağlanıncaya kadar stabilitelerini koruyabilmesi için yapışma sıcaklığı ileri ve geri primerlerin erime sıcaklığından daha düşük olmalıdır. Optimum “annealing” sıcaklığı  $T_m$  derecesinden  $5^{\circ}\text{C}$  daha düşük olarak seçilmekte ve 0,5-2 dakika “annealing” için yeterli olmaktadır (Dorak ve ark., 2006).

### **2.2.2.3. Uzama (extension)**

Zincir uzaması *Taq* polimerazın aktivitesinin en yüksek olduğu  $70-75^{\circ}\text{C}$  arasında gerçekleştirilmektedir. Genelde sıcaklık *Taq* polimeraz enziminin optimum faaliyet gösterdiği  $72^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. (Kubista ve ark., 2006) Uzama basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30 sn ile 3 dakika arasında değişebilmektedir.

### **2.2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan PZR tekniği daha sonraki yıllarda PZR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi ile gerçek zamanlı PZR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Gerçek zamanlı PZR, geleneksel PZR'ın uygulama alanlarını artırmıştır. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri nitel ve nicel olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek son derece az bir kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (Dorak ve ark., 2006).

Gerçek zamanlı PZR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle klasik PZR tekniğinde ihtiyaç duyulan agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının UV ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Gerçek zamanlı PZR ürünlerinin nicel ve nitel analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler otomatik olarak devam etmektedir. Gerçek zamanlı PZR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde yaygın olarak kullanılan bir metottür. Gerçek zamanlı PZR'da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boyanın verdiği sinyalin izlenmesiyle belirlenir. Reaksiyon süresince gelişen amplifikasyon ve buna bağlı olarak artan floresanı bilgisayar monitöründen takip etmek mümkündür. Dolayısıyla gerçek zamanlı PZR'da, PZR boyunca her amplifikasyon döngüsünde çoğalan DNA miktarı ile paralel olarak artış gösteren

floresans sinyaller toplanmakta ve bu sinyaller her bir örnek için sayısal değerlere çevrilmektedir. Kalıp molekül amplifikasyonunu görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan isaretili prob ve boyaların kullanıldığı gerçek zamanlı PZR, değişik kaynaklarda “kinetik PZR”, “homojen PZR”, “kantitatif gerçek zamanlı PZR” gibi çeşitli adlarla da anılmaktadır. Gerçek zamanlı PZR, gen klonlama çalışmalarının yanı sıra teşhis, tanımlama ve gen ekspresyon analizlerinde de kullanılabilir. Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan çok çeşitli gerçek zamanlı PZR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak piyasada en yaygın bulunan gerçek zamanlı PZR sistemleri; “Applied Biosystems 7700, Bio-Rad iQ5, Corbett Rotor-Gene, Eppendorf Mastercycler Realplex, Stratagene M x 3000p, Roche LightCycler” dir (Günel, 2007).

#### **2.2.3.1. Amplifikasyon ürünlerinin gerçek zamanlı PZR’da tespiti**

Bu teknikte reaksiyonun her bir döngüsünde reaksiyon boyunca artan ve elde edilen PZR ürünüyle paralellik gösteren floresans ölçümü için, çift zincirli DNA’ya bağlanan boyalar veya floresans ışımaya yapan diziye özgü problemlerden faydalanılır (Qiagen, 2010). SYBR-Green gerçek zamanlı PZR’da yaygın olarak kullanılan boyalardan biridir. Çalışmamızda gerçek zamanlı PZR analizleri için SYBR-Green boyası kullanılmıştır.

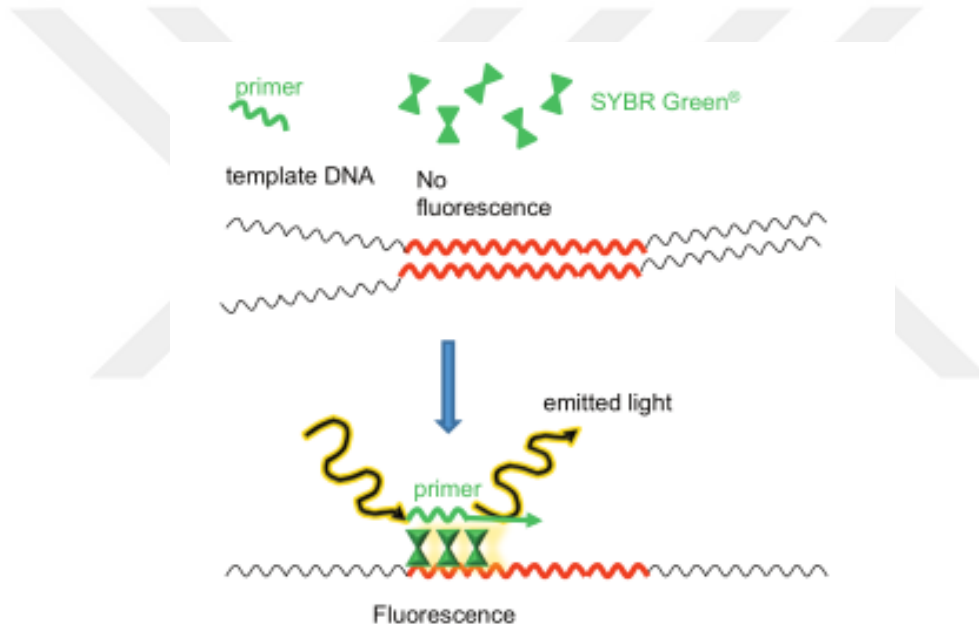
Gerçek zamanlı PZR’da oluşan ürünü, verdiği floresans sayesinde raporlayan bir raportöre (reporter dye) ihtiyaç vardır. Raportör, meydana gelen ürün miktarını yansıtan bir floresans sinyal oluşturmaktadır. İlk döngüler sırasında bu sinyal zayıftır. Ürün miktarı arttıkça sinyal miktarı da artış gösterir ve bu artış üstel olarak devam eder. Daha sonra bu artış sona erer ve doygunluk seviyesine ulaşır.

#### **2.2.3.2. SYBR-Green**

Sybr green, yalnızca çift zincirli DNA’ya bağlandığında floresans veren ve UV ışık altında görülebilen bir boyadır. SYBR Green yöntemi, amplifikasyona bağlı DNA artışı ile ortaya çıkan floresans miktarının ölçüldüğü en basit, en ucuz ve direkt floresans veren boya çeşitlerinden biridir. “SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşitidir. Bu boya, 480 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA’nın küçük

oluğuna bağlanan Sybr Green I, serbest halinden 1000 kat daha kuvvetli floresans yayar ve 30 amplifikasyon döngüsünden sonra aktivitesinin yalnızca % 6'sını kaybeder.

Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon tüpü içinde “SYBR Green I” boyası, primerler ve çift zincirli DNA molekülü ayrı ayrı bulunur. Serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışığa yapar, bu nedenle başlangıçta floresans yok denecek kadar azdır. Primerlerin hedef moleküle bağlanmasını takiben az miktarda Sybr Green çift sarmal yapıya katılmakta ve bunun sonucu olarak yayılan floresans miktarı da az olmaktadır. Uzama aşamasında yeni sentezlenen çift sarmal yapı DNA molekülünün yapısına gittikçe fazla miktarda boya katılarak zaman içerisinde floresans miktarında artışa neden olmaktadır (Levin, 2004).



Şekil 2.5. Sybr green kullanılarak primer tespiti (Lázaro ve ark., 2013).

### 2.3. Yeni Nesil Dizileme (YND)

Yeni nesil dizileme (YND) yöntemleri, hızlı ve düşük maliyetle genomik veri üretimini sağlayan mevcut standart yöntemlerdir. Bu yöntemler DNA ve RNA dizilemesinin çok hızlı bir şekilde yapılmasını sağlayarak önemli miktarda genomik, transkriptomik, DNA-protein ilişkisi ve epigenomik verisi elde edilmesini kolaylaştırmaktadırlar ve genomlara bakışımızı kökten değiştirme potansiyeline sahiptirler. Geleneksel Sanger dizileme yöntemlerine oranla daha fazla paralellik ve daha küçük hacimlerle çalışma imkanı sunarak daha fazla verinin, daha kısa dizileme süresi ve daha ucuza elde edilmesine imkan sağlarlar. YND yöntemleri önemli miktarda veri elde edilmesini sağlamalarına karşın, bu verilerin işlenmesi süreci de

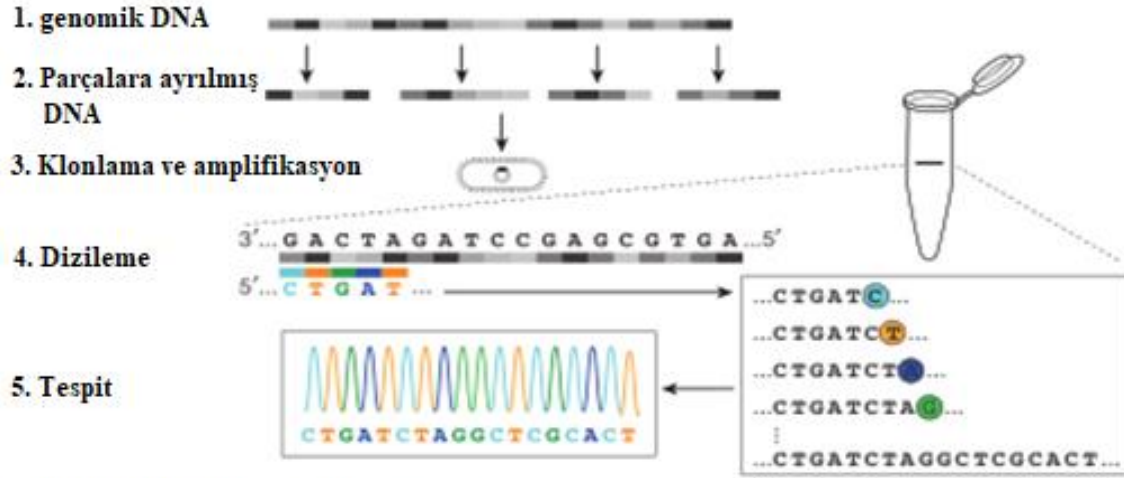
önemli bir aşamadır. YND verilerinden daha doğru ve hızlı sonuçlar elde etmek için sürekli olarak gelişmiş, bilgisayara dayalı ve yazılım araçları içeren biyoinformatik yöntemler geliştirilmektedir (Escalona ve ark., 2016). Sanger dizileme ve YND yöntemlerinin karşılaştırılması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

YND platformları geniş, genom ölçeğinde veri kümeleri üreten birçok farklı teknolojiyi bünyesinde barındırmaktadır. Fakat bu platformların her biri mühendislik, dizileme kimyası, çıktılar (okuma uzunlukları, sekans sayıları) doğru sonuç verme ve maliyet açısından birbirinden farklılık göstermektedirler. Mevcut ticari platformlar 454 (Roche), Illumina (Illumina), SOLiD ve Ion Torrent (Life Technologies), PacBio (Pacific Bio-sciences) sistemleridir. Birçok diğer üçüncü nesil dizileme yöntemleri, örneğin DNA nanoball dizileme, heliscope tek molekül (single molecule) dizileme, nanopore DNA dizileme gibi yöntemler de geliştirilme aşamasındadır (Glenn, 2011). Bu çalışmada YND analizi için Illumina Miseq platformu kullanılmıştır.

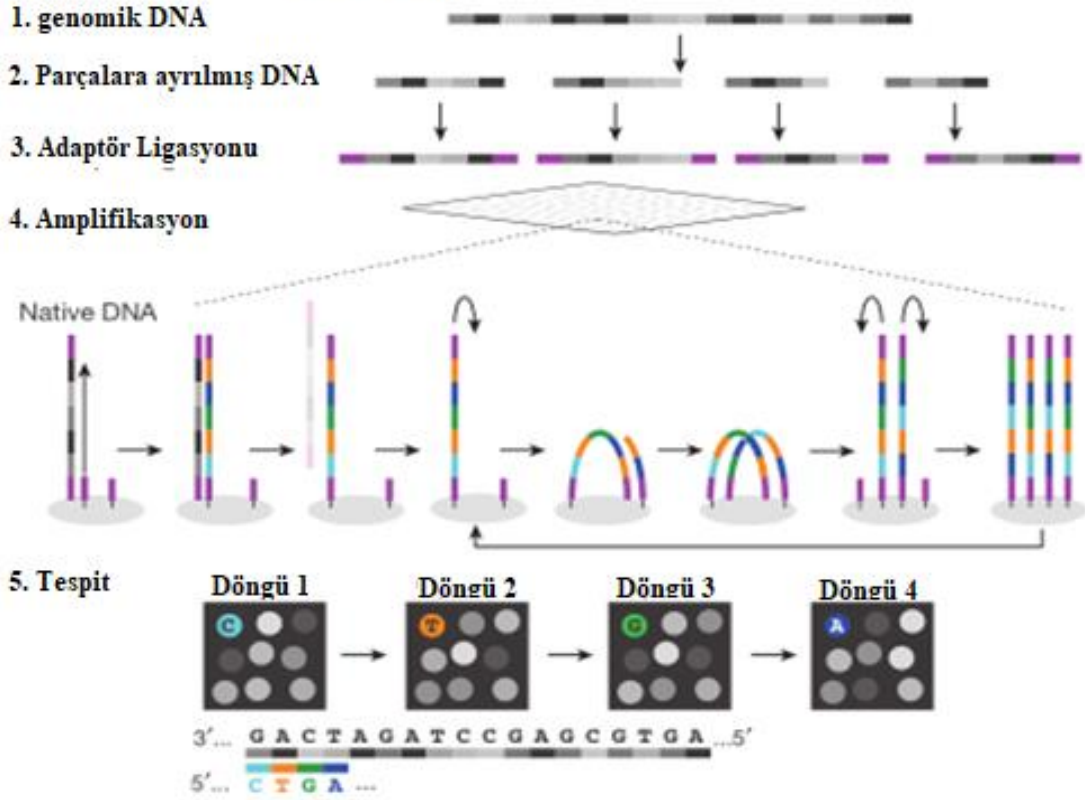
### **2.3.1. Illumina platformu**

Bu platform tarafından kullanılan teknoloji ilk defa 2006 yılında Illumina tarafından satın alınan Solexa tarafından piyasaya sürülmüştür. Bu yöntemde spesifik adaptörlere sahip DNA'yı tamamlayıcı primerler bir düzlem (akış hücresi) üzerine bağlanmış vaziyettedir. Aynı DNA molekülleri PZR ile bölgesel olarak çoğaltılır, böylece klon DNA dizilerinin düzlem üzerindeki primerlere bağlanarak köprü benzeri yapılar oluşturması sağlanır. (Şekil 2.7) Dizileme işlemi, adaptörleri tamamlayıcı ve dört çeşit bitirici (terminator) nükleotit kullanılarak sentezleme ile devam eder. Kullanılmayan bitirici nükleotitler ortamdan uzaklaştırılır. Boyanın 3' terminali engeli ile birlikte kimyasal olarak DNA'dan ayrılarak baz okuması ve bir sonraki döngünün başlaması sağlanır (Şekil 2.8). Pyrosekanslama (454 Roche) işleminin aksine DNA zincirleri tek seferde bir baz olacak şekilde uzatılır. Mevcut Illumina platformları 150-300 baz çifti (bç) arasında okumalar yapabilmektedir. Ancak bu okumalar çift uçlu (paired-end) yani DNA dizilerini her iki taraftan dizileyerek 300-600 bç'ye çıkarılabilmektedir. Tek okumada fazla miktarda dizileme çıktısının düşük maliyetle elde edilmesi bu teknolojinin en büyük avantajıdır (Mayo ve ark 2014).

