



## Determination of Bacterial Flora in Traditionally Produced Olive and Apple Vinegar Biofilm Forms by PCR DGGE Method

Burcu Oktar Uzun<sup>1,a,\*</sup>, Aytül Bayraktar<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD, 32260 Isparta, Türkiye

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 32260 Isparta, Türkiye

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 14.03.2023 Accepted : 09.10.2023</p> <p><b>Keywords:</b> Acetic acid bacteria Vinegar PCR DGGE Technique Microbial diversity Molecular techniques</p>	<p>In this study, bacterial population differences in biofilms of traditionally produced olive and apple vinegars were investigated. These differences were determined by isolating species, Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of the bacterial 16S rRNA gene's V3 region, followed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) using the Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) method, and subsequently identified through DNA sequence analyses. The obtained sequences were aligned using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) software was utilized for phylogenetic analyses. While <i>Komogataeibacter rhaeticus</i> was detected as the dominant species in olive vinegar samples, <i>Komogataeibacter xylinus</i> (<i>Gluconacetobacter</i>), also known as vinegar bacteria, was detected as the dominant species in apple cider vinegar samples. The bacterial species in vinegars produced by traditional methods were identified and isolated, and these bacteria were stored as culture.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 11(11): 2051-2058, 2023

## Geleneksel Yöntemle Üretilen Zeytin ve Elma Sirkesi Biyofilm Formlarındaki Bakteriyel Floranın PZR DGJE Yöntemi ile Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 14.03.2023 Kabul : 09.10.2023</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Asetik asit bakterisi Sirke PZR DGJE Tekniği Mikrobiyal çeşitlilik Moleküler teknikler</p>	<p>Bu çalışmada, geleneksel yöntemle üretilmiş zeytin ve elma sirke biyofilmlerindeki bakteriyel popülasyon farklılıkları; türlerinin izolasyonu, bakteriyel 16S rRNA geninin V3 bölgesinin PZR (Polimer Zincir Reaksiyonu) amplifikasyonu ve ardından DGJE (Denatüre Edici Gradyan Jel Elektrofrez) ile PZR DGJE (Polimeraz Zincir Reaksiyonu Denatüre Edici Gradyan Jel Elektrofrez) yöntemiyle belirlenerek, DNA dizi analizleriyle tanımlanmıştır. Elde edilen diziler, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool = Temel Bölgesel Hizalama Arama Aracı) analizi ile hizalanmıştır. Filogenetik analiz için MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, X) programı kullanılmıştır. Zeytin sirkesi örneklerinde <i>Komogataeibacter rhaeticus</i> baskın tür olarak, elma sirke örneklerinde ise sirke bakterisi olarak bilinen <i>Komogataeibacter xylinus</i> (<i>Gluconacetobacter</i>) baskın tür olarak tespit edilmiştir. Geleneksel üretim yöntemiyle üretilen sirkelerdeki bakteriyel türlerin tanımlanması ve izolasyonu ile bu bakteriler kültür olarak depolanmıştır.</p>

<sup>a</sup> [oktarburcu@gmail.com](mailto:oktarburcu@gmail.com)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0009-0001-9734-1631>

<sup>b</sup> [aytulbayraktar@sdu.edu.tr](mailto:aytulbayraktar@sdu.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1725-6315>



## Giriş

Geleneksel yöntemle üretilen sirke; ilk olarak etanol ardından asetik asit üretimi için çift kademeli fermentasyondan (alkolik ile asetik) oluşur. Tahıl, üzüm, elma, şeker kamışı vb. gibi ham bitkiler ile yapılmaktadır (Budak ve ark., 2014; Junior ve ark., 2014). Sirkenin sindirimi arttırma, iştahı uyarma, antioksidan aktivite, antimikrobiyal ve antidiyabetik etki gibi özellikleri vardır (Ho ve ark., 2017). Ayrıca, kandaki glukoz seviyesini kontrol etmek, lipid metabolizmasını düzenlemek ve zayıflamak için tüketilmesi önerilmektedir (Giudici ve ark., 2009).

Sirke üretimine sebep olan mikrobiyotaya karmaşık yapıya sahiptir. AAB (asetik asit bakterileri)'ne ait olan günümüze kadar belirlenebilmiş 19 adet cins içermektedir (*Acetobacter*, *Ameyamaea*, *Acidomonas*, *Gluconobacter*, *Asaia*, *Granulibacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Neoasaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Tanticharoenia*, *Commensakibacter*, *Bombella*, *Endobacter*, *Neokomagataca*, *Nguyenibacter*, *Swingsia*). *Acetobacter* ve *Komagataeibacter* suşlarının birçoğu, asetik asit (ticari olan) ve sirkenin (endüstriyel olan) yararlı özelliklerde olduğu düşünülen asetik asit ile etanol direncine ek olarak yüksek asetik asit fermentasyonu özelliğine de sahip oldukları bilinmektedir. Diğer yandan, *Gluconobacter* suşları da, farklı şeker kaynaklarından, şeker alkoller ve diğer değerli ürünlerin oluşmasına sebep olan şeker asitlerinin oksidatif fermentasyonu gerçekleştirme özelliklerine sahiptir (Şengün ve ark., 2016; Saichana ve ark., 2015). AAB suşlarının bu özelliklerinden yola çıkıldığında, Hill ve ark. (2014)'nin probiyotikler için yaptığı "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yardımı sağlayan canlı mikroorganizmalar" adlı tanımına uyduğu gözlenmektedir. Mitrou ve ark. (2010a,b) ile Petsiou ve ark. (2014) da bu hipotezi doğrular şekilde geleneksel yöntemle üretilen elma sirkesinden belirlenememiş mekanizmalarla kilo kontrolü ile diyabet tedavisinde uygulanabilecek doğal kaynaklardan birisi olarak söz etmişlerdir. Benzer olarak, Goh ve ark. (2012), bu etkilerin nedeni olarak mikroorganizmaları gösterebileceklerini belirtmişlerdir. Bu tür bakterilerin gastrointestinal sistemimizde yer alması glikoz emiliminde azalmaya, bağırsaklarımızdaki glikozun selüloza dönüştürülmesiyle de kilo alımını önlemek için yararlı olacağı düşünülmüştür. Asetik asit ve sirkenin kan glikozu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışma da; sirkenin kandaki glikoz ve insülin oranını baskıladığı ve düzenlediği görülmüş, yemeklerden sonra meydana gelen hiperglisemiye kontrol etmekte kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Ebihara, 1988; Ostman ve ark., 2005). Böyle pozitif etkileri olan mikrobiyal çeşitliliğin daha ayrıntılı şekilde tanımlanabilmesi nihai öneme sahiptir.

