

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEYTİN VE ELMA SİRKESİ ÖRNEKLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYON- DENATURE EDİCİ GRADYAN JEL ELEKTROFOREZ  
(PZR-DGJE) TEKNİĞİYLE MİKROBİYOTASININ BELİRLENMESİ**

**Burcu OKTAR**

**Danışman  
Doç. Dr. Aytül BAYRAKTAR SOFU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2020**



© 2020 [Burcu OKTAR]

## TEZ ONAYI

Burcu OKTAR tarafından hazırlanan " Zeytin ve Elma Sirkesi Örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyon-Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroforez (PZR-DGJE) Tekniğiyle Mikrobiyotasının Belirlenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Aytül BAYRAKTAR SOFU  
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK  
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Mümin POLAT  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. şule Sultan UğUR

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Burcu OKTAR**



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	3
2.1. Sirke Üretimi .....	3
2.1.1. Yavaş Yöntem .....	3
2.1.2. Çabuk Yöntem .....	3
2.1.3. Submers Yöntemi (Asetatör).....	4
2.2. Asetik Asit Bakterileri (AAB) .....	4
2.2.1. Asetik Asit Bakterilerinin Sınıflandırması.....	4
2.3. Mikrobiyal Çeşitlilik.....	8
2.4. Mikrobiyal Çeşitliliğin Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler	9
2.4.1. 16 S rRNA Dizi Analizi ve Bakterilerin Tanımlaması .....	9
2.4.2. Kültüre Dayalı Olmayan Moleküler Yöntemler .....	10
2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR).....	10
2.4.4. Tek Parçalı Kontrol Edilen Polimorfizm (SSCP).....	12
2.4.5. Floresans In Situ Hibridizasyon (FISH) .....	13
2.4.6. Sıcaklık Gradyant Jel Elektroforezi (TGGE) .....	13
2.4.7. Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroforezi (DGJE).....	13
2.4.8. DGGE Yöntemine Teknik Yaklaşımlar .....	15
2.5. Moleküler Metodların Avantaj ve Dezavantajları .....	18
3. MATERYAL-METOD .....	20
3.1. Materyal. ....	20
3.2. Metod.....	20
3.2.1. Sirke üretimi .....	20
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması .....	21
3.2.3. PZR Amplifikasyonu ve DGJE Tekniği ile Bant Eldesi .....	23
3.2.4. Dizi (Sekans) Analizi ve Yorumlanması .....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	26
4.1. Geleneksel Sirke ve Sirke Anası Üretimi.....	26
4.2. DNA İzolasyonu .....	26
4.3. Jel görüntüleme sistemi bant görüntüsü.....	27
4.4. BLAST Analiz Sonucu Filogenetik Harita .....	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	30
KAYNAKLAR .....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	35

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ZEYTİN VE ELMA SİRKEİ ÖRNEKLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON-DENATÜRE EDİCİ GRADYAN JEL ELEKTROFOREZİ (PZR-DGJE)TEKNİĞİYLE MİKROBİYOTASININ BELİRLENMESİ

Burcu OKTAR

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aytül BAYRAKTAR SOFU

Bu tez çalışmasında, geleneksel yöntemle üretilmiş zeytin ve elma sirke örneklerinin mikrobiyal popülasyonlarındaki farklılıkların, DNA dizi analizleri yapılarak tanımlanması hedeflenmiştir.

Çalışmada DNA analizi için kültürden bağımsız ve hızlı bir analiz yöntemi olan PZR-DGJE (Polimer zincir reaksiyonu-denatüre edici gradyan jel elektroforez) tekniği kullanılmıştır. Elde edilen sekanslar ise BLAST programıyla değerlendirilmiştir.

Tez çalışması sonucunda zeytin ve elma sirkesi örneklerinin her ikisinde de sirke bakterisi olarak bilinen *Gluconacetobacter* ( *Komogataeibacter xylinus*) (% 93 ve % 87 homoloji) grubuna ait DNA'lar bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Sirke, Asetik asit bakterisi, PZR-DGJE Tekniği.

2020, 35 sayfa

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **DETERMINATION OF OLIVE AND APPLE VINEGAR MICROBIOTA BY POLYMERASE CHAIN REACTION- DENATURATING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (PCR-DGGE) TECHNIQUE**

**Burcu OKTAR**

**Süleyman Demirel University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Bioengineering**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aytül BAYRAKTAR SOFU**

In this thesis study, it is aimed to identify the differences in microbial populations of olive and apple vinegar samples produced by traditional method by DNA sequence analysis.

In the study, PCR-DGGE technique, which is a culture independent and rapid analysis method, was used for DNA analysis. The obtained sequences were evaluated by BLAST program.

As a result of thesis study, DNAs belonging to Gluconacetobacter (Komogataeibacter xylinus) group (% 93 ve % 87 homology) , known as vinegar bacteria, were found in both olive and apple vinegar samples.

**Keywords:** Vinegar, Acetic acid bacteria, PCR-DGGE Technique.

**2020, 35 pages**

## TEŞEKKÜR

Araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorluklara karşı güçlü kalabilmeyi ve çözüm bulmayı öğrendiğim, kendime rol model olarak gördüğüm çok değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Aytül BAYRAKTAR SOFU'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Kimya Mühendisliği mesleğimi icra ettiğim Erçetin Gülyağı A.Ş.'nin Yöneticisi olan ve eğitim hayatımın devamlılığı için benden desteklerini esirgemeyen, sahada nasıl mühendis olacağımı öğreten, hayatımda ikinci rol model olarak gördüğüm ve 'Nasıl yönetici olunacağını gözlemlediğim A. Nuri ERÇETİN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatta bir şeyleri başaracağıma yürekten inanan insanlara ve uzakta olsalar da desteklerini hep hissettiğim tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, bu yola çıkmamda desteklerini hep hissettiğim, annem Havva OKTAR, babam Mehmet OKTAR ve kardeşim Soner OKTAR'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Burcu OKTAR  
ISPARTA, 2020



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Komagataeibacter xylinus</i> bakterisinin selüloz üretimi sırasında Scanning electron microscopy (SEM) görüntüsü. ....	7
Şekil 2.2. PZR'ın çalışma prensibi.....	12
Şekil 2.3. Mikrobiyal çeşitliliği tanımlanmasında kullanılan DGJE yöntemi.....	15
Şekil 2.4. Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroforez sistemi.....	16
Şekil 2.5. Primeri takip eden GC kuyruk.....	17
Şekil 2.6. Denatüre edici gradyan jel elektroforez cihazı.....	18
Şekil 2.7. Mikroorganizmaların tanımlanmasında ve belirlenmesinde kullanılan DGJE prosesi şeması.....	19
Şekil 3.1. Sirke üretimi ve sirke anasının ayrılması.....	20
Şekil 3.2. Elma ve zeytin sirke anası örneklerinden DNA izolasyonu.....	23
Şekil 3.3. UV/Vis Spektrofotometre Cihazı.....	23
Şekil 3.4. Jel Elektroforez cihazında DNA yürütülmesi.....	24
Şekil 3.5. Jel Görüntüleme Sistemi cihazıyla görüntü alınması.....	24
Şekil 4.1. Sirke üzerinde oluşmuş sirke anası görüntüsü.....	26
Şekil 4.2. Bant görüntüsü.....	27
Şekil 4.3. Elma sirkesi örneklerinin BLAST analiz sonucu elde edilen asetik asit bakterileri filogenetik haritası.....	28
Şekil 4.4. Zeytin sirkesi örneklerinin BLAST analiz sonucu elde edilen asetik asit bakterileri filogenetik haritası.....	29

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. Asetik asit taksonomisi .....	5
Çizelge 4.1. UV/ Vis Spektrofotometre.....	26



## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

AAB	: Asetik asit bakterileri
DGJE	: Denatüre edici gradyan jel elektroforez
FISH	: Floresans In Situ Hibridizasyon
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonları
rDNA	: Ribozomal DNA
rRNA	: Ribozomal RNA
SSCP	: Tek Parçalı Kontrol Edilen Polimorfizm
TGGE	: Sıcaklık Gradyan Jel Elektroforezi
UV-Vis	: Ultra Viyole ve Görünür Işık



## 1. GİRİŞ

Geleneksel sirke; başlangıçta etanol, sonrasında asetik asit üretmek için 2 aşamalı bir fermentasyon (alkolik ve asetik) ile tahıl, elma, üzüm veya şeker kamışı gibi ham bitkilerden yapılır (Junior, Silva, Leao, & Ferreira, 2014; Budak, Aykin, Seydim, Greene, & Seydim, 2014).

Sirke üretimine neden olan mikrobiyota karmaşıktır ve asetik asit bakterisine ait bakteriyel cinsleri içerir. Bunlar; *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Ameyamaea*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Kozakia*, *Komagataeibacter*, *Neoasaia*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Tanticharoenia*, *Bombella*, *Commensakibacter*, *Endobacter*, *Nguyenibacter*, *Neokomagataca*, *Swingsia* olarak 19 adet cins belirlenmiştir. Asetik asit bakterilerinin yetiştiriciliği, izolasyonu ve tanımlanmasının, yaşayabilir fakat yetiştirilemez durumunda bulunabilecekleri ve diğer mikrobiyal gruplarla rekabet edebilecekleri ortamlarda özellikle kendiliğinden fermentasyonda zorlandıkları bilinmektedir (De Ross ve De Vuyst, 2018).