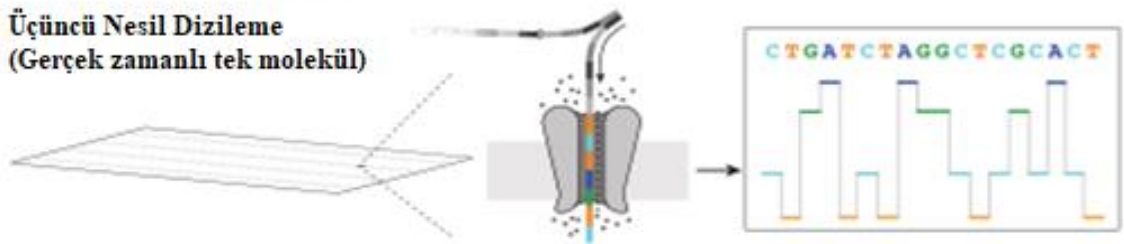
### Birinci Nesil Dizileme (Sanger)



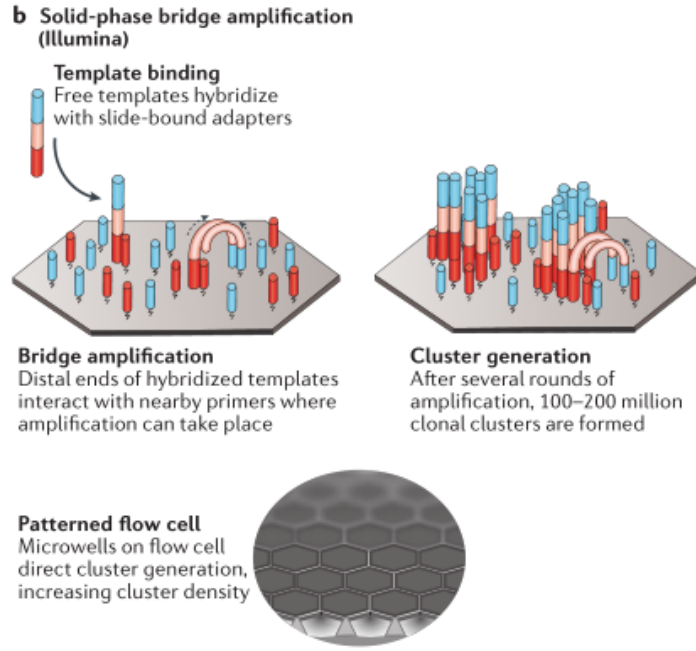
### İkinci Nesil Dizileme (massively parallel)



### Üçüncü Nesil Dizileme (Gerçek zamanlı tek molekül)

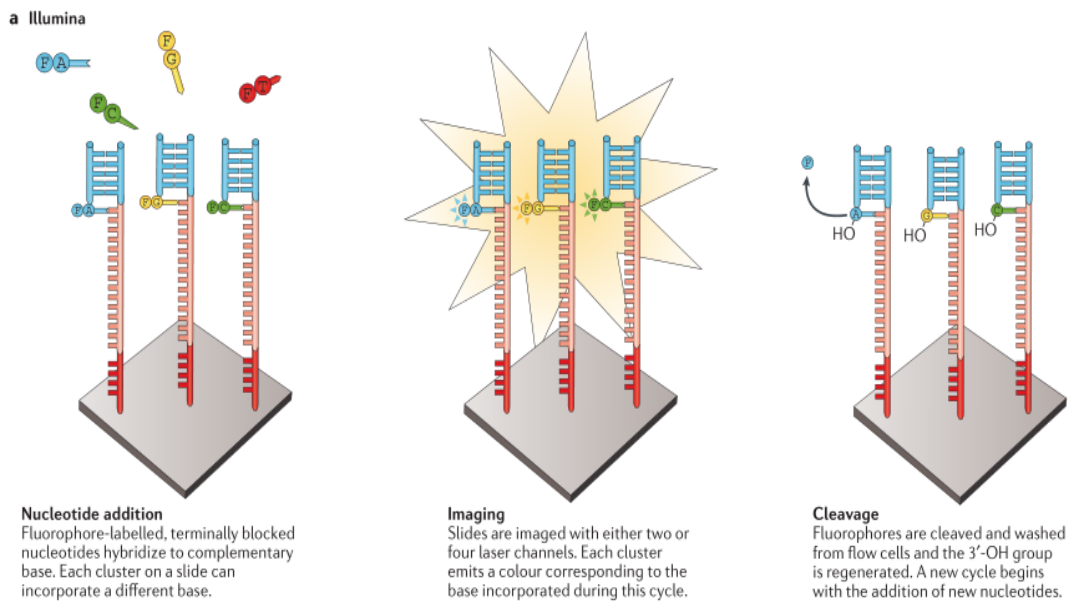


Şekil 2.6. DNA dizileme yöntemleri I.Nesil Sanger Dizileme, II. Nesil Kitlesel Paralel Adı ile de anılan Yeni Nesil Dizileme ve III. Nesil Gerçek Zamanlı Tek Molekül Dizileme (Shendure ve ark., 2017).



Şekil 2.7. Katı Faz Köprü Amplifikasyonu (Shendure ve ark., 2017)

DNA dizi parçaları spesifik adaptörlere bağlandıktan sonra tamamlayıcı adaptörlere sahip akış hücresi (flowcell) üzerindeki primerlere bağlanırlar ve DNA polimeraz ile amplifikasyonları sağlanır. Sonrasında DNA dizi parçaları ortamdaki uzaklaştırılır. İmmobilize DNA dizilerinin serbest uçları diğer serbest primerlere bağlanarak köprü benzeri yapıları oluştururlar. PZR ile bu DNA zincirleri çoğaltılarak milyonlarca DNA kopyası oluşturulur.



Şekil 2.8. Sentezleme ile Dizileme (sequencing by synthesis) (Goodwin ve ark., 2016)

Köprü amplifikasyonu sonrası akış hücresine (flowcell) DNA polimeraz, modifiye nükleotit ve primer karışımı eklenir. Her bir nükleotit 3'-O-azidometil grubu 3' terminali engeli ve baz spesifik ayrılabilir florofor boya etiketlerine sahiptir. Her döngüde sadece bir nükleotitin bağlanması sağlanır; çünkü 3' terminali engellidir. Nükleotit bağlanmasından sonra serbest nükleotitler ortamdan uzaklaştırılır ve akış hücresi toplam iç yansıma floresans (total internal reflection fluorescence (TIRF) mikroskopu ile görüntülenerek hangi bazın bağlanmış olduğunun tespiti yapılır. Sonrasında boya ayrılır; 3' terminal engeli ise tris (2-carboksietil fosfin) (TCEP) ile indirgenir. Böylece diğer döngünün başlamasına olanak sağlanır (Goodwin ve ark., 2016).

#### **2.4. Uçucu Aroma Bileşikleri**

Gıdaların ve gıda ürünlerinin tüketici açısından kabul edilebilirliği, dolayısıyla ticari değeri açısından diğer kalite parametrelerinin yanı sıra aroma maddeleri kompozisyonu ve miktarı önem taşımaktadır. Aroma bileşikleri gıdalarda çok düşük miktarlarda bulunmakta olup, bunların ayrılması ve miktarının belirlenmesi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır (T. Cserhâti, 2010). SPME (solid phase microextraction) yani katı faz mikroekstraksiyon yöntemi bu iş için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olup, genellikle gaz kromatografisi (GC) veya gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GC-MS) ile beraber kullanılmaktadır (Risticovic ve ark., 2009). SPME yöntemi meyve ve sebzeler, süt ürünleri, fermente ürünler gibi bir çok gıda ve gıda ürününün uçucu aroma bileşikleri profilini incelerken kullanılmaktadır. Yöntem, örnek içerisinde bulunan analitlerin SPME fiberine absorpsiyonu ve sonrasında ısı ile kromatografi cihazına desorpsiyonu şeklinde çalışmaktadır ve headspace-SPME ve direct injection-SPME olmak üzere iki şekilde kullanılmaktadır. HS- SPME yani üst boşluklu SPME yönteminde SPME fiberi örnek buharı içerisinde bekletilerek analitlerin fibere absorpsiyonu sağlanırken DI-SPME yani doğrudan enjeksiyonlu SPME yönteminde ise SPME fiberi içeren iğne örnek içerisine daldırılarak analitlerin SPME fiberine absorpsiyonu sağlanmaktadır (Kataoka ve ark., 2000).

Şalgam suyunun fermantasyon sürecinde uçucu aroma bileşikleri profilinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Tangüler ve arkadaşlarının (2017) farklı yöntemlerle üretilen şalgam sularının aroma kompozisyonunu inceledikleri çalışmada en yüksek konsantrasyona yüksek alkollerin sahip olduğunu, nicel olarak ise en çok terpenlerin bulunduğunu tespit

etmişlerdir. Bu çalışmada terpenler içinde en yüksek konsantrasyona 1-borneol, esterler içerisinde etil hegzadekanoat, yüksek alkoller içinde ise izoamil alkol sahiptir.

Hansen ve Schieberle'nin (2005) ekşi hamur fermantasyonunda aroma gelişimini inceledikleri çalışmada, starter kültür eklenmiş ekşi hamurda terpenlerden 3-hydroxy-2-butanone (acetoin), 2,3-butanedione (diacetyl), (E)-2-heptenal, 2-pentilfuran bileşiklerini; esterlerden etil asetat, etil propanoat, bütül asetat, 2-metilbütül asetat, pentyl asetat, etil hegzanoat, hegzil asetat, etillaktat, etil oktanoat bileşiklerini; alkollerden ise etanol, propanol, metilpropanol, 2-butanol, butanol, 2- and 3-metilbutanol, pentanol, hegzanol, 2-hegzanol, (E)-2-hekzenol, heptanol ve oktanol bileşiklerini tespit etmişlerdir.

Kjeldsen ve ark. (2001), havuçta (*Daucus carota L.*) bulunan aroma maddelerini inceledikleri çalışmada 44 farklı bileşik tespit etmişlerdir. Bunlar içerisinde en yüksek konsantrasyona sahip bileşikler terpinolen,  $\gamma$ -terpinen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -karyofilen ve (E)- $\gamma$ -bisabolen'dir.

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1. Şalgam Suyu Üretimi**

Şalgam suyu üretiminde Konya Ereğli'de 2017 sonbaharında hasat edilmiş kırmızı havuçlar kullanılmıştır. Kırmızı havuçla birlikte Şubat 2018 üretim tarihli bulgur unu, fırınlanmış kaya tuzu ve ticari ekmek mayası kullanılmıştır. Kurulumdan önce bulgur unu ve ekmek mayası su ile karıştırılıp bir gece bekletilerek ekşi hamur hazırlanmış, sonrasında yıkanıp temizlenmiş havuçlar ve ekşi hamur fermantasyon tanklarına aktarılarak 20 gün boyunca oda sıcaklığında fermantasyona bırakılmıştır.

#### **3.2. Örneklerin Alınması**

Şalgam suyu örnekleri, endüstriyel şalgam suyu üreten bir fabrikadan 2018 yılı Mart ayında alınmıştır. Şalgamın toplam fermantasyon süresi üç hafta olup, kurulumun üçüncü gününden itibaren üç günde bir örnek alınmıştır. Örnek alma işlemi öncesinde fermantasyon tanklarında karıştırma işlemi uygulanmıştır. Alınan örnekler önceden sterilize edilmiş şişelerde analizler yapılana kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.3. pH ve Toplam Asitlik Tayini**

pH ölçümleri pH metre cihazı ile doğrudan yapılmıştır. Titrasyon asitliği ölçümünde AOAC 942.15 yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. 10 mL şalgam örneği üzerine 20 mL saf su eklenmiş, pH probu örnek içerisine daldırılarak pH metrede 8,1 değeri okunana kadar 0,1 normal NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Sonrasında, toplam asitlik değeri harcanan NaOH miktarına göre laktik asit cinsinden gram/ Litre olarak hesaplanmıştır.

#### **3.4. Suda Çözünür Kuru Madde Tayini**

Kuru madde miktarı ölçümleri 20 °C'de AR2008 Krüss (Hamburg, Almanya) abbe refraktometresi kullanılarak yapılmıştır.

#### **3.5. Renk Ölçümleri**

Renk ölçümleri Konica Minolta CM-5 (Tokyo, Japonya) renk ölçüm cihazı kullanılarak yapılmıştır.

### **3.6. Mikroorganizma Sayımı Analizleri**

Şalgam örneklerinde koliform bakteri, toplam canlı bakteri, laktik asit bakterileri ve toplam maya-küf sayımları yapılmıştır. Sonuçlar KOB/mL olarak hesaplanmıştır.

#### **3.6.1. Koliform Bakteri Sayımı**

Koliform bakteri sayımı dökme plak yöntemi (pour plate method) kullanılarak yapılmıştır. 1 mL şalgam örneği boş petri kutusuna eklenmiş ve üzerine VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar dökülmüştür. Agarın donması beklendikten sonra üzerini kaplayacak kadar tekrar VRBD Agar dökülmüş ve 30 °C'de üç gün inkübasyona bırakılmıştır (Sanders, 2012).

#### **3.6.2. Toplam Canlı Bakteri Sayımı**

Toplam canlı bakteri sayımı PCA (Plate Count Agar) kullanılarak dökme plak yöntemi (pour plate method) ile yapılmıştır. 1 mL şalgam örneği petri kutularına eklenerek üzerlerine PCA dökülmüş ve 30 °C'de üç gün inkübasyona bırakılmıştır (Sanders, 2012).

#### **3.6.3. Laktik Asit Bakterisi Sayımı**

Laktik asit bakterisi sayımı MRS Agar kullanılarak dökme plak yöntemi (pour plate method) ile yapılmıştır. 1 mL şalgam örneği petri kutularına eklenerek üzerlerine MRS dökülmüş ve 30°C'de üç gün inkübasyona bırakılmıştır (Sanders, 2012).

#### **3.6.4. Toplam Maya-Küf Sayımı**

Toplam maya-küf sayımı YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar) kullanılarak yayma plak yöntemi (spread plate method) ile yapılmıştır. 0,1 mL şalgam örneği YGC içeren petri kutularına eklenerek spatül yardımı ile yayılmış ve 25 °C'de üç gün inkübasyona bırakılmıştır (Sanders, 2012).

### **3.7. Örneklerden DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu Zhou ve ark., (1996) tarafından önerilen CTAB yönteminin modifiye edilmiş hali kullanılarak yapılmıştır. 20 mL şalgam örneği önceden sterilize edilmiş tüplere koyulmuş ve 7500g hızda, 4°C'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant döküldükten sonra 2,5 mL CTAB DNA ekstraksiyon tamponu çözeltisi (20g/L CTAB; 1.4 mol/L NaCl; 0.1 mol/L Tris-HCl; 20 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA; 0.1 mol /Lsodyum hidrojen fosfat;

pH 8.0) ile karıştırılmış ve üzerine 10 µL proteinaz K (20 mg/mL) eklenerek vortex cihazı ile iyice karıştırılmıştır. Sonrasında, üzerine 500 µL SDS (% 10 w/v) çözeltisi eklenmiştir. Tüpler 65 °C’de üç saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca tüpler 15-20 dakikada bir ters çevirmek suretiyle karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüpler 7500g hızda 4°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Yeni tüplere alınmış süpernatant eşit hacimde kloroform-izoamilalkol (24:1 v/v) karışımı ile karıştırılmıştır. Örnekler yeniden 7500 g hızda 4°C’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üst faz ayrılarak yarısı hacimde ve önceden dondurulmuş izopropil alkol ile karıştırılarak bir saat oda sıcaklığında DNA çöktürülmesi sağlanmıştır. Çöktürme işlemi sonrasında tüpler 20000g hızda 4 °C’de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüş ve üzerine 500 µL önceden dondurulmuş etanol (% 70) çözeltisi eklenmiştir. Örnekler yeniden 20000g hızda 4 °C’de 20 dakika santrifüjlenmiş ve 100 µL steril Tris-EDTA tamponu içerisinde çözülmüştür. DNA çözeltileri PZR analizleri yapılana kadar -18 °C’de muhafaza edilmiştir.

### **3.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi**

Şalgam örneklerinde fermantasyon sürecinde gelişen bakteri ve küf-maya miktarlarını belirlemek için gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır. Üç günde bir alınan şalgam örneklerinden doğrudan DNA izolasyonu yapılmış ve bu örneklerdeki laktik asit bakterisi, toplam bakteri ve toplam maya-küf (fungi) miktarları *S. cerevisiae* ve *Lb. plantarum* saf kültürlerinden elde edilen DNA’ların konsantrasyona karşı eşik döngüsü  $C_t$  (threshold cycle) kullanılarak çizilmiş kalibrasyon eğrisi ile tespit edilmiştir (Park ve ark., 2009). Gerçek zamanlı PZR analizleri için “Roche Lightcycler Nano” (İsviçre) termal döngü cihazı kullanılmıştır.

#### **3.8.1. Gerçek zamanlı PZR analizleri**

Fermantasyon sürecinde toplam bakteri, toplam laktik asit bakterisi ve toplam küf-maya gelişimini belirlemek üzere gerçek zamanlı PZR analizleri yapılmıştır. Reaksiyonda bakteriler için 16S RNA gen bölgesini çoğaltan bakteri universal 340F-758R primerleri (Juck ve Ark., 2000), laktik asit bakterileri için laktik asit bakterilerine özgü skfw-skrw primerleri (Pontonio ve ark., 2017), küf maya için ise Y1-Y2 universal primerleri (Wang ve ark., 2016) kullanılmıştır. Bakteri standardı olarak, *Lb. plantarum* lmg 21677, maya standardı olarak ise firma tarafından üretimde kullanılan ekmek mayası *S. cerevisiae*’den elde edilen DNA örnekleri kullanılmıştır.

### 3.8.1.1. Toplam bakteri miktar analizi

Toplam bakteri miktarını belirlemede kullanılan gerçek zamanlı PZR reaksiyonu şu şekilde oluşturulmuştur: Şalgam örneklerinden elde edilen DNA izolatları 1/100 oranında seyreltilmiş, seyreltilen örneklerden 2 µL alınarak 8 µL önceden hazırlanmış master mix ile karıştırılarak 10 µL son hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. Master mix hazırlanırken her bir örnek için 5,5 µL SYBR green boyası (FasStart Universal SYBR Green Master (ROX), Roche, İsviçre), 0,4 µL 10 µmol bakteri universal 340F 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3' ileri primeri, 0,4 µL 10 µmol bakteri universal 758R 5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC C-3' geri primeri (Juck ve ark. 2000) ve 2,2 µL steril ultra saf su kullanılmıştır. PZR koşulları ise 94°C 10 dk ilk denatürasyon, 45 döngü boyunca 94 °C 10 sn denatürasyon, 56°C 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn primer uzama ve döngü sonrası 72°C'de 7 dk son uzama şeklinde oluşturulmuştur. Standart eğri *Lb. plantarum* lmg 21677'den elde edilen DNA örneği 81,77 µg/mL 'den 81,77x10<sup>-4</sup> µg/mL konsantrasyona kadar seyreltilerek oluşturulmuştur. Erime eğrisi analizi ise 55°C'den başlayıp 95°C'ye kadar 0,1°C /sn aralıklarla artacak şekilde oluşturulmuştur.