Geleneksel olarak AAB'lerin, besiyeri ortamında gelişimleri zayıf olduğu için, kültürasyonu (kültür ortamlarında yetiştiriciliği) zor olan mikroorganizmalar olarak kabul edilir (Bartowsky ve ark., 2003). 21. yüzyıla doğru ilerledikçe mikrobiyolojide kültüre bağımlı yaklaşımdan ziyade, 16S rRNA geni dizilenmesi gibi gelişmelerin ardından, canlı/sağlam bakteri hücrelerine ihtiyacı olmayan kültürlerden bağımsız yöntemler öne çıkmaktadır. Dolayısıyla kültürden bağımsız moleküler

tekniklerin kullanılması ile bu mikroorganizmaların taksonomilerinin geliştirilmesi sağlanacaktır. Bu yöntemler yüksek özgüllük ile duyarlılığa sahiptir. Özellikle in vitro şartlarda üretilmeyen organizmalar için ek avantaj sağlamakla birlikte patojenler doğal ortamlarında ya da patolojik materyalde kısa süre içinde tespit edilebilir (Austin, 2017). Bu avantaj kültür ortamında yetiştiriciliği zor olan AAB'leri için de geçerlidir.

Çoğunlukla 16 S rRNA geni (transkripsiyon sonrası) ya da bazen 16S rDNA olarak adlandırılan yaklaşık 1500 baz-çifti uzunluğundaki bu gen; bir yandan tüm bakteriler için aynı diziyeye sahip, yüksek derecede korunan bölgeler içermekte bir yandan da bakterilerin tür/alt-tür seviyesindeki filogenetik ayrımı ile sınıflandırılmalarını sağlayacak şekilde çeşitli genomlar arasındaki evrimsel uzaklığa orantılı olarak farklılık gösteren değişken bölgeleri vardır (Fox ve ark., 1980).

Mikrobiyal topluluk araştırmalarında kullanılan popüler tekniklerden birisi olan DGJE, bir örnekteki DNA kısımlarının karşılaştırılmasını sağlayan moleküler bir parmak izi yöntemidir. Bu teknikte farklı dizi ve/veya büyüklükteki PZR ürünleri jel veya kapiller üzerindeki farklı hareketleriyle ayrılmaktadır (Gilbride ve ark., 2006), bu hareket farklılıklarından da yeni bantlar oluşmaktadır. Farklı uzunluktaki DNA parçalarının oluşturduğu bu bantlar jel görüntüleme sisteminde gözlenir. Ayrıca elde edilen 16S sekansları, biyotiplerin tanımlanabilmesi için BLAST ile analiz edilir. Böylelikle geleneksel sirke üretiminde baskın ya da çekinik şekilde görev alan mikrobiyal kültür belirlenebilmektedir. 16 S rRNA geninin PZR DGJE yöntemi kullanarak ampikonların ayrılmalarını birleştiren moleküler parmak izi yöntemi, farklı çevresel numuneler içindeki mikrobiyal topluluklarda varyasyonların takibinde başarılı sonuçlar göstermiştir (Ovreas ve ark., 1997; Nakatsu, 2007). PZR DGJE yöntemi de dahil edildiğinde moleküler yöntemlerin analitik başarısı, hücre lizizdeki etkinliğe, çevre örneklerinden geri kazanımı olan DNA kalitesine bağımlılığından yüksek oranda etkilenmektedir (Holland ve ark., 2000).

Çeşitli mikrobiyal çalışmalarda kullanılan moleküler teknikler, farklı fermente ürünlerin ve geleneksel gıdaların mikroorganizma çeşitliliğini incelemek için etkili bir araç olarak hizmet etmiştir. Milanovic ve ark. (2018), ev yapımı sirke tohumlarında yüksek doğrulukta (%97) *Komagataeibacter*, *Acetobacter* ve *Gluconobacter* türlerini belirlemişlerdir. Fasoli ve ark. (2003), ticari probiyotik yoğurtlarda PCR DGJE tekniğini kullanarak mikroorganizma tanımlamasını başarıyla gerçekleştirmiş ve yöntemin geçerliliğini doğrulamışlardır. Sofu ve İkinci (2016) 'nin çalışması, geleneksel Türk Ezine peynirindeki bakteriyel çeşitlilik dinamiklerini PZR DGJE ve SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism= Tek İplikli Konformasyon Polimorfizmi) analizleriyle izlemiş, 17 farklı *Lactococcus lactis* grubu ve *Streptococcus thermophilus* suşunu tespit etmişlerdir. Maoloni ve ark. (2020), İtalyan *Gioddu*'nun bakteri ve mantar çeşitliliğini araştırırken, düşük biyolojik çeşitlilik ve belirgin *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* varlığı gözlemlenmişlerdir. Sonuçlara göre tespit edilen bakteri ve

mantar türleri, dikkate alınan seriye bakılmaksızın genellikle üreticiye göre kümelenmiştir. Lavasani ve ark. (2017) geleneksel elma sirkесinden BLAST analizini takiben belirledikleri, 16S rDNA gen sekansı, % 99 *K. xylinus* özdeşliğe sahip *K. XI* suşunun 48 saatte yüksek glikoz dönüşüm oranına ve in vitro olarak önemli probiyotik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Machado ve ark. (2016) ise Kombucha çayından elde edilen *Komagataeibacter rhaeticus* ile biyosentezlenen bakteriyel selülozun *G. xylinum* tarafından üretilene benzer özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, moleküler analizlerin mikroorganizma çeşitliliğinin anlaşılmasında kilit bir rol oynadığını göstermektedir ve özellikle sonuçlar üreticiye göre şekillenmiştir.