Geçmişteki bakterilerin kültür temeline dayanan metodlar sayesinde mikrobiyota hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir, fakat kültürden bağımsız moleküler yaklaşımların kullanılması ile çoğu halen tespit edilememiş mikrobiyota bilgilerimizin yanlış aynı zamanda eksik olduğu görülmüştür (Hugenholtz ve Goebel, 1980). 21. yüzyıla doğru ilerledikçe mikrobiyolojide kültür bağımlı yaklaşımlardan ziyade, özellikle 16S rRNA geninin dizilenmesi gibi modern gelişmelerin ardından, sağlam/canlı bakteri hücrelerine ihtiyaç duymayan kültürden bağımsız teknikler ön plana çıkmıştır. Bu yöntemler son derece özgül ve duyarlıdır, özellikle de *in vitro* olarak üretilmeyen mikroorganizmalar için ekstra avantaj sağlamakta hatta doğal ortamlarından veya patolojik materyalden alınan patojenler kısa sürede tespit edilebilmektedir (Austin, 2017). Kültür ortamında yetiştiriciliği zor olan asetik asit bakterileri için de bu kültür bağımsız olan moleküler yöntemlerin kullanılabilirliği taksonomilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Çoğu zaman 16S rRNA (transkripsiyon/eşleşme sonrası) geni (yaklaşık olarak 1500 baz-çifti uzunluğundadır); bir taraftan tüm bakterilerde aynı diziyeye sahiptir ve son derece korunmuş bölgeler içermektedir. Bunun yanın sıra bakterilerin tür ve alt tür seviyelerinde filogenetik ayrımı ve sınıflandırılmasına imkân verecek şekilde farklı genomlar arasındaki evrimsel uzaklığına orantılı ve belirli olarak değişiklik gösteren bölgelere sahiptir (Fox vd., 1980).

PZR, 1980'lerden bu yana, mikrobiyolojik etkenlerin belirlenmesinde vazgeçilmez bir araç olmuştur ve klinik mikrobiyolojide yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Yeni cihaz ve Termostabil olan polimerazların geliştirilmesiyle birlikte tek hedef nükleik asidin bir saatten kısa sürede milyonlarca kopyası elde etmek mümkün hale gelmiştir. Mikroorganizmaların tanımlanmaları ve filogenetik araştırmalarında mikrobiyal genomu temsil etmek üzere 16S rRNA geninin PZR amplifikasyonunu ve Dentüre Edici Gradyan Jel Elektroforezi (PZR-DGJE) kullanarak amplikonların ayrılmasını birleştiren bir moleküler parmak izi tekniği, çeşitli çevresel örneklerde mikrobiyal topluluktaki varyasyonların izlenmesinde başarılı sonuçlar vermiştir (Bartlett ve Stirling, 2003; Ovreas L vd., 1997; Nakatsu CH, 2007). PZR-DGJE dahil olmak üzere moleküler tekniklerin analitik başarısı, hücre liziz etkinliğine ve çevre örneklerinden geri kazanılan DNA kalitesine olan bağımlılığından büyük ölçüde etkilenmektedir (Holland JL vd., 2000).

DGJE, mikrobiyal toplulukların araştırılmasında kullanılan en popüler yöntemlerden birisi olan ve örneklerdeki DNA parçalarının karşılaştırılmasına imkân veren moleküler parmak izi tekniğidir. Bu yöntemde farklı dizilerdeki ve boyutlardaki PZR ürünleri bir jel ya da kapiler üzerindeki hız farklarına göre ayrılmaktadır (Gilbride vd., 2006), bu hız farklılıklarından bantlar oluşmaktadır.

## **2. KAYNAK ÖZETLERİ**

### **2.1. Sirke üretimi**

Kodeks Alimentarius Komisyonu (KAK) standartlarına göre sirke, şeker bakımından zengin çeşitli kaynaklardan (çoğunlukla tahıl veya meyve) elde edilen alt tabakaların çifte fermantasyonundan oluşmaktadır (Mas vd., 2016). Sirke; sindirimi arttırmakta, iştahı uyarmakta, antioksidan aktivite, antidiyabetik etki ve antimikrobiyal özellik göstermektedir (Ho vd., 2017). Lipid metabolizmasının düzenlenmesi, kan glukoz seviyelerinin kontrolü ve kilo kaybı için tüketimi önerilmektedir (Giudici vd., 2009). Ayrıca atıkları azaltmak için de bu atıkların sirke gibi diğer ürünlere dönüştürülmesinde başlangıç hammaddesi olarak kullanılmasında önemli rol üstlenmektedir (Ho vd., 2017). Standardize olmuş sirke (Türk Gıda Kodeksi ve USA), en az % 4, Avrupa Birliği' ne göre en az % 5 asetik asit içermesi gereklidir. Sirke üretimi sırasında, maya olarak sirke anası ya da bakteri kültürleri (saf) kullanılmaktadır. Ayrıca sirke, elde edildiği meyvelerin (elma, üzüm, nar gibi.) özel bileşimini ve çeşnisini taşır (Elgün 2011).

#### **2.1.1. Yavaş yöntem**

Bu yöntemde sirkeleşme uzun sürmektedir. Fıçı ya da damacana gibi bir kap kullanılmaktadır. Sıcak bir ortamda kendi haline bırakılır. Şaraba başlatıcı olarak 1/3 - 1/4 oranlarında pastörize edilmemiş / süzülmemiş keskin sirke ilavesi yapılır. 25 - 30 °C' de sıcaklıklarda 6-8 hafta içerisinde sirkeleşme tamamlanmaktadır.

#### **2.1.2. Hızlı yöntem**

Alman ya da jeneratör yöntemi olarak da bilinen bu yöntem üç bölümden oluşur. Ağaçtan yapılan silindir şeklinde tanklar kullanılmaktadır. Üst bölümde şarap püskürten bir başlık vardır. Tankın ortasında ise yüzey alanını geniş tutmak amacıyla yerleştirilmiş üzerinde sirke bakterileri bulunan odun talaşı

bulunur. En altta da oluşmuş sirke anası toplanmaktadır. Sıcaklık, 29 ile 30 °C' de tutulmaktadır.

### **2.1.3. Submers yöntemi (Asetatör)**

Şaraba sirke bakterileri ilave edilir ve içerisine hava verilir. Sirke yapılan kaplara "Asetatör" denir. İç kısmında soğutucu borular, alt kısmında hava verici düzeni vardır. Bunlar, paslanmaz çelik ya da tahta tanktan oluşur (<https://isparta.tarimorman.gov.tr/>).

## **2.2. Asetik asit bakterileri (AAB)**

AAB'ler katalaz pozitif, gram negatif, aerobik, oksidaz negatif, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde, elipsoidal, hareketli veya hareketsiz, hücreleri tek, çift ya da zincir şeklinde olan mikroorganizmalardır. AAB'leri hücrelerinin genişliği ve uzunluğu sırasıyla 0,4 - 1,0 mm ve 0,8 - 4,5 mm dir. Bu gruptaki gelişme sıcaklıkları 5 ile 45 °C arasında, optimum gelişme sıcaklığı ise 25-30 °C arasında değişmektedir. Bazı türleri termotolerant özellik gösterebilmektedir. AAB'leri optimum gelişim pH'ı 5,0- 6,5 değerlerindedir fakat düşük pH (3-4) değerlerinde de gelişebilmektedir (Sengun ve Karabiyikli, 2011).

### **2.2.1. Asetik asit bakterilerinin sınıflandırması**

Bu bakteriler, *Acetobacteriaceae* familyasındandır ve grupta tanımlanmış 19 adet cins bulunmaktadır. Bunlar; *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Bombella*, *Commensalibacter*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neokomagataea*, *Neoasaia*, *Nguyenibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Tanticharoenia* ve *Swingsia* cinsleridir (Sengun, 2015; Trček ve Barja, 2015).

Çizelge 2.1. Asetik asit taksonomisi (Şengün vd., 2016)

<b>Cins Adı</b>	<b>Tür Adı</b>
<i>Acetobacter</i>	<i>A. cerevisiae</i> , <i>A. aceti</i> , <i>A. Estunensis</i> , <i>A. cibirongensis</i> , , <i>A. farinalis</i> , <i>A. fabarum</i> , <i>A. indonesiensis</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>A. lambici</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A.</i> <i>nitrogenifigens</i> , <i>A. okinawensis</i> , <i>A. oeni</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A.</i> <i>orleanensis</i> , <i>A. papayae</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A.</i> <i>peroxydans</i> , <i>A. pomorum</i> , <i>A. persici</i> , <i>A. sicerae</i> , <i>A.</i> <i>senegalensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>A. thailandicus</i> , <i>A. tropicalis</i> ,
<i>Acidomonas</i>	<i>Ac. methanolica</i>
<i>Ameyamaea</i>	<i>Am. chiangmaiensis</i>
<i>Asaia</i>	<i>As. bogorensis</i> , <i>As. astilbis</i> , <i>As. lannaensis</i> , <i>As.</i> <i>krungthepensis</i> , <i>As. siamensis</i> , <i>As. platycodi</i> , <i>As.</i> <i>spathodeae</i> , <i>As. prunellae</i>
<i>Bombella</i>	<i>B. intestini</i>
<i>Commensalibacter</i>	<i>C. intestini</i>
<i>Endobacter</i>	<i>E. medicaginis</i>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Ga. asukensis</i> , <i>Ga. aggeris</i> , <i>Ga. azotocaptans</i> , <i>Ga.</i> <i>entanii</i> , <i>Ga. diazotrophicus</i> , <i>Ga. johannae</i> , <i>Ga. sacchari</i> , <i>Ga. liquefaciens</i> , <i>Ga. takamatsuzukensis</i> , <i>Ga. tumulisoli</i> <i>Ga. tumulicola</i> ,
<i>Gluconobacter</i>	<i>G. cerevisiae</i> , <i>G. albidus</i> , <i>G. cerinus</i> , <i>G. japonicus</i> , <i>G.</i> <i>frateurii</i> , <i>G. kanchanaburiensis</i> , <i>G. nephelii</i> , <i>G.</i> <i>kondonii</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>G. roseus</i> , <i>G. sphaericus</i> , <i>G.</i> <i>uchimurae</i> , <i>G. thailandicus</i> , <i>G. wancherniae</i>
<i>Granulibacter</i>	<i>Gr. bethesdensis</i>



Çizelge 2.1. Asetik asit taksonomisi (Şengün vd., 2016) (Devam)