### 3.8.1.2. Toplam laktik asit bakteri miktar analizi

Toplam laktik asit bakteri miktarını belirlemede kullanılan PZR reaksiyonu şu şekilde oluşturulmuştur: Şalgam örneklerinden elde edilen DNA izolatları 1/100 oranında seyreltilmiş, seyreltilen örneklerden 2 µL alınarak 8 µL önceden hazırlanmış master mix ile karıştırılarak 10 µL son hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. Master mix hazırlanırken her bir örnek için 5,5 µL SYBR green boyası (FasStart Universal SYBR Green Master (ROX), Roche, İsviçre), 0,4 µL 10 µmol laktik asit bakterilerine özgü SKfw 5'-GGG GAT AAC AYY AAA CAG -3' ileri primeri, 0,4 µL 10 µmol SKrw 5'- CTC GGC TAC GAT TCA TTG TCT TG -3' geri primeri (Pontonio ve ark. 2017) ve 2,2 µL steril ultra saf su kullanılmıştır. PZR koşulları ise 95°C'de 10 dk ilk denatürasyon, 45 döngü boyunca 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn primer uzama ve döngü sonrası 72°C'de 7 dk son uzama şeklinde oluşturulmuştur. Standart eğri *Lb. plantarum* lmg 21677'den elde edilen DNA örneği 81,77 µg/mL 'den 81,77x10<sup>-4</sup> µg/mL konsantrasyona kadar seyreltilerek oluşturulmuştur. Erime eğrisi analizi ise 55°C'den başlayıp 95°C'ye kadar 0,1°C/sn aralıklarla artacak şekilde oluşturulmuştur.

### 3.8.1.3. Toplam küf-maya miktar analizi

Toplam küf-maya miktarını belirlemede kullanılan PZR reaksiyonu şu şekilde oluşturulmuştur: Şalgam örneklerinden elde edilen DNA izolatları 1/10 oranında seyreltilmiş, seyreltilen örneklerden 2 µL alınarak 8 µL önceden hazırlanmış master mix ile karıştırılarak 10 µL son hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. Master mix hazırlanırken her bir örnek için 5,5 µL SYBR green boyası (FasStart Universal SYBR Green Master (ROX), Roche, İsviçre), 0,4 µL 10 µmol küf-maya üniversal Y1 5'- GCG GTA ATT CCA GCT CCA ATA G -3' ileri primeri, 0,4 µL 10 µmol Y2 5'- GCC ACA AGG ACT CAA GGT TAG -3' geri primeri (Wang ve ark., 2016) ve 2,2 µL steril ultra saf su kullanılmıştır. PZR koşulları ise 94°C'de 10 dk ilk denatürasyon, 45 döngü boyunca 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 58°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn primer uzama ve döngü sonrası 72°C'de 7 dk son uzama şeklinde oluşturulmuştur. Standart eğri *S. cerevisiae*'den edilen DNA örneği 174,1 µg/mL 'den 174,1x10<sup>-4</sup> µg/mL konsantrasyona kadar seyreltilerek oluşturulmuştur. Erime eğrisi analizi ise 55°C'den başlayıp 95°C'ye kadar 0,1°C/sn aralıklarla artacak şekilde oluşturulmuştur.

### 3.9. Yeni Nesil Dizileme Analizi

Yeni nesil dizileme analizleri "MG Biyoinformatik" (Sivas, Türkiye) firması tarafından Illumina miseq 500 platformu kullanılarak çift uçlu (paired end) olarak yapılmıştır. Şalgam örneklerinden elde edilen saf DNA örnekleri firmaya gönderilmiştir. Kütüphane hazırlama yeni nesil dizileme ve sonuçlarının ayıklanması işlemi (demultiplexing) firma tarafından gerçekleştirilmiştir. Yeni nesil dizileme esnasında bakteriler için 16S rRNA v4-v5 gen bölgesini çoğaltan 515F, 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' ileri ve 926R 5'-CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT-3' geri primeri; küf-maya için ise ITS2 bölgesini çoğaltan ITS86F 5'-GTG AAT CAT CGA ATC TTT GAA-3' ileri primeri ve ITS4R 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' geri primeri kullanılmıştır.

### 3.10. Biyoinformatik Analizi

Biyoinformatik analizler için açık kaynaklı, birbirinden bağımsız bilim insanları topluluğu tarafından geliştirilmiş (open source, community developed software) QIIME 2 yazılımından faydalanılmıştır (Bolyen ve ark. 2018). Yazılım, [www.qiime2.org](http://www.qiime2.org) internet sayfasından indirilmiştir. Casava 1.8 Fastq formatında elde edilmiş YND analiz sonuçları yazılıma tanıtılarak, 16S veri analizi akış şeması kullanılarak mikrobiyom analizi yapılmıştır. Küf-

maya ve bakteri YND analiz sonuçları ayrı ayrı yazılıma tanıtılmış ve iki veri grubu için ayrı ayrı analiz edilmiştir.

Veri tanıma işleminden sonraki ikinci aşamada YND sonuçları QIIME 2 yazılımının “DADA2 denoise-paired” eklentisi kullanılarak sekans kalite kontrolü ve özellik tablosunun oluşturulması sağlanmıştır. Bu aşamada demultiplex edilmiş sekans dizilerinde düşük kaliteli bazlar, boşluklar barkodlar ve PZR esnasında primerler ile birbirine yakın DNA parçalarının eşlenmesi sonucu oluşan chimera sekanslar temizlenmektedir (Callahan ve ark. 2016). Şalgam örneklerinin demultiplex edilmiş sekans verileri incelenmiş, ileri ve geri okumalarda ilk 20 baz kesilmiş ve örnek sekanslarının oluşturulması sağlanmıştır. Sonuç olarak bu aşamada fermantasyonun üçüncü yedinci, onuncu, on üçüncü, on yedinci ve yirminci günlerinde hangi sekansların hangi oranda bulunduğunu gösteren örnek sekans tablosu oluşturulmuştur.

Üçüncü aşamada “qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree” eklentisi kullanılarak örnek sekanslar hizalanmış belirsiz ve filogenetik olarak anlamsız hizalamalar ayrılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Dördüncü aşamada “qiime diversity core-metrics-phylogenetic” eklentisi kullanılarak örneklerin alfa ve beta çeşitlilik analizleri yapılmıştır. Bu aşama sonucunda örnekler arasındaki filogenetik anlamda topluluk farklılıklarını (community dissimilarity) nitel olarak gösteren Jaccard distance, topluluk farklılıklarını nicel olarak gösteren Bray-Curtis distance, her örnekte oluşturulan özelliklerin farklılıklarını nitel ve nicel olarak gösteren unweighted UniFrac distance ve weighted UniFrac distance grafikleri oluşturulmuştur.

Beşinci aşamada “qiime feature-classifier classify-consensus-vsearch” eklentisi kullanılarak örnek sekansların taksonomik tanımlamaları yapılmıştır. Bakteri tanımlamaları için SILVA 132 (güncellenme tarihi: 10.04.2018) ribozomal RNA veri tabanı (Quast ve ark., 2012; Yılmaz ve ark., 2013; Glöckner ve ark., 2017); küf maya için ise UNITE sürüm 8.0 (yayınlanma tarihi 18.11.2018) (UNITE topluluğu, 2019) veri tabanı kullanılmıştır. Bu eklentinin yanı sıra, örnek sekansların BLAST veri tabanı (Stephen ve ark., 1997) ile ayrıca taramaları yapılarak taksonomi tabloları oluşturulmuştur.

### 3.11. Uçucu Aroma Bileşikleri Analizi

Şalgam suyu örneklerindeki uçucu bileşiklerin analizi SPME/GC-MS yöntemi kullanarak belirlenmiştir (Selli ve Kelebek, 2011). 3 mL şalgam suyu örneği, 5 µL 4-nonanol iç standart ve 1 mL doymuş tuz çözeltisi örnek şişelerine koyulmuş ve şişeler PTFE/silikon septalı alüminyum kapak ile kapatılmıştır. Aroma maddelerinin analizi ve tanımlanması alev iyonizasyon dedektörlü (FID) “Agilent Technologies 7890 B” (Kaliforniya, ABD) marka gaz kromatografisi, buna bağlı “Agilent 5977A MSD” kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Aroma bileşiklerinin ayrılmasında “Supelco” marka SPME fiberi (Stableflex, DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm, 2cm, 24 Ga, ABD) ve DB-WAX (30m uzunluk x 250 µm iç çap x 0,25 µm kalınlık; 122-7032 Agilent, ABD) kolon kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan program splitless enjeksiyon, 40°C’de 4 dakika, sonrasında 90 °C’ye kadar dakikada 3 °C’lik artış, 90 °C’den 130 °C’ye dakikada 4 °C’lik artış, 130°C’den 240 °C’ye dakikada 5 °C’lik artış ve 240 °C’de 8 dakika bekletilecek şekilde oluşturulmuştur.

Uçucu bileşikler “Agilent MSD Productivity Chemstation for GC and GC/MS Systems Data Analysis Application” (Kaliforniya, ABD) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Bileşik tanımlanması yapılırken lineer alıkonma endeksi LRI (Linear Retention index) değerleri ve Webbook-NIST veri tabanından yararlanılmıştır (Huber ve Herzberg, 1997).

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. pH, Titrasyon asitliği ve Briks Sonuçları:

Fermantasyon sürecinde günlere ait pH, titrasyon asitliği ve briks değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde pH değerinin ilk haftada hızlı bir düşüş gösterdiği belirlenmiş, 7. ve 10. günler arasında pH düşüşünün yavaşladığı görülmüştür. 13. günden sonra ise pH değerinde önemli bir değişiklik görülmemiştir.

Titrasyon asitliği değerlerindeki değişim, pH değerlerindeki değişim ile paralellik göstermektedir. Fermantasyonun 3. gün ile 7. günleri arasında titrasyon asitliği yaklaşık % 75 artış göstermiştir. 10. günden itibaren toplam asitlik artışı yavaşlamış ve 13. günden sonra önemli bir artış olmamış, 17. gün ile 20.gün arasında ufak azalma tespit edilmiştir. pH ve titrasyon asitliği sonuçları fermantasyon sürecinin ilk hafta çok hızlı işlediğini, 10. günden itibaren yavaşladığını ve ikinci haftadan itibaren dengeye geldiğini göstermektedir. Briks değerinde ise fermantasyon süresi boyunca değişiklik gözlemlenmemiş ve % 2,7 olarak ölçülmüştür.

**Tablo 4.1.** pH, Laktik Asit Cinsinden Titrasyon Asitliği ve Briks Sonuçları

ÖRNEKLER	pH	Titrasyon Asitliği g/L (Laktik Asit cinsinden)	Briks
Fermantasyon 3.gün	4,24±0,016	4,03±0,022	2,7
Fermantasyon 7.gün	3,96±0,032	7,09±0,032	2,7
Fermantasyon 10.gün	3,86±0,010	7,83±0,010	2,7
Fermantasyon 13.gün	3,83±0,010	8,48±0,018	2,7
Fermantasyon 17.gün	3,80±0,008	8,66±0,016	2,7
Fermantasyon 20.gün	3,82±0,016	8,33±0,010	2,7

### 4.2. Şalgam Suyunda Renk Değişimi:

Renk ölçüm cihazı ile CIELAB skalasına göre elde edilen sonuçlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Sonuçlara göre, parlaklık değerini gösteren L\* değerinin fermantasyon süreci boyunca arttığı gözlemlenmiştir. En ciddi artış 13. ile 17. gün arasında olduğu görülmüştür. a\* ve b\* değerlerine bakıldığında ise yüksek +b\* değeri ve daha düşük + a\* değeri şalgamda en baskın rengin kırmızı ve daha sonra sarı olduğunu göstermektedir. Bunlarla birlikte

fermantasyon boyunca berraklık değerini gösteren C\* (chroma) ve renk tonunu gösteren h° (hue) değerlerinde de düzenli artış gözlemlenmiştir. Berraklık değerindeki en ciddi artış 13 ile 17. gün arasında grlmştir.

**Tablo 4.2.** Renk lm Sonuçları

<b>ÖRNEKLER</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>C*</b>	<b>h°</b>
Fermantasyon 3.gün	22,42±0,012	54,60±0,012	40,37±0,012	69,21±0,013	33,22±0,012
Fermantasyon 7.gün	23,25±0,010	56,18±0,010	41,29±0,010	70,36±0,012	34,85±0,011
Fermantasyon 10.gün	24,08±0,014	57,16±0,012	41,93±0,012	71,22±0,014	35,88±0,013
Fermantasyon 13.gün	24,48±0,012	57,89±0,010	42,21±0,010	71,64±0,013	36,09±0,010
Fermantasyon 17.gün	27,26±0,010	61,09±0,014	47,00±0,013	77,08±0,012	37,58±0,011
Fermantasyon 20.gün	27,47±0,012	61,10±0,010	47,36±0,010	77,31±0,011	37,78±0,012

### 4.3. Mikroorganizma Sayım Sonuçları:

Fermantasyon sürecinin belirli günlerinde alınan örneklere toplam canlı bakteri, koliform bakteri, laktik asit bakteri ve toplam maya-küf sayımları hesaplanmıştır. Sonuçlar, Tablo 4.3’de log KOB/mL olarak verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, dışarıdan herhangi bir inokülasyon olmamasına karşın, fermentasyonun 3. gününde laktik asit bakterilerinin diğer mikrofloraya baskın hale geldiği görülmektedir. 3. günden 7. güne kadar mikroorganizma popülasyonunda artış olmuş, laktik asit bakteri sayısındaki artışın koliform ve küf-maya sayısındaki artış oranına göre fazla olduğu grlmştir. Toplam canlı bakteri sayımları ile diğer sonuçlar karşılaştırıldığında, canlı mikroorganizma sayısındaki artışın ağırlıklı olarak laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirildiği görülmektedir. 7. gün ile 10. gün arası ise toplam canlı bakteri sayımında en çok artışın görüldüğü aralıktır. Bu evrede en çok gelişimi küf-maya grubu gösterirken, onları koliform ve fırsatçı bakteriler izlemiştir. 13. güne gelindiğinde ise bütün mikroorganizma popülasyonunda düşüş gözlemlenmiştir. 10. gün ile 13. gün arasında bakteri sayısında yarıya yakın düşüş görülürken, küf maya sayısında artış daha az olmuştur. 13. ile 17. gün arasında laktik asit bakterileri ve küf-maya grubunda bir miktar artış gözlemlenmiş olup koliform bakteri sayısında ufak bir artış olduğu grlmştir. Bu bilgiler ışığında fermentasyon sürecinin 10. günde laktik asit bakterileri ve küf-maya aktivitesi bakımından zirve noktasına ulaştığı, 10. ve 13. gün arasında dengeye geldiği ve 13. ve 17. günler arasında dengede seyrettiğini söylemek mümkündür. 17. günden sonra ise en çok artış koliform bakteri sayısında grlmştir. Bu aşamayı artık fermentasyonun durup, fırsatçı mikroorganizmalar tarafından bozulmanın başladığı süreç olarak adlandırmak mümkündür.

