



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**KOMBUCHA'DAKİ (ÇAY MANTARI) MİKROBİYAL
KOMPOZİSYONUN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ**

Muzaffer ARIKAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL**

Ağustos, 2018

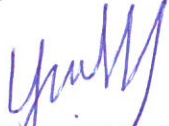
İSTANBUL

Bu çalışma, 27.08.2018 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

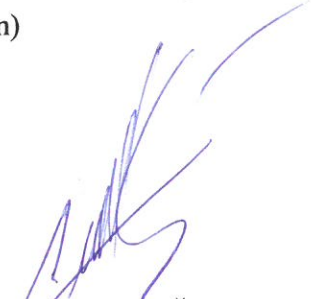
Tez Jürisi



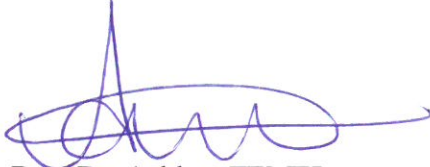
Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Kazım Yalçın ARĞA
Marmara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Cenk KIĞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Doç. Dr. Aslıhan TEMEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 20138 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 215Z672 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bana destek olan, pozitif tavrı, bilgisi ve tecrübesi ile yol gösteren, çalışmalarımda özgürce hareket edebileceğim alanlar açarak kendimi geliştirmeme büyük katkı sunan değerli danışmanım Prof. Dr. Filiz GÜREL'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktoramın başından sonuna kadar bana yol arkadaşlığı yapan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli laboratuvar arkadaşlarım Burcu KARAHALİL ve Nadia El Sarraf'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama başlamam için gerekli olan örneklerin temininde ve tezin hazırlanması ile ilgili teknik kısımlarda verdikleri destek için Bayer ARIKAN ve Eda TUNA'ya teşekkür ederim.

Yaptığımız bilimsel tartışmalarla ufku genişleten, bilime olan tutkusunu ve çalışkanlığını örnek aldığım, her ihtiyacım olduğunda yardımını esirgemeyen, tanıdığım için şanslı hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Duran ÜSTEK'e şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamın biyoinformatik analizlerini European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) kurumunda gerçekleştirme fırsatını yakaladım. Biyoinformatik alanında dünyadaki en iyi olanaklara sahip ve bilimsel anlamda bana büyük bilgi ve tecrübe kattığına inandığım bu ziyaretimi gerçekleştirilmeme olanak sağlayan, bilgi ve tecrübeleri ile bana yeni perspektifler kazandıran ve çalışmamın şekillenmesine önemli katkı sunan Sequence Families Takım Lideri Dr. Rob Finn, EBI Metagenomics Proje Lideri Dr. Alex Mitchell ve tüm EBI Metagenomics ekibine teşekkürü bir borç bilirim.

Tez deneylerimi gerçekleştirmem için bana laboratuvarını açan Prof. Dr. Hakan BERMEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime ve tez çalışmama 2211-E Doğrudan Yurt İçi Doktora Burs Programı ve 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı çerçevesinde verdiği desteklerle büyük katkı sunan, kendimi geliştirmeme ve mesleğimde daha iyiye ulaşmama yardımcı olan TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, doktora eğitimimin başlangıcında hayatıma giren ve bütün bu süreçte hep yanımda olup beni destekleyen, mesleğime olan ilgimin ve motivasyonumun yeniden artmasını sağlayan, en zor ve en güzel zamanları beraber geçirdiğim, fikirleri ile dünyamı zenginleştiren ve varlığı ile hayatımı güzelleştiren Beja PROTNER'e en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2018