<i>Komagataeibacter</i>	<i>K. intermedius, K. europaeus, K. kakiaceti, K. hansenii, K. kombuchae, K. medellinensis, K. maltaceti, K. nataicola, K. rhaeticus, K. oboediens, K. saccharivorans, K. Sucrofermentans, K. Xylinus, K. swingsii,</i>
<i>Kozakia</i>	<i>Ko. baliensis</i>
<i>Neoasaia</i>	<i>N. chiangmaiensis</i>
<i>Neokomagataea</i>	<i>Ne. thailandica, Ne. tanensis,</i>
<i>Nguyenibacter</i>	<i>Ng. vanlangensis</i>
<i>Saccharibacter</i>	<i>Sa. floricola</i>
<i>Swaminathania</i>	<i>Sw. salitolerans</i>
<i>Swingsia</i>	<i>S. samuiensis</i>
<i>Tanticharoenia</i>	<i>T. aidae, T. sakaeratensis</i>

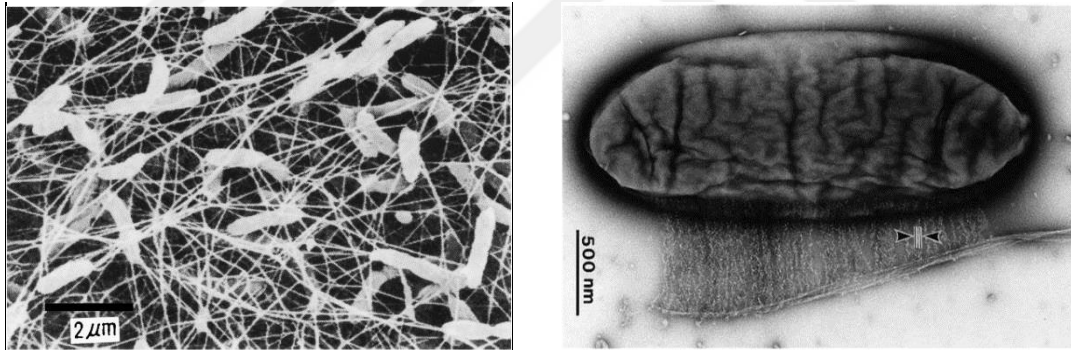
Birçok *Acetobacter* ve *Komagataeibacter* suşunun, ticari ürün olan asetik asit ve sirkenin endüstriyel üretimi için yararlı özellikleri olduğu düşünülen asetik asit ve etanol direncinin yanı sıra yüksek asetik asit fermentasyon kabiliyetine sahip olduğu bilinmektedir. Öte yandan, *Gluconobacter* suşları da çeşitli şekerlerin, şeker alkollerinin ve çeşitli değerli ürünlerin oluşumuna yol açan şeker asitlerinin oksidatif fermantasyonunu gerçekleştirme kabiliyetine sahiptir (Şengün ve Kılıç, 2016; Saichana vd., 2015).

Sirke fermantasyonundan geri kazanımından daha sık izole edilen AAB lerde temel dağılım *Acetobacter* ve *Gluconacetobacter* cinslerinden *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter polyoxogenes*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter oboediens*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter entanii*, *Gluconacetobacter intermedius*, olarak bilinen türlerdir (Yamada, 2000). Glukonobakter cinsi şeker metabolizması, C vitamini ve glukonik asit üretimi gibi birçok biyoteknolojik uygulamada (gıda,

ilaç ve hijyen uygulamaları endüstrileri gibi) kullanılmaktadır (Ramachandran vd., (2006)).

Probiyotiklerin değerli etkileri suştan suştan farklı olduğu için, spesifik hastalıkların diğer yöntemlerle birlikte önlenmesinde yardımcı olabilecek yeni suşları izole etmek ve tanımlamak için çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca probiyotik bakteriler gastrointestinal koşullara karşı dirençlidir (düşük pH ve yüksek konsantrasyonlarda safra tuzları) (Sahadeva ve ark., 2011). Bundan dolayı asetik asit bakterilerin probiyotik özellikle kullanılması oldukça olasıdır.

Bellassoued vd., (2015) çalışmalarında elma sirkelerinin mikrobiyolojik bileşiminin temelini *K. xylinus* türünün oluşturduğunu belirtmişlerdir. Şekil 2.1'de *Komagataeibacter xylinus* asetik asit bakterisinin selüloz üretimi sırasında görüntülenmiş SEM görüntüsü görüntülenmektedir (Iguchi vd., (2000) ve Hirai vd., (2002)).



Şekil 2.1. *Komagataeibacter xylinus* bakterisinin selüloz üretimi sırasında Scanning electron microscopy (SEM) görüntüsü, Iguchi vd., (2000), Hirai vd., (2002).

Şengün ve Kılıç (2016), asetik asit bakterilerinde izolasyon, tanımlanma ve güncel taksonomileri adlı derleme çalışmalarında, eskiden *Acetobacter* ve *Gluconobacter* olarak sadece iki asetik asit bakteri cinsinin bilinirken, gelişen tanımlama yöntemleri kullanılarak tanımlanmış, 19 adet AAB'si cinsi bulunduğunu belirtmişlerdir.

Mamlouk ve Gullo (2013), fermente içeceklerde PCR-DGGE tekniğini kullanarak *A. aceti*, *G. oxydans*, *A. polyoxogenes*, ve *Ga. europaeus* türlerini tanımlamışlardır.

Valera ve ark. (2015) çalışmalarında çilek sirkesinin biyofilminde kültüre bağımlı ve bağımsız teknikleri kullanmışlar, sirke biyofilmlerinde en yüksek tespit yüzdesi olarak *Ameyamaea*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter* ve *Tanticharoenia* bulunduğunu belirtmişlerdir.

Milanovic ve ark., (2018), çalışmalarında beyaz şarabın asetik fermantasyonu için kullanılan ev yapımı yerel sirkeler olan tohum sirkelerindeki bakteriyel florayı keşfetmeyi amaçlamışlar. Bu amaçla, ev yapımı sirke üreticileri tarafından sağlanan tohum sirkelerinin Illumina dizileme ve PZR-DGJE gibi ileri moleküler analizlere tabi tutmuşlar. Sonuç olarak, örnekten direk olarak kullanılarak gerçekleştirilen PZR-DGJE tekniğiyle % 97'nin üzerinde doğruluk sağlayan *Acetobacter*, *Komagataeibacter* ve *Gluconobacter* türlerini belirlemişlerdir.

### **2.3. Mikrobiyal çeşitlilik**

Çevre örneklerindeki mikrobiyal kompozisyonların farklılığını belirleyebilmek için dünyada pek çok araştırma yapılmaktadır. Bunun temelinde yatan sebep doğadaki bakteriyel farklılıkların belirlenmesi ile ekolojik sistemlerin çalışma mekanizmaları daha iyi anlaşılabilir hale gelineceği inancıdır.

Geleneksel teknikler kullanılarak mikroflora ve ekosistemlerin ilişkisini araştırma çalışmaları, bakterinin kültüre edilebilir olmasına bağlıdır. Bu yöntemler, spesifik ya da spesifik olmayan agarlar üzerinde bakterilerin kültür edilmesinden sonra oluşan kolonilerin izolasyonu ve daha sonra fenotipik karakterizasyonu belirleyen morfolojik ve biyokimyasal analizleri kapsamaktadır. Fakat, çevre ekoloji araştırmacıları agarda kültüre edilebilen toplam bakteri miktarını sadece %1'lik küçük bir oran olarak belirtmişlerdir (Amann vd., 1995). Çevre örneklerinde bakteriyel flora çalışmalarının artmasıyla; çevresel farklılıklara bakteriyel toplulukların nasıl karşılık verdiği, topluluk içindeki bakteriyel kompozisyonun ve türlere bağlı olarak birbirleriyle olan etkileşimlerinin nasıl olduğu sorularının yanıtları alınabilir hale gelmiştir (Amann vd., 1995).

Fenotipik metodların; kültüre edilebilir olması gerekliliği, ayırt edici gücünün zayıf olması, araştırmalarının zahmetli olması ve kompleks büyüme koşullarının meydana getirdiği bazı tekniklerin belirsizliği gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Alternatif olarak genotipik metodlar bakteriyel DNA çalışmaları olarak tanımlanmaktadır. Genotipik metodların dezavantajlarını ise pahalı donanım ve prosedürün olması ayrıca sık sık ihtiyaç duyulan veri analizi çalışmaları oluşturmaktadır (Hovda, 2007).

## **2.4. Mikrobiyal çeşitliliğin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler**

### **2.4.1. 16 S rRNA dizi analizi ve bakterilerin tanımlaması**

Bu yöntemin temeli nükleik asit kimyası ve yapısal özelliklerinin belirlenebilmesine, ayırımına yönelmiş çalışmalara dayanmaktadır. RNA'lar protein ve farklı enzimlerin sentezlenmesini gerçekteştiren reaktörlere benzer olarak görev yapar ve hücre metabolizması için gereken enzimleri sentezler ve genetik kodun açıklanmasını, anlaşılmasını sağlamaktadır (Jill, 2004).

1980 yıllarında bakteri tanımlamak için yeni teknikler geliştirilmeye başlanmıştır. Woese (1985) ifadesinde, laboratuvar çalışmalarında bakterilerin yaşam formlarını belirleyebilen genetik kodlarındaki stabil parçaların karşılaştırılmasının yapılmasıyla, bakterilerin filogenetik ilişkilerini belirlenebileceğini belirtmiştir.

Prokaryotların filogenetik araştırmalarıyla ilgili gelişmeler, ribozomik RNA'nın ayırım tekniğindeki ilerlemelere sebep olmuştur. Elde edilmiş sonuçlara göre ne bakteri türü, nede cins seviyesindeki ayrımlara imkân vermemiş sadece evrim sırasını belirlemek için yardımcı olmaktadır. RNA'lardan 16 S uzunluğunda (1500 nt) elde edilen molekül, daha fazla yarar sağlamaktadır (Kolbert ve Persing, 1999, Böttger, 1989;).