Bu çalışmada ise, PZR DGJE analizleri kullanılarak geleneksel metot ile üretimi yapılmış Manisa yöresinde yetişmiş Amasya misket elması ile Edremit zeytin sirkесinin ihtiva ettiği bölgesel mikrobiyal çeşitliliklerin belirlenmesi, ürününün aromasında, tadında ve tekstüründe farklılıklara potansiyel sebep olabilecek bakteriyel popülasyon dinamiklerinin belirlenmesi, sistemin performansına dayalı verilerle desteklenmesi ve prosesin kontrol altına alınmasını sağlamak açısından yüksek öneme sahiptir. Böylece geleneksel üretimdeki mikrobiyal çeşitlilik sebebiyle oluşan bakteriyel popülasyonlar tanımlanmış ve stok kültürler oluşturulmuştur. Özellikle sirke üzerinde bir zar şeklinde oluşan farklı endüstrilerde kullanılma potansiyeline sahip olan BS (Bakteriyel selüloz) oluşumuna katkı sağlayan geleneksel mikrobiyal popülasyonun belirlenecek olması bu çalışmanın özgüllüğünü oluşturmuştur.

## Materyal ve Metot

### Materyal

Bu çalışmada Manisa yöresinde yetişmiş Amasya misket elması ile Edremit türü zeytin kullanılmıştır. Ürünler kendi yöre halkındaki üreticilerden elde edilmiştir. Kaya tuzu, toz şeker, bulgur ve nohut yerel firmalardan temin edilmiştir. DNA izolasyonunda QIAamp DNA Stool Kit (QIAGEN, CA, USA) kullanılmıştır.

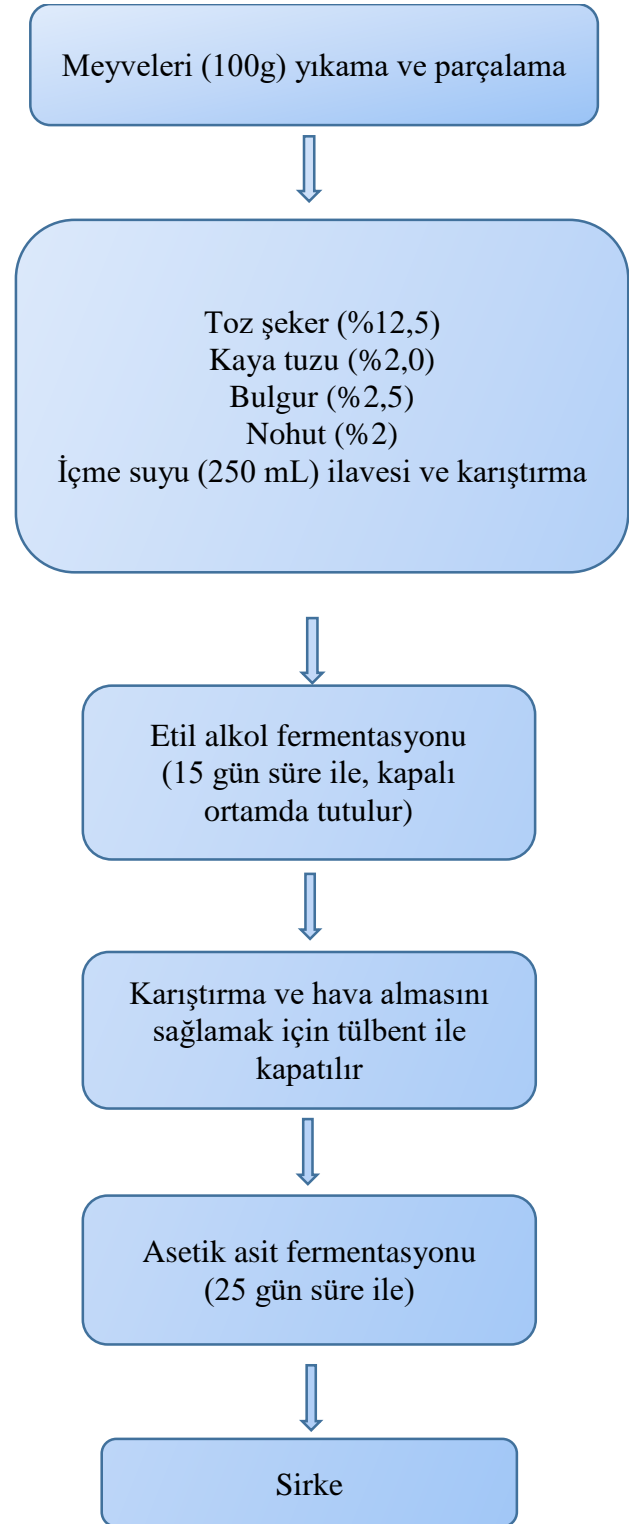
### Metot

#### Sirke Üretimi

Sirke üretimi sırasıyla alkol ve asetik asit fermentasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Alkol, %13 seviyelerine çıktığında, AAB'ler sıvı yüzey üzerinde gelişerek BS oluşturmaktadır. Yüzey üzerinde oluşan bakteriyel selüloz, etanolün asetik aside çevrimini sağlamaktadır ve işlem 28-30°C' de gerçekleştirilmiştir.

Zeytin ile elma sirkelerinin üretimi sırasında proses akışında bazı değişiklikler yapılarak geleneksel yavaş sirke üretim yöntemi kullanılmıştır (Aktan ve Yıldırım, 2011; Şahin, 1982; Tangüler ve ark., 2021). Proses detayları Şekil 1. de verilmiştir.

Sirke üzerinde oluşmuş biyofilm numuneleri steril ortamda toplanarak, DNA izolasyonu amacıyla -20°C' de depolanmıştır. İzolasyon sırasında numunelerin homojenizasyonu sağlanmış ve ihtiva ettikleri bakterilerin DNA'ları QIAamp DNA Stool Kit (QIAGEN, CA, USA) ile firma protokolü doğrultusunda izole edilmiştir.



Şekil 1. Sirke üretimi akış şeması  
Figure 1. Vinegar production flow chart

#### DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Liziz solüsyonu; 10 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA ve % 1'lik Triton X 100 içermektedir. 50 µl liziz solüsyonu 1-2 koloni için kullanılmıştır. Liziz solüsyonunda dağılmış hücreler 100°C' de 15-30 dk süre boyunca kaynatılmıştır. Sonrasında 5 dk 14.000 rpm (3293g)'de santrifüjlenmiştir. İçinde 1 mL pepton su içeren 2 mL'lik tüplere aktarılmış ve DNA izolasyonu için hazırlanmıştır.