**Tablo 4.3.** Canlı Mikrorganizma Sayım Sonuçları (log KOB/mL)

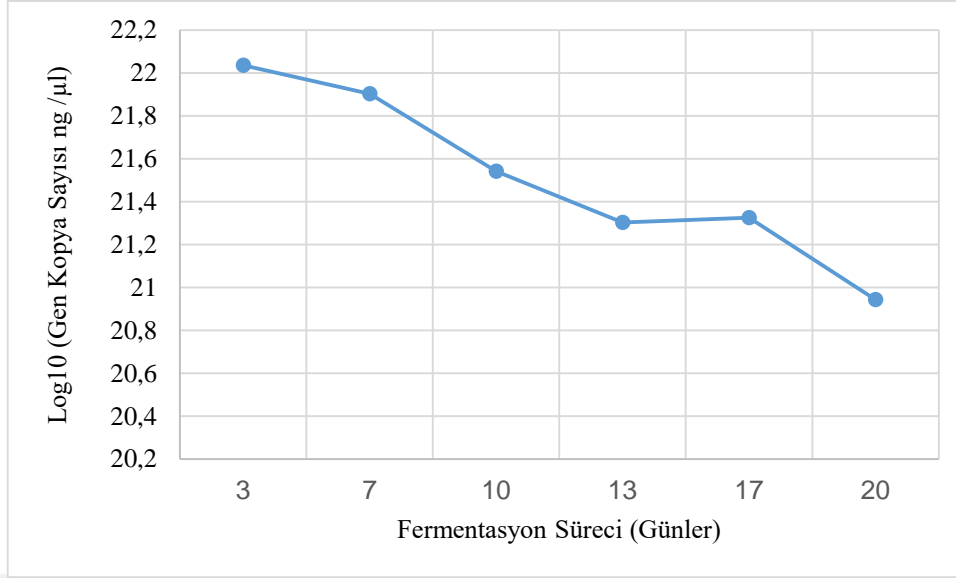
ÖRNEKLER	Sayımlar (log KOB/mL)			
	Koliform	Toplam Canlı Bakteri	Laktik Asit B.	Maya-Küf
Fermantasyon 3.gün	2,00 ±0,05	6,40 ±0,13	6,13 ±0,13	3,29 ±0,02
Fermantasyon 7.gün	2,15 ±0,05	6,76 ±0,15	6,76 ±0,15	3,34 ±0,02
Fermantasyon 10.gün	3,54 ±0,06	8,12 ±0,20	8,19 ±0,20	4,70 ±0,03
Fermantasyon 13.gün	1,70 ±0,05	4,60 ±0,12	4,60 ±0,13	2,98 ±0,013
Fermantasyon 17.gün	1,78 ±0,05	4,19 ±0,14	4,63 ±0,15	3,04 ±0,012
Fermantasyon 20.gün	2,23 ±0,05	4,87 ±0,15	4,98 ±0,15	3,31 ±0,012

#### 4.4. Gerçek Zamanlı PZR Analizi Sonuçları:

Şalgam üretim sürecinde 3. günden 20. güne kadar belirli günlerde alınan örneklerde gerçek zamanlı-PZR analizleri yapılmıştır. Analizlerde şalgamdan doğrudan izole edilmiş DNA örnekleri kullanılmış ve standart mikroorganizmaların seri dilüsyonları örneklerle aynı anda PZR'a sokularak oluşturulmuştur. Reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan standart eğri denklemleri bakteriler için  $y=-3,9129x+16,804$ , laktik asit bakterileri için  $y=-3,2535x+8,8446$  ve küf-maya için  $y=-3,4199+11,665$  şeklindedir. ( $x=\log$  DNA konsantrasyonu,  $y=\text{cycle threshold}$ , eşik döngü değeri)  $R^2$  değerleri ise sırası ile 0,9984, 0,9999 ve 0,9961 olarak bulunmuştur. Gen kopya sayılarını belirleme işlemi ise Ritalahti ve arkadaşları (2006) tarafından tarif edilen formül (Şekil 4.1) kullanılarak yapılmıştır. Günlere karşı toplam bakteri gen kopya sayıları Şekil 4.2'de, laktik asit bakterisi gen kopya sayıları Şekil 4.3'de ve maya-küf gen kopya sayıları Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

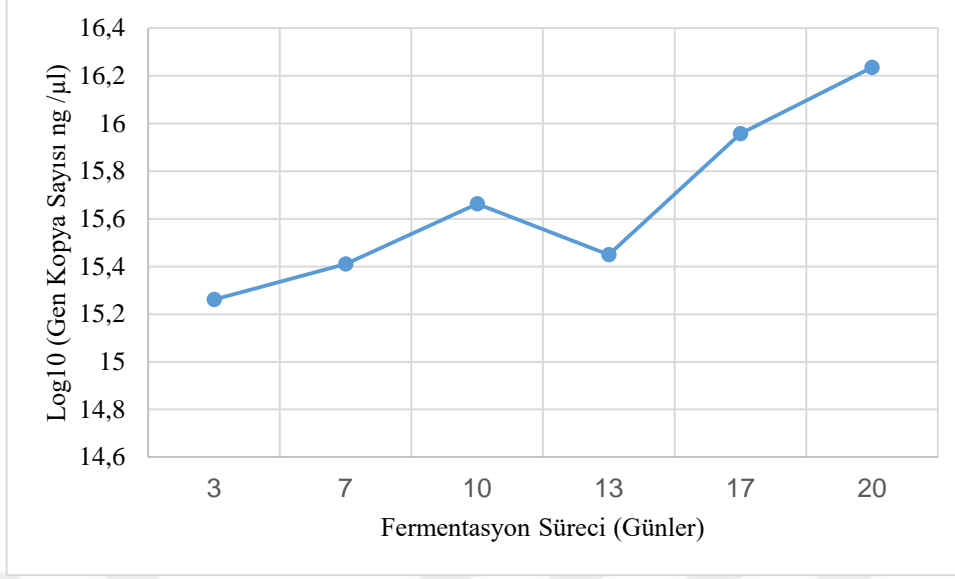
$$\begin{aligned} \text{Gen kopya sayısı} &= (\text{DNA konsantrasyonu [ng/}\mu\text{l]}) \left( \frac{1 \text{ g}}{1,000^3 \text{ ng}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol b}\check{\text{c}} \cdot \text{DNA}}{660 \text{ g DNA}} \right) \\ &\times \left( \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ b}\check{\text{c}}}{\text{mol b}\check{\text{c}}} \right) \left( \frac{1 \text{ kopya}}{\text{genom veya plazmid uzunlu}\check{\text{ğ}} \text{ [b}\check{\text{c}}]} \right) \end{aligned}$$

**Şekil 4.1.** Gen Kopya sayısı formülü (Ritalahti ve ark., 2006)



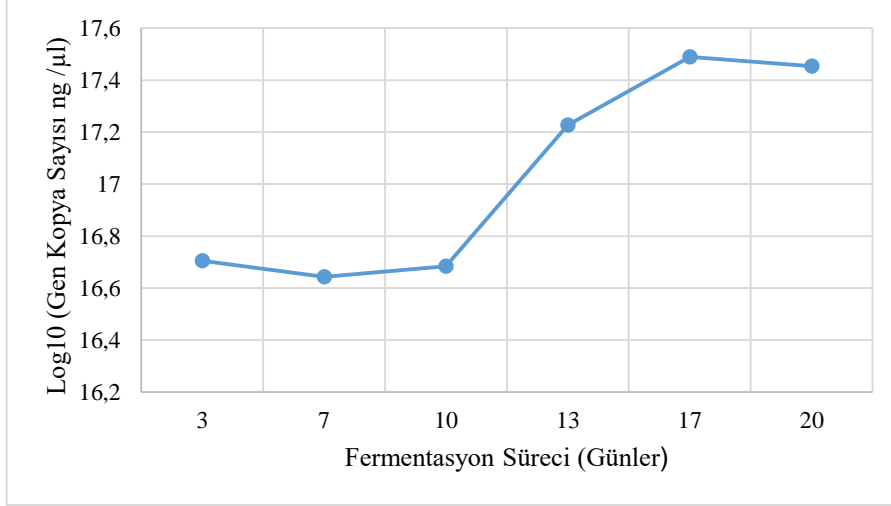
**Şekil 4.2.** Toplam Bakteri Gen Kopya Sayısı Değişimi

Bakteri 16S rRNA gen bölgesini çoğaltan primerlerin kullanıldığı PZR analizinin sonuçları incelendiğinde toplam bakteri sayısında genel düşüş gözlemlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.3’de görülen değişimler ile tutarlılık göstermektedir, ancak Tablo 4.3’de 7. ile 10. gün arasındaki artış burada görülmemektedir; ancak mikroorganizma sayısındaki genel düşüş tutarlılık göstermektedir. Ayrıca laktik asit bakteri popülasyonu artarken toplam bakteri popülasyonunun düşmesi fermentasyon ortamı için uygun bir durumdur; çünkü ortam pH’ı giderek düşmektedir. Dolayısıyla ortam bakteri gelişimi için giderek uygunsuz hale gelmektedir. 3. ile 7. günler arasında düşüş yavaşken, fermentasyonun hızlandığı 7. ve 13. günler arasında düşüş hızlanmış, fermentasyonun dengeye geldiği 13. ve 17. günler arasında ise bir miktar artış olmuştur. Bu evre laktik asit bakterileri popülasyonunun en hızlı arttığı evredir. 17. ve 20. günler arasında ise popülasyon yeniden azalmaya başlamıştır. Bakterilerin toplam gen kopya sayısı  $1,08 \times 10^{22}$  ile  $8,7 \times 10^{20}$  arasında değişmiştir.



**Şekil 4.3.** Laktik Asit Bakterisi Gen Kopya Sayısı Değişimi

Şalgam üzerine yapılan birçok çalışma incelendiğinde fermantasyon sürecinin laktik asit bakterileri tarafından yürütüldüğü görülmektedir. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 beraber incelendiğinde toplam bakteri sayısı azalırken, laktik asit bakterilerinin çoğaldığı görülmektedir. Fermantasyonun 3. gününden 7. gününe kadar laktik asit bakteri sayısında artış görülmektedir. 10. ve 13. günler arasında ise popülasyonda bir miktar düşüş gözlemlenmiştir. Tablo 4.3 incelendiğinde de benzer bir durum görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.4 incelendiğinde bu evre küf-maya sayısında artışın en hızlı olduğu evredir, yani bu noktada küf-mayaların fermantasyon üzerindeki etkisinin giderek arttığı söylenebilir. Yeni nesil dizileme sonuçları da incelendiğinde bu evrede küf-maya popülasyonunun dengeye geldiği görülmektedir. Ancak 13. günden sonra laktik asit bakterilerindeki artış hızlanmış, 17. ile 20. arasında ise artış daha yavaş olarak devam etmiştir. Laktik asit bakterileri gen kopya sayısı değerlerinin ise  $1,82 \times 10^{15}$  ile  $1,71 \times 10^{16}$  arasında değiştiği gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.4.** Küf-Maya Gen Kopya Sayısı Değişimi

Şalgam üzerinde etkili olan laktik asit bakterileri birçok çalışmada detaylıca incelenmiş olmasına karşın fermantasyon sürecinde maya-küflerin değişimi tam olarak belirtilmemiştir. Şalgam üretiminin başlangıcında dışarıdan *Saccharomyces cerevisiae* ilavesi yapılmaktadır. Diğer küf-mayalar ise fermantasyon tankları ve hammadde üzerinde bulunan mikrofloradan gelmektedir (Tangüler ve ark., 2012b). Fermantasyon sürecinin başında küf-maya gelişiminde ciddi bir artış olmamıştır. 7. ile 10. günler arasında bir miktar artış olup, en ciddi artış 10. ve 13.günler arasında görülmüştür. Bu aşama, Şekil 4.2’de de görülebileceği üzere laktik asit bakterileri popülasyonunun düşüş gösterdiği evredir. 13. ve 17. günler arasında bir miktar artış gözlemlenmiş olup, küf maya gelişimi 17. günden sonra yeniden durmuştur. Küf-maya için gen kopya sayısı değerleri  $4,39 \times 10^{16}$  ile  $3,08 \times 10^{17}$  arasında değişiklik göstermiştir.

Toplam canlı bakteri, laktik asit bakterileri ve küf-maya gelişimleri birlikte değerlendirildiğinde laktik asit bakterileri ile birlikte küf-mayalarının da fermantasyon sürecinde etkin olduğu söylenebilir. Fermantasyonun ilk on gününde laktik asit bakterileri gelişirken küf-maya gelişimi yavaş şekilde seyretmektedir. Ancak 10. günden sonra laktik asit bakteri sayısında düşüş ile küf-maya gelişiminde artış gözlemlenmesi bu aşamada küf-mayaların laktik asit bakterilerine baskın hale geçmeye başladığı görülmektedir. Bütün tablolar bizlere şalgam fermantasyonunun 10. ve 13. gün arasında dengeye geldiğini göstermektedir. 13. ve 17. günlerde hem laktik asit bakterileri hem de küf maya sayısında artış görülmektedir. Zaten endüstriyel üretimde fermantasyon 17. ve 20. gün arasında son ürünün durumuna göre bitirilmektedir. Çalışmamıza göre özetle şalgam üretiminde LAB kadar küf mayaların da rol aldığını söylemek mümkündür.

#### 4.5. Biyoinformatik Analiz Sonuçları:

Yeni nesil dizileme analizleri sonucunda şalgam örneklerinin bakteri ve küf-maya tanımlamaları yapılabilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde her gün için yaklaşık 30 bakteri türü tespit edilmiş, küf-maya çeşidi ise çok daha az sayıda tespit edilmiştir. Bakteriler arasında *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactobacillus lactis*; küf-maya grubunda ise bekleneneği üzere *Saccharomyces cerevisiae* ve farklı olarak *Candida boidinii* baskın olarak bulunmuştur. Bakteri ve küf-maya topluluklarının belirlenmesinde 16S V4-V5 ve ITS2 bölgesini çoğaltan primerler kullanılmış, küf maya profili günlere göre sırasıyla Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da; bakteri profili ise günlere göre sırasıyla Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Küf-Maya Dağılımı 3-7.Gün

3. GÜN			7. GÜN		
#	Küf-Maya Türü	Örnek İçindeki Yüzdesi	#	Küf-Maya Türü	Örnek İçindeki Yüzdesi
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77,233	1	<i>Candida boidinii</i>	96,495
2	<i>Candida boidinii</i>	10,951	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,217
3	<i>Typhula ishkariensis</i>	9,222	3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0,410
4	Uncultured fungus (stilbum)	2,594	4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,414
<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>	5	<i>Barnettozyma californica</i>	0,193
			6	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	0,124
			8	<i>Naganishia albida</i>	0,043
			9	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,031
			10	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,031
			11	<i>Trebouxia sp.</i>	0,031
			12	<i>Acremonium antarcticum</i>	0,012
			<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>

Şalgam fermantasyonunun ilk haftasındaki küf-maya gelişimi incelendiğinde, 3. günde hala *S. cerevisiae*'nin baskın olduğu görülmektedir. Ekmek mayasının yanı sıra *Candida boidinii* ve *Typhula ishkariensis* gelişimi de 3. günde görülmektedir. Ayrıca Tanımlanmamış *Stilbum* küf DNA'sı 3. günde alınan şalgam suyu örneklerinde tanımlanmıştır. Fakat bu türler, 7. günden itibaren tespit edilememiştir.

*Typhula* mantar türleri çimen ve tahıllara zarar veren patojen bir küf türüdür (Arsvoll ve Smith, 1978). *Typhula ishkariensis* ise karlı bölgelerde çimen ve kış tahıllarına zarar veren ve özellikle uzun süre kar altında kalan bitkileri etkileyen patojen bir mantar türüdür (Chang, 2015). Şalgam üretiminde kullanılacak havuçların hasat sonrasında "lodalama" denilen işleme tabi tutulması, yani fabrika ve dağıtım yerlerine ulaştırılmadan önce toprak ve kar altında

bekletilmesi neticesinde bu mantar türünün havuçlara bulaştığı düşünülmektedir. *Daucus carota* ise kırmızı havucun Latince adı olup, 3. günde diğer türler ile birlikte DNA'sı tespit edilmiştir. *Stilbum* türü mantarlar ise bitki dokularında yaygın olarak bulunan bir mantar türüdür (Akinsanmi ve Dreth, 2006). 7. günde ise bitki patojenleri ortadan kaybolmuş, *Candida boidinii* küf-maya popülasyonunda üstünlüğü ele geçirmiştir ve diğer küf-maya türleri gelişmeye başlamıştır.

**Tablo 4.5.** Küf-Maya Dağılımı 10-13.Gün

10. GÜN			13. GÜN		
#	Küf-Maya Türü	Örnek İçindeki Yüzdesi	#	Küf-Maya Türü	Örnek İçindeki Yüzdesi
1	<i>Candida boidinii</i>	91,352	1	<i>Candida boidinii</i>	97,981
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,623	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,299
3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1,975	3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0,626
4	<i>Trichosporon</i> sp	0,051	4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,070
<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>	5	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	0,023
			<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>

Şalgam üretiminin ikinci haftasında *Candida boidinii*'nin üstünlüğü devam etmekte olup, *Wickerhamomyces anomalus* ve *Rhodotorula mucilaginosa* varlık göstermektedir. Bu aşamada görülen *Wickerhamomyces anomalus* (eski adıyla *Pichia anomala*), tomurcuklanarak ve ascospore oluşumuyla aseksüel olarak üreyen *Wickerhamomycetaceae* ailesine ait bir maya türüdür. Bu tür birçok ortamda bulunmakla birlikte meyve ve bitki dokularından, tahıl tanelerinden mısırdan, yüksek şekerli gıda ürünlerinden ve şaraptan izole edilmiştir. *Wickerhamomyces anomalus*, düşük ve yüksek pH, düşük su aktivitesi, yüksek ozmotik basınç ve anaerobik koşullar gibi aşırı çevresel stres koşullarında büyüyebilmektedir (Satora ve ark., 2014). Bu özelliklerden dolayı şalgamın düşük pH ortamında da gelişebilmiştir. *Rhodotorula mucilaginosa* ise genellikle yiyeceklerden ve içeceklerden izole edilmiştir. Bazı çalışmalarda yer fıstığı, elma şarabı, kiraz, taze meyve, meyve suyu, peynir, sosis, yenilebilir yumuşakçalar ve kabuklularda da *R. mucilaginosa*'nın varlığı tespit edilmiştir (Wirth ve Goldani, 2012).

**Tablo 4.6.** Küf-Maya Dağılımları 17-20.Gün

17. GÜN			20. GÜN		
#	Küf-Maya Türü	rnek İçindeki Yüzdesi	#	Küf-Maya Türü	rnek İçindeki Yüzdesi
1	<i>Candida boidinii</i>	96,164	1	<i>Candida boidinii</i>	61,687
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,124	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34,192
3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1,383	3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1,867
4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,156	4	<i>Malassezia restricta</i>	0,966
5	<i>Barnettozyma californica</i>	0,101	5	<i>Uncultured Agaricomycetes</i>	0,901
6	<i>Candida humilis</i>	0,037	6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,193
7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,037	7	<i>Rhodotorula diobovata</i>	0,193
<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>	<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>

Üretim son haftasında *C. boidinii* hala % 90 oranında küf-maya popülasyonunda bulunmaktadır. Ancak 20. günde bu oran % 60'a düşmüş ve *S. cerevisiae* yeniden yükseliş geçmiştir. Ayrıca şalgam koşullarına dayanıklı *W. anomalus* yüzde 1-2 oranlarında hala ortamda bulunmaktadır.