Moleküler tanımlama yöntemleri olan birçok hızlı ayırım tekniği, 16S rRNA üzerinde daha fazla bilgi edinme amacıyla kullanılmıştır. *Thermus aquaticus*'dan izole edilmiş termostabil Taq DNA polimerazı, PZR tekniğini başarıyla uygulaması, spesifik DNA dizilerini *in vitro* şartlarda çoğaltılabilmesini mümkün kılmıştır (Kary B. Mullis, 1983). RNA 16 S deki oligonükleotidlerinin dizilişlerindeki kıyaslama, hem bakteri filogenetiği hem de sistematik araştırmalar için kullanılır. Bu moleküller, bakteriler arasındaki orijinleri ile ilişkilerini gösteren ve evrim safhalarını belirten moleküler kronometreleri assimile edebilmektedirler. Modifiye PZR bazlı, hedef DNA ve RNA dizilerinin amplifikasyonu ve tanımlanmasını daha da duyarlı, özgül yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çabalar takip etmiştir (Giovannoni vd., 1990; Böttger, 1989; Ward vd., 1990; Ludwig ve Schleifer, 1994; Muyzer vd., 1993; Amann vd., 1995; Harmsen ve Karch, 2004; Head vd., 1998).

#### **2.4.2. Kültüre dayalı olmayan moleküler yöntemler**

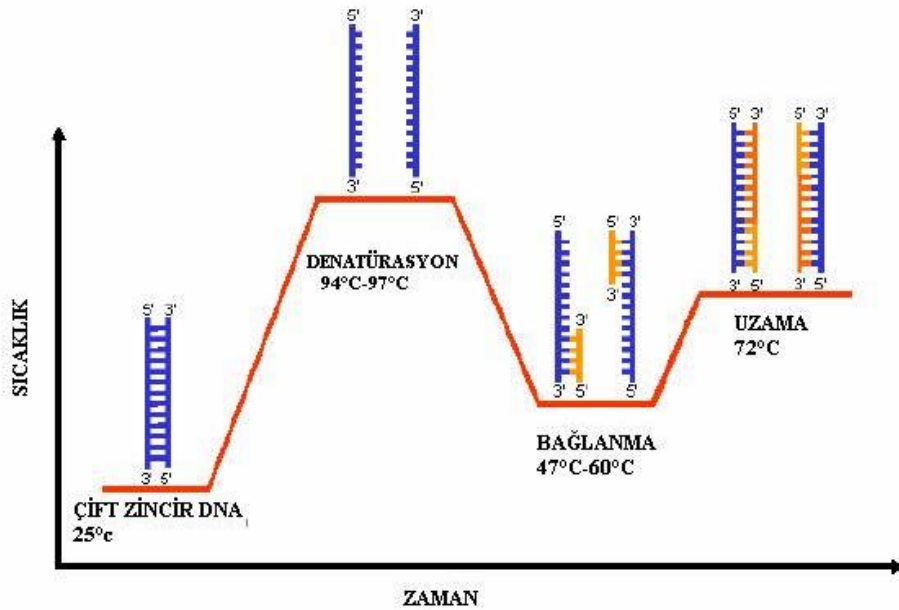
Son yıllarda kültüre dayalı olmayan metodlar süt ürünlerindeki mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde güçlü araçlar haline gelmiştir. Toplulukları oluşturan bakteriyal popülasyonları tanımlamada PZR bazlı moleküler metodlar kullanılmıştır. Kültüre dayalı olmayan metodlar mikrobiyal popülasyonların parmakizi kontrolünde kullanılmakta ve popülasyonlar arasındaki ilişkiyi, karşılaştırma yapabilmeyi sağlayarak (Duineveld vd., 1998; Ampe ve Miambi, 2000) mikrobiyal ekoloji indeksini oluşturmada katkı sağlamaktadırlar. Süt ürünlerinde Laktik asit bakterilerini tanımlamaya yönelik kültüre dayalı olmayan metodlar arasında Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroforez (DGJE), Sıcaklık Gradyan Jel Elektroforez (TGGE), Floresans In Situ Hibridizasyon (FISH) ve Tek Parçalı Kontrol Edilen Polimorfizm (SSCP) teknikleri bulunmaktadır (Muyzer vd., 1993; Ercolini vd., 2003; Ogier vd., 2004).

#### **2.4.3. Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR)**

Hücredeki normal şartlarda gerçekleşen doğal DNA eşlenmesinin laboratuvar koşullarında cihazlardan yardım alarak gerçekleşmesi olayına denir. PZR

teknığının uygulanması ısısız döngü cihazı içinde, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen, gerekli reaksiyon karışımı kalıp DNA'yı, bir ya da iki tane oligonükleotid primeri, nükleotid karışımını (dNTPs), DNA polimeraz enzimi, MgCl<sub>2</sub> ve tampon çözeltisini içermektedir. Çalışmada kullanılacak kalıp DNA, incelenen mikroorganizmalardan çeşitli tekniklerle elde edilir. Primerler, kalıp DNA da çoğaltılmak istenen alana özeldir ve PZR primerleri genellikle 10 ile 33 adet arasında baz içerir. Günümüzdeki PZR tekniğinde en yaygın kullanılan polimeraz enzimi, Taq polimerazlarıdır. Bu enzim 94°C gibi yüksek sıcaklığa da dayanıklıdır, optimum 72°C sıcaklıkta çalışmaktadır. Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, reaksiyon koşulları ve amplifikasyon protokolüne karşı hassastır. Hedeflenen DNA'nın oligonükleotid primeri, konsantrasyonu, Mg<sup>+2</sup>, DNA polimeraz miktarları, yapışma sıcaklığı ile DNA kalitesi gibi parametreleri DNA amplifikasyonunu etkiler. Dolayısıyla, bu parametrelerin moleküler teknik çalışmalarından önce optimize edilmesi gereklidir.

Bu teknikte, nükleik asit dizilerinin kalıp DNA bağı olarak çoğaltılması gerçekleştirilmektedir (Kumar, 1989) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. PZR'ın çalışma prensibi

Oluşan her DNA sarmalı tekrar ısıtılarak çöktürme (denatüre) edilmekte böylelikle ayrılmaktadır, bu şekilde oluşan zincirlere yeniden primer bağlanmakta, tekrar DNA sentezlenmekte, işlem devamlı tekrarlanmaktadır. Bu döngü birkaç saat içerisinde 20 ile 30 defa tekrarlanmaktadır. Eşleme ve çoğaltma hızlı bir şekilde gerçekleştiği için az miktarda bulunan DNA parçasından fazla miktarda ( $2^n$  sayıda, n=döngü sayısı) DNA oluşturulur. Sonuç olarak, milyonlarca kopya elde edilmektedir (Kumar, 1989).

PZR metodu adli tıptan ekolojiye ve DNA'nın teşhis ve tanıya dayalı olan çalışmalarından temeldeki araştırmalara değin birçok alanda uygulanma fırsatı bulmaktadır. PZR tekniğinin basitliği, hızı ve kolaylığı çabuk bir şekilde bu tekniğin kabul edilmesinin sebebi olmuştur (Kumar, 1989).

PZR tekniğinin kullanım alanları şu şekildedir:

- Tanı / Teşhis,
- Genetiği Değiştirilmiş Bitki / Mikroorganizmanın Belirlenmesi,
- DNA'sının Klonlaması,
- DNA'larındaki Baz Dizilişlerinin Belirlenmesi,
- Akrabalık Tespiti (Genetik) ve Adli Tıp Olaylarının Belirlenmesi

#### **2.4.4. Tek parçalı kontrol edilen polimorfizm (SSCP)**

SSCP tekniği, kültüre dayalı olmayan metodlardandır. Tek zincirden oluşan DNA'nın molekül içerisindeki etkilişimi sonucunda zincirlerin farklı formda katlanıp kıvrılması ile farklı yapılarının oluşmasına, poliakrilamid jelde değişik hızlardaki hareketi temeliyle kurulmuş bir yöntemdir. Bu yöntemdeki temel amaç mutasyonun bulunduğu bölgeyi belirlemektir. DNA molekülünde tek baz farkı, mutasyon içeren normal dizide değişik yapı oluşturacağından farklı yerlerde bantlaşma gözlenir. İncelenen normal örnekler arasında fark gözlenmesi örneğimizde mutasyon olduğunu gösterir. Nokta mutasyonları DNA dizi analizleriyle kesin bir biçimde teşhis edilebilir fakat taranacak olan DNA parçası büyüdükçe analiz maliyeti ve teşhis süresi artacaktır. Bu durumun önlenmesi şu şekilde olur: mutasyon içerdiği bilinen gen, kısa DNA parçaları

(200 bp) şeklinde amplifiye edilir ve SSCP yöntemiyle taranır ve mutasyonun bulunduğu parçaçık belirlenebilir.

#### **2.4.5. Floresans in situ hibridizasyon (FISH)**

FISH tekniği, PZR bazlı değildir. rRNA'yı tanıtıcı problarla işaretleyerek hücrelerin tanımlanmasında kullanılan moleküler tekniklerden birisidir. Hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip bir tekniktir. Filogenetik, ekolojik ve tanısal tanımlamada kullanılır (Moter ve Gobel, 2000; Amann vd., 2001).

#### **2.4.6. Sıcaklık gradyant jel elektroforezi (TGGE)**

Sıcaklığın etkisiyle DNA yapısında meydana gelen değişmelere bağlı olarak poliakrilamid jel üzerindeki farklılaşmanın izlenmesiyle oluşan bir tekniktir. TGGE sadece molekülleri ayırmaz onların erime davranışları hakkında da bilgi verir (Ogier, 2002).