Sofu ve Ekinici (2010)'nin yeniden geliştirdikleri QIAamp DNA Stool Kit (QIAGEN, CA, USA) kullanım protokolüne göre; numuneler (1 g) steril 15 mL'lik tüplere aktarılmış, 5 mL ASL tampon ilave edilmiştir. Mekanik parçalamayı oluşturmak için cam boncuk (1 g) ilave edilmiştir. Numuneler, 95°C'de 10 dk bekletilmiş, her 1 dk içinde 30 s vorteks yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır. 22°C'de 8.000 rpm (1075g)'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Pelet ile yağ tabakası haricindeki sıvı faz steril pipet yardımıyla toplanmıştır. Toplanan sıvı faz üzerine 1 adet inhibex tablet ilave edilmiş, 1 dk inkübasyona bırakılmıştır. Numuneler 22°C'de 8.000 rpm (1075g)'de 4 dk santrifüjlenmiştir. Pelet faz steril pipet yardımıyla uzaklaştırılmış, sıvı faz toplanmıştır. Sıvı faz üzerine izopromil alkol (4 ml) (-20°C'de) ilave edilmiştir. Numuneler 4 °C'de 8.000 rpm (1075g)'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Sıvı faz uzaklaştırılmış, kalan faza ASL tampon (200 µl) ilave edilmiş, pellet kısım yeniden süspansiyon edilmiştir. Üzerine AL tampon (200 µl) ve proteinaz K (15 µl) ilave edilmiştir. Numuneler 10 dk boyunca 70 °C'de bekletilmiştir. Üzerine etanol absolute (200 µl) ilave edilmiş, 15 s vortekslenmiştir. Numuneler 600 µl spin kolonlara koyularak 1 dk 14.000 rpm (3293g)'de santrifüjlenmiştir. Tekrar numuneden boş spin kolon altı takılarak 600 µl alınmış, 1 dk 14.000 rpm (3293g)'de santrifüjlenmiştir. 400 µl AW1 spin kolona ilave edilmiş, 1 dk 14.000 rpm (3293g)'de santrifüjlenmiştir. Altına boş yeni kolon takılmış, 500 AW2 ilave edilmiş, 3 dk 14.000 rpm (3293g)'de santrifüjlenmiştir. Altına boş yeni kolon takılmış, 1 dk 14.000 rpm (3293g)'de santrifüjlenmiştir. AE tampon (200 µl) ilave edilmiş, 1 dk inkübasyon için bırakılmıştır. Altına boş yeni kolon takılarak 14.000 rpm (3293g)'de 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Kültür stoğu oluşturmak için DNA izolasyonu ardından numunelerin bulunduğu tüpler üzerine gliserol (%20'lik) ilave edilmiş ve muhafaza edilmek üzere -20°C'ye kaldırılmıştır. İzolasyonu tamamlanmış DNA örneklerinin konsantrasyon araştırmaları için UV-görünür spektrofotometre kullanılmıştır.

#### *PZR Amplifikasyonu ve DGJE Tekniğiyle Bant Eldesi*

PZR analiz uygulaması için V3 bölgesinin 16S rDNA amplifikasyonunda V3F (F357) (Forward primer, 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ile V3R (R518) (Reverse Primer, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') evrensel primerleri kullanılmıştır. PZR tekniği ile bölgelerin amplifikasyonu sağlanmıştır (Ercolini ve ark., 2003; Muyzer ve ark., 1993). Uygulama sıcaklığı programlanabilen inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

GC-F357'yi elde etmek için bir GC kelepçesi (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGG-3') (Muyzer ve ark., 1993) ilk primere bağlanmıştır. Son hacim 25 µL olacak şekilde her karışım 1 µL DNA şablonu içermektedir (~ 25 ng), 0,2 µmol tersine ve ileri primer, her dNTP için 0.25 mmol, 2,5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 10× PCR tamponundan 2,5 µL ve Taq polimerazından 2,5 U (Promega, CA, ABD). Şablon DNA, 94°C'de 5 dk boyunca bozundurulmuştur. Yanlış bant oluşumunu azaltmak ve amplifikasyonun özgülüğünü artırmak için bir 'touchdown' PZR yapılmıştır (Muyzer ve ark., 1993). Kullanılan başlangıç tavlama sıcaklığı beklenen tavlama sıcaklığı (65°C)'nin 10°C üzerindedir ve sıcaklık her ikinci döngüde 1°C azaltılarak 55°C'ye (touchdown sıcaklığına) ulaşana kadar devam edilmiştir.

55°C'ye ulaşıldığında 10 döngü daha gerçekleştirilmiştir. Primer uzatma, 72°C'de 3 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Son final uzatma olarak, örnekler 10 dk boyunca 72°C'de inkübe edilmiştir.

PZR analizi son ürünleri DGJE ve evrensel mutasyon belirleme aparatı olan DCode (Bio-Rad, Hercules, CA, UK) kullanılarak analiz edilmiştir (Ercolini ve ark., 2003; Muyzer ve ark., 1993). V3 bölgesindeki PZR nihai ürünleri, bant (200 bp'lik) genişliğinde poliakrilamid jel (%8 w/v) içinde 1xTAE tamponunda çözülmüştür. Jeller, 50 V'de 10 dakika ve 170 V'de 5 saat süreyle elektroforez edilmiştir, ardından etidyum bromür ile 5 dakika süreyle boyanmış, 20 dakika süre boyunca damıtılmış su ile durulanmıştır (Sofu ve Ekinici, 2016). Elektroforetik akım süresince, 16S rRNA gen amplikonları jel üzerinde ileri doğru hareket etmiştir. Başlangıçta, DNA parçacıkları sadece moleküler ağırlıklarına bağlı olarak ilerlerken daha sonra denatürleyici ajanın etkisinin artmasıyla DNA zincirleri bozunmaya başlamıştır. DNA zincirleri neredeyse tamamen bozduğunda jeldeki hareketleri durmuştur. Böylelikle farklı diziyeye sahip DNA parçaları birbirinden ayrılmış ve bantlar gözlemlenmiştir.

Seçilen DGJE bantları jellerden steril bir neşterle kesilmiştir. Her bant gece boyunca 4° C'de 2 mL steril su içerisinde bekletilmiştir. Her DGJE bandından seyreltilen DNA'nın 1 µL'si, F357 primeri (GC kelepçesi olmadan) ve R518 primerleri kullanılarak yeniden çoğaltıldı (Cocolin ve ark., 2007). İzolasyon sonrası agaroz jelde (% 1'lik) elde edilen görüntü jel görüntüleme sistemi (Bio Rad ChemiDoc XRS, Hercules, USA) kullanılarak görüntülenmiştir (Ercolini ve ark., 2003).