Küf-maya sonuçları incelendiğinde, aslında şalgam üretim sürecinde ekşi hamur yapımında kullanılan ekme mayası *S. cerevisiae*'nin baskın olması beklenirken, *C. boidinii*'nin % 90 oranlarında fermantasyon boyunca baskın olarak seyrettiği görülmüştür. Bu mikroorganizma tabiatta yaygın olarak bulunan bir tür olup, özellikle insan aktivitesine bağlı şarap fermantasyonu, zeytin işleme gibi substratlardan izole edilmiştir. Bununla birlikte *C. boidinii* biyoteknolojik potansiyele sahip bir türdür. Özellikle zeytin üretiminde lipaz aktivitesi, meyve epidermisi üzerinde biyofilm oluşumu ve laktik asit bakterileri ile bir arada gelişme gibi özellikler göstermektedir (Camiolo ve ark., 2017). Şalgam üretiminde küf-maya ile bakteri popülasyonunun birbirine yakın olduğu ve kf-mayaların neredeyse fermantasyon sonuna kadar yüzde doksanını bu türün oluşturduğu göz önüne alındığında *C. boidinii*'nin şalgama tadını veren en önemli mikroorganizma türü olabileceği düşünülmektedir. *C. boidinii*'nin 17. günden itibaren azalmaya ve fırsatçı kf-mayaların yeniden ortamda çoğalmaya başlamasının maya-küf popülasyonu açısından değerlendirildiğinde 17 günün endüstriyel şalgam fermantasyonu için yeterli bir süre olduğu yorumunu yapmak mümkündür.

**Tablo 4.7. Bakteri Dağılımı 3-7.Gün**

3. GÜN			7.GÜN					
#	Bakteri Türü	Örnek İçindeki yüzdesi	#	Bakteri Türü	Örnek İçindeki yüzdesi	#	Bakteri Türü	Örnek İçindeki yüzdesi
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	48,507	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	44,750	29	<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	0,066
2	<i>Lactococcus lactis</i>	12,714	2	<i>Lactococcus lactis</i>	27,826	30	<i>Shewanella algae</i>	0,047
3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	12,161	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	6,524	31	<i>Myroides odoratus</i>	0,043
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,418	4	<i>Serratia grimesii</i>	5,010	32	<i>Gallaecimonas pentaromativorans</i>	0,033
5	<i>Serratia grimesii</i>	4,046	5	<i>Enterobacter cloacae</i>	3,598	33	<i>Weissella soli</i>	0,028
6	<i>Leuconostoc inhae</i>	3,516	6	<i>Raoultella terrigena</i>	2,314	34	<i>Kluyvera ascorbata</i>	0,026
7	<i>Weissella confusa</i>	2,897	7	<i>Weissella confusa</i>	2,290	35	<i>Uncultured bacterium</i>	0,021
8	<i>Enterobacter asburiae</i>	1,920	8	<i>Leuconostoc inhae</i>	1,535	36	<i>Lactobacillus nagelii</i>	0,019
9	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1,637	9	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1,164	37	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,017
10	<i>Raoultella terrigena</i>	1,013	10	<i>Leuconostoc kimchii</i>	0,686	38	<i>Leuconostoc fallax</i>	0,014
11	<i>Serratia fonticola</i>	0,824	11	<i>Serratia fonticola</i>	0,554	39	<i>Uncultured bacterium</i>	0,014
12	<i>Leuconostoc kimchii</i>	0,724	12	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,471	40	<i>Chishuiella sp.</i>	0,014
13	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,707	13	<i>Serratia plymuthica</i>	0,440	41	<i>Sphingobacterium sp.</i>	0,014
14	<i>Klebsiella michiganensis</i>	0,624	14	<i>Klebsiella michiganensis</i>	0,267	42	<i>Paenibacillus sp.</i>	0,009
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,536	15	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,263	43	<i>Sphingobacterium sp.</i>	0,009
16	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,483	16	<i>Acetobacter acetii</i>	0,225	44	<i>Pedobacter sp</i>	0,009
17	<i>Serratia plymuthica</i>	0,377	17	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	0,222	45	<i>Thalassospira mesophila</i>	0,007
18	<i>Lactococcus piscium</i>	0,353	18	<i>Lactococcus piscium</i>	0,196	46	<i>Proteus vulgaris</i>	0,007
19	<i>Vibrio fluvialis</i>	0,230	19	<i>Vibrio fluvialis</i>	0,187			
20	<i>Weissella confusa</i>	0,206	20	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,175			
21	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	0,188	21	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,163			
22	<i>Weissella soli</i>	0,183	22	<i>Aeromonas caviae</i>	0,114			
23	<i>Aeromonas caviae</i>	0,165	23	<i>Pseudocitrobacter anthropi</i>	0,111			
24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,153	24	<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,097			
25	<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,130	25	<i>Uncultured (Dysgonomonas)</i>	0,102			
26	<i>Shewanella decolorationis</i>	0,082	26	<i>Acetobacter peroxydans</i>	0,085			
27	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	0,071	27	<i>Enterococcus italicus</i>	0,083			
28	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,071	28	<i>Chryseobacterium sp</i>	0,078			
29	<i>Enterococcus gallinarum</i>	0,065	29	<i>Lactococcus garvieae</i>	0,071			
<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>	<b>TOPLAM</b>					<b>100</b>

Bakteri popülasyonunda ilk haftada en baskın olan üç tür *L. mesenteroides*, *L. lactis* ve *L. pseudomesenteroides* olarak tespit edilmiştir. Bu üç tür toplam bakteri popülasyonunun yaklaşık % 75-80'nini oluşturmaktadır. Tüm süreç boyunca en çok bakteri türü 7. günde tespit edilmiş olup, *Serratia grimesii* ve *Enterobacter cloacae* laktik asit bakterilerinden sonra baskın türler olarak tespit edilen türlerdir. İki tür de *Enterobacteriaceae* ailesine mensup olup tabiatta yaygın olarak bulunmaktadır (Stok ve ark., 2003; Hinton ve Bacon, 1995).

**Tablo 4.8.** Bakteri Dağılımı 10-13.Gün

10. GÜN			13.GÜN		
#	Bakteri Türü	Örnek içindeki yüzdesi	#	Bakteri Türü	Örnek içindeki yüzdesi
1	<i>Lactococcus lactis</i>	47,668	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	40,850
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	18,922	2	<i>Lactococcus lactis</i>	28,561
3	<i>Vibrio fluvialis</i>	18,157	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	10,646
4	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	5,763	4	<i>Enterobacter cloacae</i>	3,092
5	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,159	5	<i>Leuconostoc inhae</i>	2,923
6	<i>Weissella confusa</i>	1,971	6	<i>Serratia grimesii</i>	2,843
7	<i>Aeromonas caviae</i>	1,235	7	<i>Weissella confusa</i>	2,921
8	<i>Serratia grimesii</i>	0,755	8	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1,988
9	<i>Leuconostoc inhae</i>	0,689	9	<i>Enterobacter asburiae</i>	1,355
10	<i>Serratia plymuthica</i>	0,629	10	<i>Raoultella terrigena</i>	1,037
11	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,318	11	<i>Leuconostoc kimchii</i>	0,858
12	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	0,306	12	<i>Serratia fonticola</i>	0,537
13	<i>Serratia fonticola</i>	0,273	13	<i>Klebsiella michiganensis</i>	0,345
14	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,173	14	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,313
15	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	0,166	15	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,281
16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,164	16	<i>Lactococcus piscium</i>	0,219
17	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,154	17	<i>Serratia plymuthica</i>	0,200
18	<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,123	18	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	0,158
19	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,112	19	<i>Aeromonas caviae</i>	0,150
20	<i>Weissella confusa</i>	0,090	20	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,136
21	<i>Shewanella decolorationis</i>	0,078	21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,107
22	<i>Acetobacter acetii</i>	0,038	22	<i>Lactococcus garvieae</i>	0,104
23	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	0,024	23	<i>Vibrio fluvialis</i>	0,091
24	<i>Lactobacillus nagelii</i>	0,019	24	<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,053
25	<i>Rhizobium sp</i>	0,007	25	<i>Weissella soli</i>	0,051
26	<i>Xanthomonas oryzae</i>	0,005	26	<i>Shewanella decolorationis</i>	0,045
<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>	27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,091
			28	<i>Enterococcus italicus</i>	0,032
			29	<i>Leuconostoc fallax</i>	0,013
			<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>

10. günde *L. lactis* bakteri popülasyonunun yaklaşık % 48'ini oluşturmak suretiyle baskın tür haline gelmiştir. Ancak 13. günde *L. mesenteroides* yeniden baskın hale gelmiştir. 10. günde bir diğer fırsatçı mikroorganizma *Vibrio fluvialis*, *L. pseudomesenteroides*'in de önüne geçerek üçüncü baskın tür haline gelmiştir. *V. fluvialis* tuzlu ve özellikle suda gelişen bir bakteri türüdür (Wu ve ark., 2019). Bununla birlikte ortamda yaklaşık % 2 oranında *Weissella confusa* tanımlanmıştır. Bu tür, *L. pseudomesenteroides*'e genetik benzerlik gösteren ve şeker kamışı, havuç suyu, çiğ süt gibi ortamlarda gelişen bir bakteri türüdür (Björkroth ve ark., 2002).

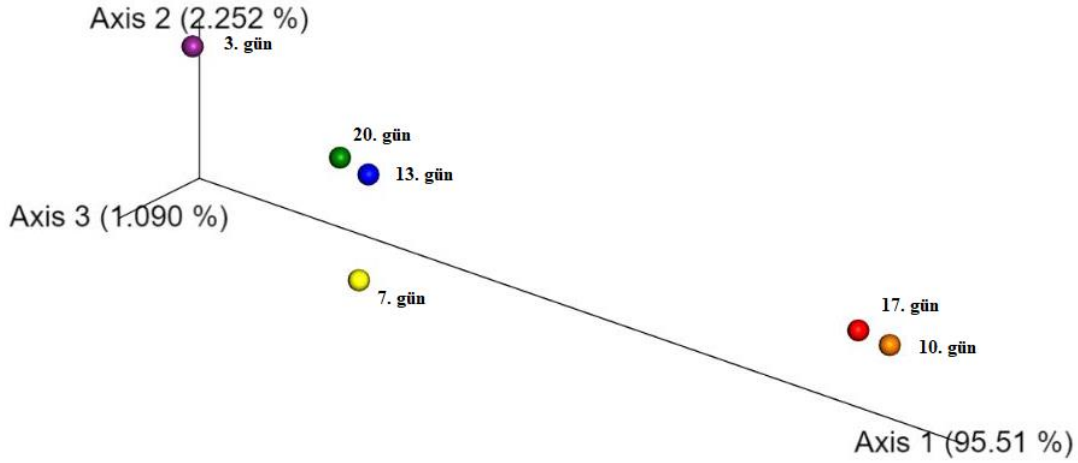
**Tablo 4.9.** Bakteri Dağılımı 17-20.Gün

17. GÜN			20.GÜN		
#	Bakteri Türü	Örnek İçindeki Yüzdesi	#	Bakteri Türü	Örnek İçindeki Yüzdesi
1	<i>Lactococcus lactis</i>	56,373	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	42,720
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	23,815	2	<i>Lactococcus lactis</i>	24,859
3	<i>Vibrio fluvialis</i>	6,702	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	7,900
4	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	2,389	4	<i>Enterobacter cloacae</i>	4,405
5	<i>Weissella confusa</i>	2,325	5	<i>Leuconostoc inhae</i>	3,661
6	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,539	6	<i>Serratia grimesii</i>	3,376
7	<i>Aeromonas caviae</i>	1,438	7	<i>Weissella confusa</i>	2,553
8	<i>Serratia grimesii</i>	0,791	8	<i>Enterobacter huaxiensis</i>	1,833
9	<i>Serratia plymuthica</i>	0,705	9	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1,517
10	<i>Acetobacter acetii</i>	0,577	10	<i>Raoultella terrigena</i>	1,172
11	<i>Leuconostoc inhae</i>	0,577	11	<i>Leuconostoc kimchii</i>	0,874
12	<i>Enterobacter asburiae</i>	0,444	12	<i>Vibrio fluvialis</i>	0,761
13	<i>Serratia fonticola</i>	0,422	13	<i>Serratia fonticola</i>	0,680
14	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	0,358	14	<i>Klebsiella michiganensis</i>	0,599
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,315	15	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,399
16	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,230	16	<i>Weissella confusa</i>	0,350
17	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,224	17	<i>Serratia plymuthica</i>	0,347
18	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	0,203	18	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,290
19	<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,198	19	<i>Lactococcus piscium</i>	0,249
20	<i>Acetobacter papayae</i>	0,112	20	<i>Aeromonas caviae</i>	0,243
21	<i>Raoultella terrigena</i>	0,107	21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,173
22	<i>Shewanella decolorationis</i>	0,059	22	<i>Erwinia rhapontici</i>	0,158
23	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,048	23	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	0,153
24	<i>Herbaspirillum sp</i>	0,048	24	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,139
<b>TOPLAM</b>			25	<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,081
			26	<i>Pseudocitrobacter anthropi</i>	0,075
			27	<i>Shewanella decolorationis</i>	0,075
			28	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,072
			29	<i>Lactococcus garvieae</i>	0,058
			30	<i>Weissella soli</i>	0,055
			31	<i>Kluyvera ascorbata</i>	0,055
			32	<i>Kosakonia cowanii</i>	0,043
			33	<i>Pseudomonas sp</i>	0,038
			34	<i>Enterococcus italicus</i>	0,026
			35	<i>Leuconostoc fallax</i>	0,013
			<b>TOPLAM</b>		<b>100</b>

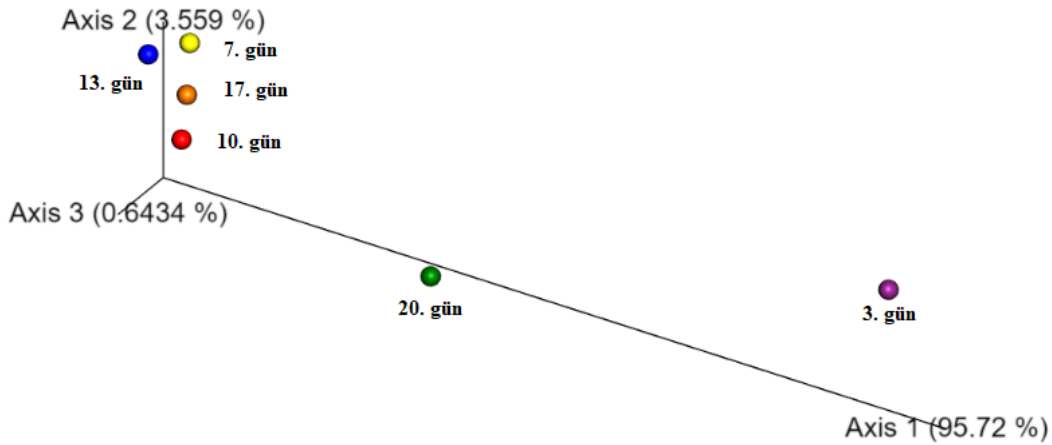
Fermantasyonun 17. gününde *L. lactis* yeniden baskın tür haline gelmiştir. Ancak 20. günde yeniden *L. mesenteroides*'in gerisine düştüğü görülmüştür. *V. fluvialis* 17. günde de ciddi varlık göstermektedir. Sonuç olarak endüstriyel şalgam üretiminin bakteri popülasyon dağılımı sonuçları incelendiğinde diğer çalışmalarda da belirtildiği gibi baskın türün laktik asit bakterileri olduğu gözlemlenmiştir. Özetle fermantasyon sürecinde baskın türlerin C.

*boidinii*, *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *L. pseudomesenteroides* ve kısmen *S. cerevisiae* olduğu belirlenmiştir.