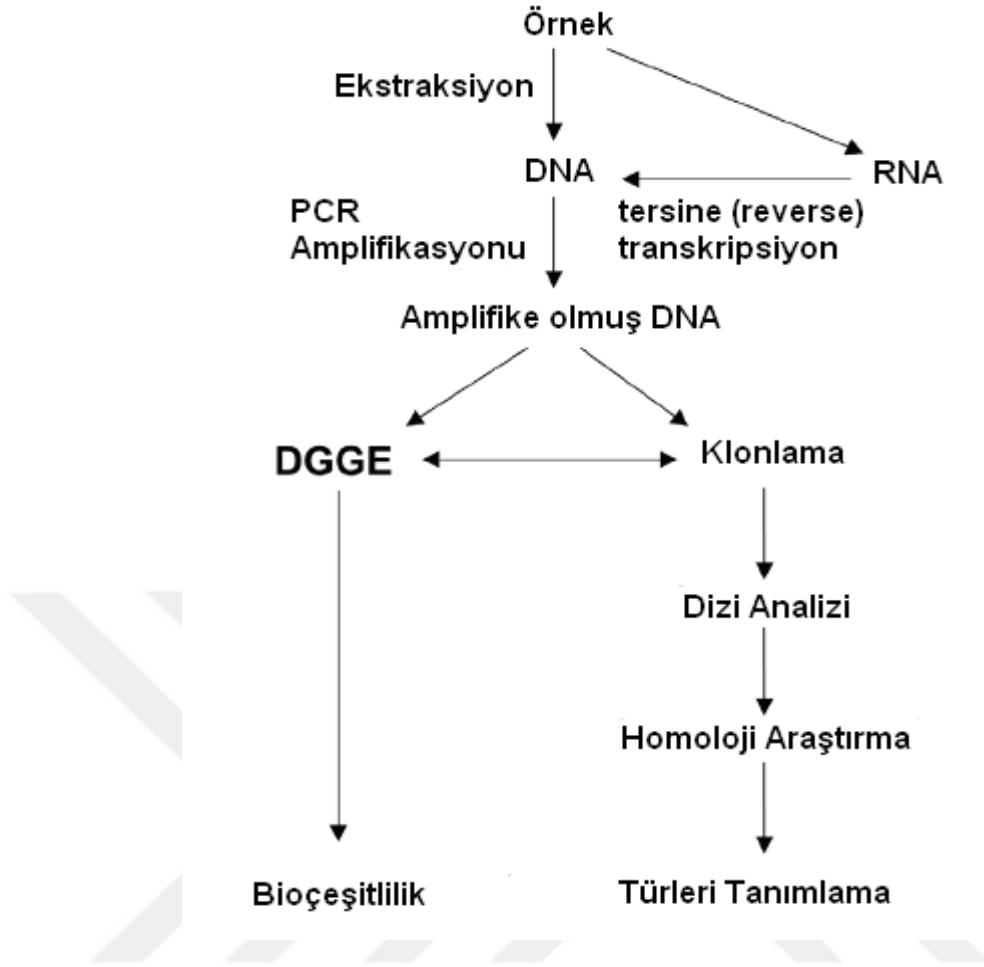
TGGE, DGJE sistemine benzer fakat DGJE'de çözeltiler tarafından gradyan bir yapı oluşurken TGGE'de sıcaklık gradyanı kullanılır. Her iki yöntemde farklı habitatlardaki mikroorganizmaların genetik çeşitliliğini ortaya koymak için kullanılmaktadır.

Bakteriyel populasyonların yapısal analizinde kullanılan DGJE yöntemi ile TGGE yöntemi aynı prensibe bağlı olarak çalışmaktadır.

#### **2.4.7. Denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGJE)**

Karışık mikrobiyal populasyonun genetik çeşitliğini doğrudan belirleyen yeni bir yaklaşımdır. DGJE prosedürü, PZR-amplifikasyon (güçlendirilmiş) 16S rDNA parçasının poliakrilamid jel içeren doğrusal bir yapıda denatüre edilmiş giderek artan kademeli elektroforez sistemidir. DGJE'de DNA parçaları aynı uzunluktadır ve farklı baz çifti dizilimine göre ayrılabilirler (Myers vd., 1987; Muyzer vd.,1993) (Şekil 2.3.).



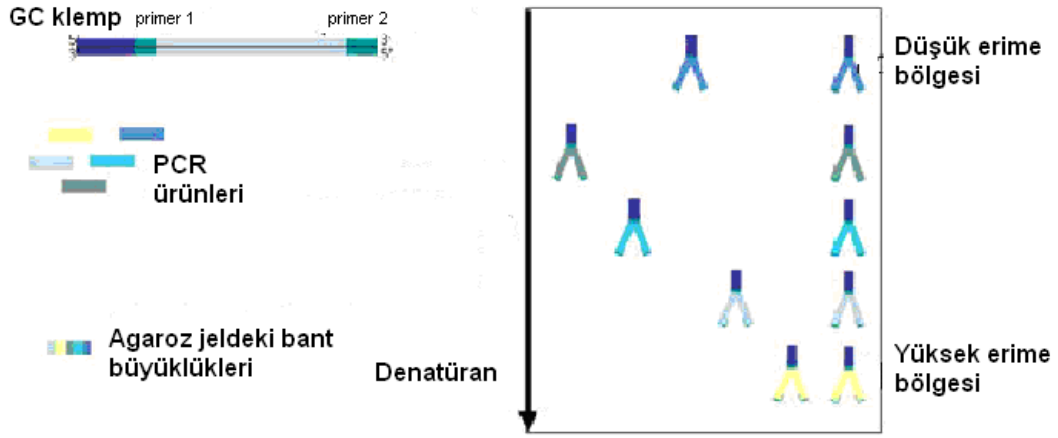


Şekil 2.3. Mikrobiyal çeşitliliği tanımlanmasında kullanılan DGJE yöntemi

DGJE'deki ayırım; poliakrilamid jel içerisinde kısmen erimiş olan DNA molekülünün elektroforetik hareketliliğine bağlıdır. Bu hareketlilik DNA molekülünün tam helezon formuna göre düşüktür (Myers vd., 1987; Sheffield vd.,1989; Muyzer vd.,1993).

Parçaların erimesi çokça söz edilen erime bölgeleri üzerinden gerçekleşmektedir. En düşük erime sıcaklığına sahip erime bölgesi bu sıcaklığa DGJE jeli içinde belirli bir pozisyona ulaştığında, helezon form ile kısmi erimiş moleküllerin birarada bulunduğu bir geçiş durumu meydana gelir. Böylelikle molekülün hareketi pratikte sonlanmaktadır (Myers vd., 1987; Sheffield vd.,1989; Muyzer vd.,1993) (Şekil 2.4.).

## Tek Baz Poliformizinin Tesbiti DGGE / TGGE



Şekil 2.4. Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroferez sistemi

PZR'la amplifikasyonu gerçekleştiren eşit uzunluktaki çift DNA parçaları denatüre edici gradyan poliakrilamid jelde ayrılmaktadırlar. Gradyan oranının ve erime bölgelerinin giderek artması ile çift DNA parçalarının ayrılması sağlanmaktadır. PZR parçasının 5' ucunun sonuna eklenen GC kuyruk tam denatürasyonu engellemektedir. DGJE ayrılması sonrasında, jelde her bant teorik olarak, farklı baz çifti kompozisyonuna sahip spesifik bakterilerin DNA parçalarını temsil etmektedir.

Dizi değişimi erime sıcaklığındaki farklılıkla ortaya çıkar. Farklı dizilerdeki özel parçalar kademe içinde farklı pozisyon da jelde hareketlerini sonlandırırlar ve böylece DGJE ile etkin olarak ayrılmış olurlar (Muyzer vd.,1993).

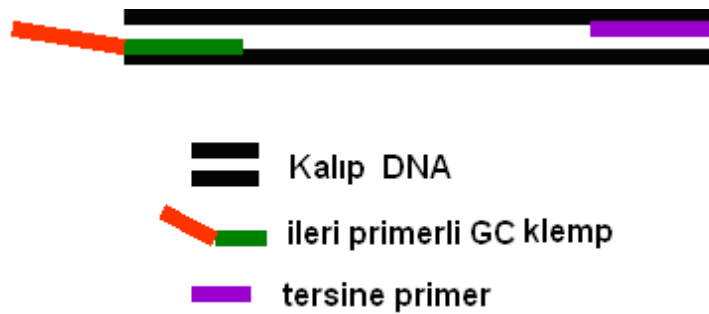
### 2.4.8. DGGE yöntemine teknik yaklaşımlar

DGJE'de elektroforetik metotla, farklı baz çifti dizilimine sahip fakat aynı uzunlukta olan DNA parçalarının arasındaki farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu parçaların DGJE'de ayrılabilmeleri onların diferensiyel denatüre edici profilleri sayesinde olmaktadır. Bu teorik yaklaşım (akrilamid jelin, denatüre edici koşulları) ilk defa Fisher ve Lerman (1983) tarafından

tanımlanmıştır. Kısaca, DGJE'de aynı uzunlukta olan DNA fragmentleri sahip oldukları farklı dizilere göre ayrılabilirlerdir.

DGJE düşey veya paralel denatüre edici gradyan jelden oluşabilmektedir. Düşey DGJE'de genellikle gradyan aralığı % 0-100 veya % 20-100 arasında olmaktadır. Paralel elektroforezde ise erime davranışına göre deneysel tecrübelerle optimum gradyan aralığı belirlenir. Düşey gradyan jelde sadece bir örnek veya karışık ampikonlar yüklenmekte ve erime davranışına göre çalışmaktadır. Paralel DGJE'de ise paralel elektrik alanlar ve daraltılmış denaturant aralığı ile daha iyi bir ayırma sağlanmaktadır (Myers vd.,1987).

Paralel jelde aynı jel üzerinde birçok örnek yürütülebilmektedir. Farklı örneklerdeki en iyi ayırmanın optimum süresi deneysel çalışmalarla belirlenmektedir. DGJE'ye genellikle PZR ürünü yüklenmektedir. Molekül tamamen denatüre olmadan da optimum çözünürlük elde edilebilmekte ve PZR primerlerinden bir tanesini 30-40 bp'lik GC kuyruk eklenerek DNA parçasının çift iplikçikli, en düşük erime bölgesinde olması temin edilmektedir (Myers vd.,1985; Sheffield vd.,1989). Alternatif olarak GC kuyruğunun (Şekil 2.5.) aynı etkisini gösteren kimyasal kuyruklarda PZR primer olarak kullanılabilir (Führ, 1996).