#### *Sekans (Dizi) Analizi*

Tek bant elde edilen PZR ürünleri saflaştırma kiti (BigDye Cycle Purification Kit; Applied Biosystems, CA, ABD) ile saflaştırıldı ve sekanslama için gönderilmiştir (Refgen, Ankara, Türkiye). Dizilim öncesi her bandın pozisyonu, orijinal DGJE profilindeki göreceli konumuyla karşılaştırıldı. Bazı durumlarda, saf ilgi bandını elde etmek için birden fazla yeniden amplifikasyon ve DGJE turu yapılmıştır. Tüm dizilimler son olarak BLAST programını kullanarak (Altschul ve ark., 1997) GenBank veri tabanındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ve Ribozomal veri tabanı projesindeki dizilimlerle (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) karşılaştırıldı.

#### *BLAST Analizi Sonucu Filogenetik Harita*

Hızlanmış diziler, MEGA X (Kumar ve ark., 2018) kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulması için kullanılmıştır. Boşluk içeren tüm pozisyonlar elenmiş, Tamura-Nei modeline (Tamura ve Nei, 1993) dayalı olarak ve 1000 bootstrapt (ön yükleme) kopyası ile maksimum olasılık filogenleri oluşturulmuştur.

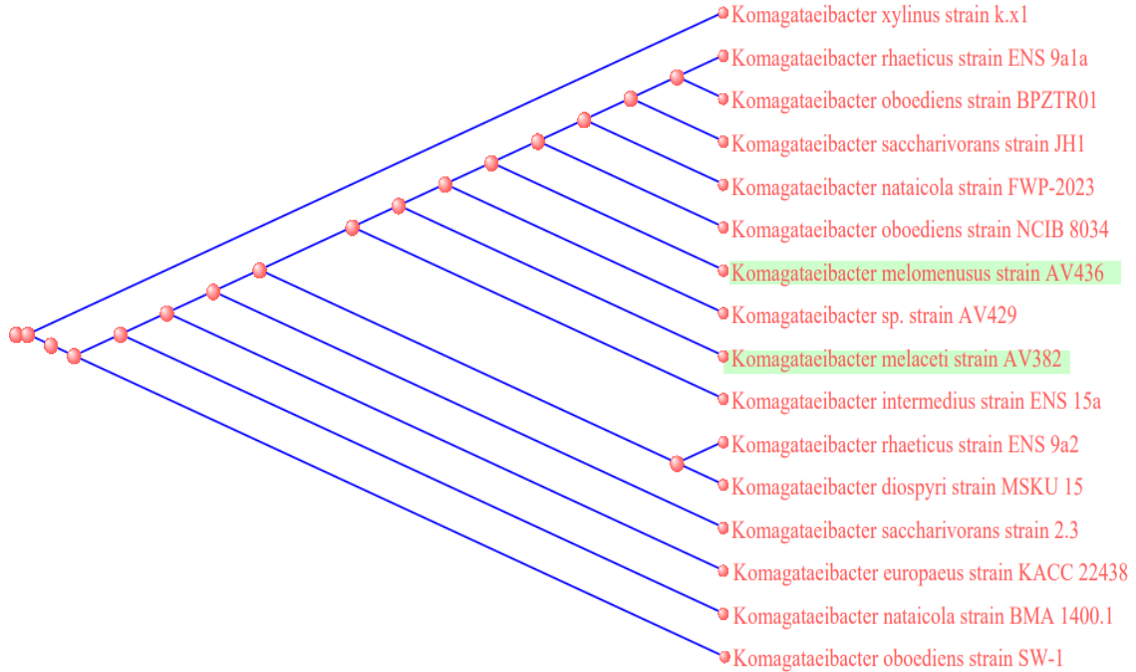
## **Bulgular ve Tartışma**

Bu çalışmada, geleneksel yöntem ile üretilen elma ve zeytin sirke numunelerindeki çoğunlukla tanımlanmamış mikroorganizma topluluklarının 16 S rRNA gen amplifikasyonları DNA izolasyonundan sonra PZR DGJE tekniğinin kullanılmasıyla hızlı bir biçimde belirlenmiştir. DGJE sonucu elde edilen dizilerdeki mikrobiyotaların araştırılmasında ve 16 S rDNA sekanslarının bilinen akrabalarının tespit edilmesinde BLAST analiz programı kullanılmıştır. Sirke numunelerinin mikrobiyal popülasyon

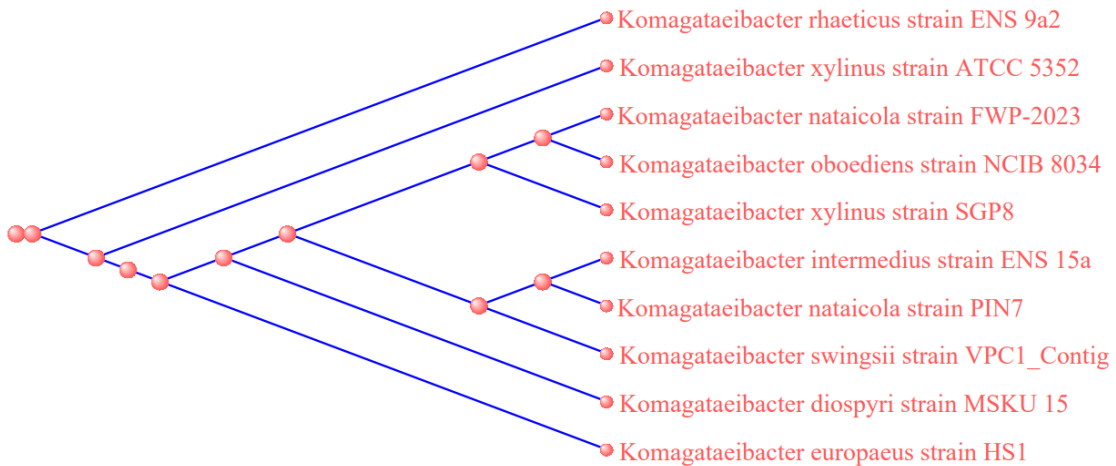
çeşitlerinin ve henüz tanımlanamamış yeni bantların da sekans analizleri yapılarak belirlenmeleri hedeflenmiştir. BS biyofilm numunelerinden direkt izolasyon yöntemi ile kolonilerden elde edilen DNA'lar PZR ile çoğaltılmıştır. DGJE sonrasında UV görünür ışık altında jel görüntüleme sistemi ile beklenen boyutlardaki bantlar gözlenmiştir. Gözlenen bu sonuçlar, PZR şartları ile uygulanan primerlerin çalıştığı göstermektedir.