#### 4.6. Şalgam Suyu Örneklerinin Biyoinformatik Analiz Sonuçlarına Göre İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi:



Şekil 4.5. Bakteri popülasyonlarının örneklere göre kompozisyon farklılıklarını gösteren Bray-Curtis farklılığı

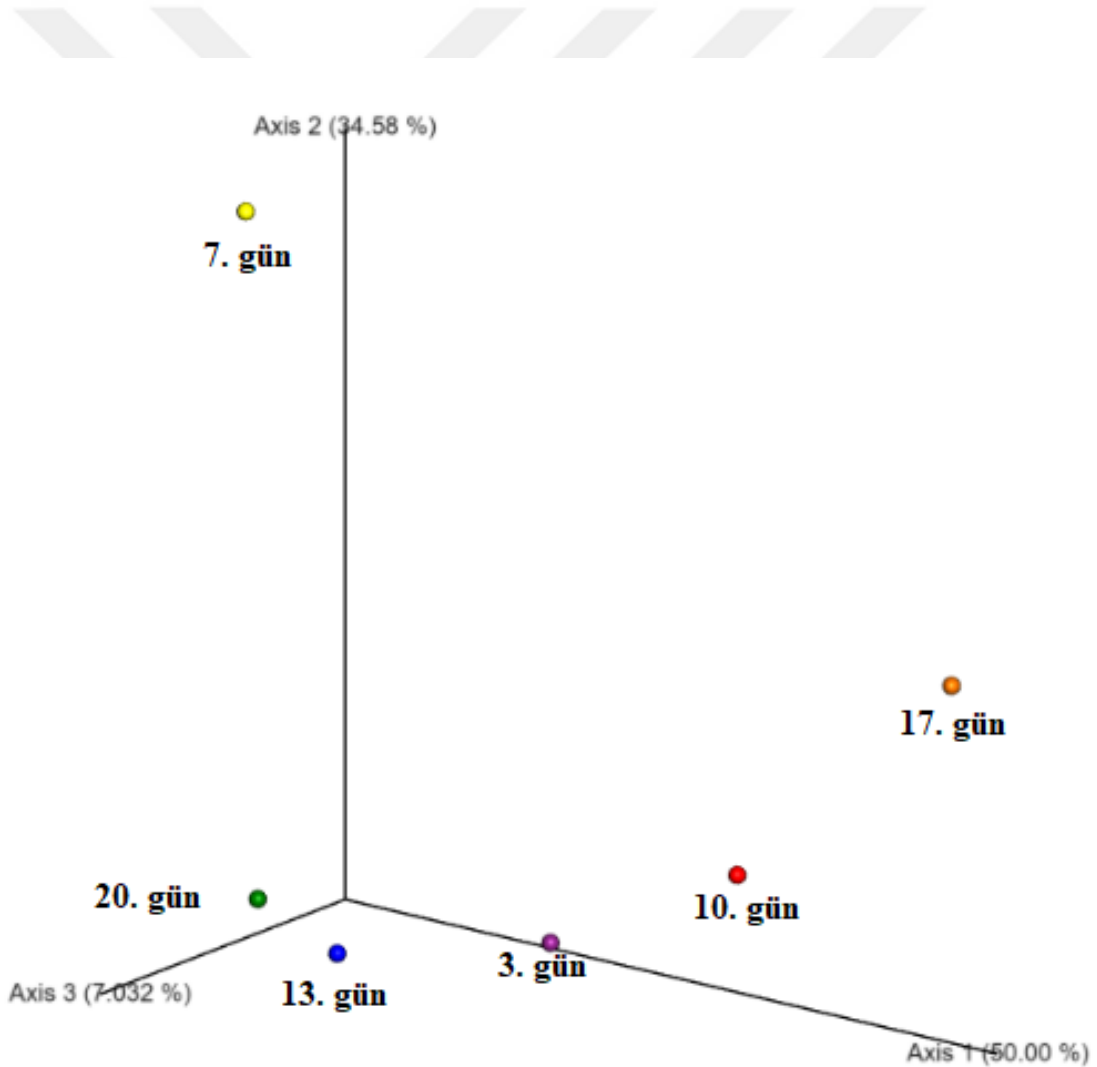


Şekil 4.6. Küf-maya popülasyonlarının örneklere göre kompozisyon farklılıklarını gösteren Bray-Curtis farklılığı

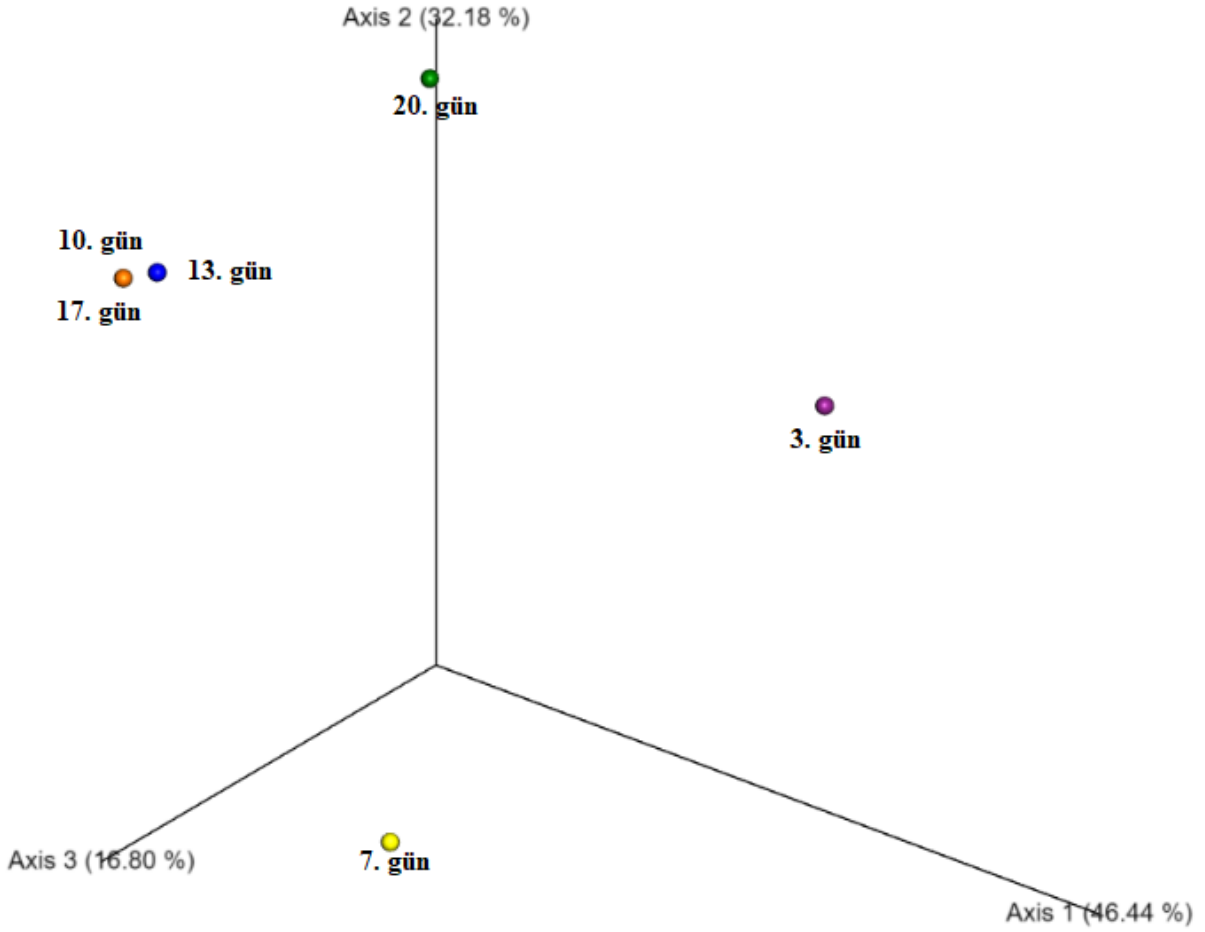
Bray-Curtis farklılığı (dissimilarity) örneklerin sahip olduğu mikrobiyal floranın nicel olarak farklılıklarını gösteren bir istatistiksel analiz yöntemidir. Bu yöntemde her bir örneğin barındırdığı mikroorganizma türü ve bunların nicel olarak birbirinden farklılıkları incelenmektedir. Her iki kümede de bulunan ve sayıca az olan eleman sayısının, kümelerin toplam eleman sayısına bölünmesi ve bu sonucun birden çıkarılması ile hesaplanmaktadır.

Bulunan değer 100 ile çarpılarak yzde değerine ulaşılmaktadır (Clarke ve ark., 2006). Şekil 4.5 incelendiğinde 7., 13. ve 20. günler bakteri bakımından birbiri ile benzerlik göstermiştir. 10. ve 17. günlerin ise diğer örneklerden ayrıldığı grlmştir; çünkü bu iki örnekte baskın tür diğer günlerin aksine *L. mesenteroides* değil, *L. lactis*'tir. Üstelik bu iki günde *V. fluvialis* diğer örneklerle oranla fazla miktarda bulunmaktadır.

Şekil 4.6 incelendiğinde küf-maya profilleri bakımından 20. ve 3. günler dışında örnekler birbirine benzerdir. 3. günde *Typhula ishikariensis* ve diğer toprak kökenli küfler bulunurken diğer günlerde bunlar tespit edilememiştir. 20. günde ise *S. cerevisiae* yeniden artışa geçmiştir.

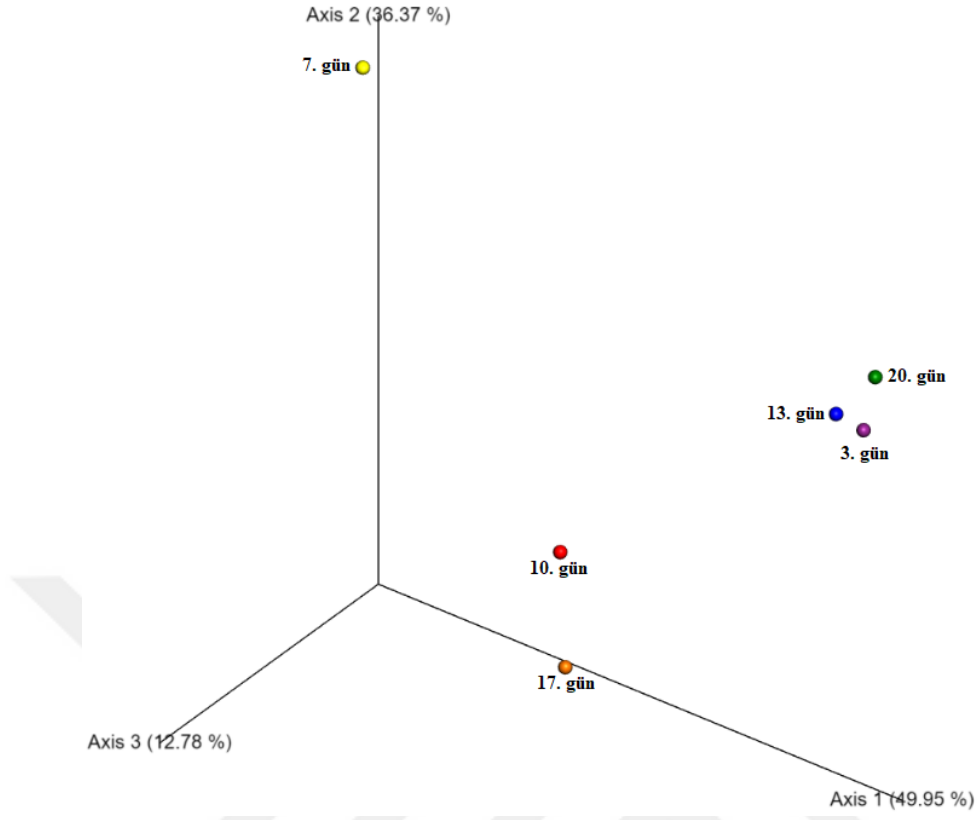


Şekil 4.7. Örneklerin Bakteri popülasyonları bakımından nitel farklılıklarını gösteren Jaccard Mesafesi

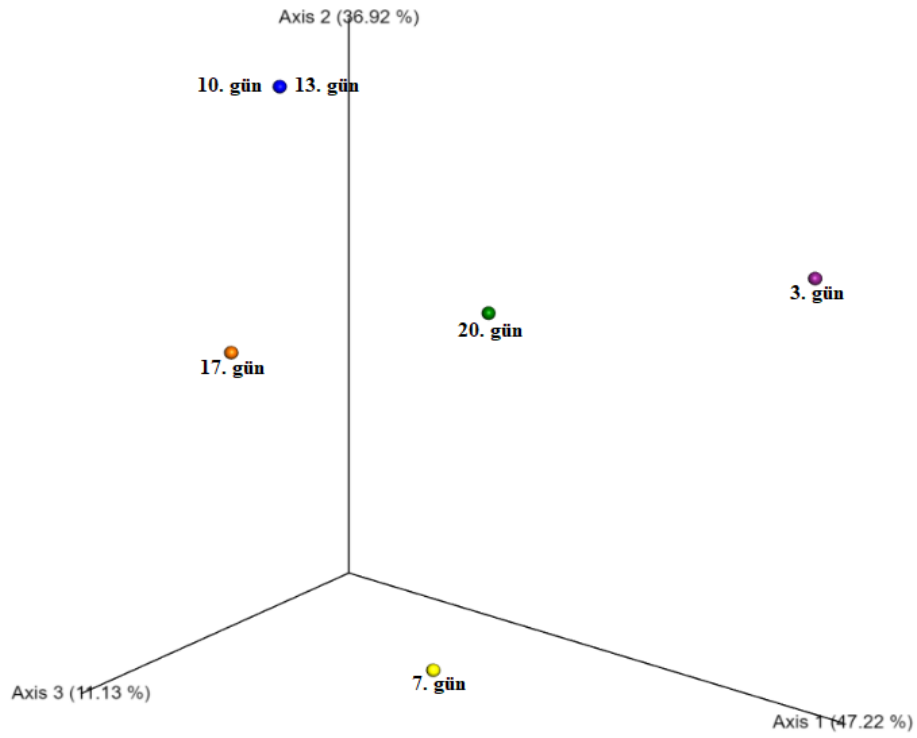


Şekil 4.8. Örneklerin Küf-maya popülasyonları bakımından nitel farklılıklarını gösteren Jaccard Mesafesi

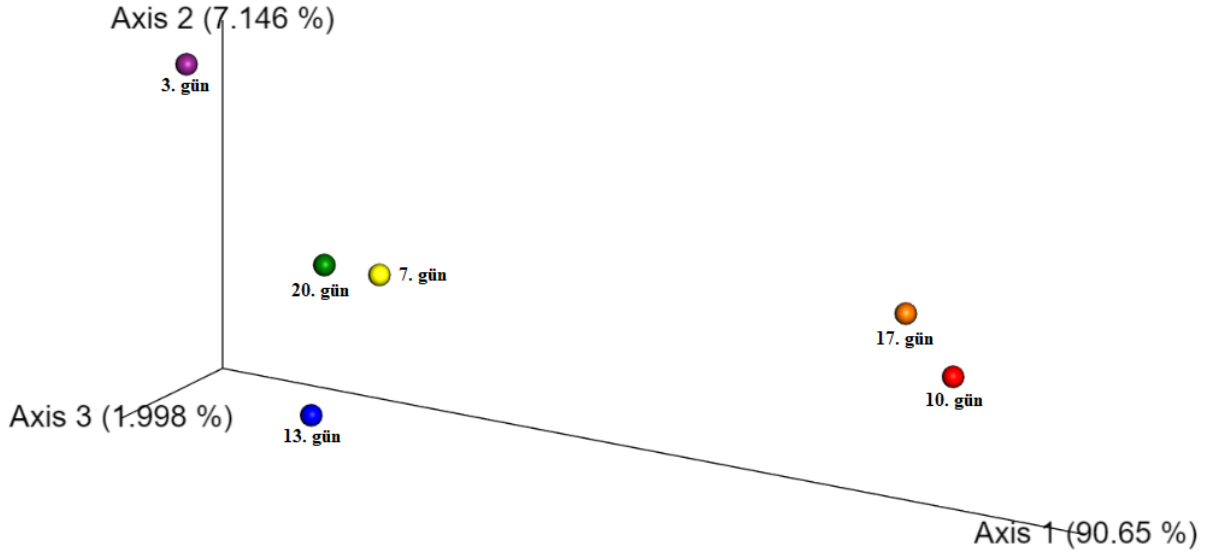
Jaccard mesafesi iki küme elemanlarının ne kadar benzerlik ve ne kadar farklılık gösterdiğini ölçen bir istatistiksel analiz yöntemidir.  $1-(A \cap B / A \cup B) * 100$  denklemi ile hesaplanmakta, A ve B burada iki farklı örneği temsil etmektedir ve yüzde olarak ifade edilmektedir. Biyoinformatik analizlerde örneklerin içerdikleri ortak ve birbirinden farklı mikroorganizma türleri bakımından nitel benzerliklerini göstermektedir (Prokopenko ve ark., 2015). Grafikler incelendiğinde örnek benzerlikleri Bray-Curtis sonuçları ile paralellik göstermektedir. Fermantasyonun 3. günü ve 20. günü küf-maya popülasyonu bakımından, 7. gün hem küf-maya hem bakteri popülasyonları bakımından nitel olarak farklılık göstermektedir.