Şekil 2.5. Primeri takip eden GC kuyruk

Kimyasal kuyruklarla birleşmiş DNA iplikçikleri kovalent bağlanmış olarak sonlandığı için DGJE fragmentlerinde dizi analizlerinde kullanılamazlar. Bantlar nested primer kullanılmazsa doğrudan yeniden amplifiye olmaktadır.

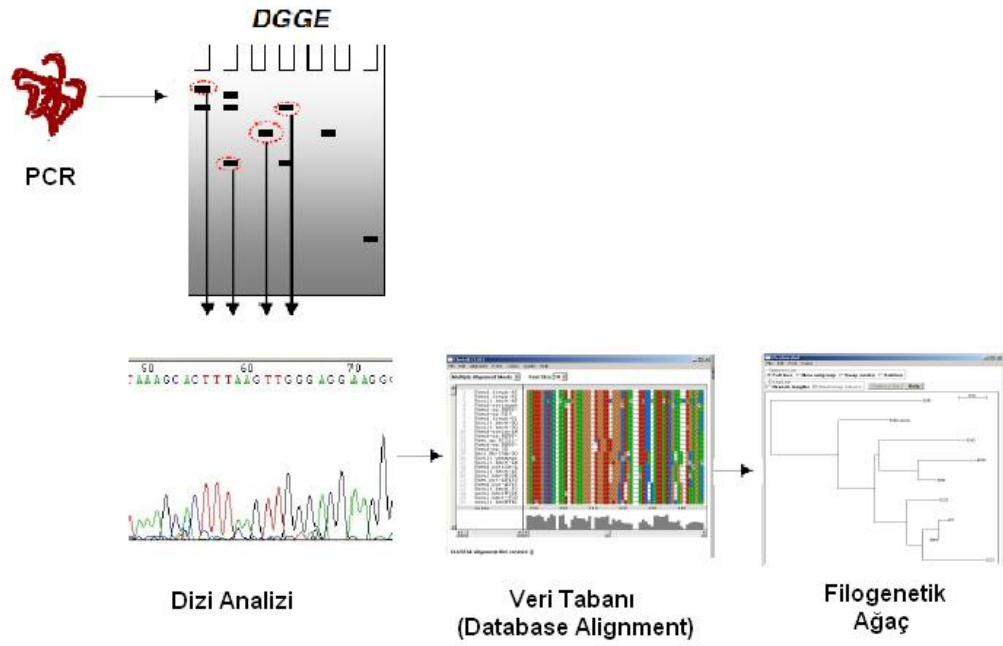
Lerman vd., (1984)'de DNA çift iplikçindeki erime davranışını bilgisayar modeli olarak geliştirmişlerdir.

Primerlerin ve GC kuyruklerinin yerleşimi DNA'nın erime profili üzerindeki yerleşme etkisi analizine göre optimize edilebilmektedir. DGJE parmakizinde bantlar etidium bromide boyasının etkisiyle görüntülenebilmektedir. Çoğu duyarlı prosedürde ise gümüş boyama kullanılmaktadır (Felske vd.,1996). Gümüş boyama kullanılan jelde hibridizasyon örnekleri kullanılmamaktadır ve tek DNA iplikçigi fragmenti saptanmaktadır. Aynı zamanda SYBER Green I'de DGJE görüntüleme alternatif boyalardandır (Muyzer vd.,1997). SYBER Green boyama arka planda boyama yapmamaktadır, böylece çok düşük konsantrasyonlu DNA fragmenti belirlenebilmektedir. DGJE ekipmanını temin eden Bio-Rad, INGENY (Leiden, Hollanda), ve CBS Scientific (Del Mar, Amerika) gibi şirketler vardır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Denatüre edici gradyan jel elektroforez cihazı

DGJE sistemi ile çoklu numunelerden, hızlı bir şekilde DNA parçalarından oluşan bantlar jelden toplanabilmekte ve birbirleriyle karşılaştırma yapılabilmekte, dizi analizine gönderilerek bantların temsil ettiği bakteri türleri tanımlanabilmekte, böylelikle örneğin içindeki bakteri florası hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Şekil 2.7.) (Hovda, 2007).



Şekil 2.7. Mikroorganizmaların tanımlanmasında ve belirlenmesinde kullanılan DGJE prosesi şeması

Örnekler direk ekstraksiyon sonrası PZR ile çoğaltıldıktan sonra DGJE jelde yürütülerek görüntü alınmaktadır. Bantlar kesilmekte sonrasında dizi analizi yapılmaktadır. Uygun programlarda veri tabanı kullanılarak dizi analizi sonuçları sıralanmaktadır, bakteriler arasındaki homoloji yapılarına göre filogenetik ağaç oluşturulmaktadır (Hovda, 2007).

## 2.5. Moleküler metodların avantaj ve dezavantajları

DGJE analizi bazı dezavantajlarının olmasının yanısıra mikrobiyal topluluk analizlerinde sık sık kullanılmaktadır. DGJE hızlı ve tekrarlanabilir özelliklerinden dolayı yüksek oranda tercih edilen bir tekniktir (Cocolin vd., 2001, Schäfer ve Muyzer, 2001; Ercolini, 2004b; Temmerman vd., 2004).

DGJE'de jelde çözünürlük azaldığı için 500 baz çifti (bp) uzunluktaki DNA parçaları ile limitlidir (Myers vd., 1985). Bu limit faktörü dizi analizinin performansını ve prob dizaynını etkilemektedir. 16 S rDNA V3 bölgesini hedef alan universal primerler yaklaşık 150-200 bp'dir. V3 bölgesinin yüksek seviyede çözünürlüğe ve yüksek değişkenliğe sahip olduğu bilinmesine rağmen kısa dizi

analizlerinin verilerin karşılaştırılmasını göreceli olarak vermektedir (Ovreas, 2000). Bu nedenle daima aynı cins içinde farklılık görülmeyebilmektedir.

DGJE'de PZR ürünlerinin ölçmesi ve bant yoğunluğunun analizi, farklı türler arasındaki populasyon miktarıyla ilgili ekstra bilgiyi verebilmektedir. Bant yoğunluğunun şiddeti bakteri türünün populasyondaki miktarı ile ilgili bilgi verebilmektedir.

Bununla birlikte, bulunan bantların, bakteriyal topluluğun dominant türleri olduğuna inanılmakta ve DGJE profillerindeki bantların görünmesi veya kaybolmasının bakteri sayısındaki artışı veya azalışı gösterdiği kabul edilmektedir (Ferris ve Ward, 1997).

### 3. MATERYAL-METOD

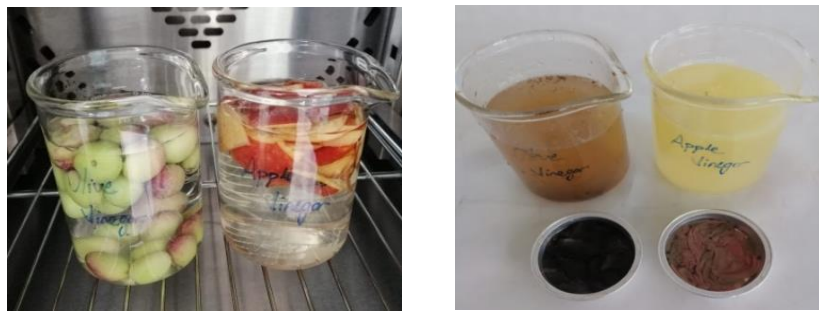
#### 3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında Manisa yöresinde yetişen Amasya misket elması ve Edremit zeytini kullanılmıştır. Bu ürünler kendi yöresindeki üreticilerden temin edildi.

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Sirke üretimi

Sirke üretimi için alkol fermantasyonu hammadde gerçekleştirilir. Alkol oranı % 13 düzeylerine çıkarsa, asetik asit bakterileri sıvı yüzeyde gelişerek bir zar (sirke anası) oluşturmaktadır. Yüzeyde oluşmuş sirke anası, etil alkolün asetik aside dönüşmesi olayını gerçekleştirir. (Şekil 3.1.). İşlem 28 - 30°C'de gerçekleştirilir (<http://blog.yalova.edu.tr/>). Zeytin ve elma sirkeleri geleneksel sirke üretim yöntemi ile üretilmiştir. Elma kabukları küçük parçalar haline getirilip 100 g olarak tartılmıştır. Behere 250 ml su ilave edilmiş ve ortama 50 g şeker ilavesiyle sirke oluşum süreci için beklemeye bırakılmıştır. Zeytin taneleri de 100 g olarak tartılmış, behere koyulmuştur, üzerine 250 ml su ve 50 g şeker ilave edilmiştir.



Şekil 3.1. Sirke üretimi ve sirke anasının ayrılması

### 3.2.2. DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması

Sirkede oluşmuş sirke analarından alınan örneklerden direk DNA izolasyonu yapılmıştır.

Numunelerin homojenizasyonunu sağlanmış ve numuneler içinde bulunan bakterilerin DNA'sı mini kit sistemi kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda izole edilmiştir. Çalışma izolasyonunda QIAGEN DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

Lysis solüsyonu;

- 10 mM Tris-HCL
- 100 mM NaCL
- 1mM EDTA
- % 1'lik Triton X-100

1-2 koloni için 50 µl lysis solüsyonu kullanılmıştır. Suspend edildikten sonra 100°C'de 15-30 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. 1 ml peptonlu su içeren 2 ml'lik tüplere toplanarak DNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir.