DGJE sonucunda bantlar elde edilmiştir ve bu bantlar BLAST analizi için gönderilmiştir. Analiz sonucunda hem zeytin hem de elma sirkesi örneklerinde *Komagataeibacter* cinsi AAB'leri belirlenmiştir. Mariç ve ark. (2020), elma sirkesinden belirledikleri iki suşta da (AV382 ve AV436) 16S rRNA gen dizilimi ile *Komagataeibacter* cinsine ait olduğunu doğrulamıştır. Her iki suşun nükleotid kimliği, en yakın türe çok yüksek 16S rRNA gen dizilimi benzerliği göstermiştir. AV436 suşunun 16S rRNA gen dizisi, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter swingsii*, *K. nataicola*,

*Komagataeibacter sucrofermentans*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter diospyri* ve *K. xylinus* türlerinin dizilerine en yüksek benzerliği (%99,4-99,8) göstermiştir. AV382 suşunun sekansı *K. swingsii*, *K. europaeus*, *K. sucrofermentans*, *K. nataicola*, *Komagataeibacter kakiaceti*, *K. saccharivorans*, *K. oboediens* ve *K. intermedius* türleriyle en yüksek benzerliğe (%99,3-99,5) sahiptir. Çalışmamız Mariç ve ark. (2020)'nin çalışmasına benzer olarak, elma sirkesi örneklerinde *Komagataeibacter xylinus* suşunun sekansı *K. rhaeticus*, *K. oboediens*, *K. saccharivorans*, *K. nataicola*, *K. melomenus*, *K. sp.*, *K. melaceti*, *K. intermedius*, *K. diospyri* ve *K. europaeus* türleriyle en yüksek benzerliğe (%93-97) sahiptir. Zeytin sirkesi örneklerinde *Komagataeibacter rhaeticus* suşunun sekansı *K. xylinus*, *K. nataicola*, *K. oboediens*, *K. intermedius*, *K. swingsii*, *K. diospyri* ve *K. europaeus* türleriyle en yüksek benzerlik oranına (%97-98) sahip olarak bulunmuştur. Filogenetik haritalar Şekil 2. ve Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 2. BLAST analizi sonucunda elma sirke numunesinden elde edilen filogenetik harita  
Figure 2. Phylogenetic map obtained from apple vinegar sample as a result of BLAST analysis



Şekil 3. BLAST analizi sonucunda zeytin sirke numunesinden elde edilen filogenetik harita  
Figure 3. Phylogenetic map obtained from olive vinegar sample as a result of BLAST analysis

Stornik ve ark. (2016), organik ile konvansiyonel elma sirkesinde yetiştirilebilir AAB mikrobiyotasının karşılaştırılması adlı çalışmalarında organik sirke yetiştirme ortamında çalışmamıza benzer olarak *Acetobacter* ve *Komagataeibacter* türlerinden *Acetobacter pasteurianus* (%71,90), *Acetobacter ghanensis* (%12,50), *Komagataeibacter oboediens* (%9,35) ve *Komagataeibacter sakarivoranlar* (%6,25) bakteri çeşitleri bulunmuştur. Geleneksel elma sirkesinde aynı analitik yaklaşımları kullanarak, *Acetobacter pasteurianus* (%66,70), *Komagataeibacter oboediens* (%33,30) türlerine ait yalnızca iki farklı bakteri türü tanımlanmıştır. Bu çalışma, organik elma sirkesinin endüstriyel üretimi için bakteriyel mikrobiyotasının, geleneksel elma sirkesinin endüstriyel üretimi için bakteriyel mikrobiyotasından açıkça daha heterojen olduğunu göstermiştir.

Çalışmamıza benzer olarak, Milanovic ve ark. (2018), beyaz şarabı asetik asit fermentasyonu için kullandıkları ev yapımı geleneksel sirkeler olan tohum sirkelerinin içerdiği bakteriyel florayı keşfetmeyi amaçladıkları PZR DGJE ve Illumina dizileme vb. ileri moleküler analizleri kullandıkları çalışmalarında, numuneden direkt olarak kullanılarak gerçekleştirildikleri PZR DGJE tekniğiyle doğruluğu %97'nin üzerinde sağladıkları *Komagataeibacter*, *Acetobacter* ve *Gluconobacter* türlerini tespit etmişlerdir.

Yetiman ve Kesmen (2015), farklı moleküler teknikler kullanarak geleneksel olarak üretilen sirke ve sirke anasında (BS) AAB'lerin tanımlanması çalışmalarında; doğrudan analiz edilen örneklerin hemen hepsinde *Komagataeibacter hansenii* ve *Komagataeibacter europaeus* / *Komagataeibacter xylinus* en baskın tür olarak bulunmuştur. Benzer bir çalışma olarak, Bellassoued ve ark. (2015), elma sirkelerini oluşturan mikrobiyolojik bileşimin temelini çalışmamızda da olduğu gibi *Komagataeibacter xylinus* türünün oluşturduğunu belirtmiştir. De Vero ve ark. (2006) ise geleneksel balzamik sirkedeki AAB'lerini değerlendirmek için DGJE analizinin uygulanması çalışmalarında doğrudan analiz edilen her üç sirke örneğinde de *A. pasteurianus* / *A. aceti* grubu türler tespit etmiştir. Kültüre bağlı prosedürlerin de *A. malorum* ve *A. europaeus* sirke örneklerinde tespit edilen başlıca türler olarak bulunmuştur.

Song ve ark. (2019), elma sirkesi fermentasyonunda 16S rDNA dizilim işlemi ile mikrobiyal çeşitlilik analizini yapmışlardır. Elma sirkesinin ön (alkol) fermentasyonunda *Lactococcus* ve *Oenococcus* baskın bakteriler iken orta ve geç fermentasyon aşamalarında *Lactococcus* and *Acetobacter* baskın türler olarak bulunmuştur. Elma sirkesi üretiminde tüm fermentasyon süreci boyunca, *Lactococcus* en baskın bakteri olduğu gibi, asetik asit fermentasyonu sırasında da *Acetobacter* 'ın sayıca en hızlı artan bakteri olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda *Lactococcus* gözlenmemiş fakat *Acetobacter* gözlenen baskın türler arasındadır.