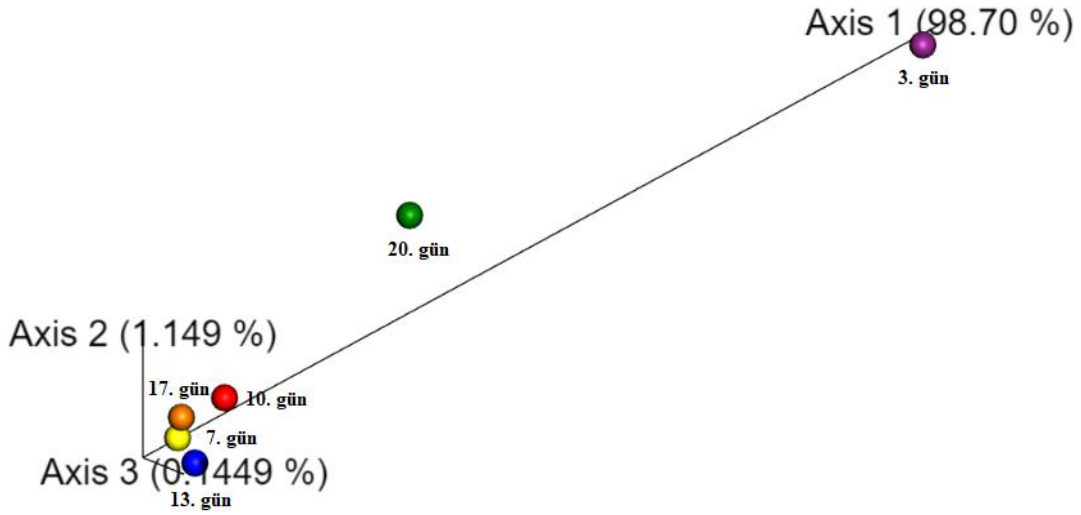
Şekil 4.9. Bakteri Ağrılıksız (Unweighted) Unifrac mesafesi



Şekil 4.10. Küf-maya Ağrılıksız (Unweighted) Unifrac mesafesi



Şekil 4.11. Bakteri Ağrılıklı (Weighed) Unifrac mesafesi



Şekil 4.12. Küf-maya Ağrılıklı (Weighed) Unifrac mesafesi

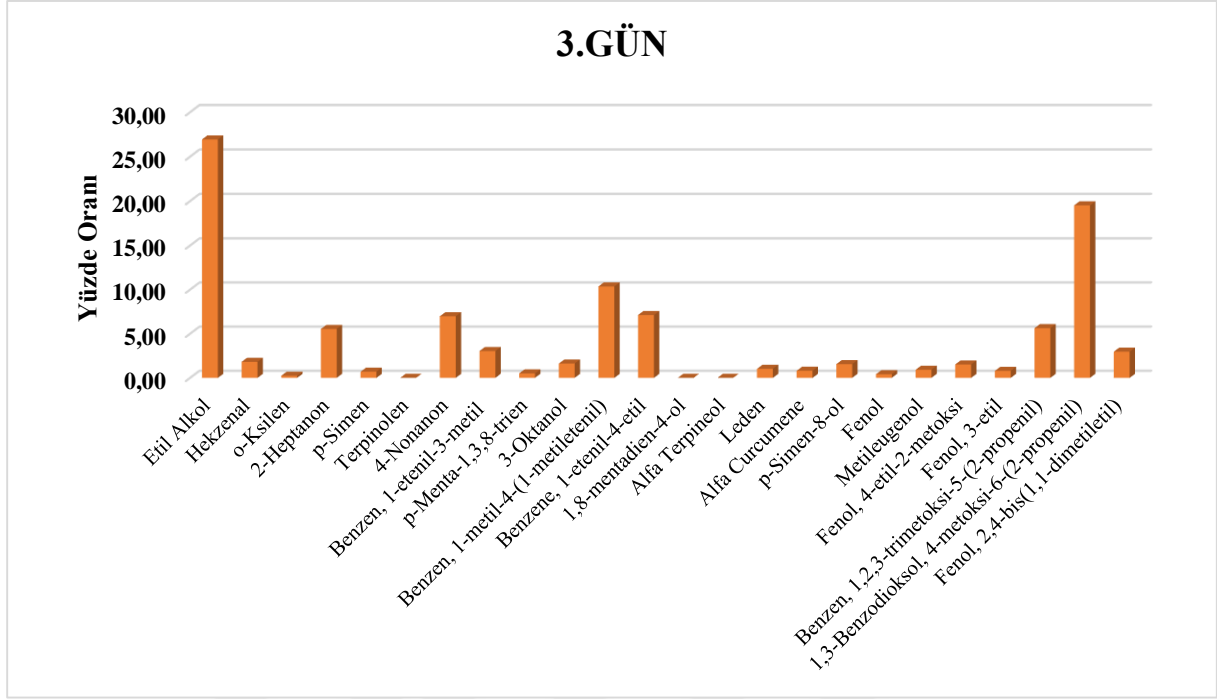
Ağrılıklı ve ağrılıksız unifrac mesafeleri örneklerin mikrobiyel toplulukları arasındaki benzerliği filogenetik bilgiyi de göz önünde bulundurarak nitel (ağrılıksız) ve nicel (ağrılıklı) olarak göstermektedir. Bu analiz yönteminde örneklerde tespit edilen toplam dal (branch) uzunluğu ve tespit edilen birimlerin hangi örnekte ne kadar tespit edildiği ve bu birimlerin birbirine olan genetik benzerlikleri göz önünde bulundurulmaktadır. (Lozupone ve ark., 2011). Ağrılıklı Unifrac sonuçları incelendiğinde 10. ve 17. gün örnekleri benzerlik göstermektedir. Küf-maya sonuçları incelendiğinde diğer günler birbiri ile benzerlik gösterirken yine 3. gün ve 20. gün örnekleri diğerlerinden farklılık göstermiştir. Bu duruma aynı Bray-Curtis sonuçları gibi 3. günde hala ortamda bulunan çevreden gelen küfler ile 20.

günde *S. cerevisiae*'nin yeniden artışa geçmesinin sebep olduğu düşünülmektedir. Ağırlıksız sonuçlar küf-mayalarda dağınık bir görüntü arz ederken, bakterilerde 7. gün farklılık göstermekte (en fazla bakteri türünün tespit edildiği gün) ve diğer istatistiksel sonuçlarla aynı şekilde 10. 17. günler ve diğer günlerin kendi aralarında gruplandıkları görülmektedir.

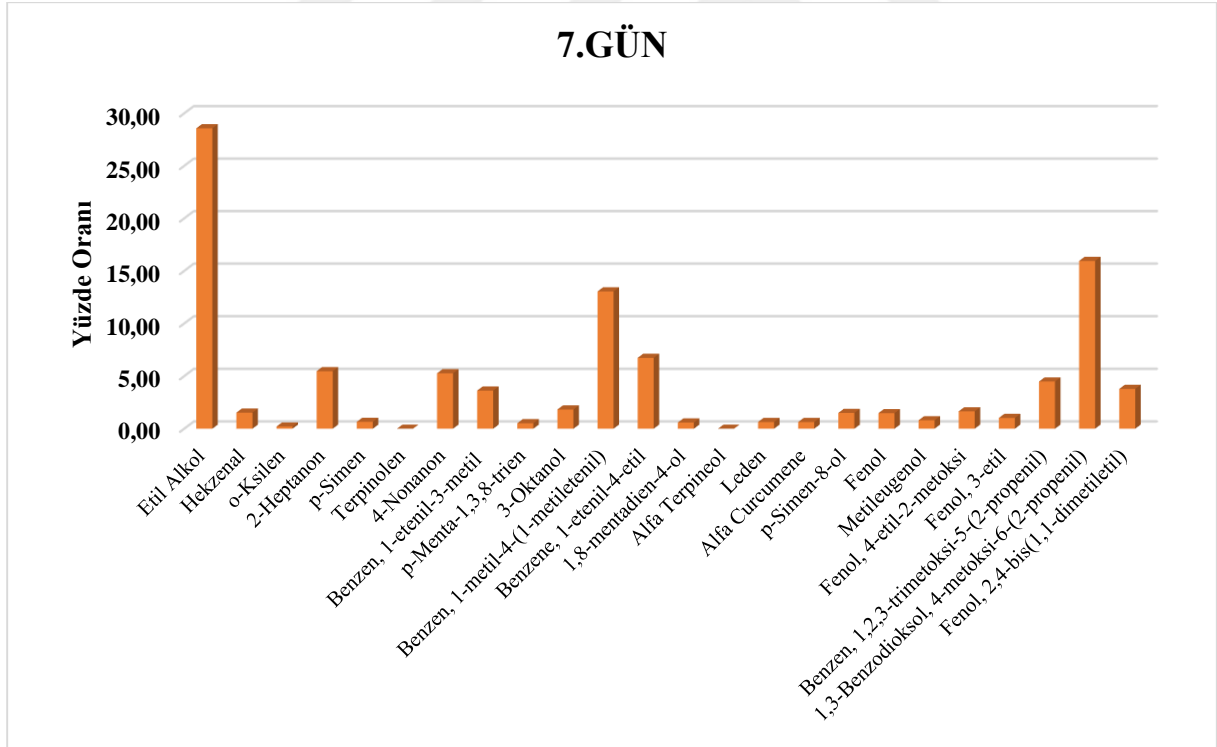
#### **4.7. Uçucu Aroma Bileşikleri Analizi Sonuçları:**

SPME ekstraksiyon yöntemi ile GC-MS kullanılarak yapılan uçucu aroma bileşikleri analiz sonuçları günlere göre sırasıyla şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 4.16 ve 4.17'de gösterilmiştir. Şalgam suyu örneklerinde en yüksek konsantrasyona sahip bileşikler etil alkol, 1,3-benzodioksol, 4-metoksi-6-(2-propenil), benzen, 1-metil-4-(1-metiletetil), 4-nonanon ve 1-etenil-4-etil olarak bulunmuştur.

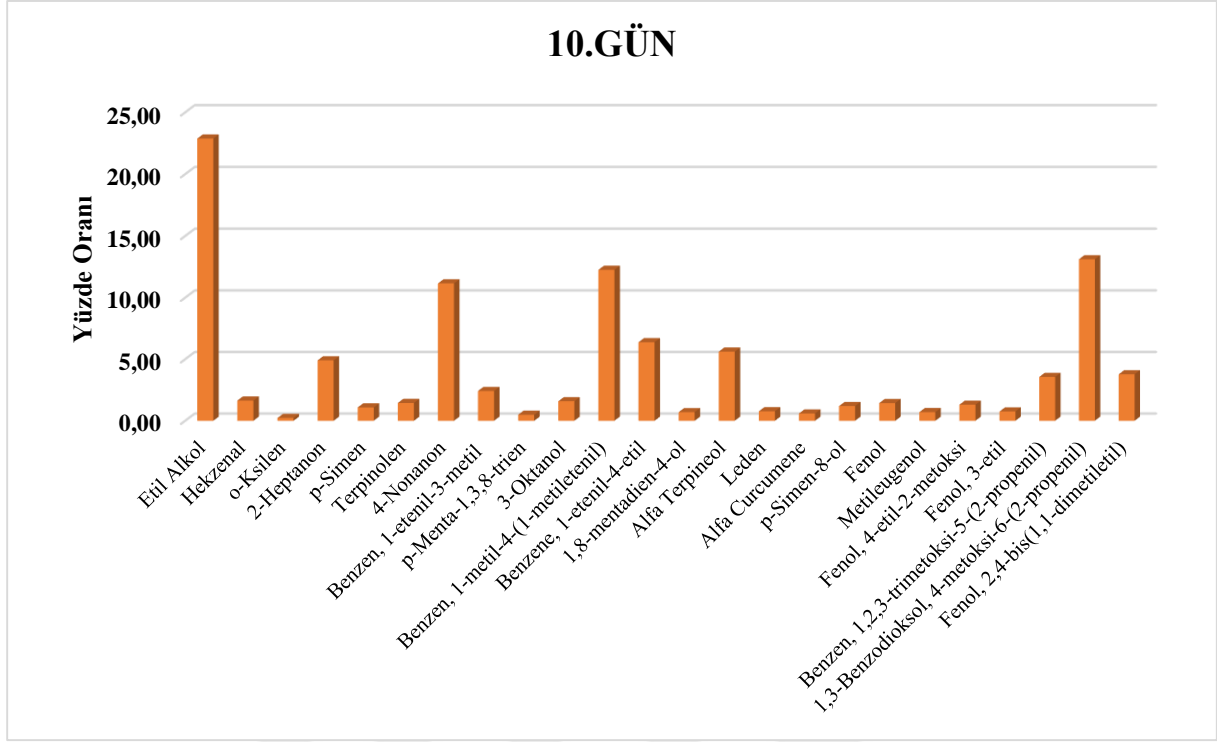
Uçucu aroma bileşiklerinden alfa terpieneol ve terpinolen 3.gün ve 7.gün'e ait örneklerde bulunmazken 10.günden itibaren tespit edilmiştir. 1-8 mentadien-4-ol ise sadece 3.güne ait örnekte bulunmazken diğer günlere ait numunelerde tespit edilmiştir. bütün uçucu aroma bileşiklerinin konsantrasyonunda düzenli bir artıştan söz etmek mümkün değildir. Örneğin yukarıda bahsi geçen aroma bileşikleri örneklerde ilk günlerde bulunmuyorken sonradan konsantrasyonlarının arttığı görülmüş, ancak alfa curcumen ve o-ksilen gibi bileşiklerin ise yaklaşık yarı yarıya azaldığı görülmüştür. Bütün örneklerde en yüksek konsantrasyona sahip etil alkol 3. gün ve 13. gün arasında benzer konsantrasyon değerlerine sahipken 17.günde en yüksek değerine ulaştığı görülmüştür. Aynı değerlendirmeyi diğer yüksek konsantrasyona sahip bileşikler için de söylemek mümkündür. Bütün bileşiklere ait konsantrasyonların günlere bağlı değişimi Tablo 4.10'da gösterilmiştir.



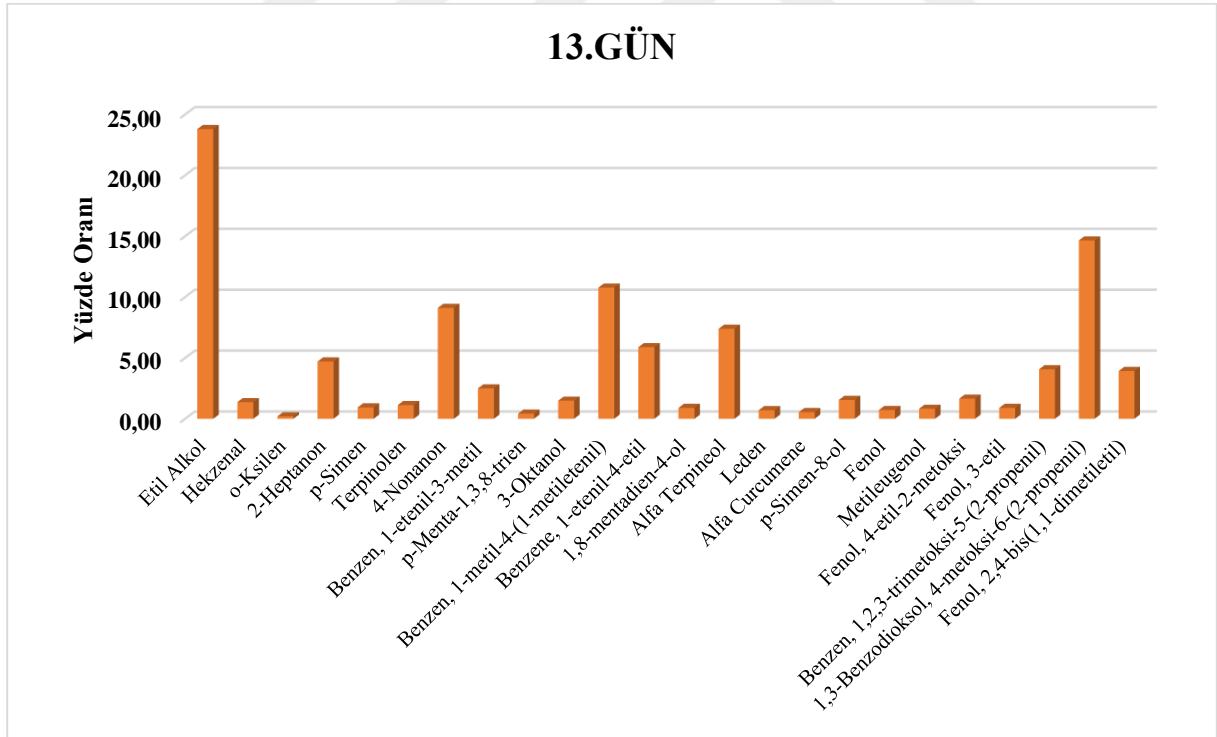
Şekil 4.13. 3.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu



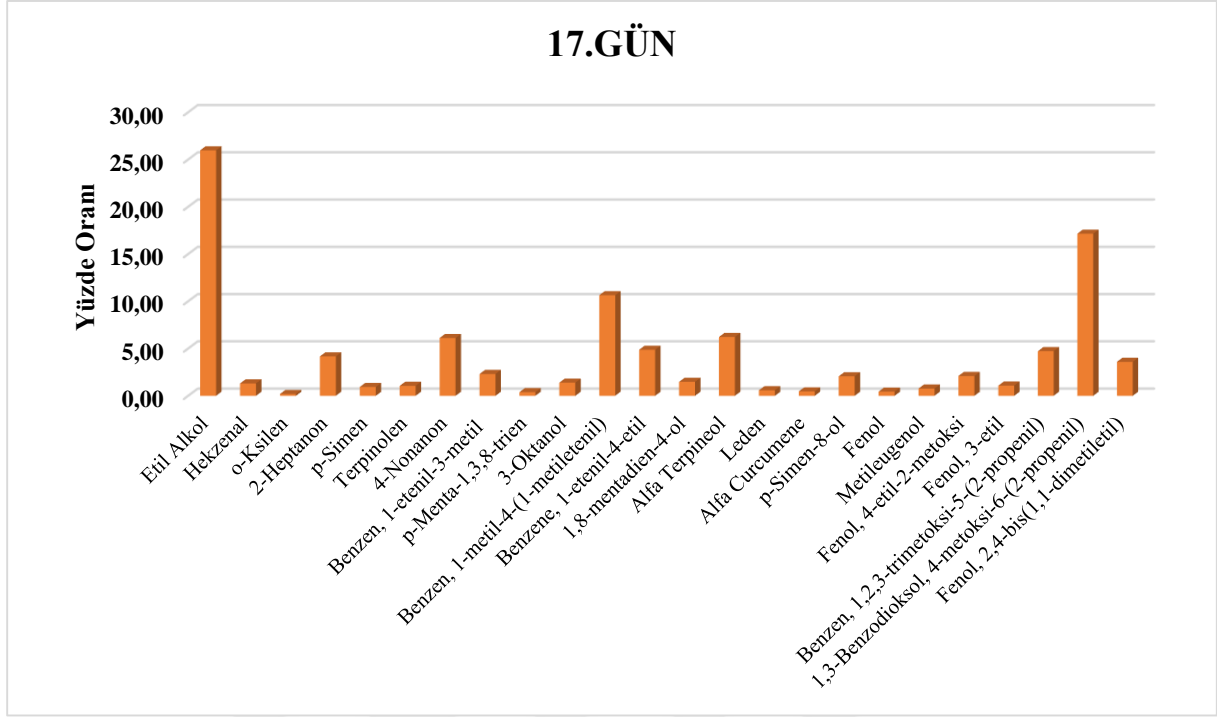
Şekil 4.14. 7.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu



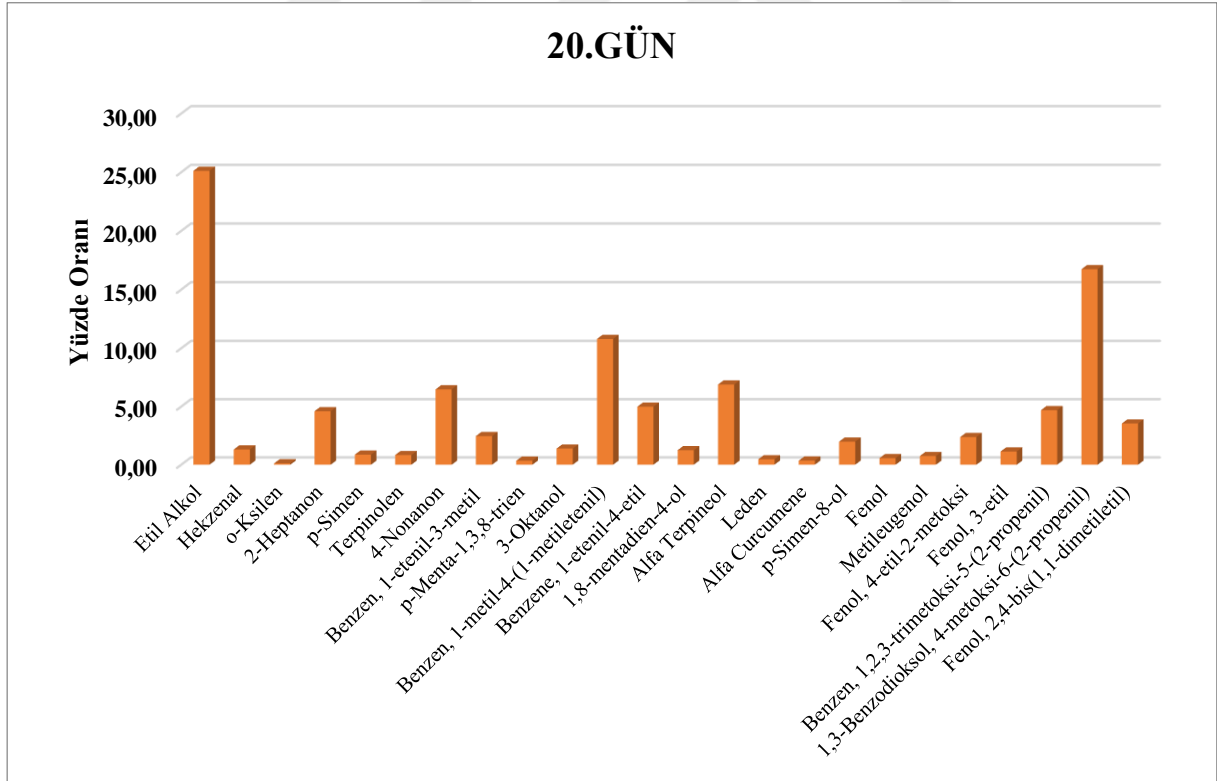
Şekil 4.15. 10.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu



Şekil 4.16. 13.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu



Şekil 4.17. 17.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu



Şekil 4.18. 20.gün Uçucu Aroma Bileşikleri Kompozisyonu

Şalgam fermantasyon sürecinde en fazla tespit edilen bileşik etanol olmuştur. Diğer konsantrasyonu yüksek bileşiklerden 1,3-benzodioxole, 4-methoxy-6-(2-propenyl), baharatsı

odunsu aromaya, benzene 1-metil-4-(1-metiletetil) baharatsı fındıksı aromaya sahiptir. Fermantasyon sürecinde sonradan oluşan alfa terpineol odunsu, terpenik, çamsı ve narenciye kokusuna; terpinolen ise ferah odunsu narenciye kokusuna sahiptir (The goodscent company veritabanı 2019). Terpineol ve terpinolen bileşikleri ve şalgam suyunda en yüksek konsantrasyona sahip 1,3-benzodioksol, 4-metoksi-6-(2-propenil) diğer adıyla miristisin'in havuçta bulunması (Kjeldsen ve ark., 2001) ve ekşi hamur fermantasyonu sonucu ortaya çıkan alkoller göz önünde bulundurulduğunda havuç ve ekşi hamurun birbirlerine baskın olmaktan ziyade şalgam suyu aromasının oluşumunda beraber rol aldıkları yorumunu yapmak mümkündür.





## 5. SONUÇLAR

Endüstriyel olarak üretilen şalgam suyunda fermantasyon sürecinde başlıca rol alan mikroorganizmaların, bu süreçte oluşan uçucu aroma analizlerinin ve bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerdeki değişimlerin incelendiği bu çalışmada aşağıda verilen sonuçlara ulaşılmıştır:

Fermantasyon süreci boyunca pH düşmekte ve 20. günde 3,80 civarında bir değere ulaşmaktadır. Titrasyon asitliği ise bekleneneği üzere giderek artmıştır. 3. günde laktik asit cinsinden yaklaşık 4 g/L olan titrasyon asitliği değeri fermantasyon sonucunda yaklaşık 8.3 g/L değerine ulaşmıştır. Başlarda daha açık renkte olan şalgam, son halini aldığı berrak ve koyu kırmızı bir renk almıştır. Briks değeri ise süreç boyunca değişmemiş ve hep 2.7 olarak ölçülmüştür.

Gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda bakteri gen kopyası sayısının giderek düştüğü, laktik asit bakterisi ve küf-maya gen kopya sayısının ise giderek arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar kültürel yöntemler ile elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir. Küf-maya ve laktik asit bakterileri gen kopya sayısı birbirine yakın olarak bulunmuştur.

Yeni nesil dizileme analizi ile fermantasyonun belirli günlerinde alınan örneklerin mikrobiyal kompozisyonları ve birbirleri ile benzerlikleri incelenmiştir. Süreç boyunca bakteri popülasyonunun yaklaşık % 75-80'ini *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* ve *Leuconostoc pseudomesenteroides*'in oluşturduğu görülmüştür. Bu bakteriler özellikle süt ürünleri ve ekşi hamur fermentasyonunda starter kültür olarak kullanılmaktadırlar (Frantzen ve ark., 2017).

Bu çalışmada tespit edilen en ilginç sonuç ise küf-maya popülasyonları incelendiğinde elde edilmiştir. Şalgam üretiminde ekşi hamur fermantasyonu aşamasında *S. cerevisiae* ortama starter kültür olarak eklenmektedir. Dolayısı ile küf-maya popülasyonu incelendiğinde *S. cerevisiae*'nin baskın olması beklenirken 3. günden 17. güne kadar *Candida boidinii*'nin küf-mayaların % 90'ını oluşturduğu görülmüştür. Zeytin ve şarap gibi ürünlerin fermantasyon sürecinde izole edilmiş olması, laktik asit bakterileri ile aynı ortamda gelişmesi göz önünde

bulundurulduğunda çalışmamız, bu mayanın endüstriyel şalgam üretiminde *S. cerevisiae*'den daha fazla rol aldığını ortaya koymaktadır.

Uçucu aroma bileşikleri kompozisyonları belirli günlerde alınan şalgam örneklerinde incelenmiştir. Toplam konsantrasyon 3. günden 17. güne kadar artmış, 20. günde bir miktar azalmıştır. Şalgam fermantasyon sürecinde en fazla tespit edilen bileşik etanol olmuştur. Diğer konsantrasyonu yüksek bileşiklerden 1,3-benzodioksol, 4-metoksi-6-(2-propenil), baharatsı odunsu aromaya, benzene 1-metil-4-(1-metiletetil) baharatsı findıksı aromaya sahiptir. Fermantasyon sürecinde sonradan oluşan alfa terpineol odunsu, terpenik, çamsı ve narenciye kokusuna; terpinolen ise ferah odunsu narenciye kokusuna sahiptir. Terpineol ve terpinolen bileşikleri ve şalgam suyunda en yüksek konsantrasyona sahip 1,3-benzodioksol, 4-metoksi-6-(2-propenil) diğer adıyla miristisin'in havuçta bulunması ve ekşi hamur fermantasyonu sonucu ortaya çıkan alkoller göz önünde bulundurulduğunda havuç ve ekşi hamurun birbirlerine baskın olmaktan ziyade şalgam suyu aromasının oluşumunda beraber rol aldıkları yorumunu yapmak mümkündür.

## 6. KAYNAKLAR

Acidity titratable of fruit products (AOAC Official Method 942.15). Official methods of analysis of AOAC International.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.

Akinsanmi, O. A., & Drenth, A. (2006). First report of *Tubercularia lateritia* as the causal agent of canker on macadamia. *Australasian Plant Disease Notes*, 1(1), 49-51.

Aran, N. (2010). *Gıda biyoteknolojisi*. Nobel Yayın Dağıtım. Sayfa 254-255.

Årsvoll, K., & Smith, J. D. (1978). *Typhula ishkariensis* and its varieties, var. *idahoensis* comb. nov. and var. *canadensis* var. nov. *Canadian Journal of Botany*, 56(3), 348-364.

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.

Bircan S., (2013). Şalgam Suyundan İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Bunların Starter Kültür Olarak Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*.

Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., Korkeala, J. H., & Vandamme, P. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 141-148.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N.A., Abnet, C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M.,

Chase J., Cope, E., Da Silva, R., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvall, C., Edwardson, C. F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G., Janssen, S., Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S. T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G., Lee, J., Ley, R., Liu, Y., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J., Melnik, A. V., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J., Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A., Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Pruesse, E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J. R., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ull-Hasan, S., van der Hoof, J. J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C., Williamson, C. H., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *Peer J Preprints*, (No. e27295v1).

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.

Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., ... & Arroyo-López, F. N. (2017). Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards in genomic sciences*, 12(1), 70.

Canbaş, A., & Deryaoğlu, A. (1993). Şalgam suyunun üretim tekniği ve bileşimi üzerinde bir araştırma. *Doğa*, 17, 119-129.

Ceuppens, S., Li, D., Uyttendaele, M., Renault, P., Ross, P., Ranst, M. V., ... & Donaghy, J. (2014). Molecular methods in food safety microbiology: interpretation and implications of nucleic acid detection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 551-577.

Chang, S.-W. (2015). Genetic Relationships among *Typhula ishkariensis* varieties from Wisconsin. *Weed & Turfgrass Science*, 4, 135-143.

Clarke, K. R., Somerfield, P. J., & Chapman, M. G. (2006). On resemblance measures for ecological studies, including taxonomic dissimilarities and a zero-adjusted Bray–Curtis coefficient for denuded assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 330(1), 55-80.

Cserhádi, T. (2010). *Chromatography of aroma compounds and fragrances*. Springer Science & Business Media.

Dorak, M. T. (Ed.). (2007). *Real-time PCR*. Taylor & Francis. Sayfa 39 – 62.

Eisenstein, B. I. (1990). The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New England Journal of Medicine*, 322(3), 178-183.

Erten H., Tanguler H., Canbaş A., (2008). A Traditional Turkish Lactic Acid Fermented Beverage: Shalgam (Salgam), *Food Reviews International*, 24 (3), 352-359.

Escalona, M., Rocha, S., & Posada, D. (2016). A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 459.

Frantzen, C. A., Kot, W., Pedersen, T. B., Ardö, Y. M., Broadbent, J. R., Neve, H., ... & Vogensen, F. K. (2017). Genomic characterization of dairy associated *Leuconostoc* species and diversity of *Leuconostocs* in undefined mixed mesophilic starter cultures. *Frontiers in microbiology*, 8, 132.

Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources*, 11(5), 759-769.

Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., ... & Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, 261, 169-176.

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333.

Gut, M., Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Pedersen, N. C., & Lutz, H. (1999). One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of Virological Methods*, 77(1), 37-46.

Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(5), 763-767.

Hansen, A., & Schieberle, P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 85-94.

Hinton, D. M., & Bacon, C. W. (1995). *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129(2), 117-125.

Huber, K. P., & Herzberg, G. (1997). NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. PJ Linstrom and WG Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899.

Juck, D., Charles, T., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(3), 241-249.

Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 219(5), 479-486.

Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 35-62.

Kjeldsen, F., Christensen, L. P., & Edelenbos, M. (2001). Quantitative analysis of aroma compounds in carrot (*Daucus carota* L.) cultivars by capillary gas chromatography using

large-volume injection technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4342-4348.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125.

Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press. Sayfa5-6

Lazaro-Rodríguez, D. (Ed.). (2013). *Real-time PCR in food science: current technology and applications*. Horizon Scientific Press. Sayfa 4-5.

Levin, R. E. (2004). The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnology*, 18(1), 97-133..

Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, 5(2), 169.

Ma, H., Shieh, K. J., Chen, G., Qiao, T., & Chuang, M. Y. (2006). Application of real time polymerase chain reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, 2(3), 1-5.

Mayo Baltasar., TCC Rachid, C., Alegría, Á., MO Leite, A., S Peixoto, R., & Delgado, S. (2014). Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current genomics*, 15(4), 293-309.

Okcu, G., Ayhan, K., Altuntas, E. G., Vural, N., & Poyrazoglu, E. S. (2016). Determination of phenolic acid decarboxylase produced by lactic acid bacteria isolated from shalgam (şalgam) juice using green analytical chemistry method. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 615-621.

Park, E. J., Chang, H. W., Kim, K. H., Nam, Y. D., Roh, S. W., & Bae, J. W. (2009). Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi. *The Journal of Microbiology*, 47(6), 682-685.

Pontonio, E., Di Cagno, R., Mahony, J., Lanera, A., De Angelis, M., van Sinderen, D., & Gobbetti, M. (2017). Sourdough authentication: quantitative PCR to detect the lactic acid bacterial microbiota in breads. *Scientific Reports*, 7(1), 624.

Prokopenko, D., Hecker, J., Silverman, E. K., Pagano, M., Nöthen, M. M., Dina, C., ... & Fier, H. L. (2015). Utilizing the Jaccard index to reveal population stratification in sequencing data: a simulation study and an application to the 1000 Genomes Project. *Bioinformatics*, 32(9), 1366-1372.

Qiagen, (2010). Critical Factors for Successful Real-Time PCR.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.

Risticvic, S., Niri, V. H., Vuckovic, D., & Pawliszyn, J. (2009). Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(3), 781-795.

Ritalahti, K. M., Amos, B. K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S. S., & Löffler, F. E. (2006). Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2765-2774.

Samantir N., (2014). Şalgam Suyundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S-rRNA İle Tanımlanması ve Bazı Gelişme Parametrelerinin Belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.

Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: plating methods. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (63), e3064.

Satora, P., Tarko, T., Sroka, P., & Blaszczyk, U. (2014). The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Research*, *14*(5), 729-740.

Satora, P., Tarko, T., Sroka, P., & Blaszczyk, U. (2014). The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Research*, *14*(5), 729-740.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2013). *Principles of fermentation technology*. Elsevier. Sayfa 1-2.

Stock, I., Grueger, T., & Wiedemann, B. (2003). Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *22*(1), 35-47.

Selli, S., & Kelebek, H. (2011). Aromatic profile and odour-activity value of blood orange juices obtained from Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Industrial Crops and Products*, *33*(3), 727-733.

Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(3), 591-610.

Tanguler, H., & Erten, H. (2012a). 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. (2012b). 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.

Tangüler, H., & Erten, H. (2012c). Şalgam Suyu Üretiminde Gerçekleştirilen Hamur Fermantasyonu Sırasında İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, *10*(2).

Tangüler, H., Selli, S., Sen, K., Cabaroglu, T., & Erten, H. (2017). Aroma composition of shalgam: a traditional Turkish lactic acid fermented beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 2011-2019.

The Good Scent Company Veritabanı. Leffingwell and Associates, Canton, Georgia, ABD. <http://www.thegoodscentcompany.com> (Erişim Tarihi: Mayıs 2019)

UNITE Topluluğu (2019): UNITE QIIME release for Fungi. Version 18.11.2018. UNITE Community. <https://doi.org/10.15156/BIO/786334>

Üçok, E. F., & Tosun, H. (2012). Şalgam suyu üretimi ve fonksiyonel özellikleri. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 17-26.

Wang, Z. M., Lu, Z. M., Shi, J. S., & Xu, Z. H. (2016). Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar. *Scientific Reports*, 6, 26818.

Wirth, F., & Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of Rhodotorula: an emerging pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, Article ID 465717, 7 pages.

Wu, M., Tu, Z., Huang, F., He, Q., Fu, J., & Li, Y. (2019). Panning anti-LPS nanobody as a capture target to enrich *Vibrio fluvialis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 512(3), 531-536.

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., ... & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D643-D648.

Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 316-322.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

09.01.1988 tarihinde Gaziantep’de doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi Gaziantep’te tamamladım, 2011 yılında Gaziantep Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünden mezun oldum. 2011-2013 yılları arasında Özgü Piliç firmasında üretim sorumlusu, 2013-2015 yılları arasında Şölen Çikolata firmasında üretim uzman yardımcısı olarak çalıştım. 2016 yılından beri Kilis 7 Aralık Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.