Yeni geliştirilen QIAmp (USA) DNA stool Mini Kiti Kullanım Protokolü (Aytül, 2009):

1. Örnekler (1 g) 15 ml'lik steril tüplere alınmış, tüplere 5 ml ASL buffer ilave edilmiştir. Mekanik parçalamayı sağlamak amacıyla cam boncuk ilave edilmiştir(1 g).
2. Örnekler, 95°C'de 10 dakika bekletilerek, her 1 dakikada 30 sn vorteks yapılmış, homojenizasyon sağlanmıştır.
4. Örnekler 8.000 rpm.'de 22 °C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Steril pipetle pelet ve yağ tabakası dışındaki supernatant kısmı toplanmıştır.
6. Toplanan supernatant kısmın üzerine 1 tane inhibex tablet ilave edilerek 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır.



7. 8.000 rpm.'de 22 °C'de örnekler 4 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Steril pipetle pelet kısmı uzaklaştırılmış, supernatant kısmı toplanmıştır.
9. Supernatant kısmın üzerine 4 ml izo promil alkol (-20 °C) ilave edilmiştir.
10. 8.000 rpm.'de 4 °C'de örnekler 15 dakika santrifüjlenmiştir.
11. Supernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 200 µl ASL buffer ilave edilerek pellet kısmın resuspend edilmiştir.
12. Üzerine 200 µl AL buffer ve 15 µl proteinaz K ilave edilmiştir.
13. 70°C'de örnekler 10 dakika bekletilmiştir.
14. Üzerine 200 µl etanol absolute ilave edilir ve 15 sn vortekslenmiştir.
15. Spin kolonlara 600 µl örnekten koyularak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
16. Boş spin kolon altı takılarak tekrar örnekten 600 µl alınarak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
17. Spin kolona 400 µl AW1 ilave edilerek 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir (Altına yeni boş kolon takılarak).
18. Altına yeni boş kolon takılmış ve 500 AW2 ilave edilerek 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir.
19. Altına yeni boş kolon takılarak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
20. 200 µl AE buffer ilave edilerek 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Altına yeni boş kolon takılarak).
21. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
22. DNA izolasyonu sonrasında stok kültür oluşturmak amacıyla örnek tüplerin üzerine % 20'lik gliserol ilave edilerek -20°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2.).

Elde edilen DNA izolasyonlarında DNA yoğunluğuna bakmak için UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.2. Elma ve zeytin sirke anası örneklerinden DNA izolasyonu



Şekil 3.3. UV/Vis Spektrofotometre Cihazı

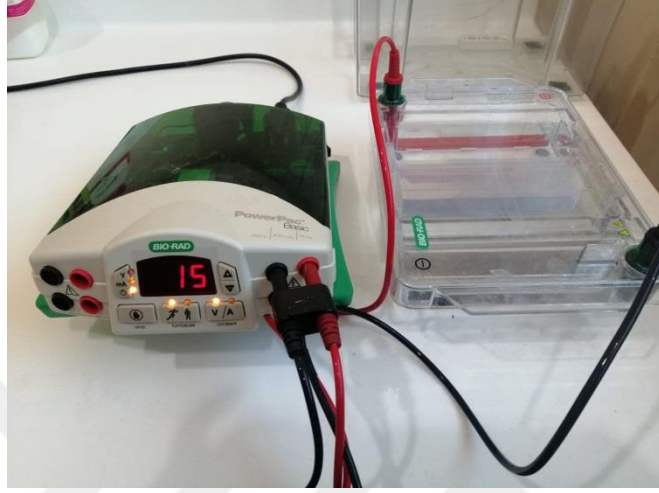
Supernatant kısmından 3 µl alınarak PCR uygulaması yapılmıştır (Boşgelmez, Tınaz vd., 2008). Daha sonra %1'lik agaroz jel'de 100 V görüntü elde edilmiştir.

### 3.2.3. PZR amplifikasyonu ve DGJE tekniği ile bant eldesi

PZR analizi için V3 bölgesinin 16S rDNA amplifikasyonu için V3F ve V3R evrensel primerleri kullanılmıştır (Ercolini vd., 2003, Florez ve Mayo, 2006). Amplifikasyon sıcaklık programlanabilir inkübator'de gerçekleştirilmiştir. Final konsantrasyonu 50 µl olacak şekilde DNA karışımı hazırlanmıştır (Ercolini vd., 2003).

PZR ürünleri DGGE yöntemi kullanılarak (Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, UK) ile analiz edilmiştir (Ercolini vd., 2003; Muyzer vd., 1993). V3 bölgesinin PZR ürünleri 200 bp'lik bant

genişliğinde %8 (w/v)'lik polyakrilamid jel kullanılarak görüntülenmiştir (Ercolini vd., 2003). Elektroforez 50 V'da 10 dakika 170 V'de 5 saat yürütülmüş (Şekil 3.4.), elde edilen görüntüler jel görüntüleme sisteminde (Şekil 3.5.) görüntülenmiştir (Ercolini vd., 2003).



Şekil 3.4. Jel Elektroforez cihazında DNA yürütülmesi



Şekil 3.5. Jel Görüntüleme Sistemi cihazıyla görüntü alınması

### 3.2.4. Dizi (sekans) analizi ve yorumlanması

Elde edilen 16 S sekansları, biyotiplerinin tanımlanması için bir BLAST analizine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gönderilmiştir. Bakterilerin türlerini belirlemek için dizi analizleri Sanger firmasına yaptırılmıştır.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Geleneksel sirke ve sirke anası üretimi

40 gün sonunda beher üzerinde oluşan sirke anası örnekleri (Şekil 4.1.) yüzeyden steril ortamda toplanmış ve DNA izolasyonu için -20 °C' de muhafazaya alınmıştır.



Şekil 4.1. Sirke üzerinde oluşmuş sirke anası görüntüsü

### 4.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu tamamlanan numuneler UV/Vis spektrofotometre kullanılarak konsantrasyonlarına bakılmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. UV/ Vis Spektrofotometre

Sample ID	Konsantrasyon	Birim	A(260nm)	A(280 nm)	260/280
1	24,224	mg/mL	0,484	0,263	1,845
2	39,984	mg/mL	0,800	0,423	1,888

Sonrasında, 16S rRNA gen amplifikasyonu için V3 bölgelerindeki gen dizilimini ifade eden V3 F ve V3 R primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile bu bölgelerinin amplifikasyonu sağlanmıştır. DNA izolasyonu sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntü elde edilmiştir (Şekil 4.2.) (Muyzer vd.,1999, Ercolini vd., 2003, Florez vd., 2006).

### 4.3. Jel görüntüleme sistemi bant görüntüsü



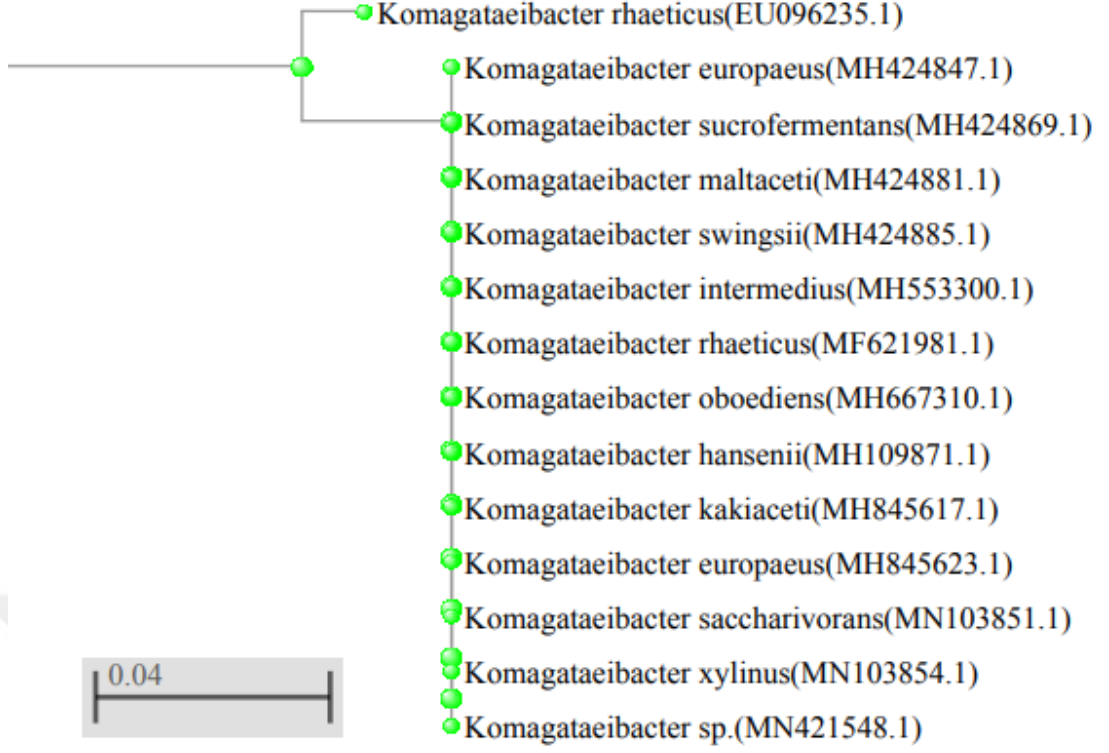
Şekil 4.2. Bant görüntüsü

### 4.4. BLAST analiz sonucu filogenetik harita

BLAST analizine gönderilen numunelerin filogenetik haritaları çıkarılmıştır (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.)



Şekil 4.3. Elma sirkesi örneklerinin BLAST analiz sonucu elde edilen asetik asit bakterileri filogenetik haritası



Şekil 4.4. Zeytin sirkesi örneklerinin BLAST analiz sonucu elde edilen asetik asit bakterileri filogenetik haritası



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasındaki temel hedef, geleneksel yöntemle üretilmiş elma ve zeytin sirke örneklerindeki geniş ölçüde tanımlanmamış mikroorganizma topluluklarının sahip oldukları 16 S rRNA gen amplifikasyonlarının DNA izolasyonu sonrasında PZR-DGJE tekniğinin kullanılması ile hızlı bir şekilde belirlenmesidir. DGJE sonucunda elde edilen sekanslardaki mikrobiyota araştırmasında ve 16 S rDNA dizisinin bilinen akrabalarının belirlenmesinde BLAST programı kullanılmıştır. Farklı sirke örneklerinin mikrobiyal popülasyonlarındaki farklılıkların ve daha önce tanımlanamamış yeni bantların da DNA dizi analizleri yapılarak tanımlanması amaçlanmıştır.