Mitrou ve ark. (2010 a,b) ve Petsiou ve ark., (2014) çalışmalarında, geleneksel yöntemle üretilmiş elma sirkesinden henüz belirlenememiş mekanizmalarla kilo kontrolü ile diyabet tedavisinde kullanmak amacıyla tespit edilmiş doğal kaynaklardan birisi olarak söz etmiştir. Goh ve ark. (2012), gözlenen bu etkilerin temel sebebi olarak, mikroorganizmaların gösterilebileceğini açıklamışlardır. Machado ve ark. (2016), BS üretebilmek için *Komagataeibacter rhaeticus* türünün alternatif bir bakteri türü olması konusu üzerindeki kinetik çalışmalarında;

kalınlık, verim ile su tutmabilme kapasitesi verilerinden yola çıkarak bu türün BS üretebilmek için uygun bir bakteri türü olduğunu tespit etmişlerdir. Gorgieva ve Trcek, (2019), *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter medellinensis*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter nataicola*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter saccharivorans* ve *Komagataeibacter pomaceti* gibi türleri bulunan *Komagataeibacter* cinsinin, kütleli ve etkili bir şekilde nanoselüloz üretimi nedeniyle araştırmacılar arasında büyük ilgi gördüğünü ifade etmiştir. Bu hipotezler doğrultusunda bakteri türünün gastrointestinal sistemimizde yer alması, glikoz emiliminde azalmaya ve bağırsaktaki glikozun selüloza dönüşmesine yardımcı olarak kilo alımını önleyebileceği düşünülmüştür. Özellikle zeytin sirkesi üzerinde oluşan BS örneğinin filogenetik haritasında *Komagataeibacter rhaeticus* türünün ve her iki örnekte de baskın olarak tespit edilen *Komagataeibacter xylinus* varlığı elde edilen BS örneklerinin endüstriyel alanlarda kullanım potansiyeline uygun olduğunu göstermektedir.

Lavasani ve ark. (2019), geleneksel elma sirkesinden BLAST analizini takiben belirledikleri, 16S rDNA gen sekansı, %99 *Komagataeibacter xylinus* özdeşliğe sahip *K. X1* suşunun 48 saatte yüksek glikoz dönüşüm oranına ve in vitro olarak önemli probiyotik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bu bakteriler insan sağlığını olumlu yönde etkilemek için düzenli olarak planktonik probiyotik olarak tüketilebileceği sonucuna ulaşmışlardır. Bakterinin glikozu selüloza dönüştürme yeteneği onu ticari probiyotik ürünlerde kullanmaya uygun hale getireceğini aktarmıştır.

Bu çalışma, PZR DGJE tekniğinin kullanılmasıyla birlikte geleneksel yöntemlerle üretilmiş elma ve zeytin sirkesi örnekleri üzerinde oluşan biyofilm tabakasında bulunan mikrobiyal çeşitlilikleri belirlemenin önemine odaklanmıştır. Bu çalışma, ürünlerin aroması, tadı ve tekstüründe potansiyel farklılıklara sebep olabilecek bakteriyel populasyon dinamiklerini ortaya çıkarmak için tasarlanmıştır. Aynı zamanda, bu mikrobiyal çeşitliliklerin performans verileriyle desteklenmesi, ürünlerin kalitesini, tutarlılığını ve genel olarak üretim sürecinin etkinliğini değerlendirmek için kritik bir rol oynamaktadır. Ek olarak çalışma elma sirkesinin mikrobiyotasının literatürde yer alan diğer çalışmalarla (Marič ve ark., 2020; Lavasani ve ark., 2019; Song ve ark., 2019; Yetiman ve Kesmen, 2015; Stornik ve ark., 2016; Milanovic ve ark., 2018) heterojen olduğunu doğrular niteliktedir. Böylece geleneksel üretim akışına ait mikrobiyal çeşitliliğe sahip stok kültürler oluşturulmuştur. Bu iki kültürün endüstriyel BS üretimine uygun olacak şekilde optimizasyon çalışmalarının araştırılmasına uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca elde edilen stok kültürlerin bağırsak glikoz emilimini azaltarak obezite ve diyabetin önlenmesine destek olan ek bir terapötik probiyotik olarak tüketilip tüketilemeyeceği gelecek çalışmalarda değerlendirilecektir.

## Kaynaklar

- Aktan N, Yıldırım HK. 2011. Sirke Teknolojisi, Sidas Medya, Yayın No: 11-1B. ISBN : 978-605-87976-4-2.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389