Sirke anası örneklerinden direk izolasyon yöntemiyle kolonilerden elde edilen DNA lar PZR ile çoğaltılmış, DGJE sonrası UV ışık altında jel görüntüleme sisteminde umulan boyutlardaki bantlarda gözlenmiştir, bu da PZR şartlarının ve uygulanan primerlerin çalıştığını göstermektedir.

DGJE sonucu elde edilen bantlar kesilerek BLAST analizine gönderilmiştir. Analiz sonucu hem zeytin hemde elma sirke analarında *Komagataeibacter* cinsi asetik asit bakterileri belirlenmiştir. Yoğun olarak zeytin sirke örneğinde *Komagataeibacter rhaeticus* (%93 homoloji) türü baskın olarak bulunurken, elma sirkesi örneğinde *Komagataeibacter xylinus* (% 87 homoloji) türü baskın olarak gözlenmiştir. Gelecek çalışmalar için stok kültür oluşturulmuş, geleneksel üretim yöntemiyle üretilen sirke mikrobiyal kültürümüz koruma altına alınmıştır.

Mitrou vd., (2010a, b) ve Petsiou vd., (2014), Geleneksel elma sirkesinden belirsiz mekanizmalar ile kilo kontrolü ve diyabet tedavisi için doğal kaynaklardan biri olarak bahsetmiştir. Goh vd., (2012), bu etkilerin sebebi olarak mikroorganizmaların gösterebileceğini belirtmişlerdir. Bu bakteri türlerinin gastrointestinal sistemimizde bulunması glikoz emilimini azaltmaya yardımcı olabilir ve insan bağırsağındaki glikozu selüloza dönüştürerek kilo alımını önleyebileceği düşünülmektedir.

Milanovic ve ark., (2018), çalışmalarında beyaz şarabın asetik fermantasyonu için kullanılan ev yapımı yerel sirkeler olan tohum sirkelerindeki bakteriyel florayı keşfetmeyi amaçlamışlar. Bu amaçla, ev yapımı sirke üreticileri tarafından sağlanan tohum sirkelerinin Illumina dizileme ve PZR-DGJE gibi ileri moleküler analizlere tabi tutmuşlar. Sonuç olarak, örnekten direk olarak kullanılarak gerçekleştirilen PZR-DGJE tekniğiyle % 97'nin üzerinde doğruluk sağlayan *Acetobacter*, *Komagataeibacter* ve *Gluconobacter* türlerini belirlemişlerdir.

Bellassoued vd., (2015) çalışmalarında, tez çalışmamıza benzer olarak elma sirkelerinin mikrobiyolojik bileşiminin temelini *K. xylinus* türünün oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Dos Santos ve arkadaşları (2014) çalışmalarında *Komagataeibacter rhaeticus* türünü yeni bir selüloz üreticisi olarak izole etmiştir.

Machado R. T. A. vd., (2016) *Komagataeibacter rhaeticus* türünün bakteriyel selüloz üretimi için alternatif bakteri olabilecekleri üzerine çalışma yapmışlar, kinetik çalışmalar *Komagataeibacter rhaeticus*'un verim, kalınlık ve su tutma kapasitesi verilerine göre BC üretmek için uygun bir bakteri olduğunu ortaya koymuştur.

Bu tez çalışması, PZR-DGJE analizi kullanılarak geleneksel yöntemle üretimi yapılan elma ve zeytin sirkesinde bulunan mikrobiyal farklılıkların belirlenmesi, ürününün tadında, aromasında ve tekstüründe çeşitlilik göstermesini sağlayan bakteriyel populasyonlar dinamiklerinin tespit edilmesi, sistem performansına yönelik verilerle desteklenmesi ve starterin etkililiğinin belirlenmesi ile prosesin kontrol altına alınabilmesini sağlaması açısından büyük önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Austin, B. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017; 110: 1247.
- A. Sofu, F. Y. Ekinci, 2010. Identification of lactic acid bacteria in different traditional cheeses by using PCR-DGGE method. 1st Int. Congress on Food Technology. Antalya. Page 110.
- Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2003; 226: 3– 6.
- Bellassoued K, Ghrab F, Makni-Ayadi F, Van Pelt J, Elfeki A, Ammar E., 2015. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharm Biol*. 2015;53(11):1699-709.
- Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Seydim, Z. B. G. (2014). Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science*, 79(5), 757–764.
- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G., Ciani, M. (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research*, 5, 237-245.
- De Roos, J., De Vuyst, L., 2018. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr. Opin. Biotechnol*. 49, 115–119.
- De Vero L., Gala E., Gullo M., Solieri L., Landi S., Giudici P. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* Volume 23, Issue 8, December 2006, Pages 809-813.
- Elgün A (2011). Şarabın Sirkeye Dönüşümü. 1. Ulusal Helal Ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 50- 58, Ankara.
- Felske A, Osborn AM (2005) DNA fingerprinting of microbial communities. In: Osborn AM, Smith CJ (eds) *Molecular microbial ecology*. Taylor and Francis, Abingdon, pp 65–96.
- Fischer SG, Lerman LS (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in 2-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191–200.
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, et al. The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 1980; 209: 457–463.
- Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9: 312–22.

- Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J Microbiol Meth.* 2006; 66: 1–20.
- Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L., Falcone, P.M., 2009. Technological and microbiological aspects of traditional balsamic vinegar and their influence on quality and sensorial properties. *Adv. Food Nutr. Res.* 58, 137–182.
- Goh, W.N., Rosma, a., Kaur, B., Fazilah, a., Karim, a. a., Bhat, R., 2012. Fermentation of black tea broth (kombucha): I. effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *Int. Food Res. J.* 19 (1), 109–117.
- Ho, C.W., Lazim, A.M., Fazry, S., Hussain Zaki, U.K.H., Lim, S.J., 2017. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: a review. *Food Chem.* 221, 1621–1630.
- Holland JL, Louie L, Simor AE, Louie M: PCR detection of Escherichia Coli O157:H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *J Clin Microbiol.* 2000, 38 (11): 4108–4113.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology.* 1998;180(18):4765-4774.
- İlkin YÜCEL ŞENGÜN et al., Isolation, identification and current taxonomy of acetic acid bacteria. *Biological Diversity and Conservation.* 9/1 (2016) 154-162.
- Junior, M. M. S., Silva, L. O. B., Leao, D. J., & Ferreira, S. L. C. (2014). Analytical strategies for determination of cadmium in Brazilian vinegar samples using ETAAS. *Food Chemistry*, 160, 209–213.
- Machado, R. T. A., Gutierrez, J., Tercjak, A., Trovatti, E., Uahib, F. G. M., Moreno, G. de P., ... Barud, H. S. (2016). *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production. *Carbohydrate Polymers*, 152, 841–849. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.06.049.
- Mas, A., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., Torija, M.J., 2016. Vinegar. In: Reference Module in Food Science, *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 418–423.
- Milanovića V., Osimania A., Garofalo C., De Filippis F., Ercolin D., Cardinalia F., Taccaria M., Aquilantia L., Clementia F., Profiling white wine seed vinegar bacterial diversity through viable counting, metagenomic sequencing and PCR-DGGE. *International Journal Of Food Microbiology.* 2018; 286, 86-74.

- Mitrou, P., Raptis, A.E., Lambadiari, V., Boutati, E., Petsiou, E., Spanoudi, F., et al., 2010a. Vinegar decreases postprandial hyperglycemia in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 33 (2), 2010.
- Mitrou, P., Raptis, A.E., Lambadiari, V., Boutati, E., Petsiou, E., Spanoudi, F., et al., 2010b. Vinegar decreases postprandial hyperglycemia in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 33 (2), 2010.
- Nakatsu CH: Soil microbial community analysis using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Sci Soc Am J.* 2007, 71 (2): 562-571. 10.2136/sssaj2006.0080.
- Ovreas L, Forney L, Daae F, Torsvik V: 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.* 1997, 63 (9): 3367-3373.
- Petsiou, E.I., Mitrou, P.I., Raptis, S.A., Dimitriadis, G.D., 2014. Effect and Mechanisms of Action of Vinegar on Glucose Metabolism , Lipid Profile , and Body Weight, 72 10, pp. 651e661.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C., 2006. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology and*
- Sahadeva, R. P. K., S. F. Leong, K. H. Chua, C. H. Tan, H. Y. Chan, E. V. Tong, et al. 2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int. Food Res. J.* 18:1515–1522.
- 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.
- Valera, M.J., Torija, M.J., Mas, A., Mateo, E., Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiol* (2015). 46, 452–462.
- Wintzingerode FV, Göbel UV, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 1997; 21: 213–229.
- Yamada, Y., 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 Nov;50 Pt 6:2225-7.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu OKTAR  
Doğum Yeri ve Yılı : Salihli, 1994  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce, Rusça  
E-posta : oktarburcu@gmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Türkbirliği Lisesi, 2011  
Lisans : SDÜ, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği, 2016

### Mesleki Deneyim

Erçetin Gülyağı A.Ş. (Kimya Mühendisi) 2017- (halen)

### Yayınlar

- A. Sofu ve B. Oktar, 2014. Biyopolimerler; Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyobozunur polimerler ve uygulama alanları. 2014. Kimya ve Sanayi Dergisi. 44,232, 49.
- B. Oktar, O. Sarı, A. Sofu, F.Y.Ekinci, 2019. Production of biodegradable polylactic acid (PLA) by homofermentative lactic acid bacteria using whey as an energy source. Süleyman Demirel University, Isparta; Yeditepe University, İstanbul, Turkey. NANOMED & NANOBIO TECH, Koyceğiz, Muğla.
- Homofermantatif Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Peyniraltı Suyundan Laktik Asit Üretimi, 2241 Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi, TÜBİTAK (2015).