- Austin B. 2017. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110: 1247 -1256. doi: 10.1007/s10482-017-0840-8.
- Bartowsky EJ, Xia D, Gibson RL, Fleet GH, Henschke PA. 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 307-314. doi: 10.1046/j.1472-765x.2003.01314.x.
- Bellassoued K, Ghrab F, Makni-Ayadi F, Van Pelt JV, Elfeki A, Ammar E. 2015. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharm Biol.*, 53(11):1699-709. doi: 10.3109/13880209.2014.1001408
- Boşgelmez Tinaz G, Ulusoy S, 2008. Characterization of N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* 44 (2008) 13–19. doi: 10.1016/j.micpath.2007.06.005.
- Budak NH, Aykin E, Seydim AC, Greene AK, Güzel Seydim ZB. 2014. Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science*, 79(5): 757–64. doi: 10.1111/1750-3841.12434
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinform.* 10: 421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
- Cocolin L, Diez A, Urso R, Rantsiou K, Comi G, Bergmaier I and Beimfohr C. (2007) Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 100–109. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.015
- De Vero L, Gala E, Gullo M, Solieri L, Landi S, Giudici P. 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGJE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*, 23: 809–813. doi: 10.1016/j.fm.2006.01.006
- Ebihara K, Nakajima A. 1988. Effect of acetic acid and vinegar on blood glucose and insulin responses to orally administered sucrose and starch. *Agricultural Biology Chemistry*, 52:1311–1312. doi: https://doi.org/10.1271/bbb1961.52.1311
- Ercolini D, Hill PJ and Dodd CER. 2003. Bacterial community structure and location in stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3540–3548. doi: 10.1128/AEM.69.6.3540-3548.2003
- Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio F, Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGJE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 59–70. doi: https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00259-3
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrs KR, Chen KN, Woese CR. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*, 209: 457–463. doi: 10.1126/science.6771870
- Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA. 2006. Molecular techniques in waste water: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J Microbiol Meth.* 66: 1–20. doi: 10.1016/j.mimet.2006.02.016
- Giudici P, Gullo M, Solieri L, Falcone PM, 2009. Technological and micro biological aspects of traditional balsamic vinegar and their influence on quality and sensorial properties. *Adv. Food Nutr. Res.* 58: 137–182. doi: 10.1016/S1043-4526(09)58004-7
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Goh WN, Rosma A, Kaur B, Fazilah, A, Karim A, Bhat R. 2012. Fermentation of black tea broth (kombucha): I. effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19(1): 109-117.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 11:506–514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66
- Ho CW, Lazim AM, Fazry S, Hussain Zaki UKH, Lim SJ., 2017. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: a review. *Food Chemical*, 221: 1621–1630. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.128
- Holland JL, Louie L, Simor AE, Louie M. 2000. PCR detection of *Escherichia Coli* O157:H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *J Clin Microbiol.*, 38 (11): 4108-4113. doi: 10.1128/JCM.38.11.4108-4113.2000
- Junior MMS, Silva LOB, Leao DJ, Ferreira SLC. 2014. Analytical strategies for determination of cadmium in Brazilian vinegar samples using ET AAS. *Food Chemistry*, 160: 209–213. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.090
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lavasani PS, Motevaseli E, Shirzad M, Modarressi MH. 2017. Isolation and identification of *Komagataeibacter xylinus* from Iranian traditional vinegars and molecular analyses. *Iran J Microbiol.* 9(6): 338–347.
- Machado RTA, Gutierrez J, Tercjak A, Trovatti E, Uahib FGM, Moreno GP, Barud HS. 2016. *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production. *Carbohydrate Polymers*, 152: 841–849. doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.049
- Maoloni A, Milanovic V, Cardinali F, Mangia NP, Murgia MA, Garofalo C, Clementi F, Osimani A, Aquilanti L. 2020. Bacterial and Fungal Communities of Gioddu as Revealed by PCR–DGJE Analysis. *Indian J Microbiol.* 60(1):119–123. doi: 10.1007/s12088-019-00838-6
- Marič L, Cleenwerck I, Accetto T, Vandamme P, Trcek J. 2020. Description of *Komagataeibacter melaceti* sp. nov. and *Komagataeibacter melomenusus* sp. nov. Isolated from Apple Cider Vinegar. *Microorganisms*. 8: 1178. doi:10.3390/microorganisms8081178
- Milanović V, Osimani A, Garofalo C, De Filippis F, Ercolini D, Cardinali F, Taccari M, Aquilanti L, Clementi F. 2018. Profiling White wine seed vinegar bacterial diversity through viable counting, metagenomic sequencing and PCR-DGJE. *International Journal Of Food Microbiology*. 286: 86-74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.022
- Mitrou P, Raptis AE, Lambadiari V, Boutati E, Petsiou E, Spanoudi F, Papakostantinou E, Maratou E, Economopoulos T, Dimitriadis G, Raptis SA., 2010a,b. Vinegar decreases postprandial hyperglycemia in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 33:2, doi: 10.2337/dc09-1354
- Muyzer G, De Waal EC and Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700. doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
- Nakatsu CH. 2007. Soil microbial community analysis using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*. 71 (2): 562-571. doi: 10.2136/sssaj2006.0080
- Ostman E, Granfeldt Y, Persson L, Björck I. 2005. Vinegar supplementation lowers glucose and insulin responses and increases satiety after a bread meal in healthy subjects. *European Journal Clinical Nutrition*. 59: 983–988. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602197

- Ovreas L, Forney L, Daae FL, Torsvik V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 63 (9): 3367-3373. doi: 10.1128/aem.63.9.3367-3373.1997
- Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. 2015. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 31: 3691-3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421
- Petsiou EI, Mitrou PI, Raptis SA, Dimitriadis GD. 2014. Effect and Mechanisms of Action of Vinegar on Glucose Metabolism, Lipid Profile and Body Weight, *Nutrition rev.*, 72 (10): 651-661. doi: 10.1111/nure.12125
- Saichana N, Matsushita K, Adachi O, Frébort I, Frebortova J. 2015. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 33: 1260-1271. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.001
- Seemann T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 30: 2068-2069, doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Sofu A, Ekinci FY. 2016. Bacterial diversity dynamics of traditional Turkish Ezine Cheese as evaluated by PCR-DGJE and SSCP analysis. *International Journal of Dairy Technology*, doi: 10.1111/1471-0307.12311.
- Sofu A, Ekinci FY. 2010. Identification of lactic acid bacteria in different traditional cheeses by using PCR-DGJE method. *1st Int. Congress on Food Technology, Antalya, 3 - 6 Ekim 2010*, page 110.
- Song J, Zhang JH, Kang SJ, Zhang HY, Yuan J, Zeng CZ, Zhang F, Huang YL. 2019. Analysis of microbial diversity in apple vinegar fermentation process through 16s rDNA sequencing. *Food Science Nutrition*, 7:1230-1238. doi: 10.1002/fsn3.944
- Stornik A, Skok B, Trček J. 2016. Comparison of Cultivable Acetic Acid Bacterial Microbiota in Organic and Conventional Apple Cider Vinegar. *Bacterial Microbiota in Apple Cider Vinegar. Food Technol. Biotechnol.* 54 (1): 113-119. doi: 10.17113/ftb.54.01.16.4082
- Şahin İ. (1982) Asit Fermantasyonları (Sirke, Laktik ve Sitrik Asit Fermantasyonları). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tezsiz No:78, 142s.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
- Tangüler H, Mert H, İlman F, Yücel B, Gençtürk S. (2021). Elma atıklarından elma sirkesi üretimi üzerine bir araştırma. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10 (1): 132-139. doi: 10.28948/ngumuh.673508
- Yetiman AE, Kesmen Z. 2015. Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 204: 9-16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.013
- Yücel Şengün İ, Kılıç G., 2016. Isolation, identification and current taxonomy of acetic acid bacteria. *Biological Diversity and Conservation.* 9 / 1: 154-162.