Muzaffer ARIKAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
2.1. KOMBUCHA FERMENTASYONU VE ÖZELLİKLERİ	2
2.1.1. Kombucha'nın Kökeni	2
2.1.2. Kombucha'nın Hazırlanışı.....	3
2.1.3. Kombucha'nın Kimyasal Kompozisyonu	4
2.1.4. Kombucha'nın Mikrobiyal Kompozisyonu.....	5
2.1.5. Fermentasyon Süreci ve Mikrobiyal Etkileşimler.....	6
2.1.6. Kombucha'nın Sağlık Üzerine Etkileri	8
2.2. METAGENOMİK ANALİZ TEKNİKLERİ	9
2.2.1. Yeni Nesil Dizileme	9
2.2.2. Metagenomik.....	10
2.2.3. İşlevsel Metagenomik.....	10
2.2.4. Dizileme Temelli Metagenomik (Shotgun Metagenomik).....	12
2.2.5. Amplikon Dizileme ile Mikrobiyom Analizleri	14
2.3. KOMBUCHA'DA METAGENOMİK ANALİZLER.....	16
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. ÇALIŞMA TASARIMI	20
3.2. KOMBUCHA MATERYALİ VE FERMENTASYONU	20
3.3. METAGENOMİK DNA İZOLASYONU	21
3.4. YENİ NESİL DİZİLEME ANALİZLERİ	22
3.5. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER	24
3.5.1. Kalite Kontrol ve Filtrelemeler	24

3.5.2. Taksonomik Analizler	25
3.5.3 Metagenom Kurulum (Assembly) Analizleri	26
3.5.4. Plazmid Metagenom Analizleri	27
3.5.5. İşlevsel Analizler	28
3.5.6. Sekonder Metabolit Gen Kümelerinin Taranması.....	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. FERMENTASYON VE METAGENOMİK DNA İZOLASYONU	30
4.2. BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI	31
4.2.1. Kalite Kontrol ve Filtreleme.....	31
4.2.2. Taksonomik Analizler	36
4.2.2. Metagenom Kurulum (Assembly) Analizleri	39
4.2.3. Plazmid Metagenom Analizleri.....	43
4.2.4. İşlevsel Analizler	44
4.2.5. Sekonder Metabolit Gen Kümeleri.....	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
KAYNAKLAR.....	56
EKLER	68
EK 1. Tüm metagenom dizileme için hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrol sonuçları.....	68
EK 2. ENA yüklenen dizilerin erişim numaraları.	73
EK 3. Taksonomik binning sonuçları.....	74
EK 4. GenomeProperties sonuçları.	76
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Kombucha'nın genel görünümü (Garten, 2007).....	2
Şekil 2.2: Kombucha fermentasyonu sırasında meydana gelen temel metabolik aktiviteler (Villarreal-Soto ve diğ., (2018)'den uyarlanmıştır.).....	7
Şekil 2.3: Shotgun metagenomik çalışmalarının genel basamakları.....	13
Şekil 2.4: Prokaryotik (a) ve ökaryotik (b) ribosomal RNA genlerinin genel yapısı.	16
Şekil 3.1: Uygulanan deneysel ve biyoinformatik analiz basamakları.	20
Şekil 3.2: EBI Metagenomics analiz akışı (Mitchell ve diğ., 2018).	26
Şekil 4.1: Kombucha fermentasyonun 3., 10. ve 15. günlerindeki pelikül gelişimi.	30
Şekil 4.2: DNA izolasyon sonuçlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri (sağdan sola; lane 1: 1k ladder (NEB), lane 2: A örneği sıvı faz, lane 3: A örneği pelikül, lane 4: B örneği sıvı faz, lane 5: B örneği pelikül).	31
Şekil 4.3: BP3 için SSU ve LSU rRNA geni temelli taksonomik analiz sonuçları.	32
Şekil 4.4: Shotgun dizileme örneklerinde elde edilen dizilerin başlangıç ve bitiş koordinatlarının dağılımı.	33
Şekil 4.5: BP3 örneğinde filtreleme öncesi (SSU-FÖ) ve filtreleme sonrası (SSU-FS) SSU ile LSU rRNA geni temelli analiz sonuçları.	34
Şekil 4.6: BP3 örneği çıkarıldıktan sonra koordinat dağılımları.	35
Şekil 4.7: BP3, BP10, BP15, BS3 örnekleri için dekontaminasyon ve yeniden dizileme sonuçları (D: Dekontaminasyon uygulanmış örnek, R: Yeniden dizilenmiş örnek).	36
Şekil 4.8: Kombucha örneklerindeki bakterilerin (familya düzeyinde) ve fungusların (şube düzeyinde) görece bulunma oranları (Bulunma yüzdesi herhangi bir örnekte %1'in üzerinde olan familya ve şubeler gösterilmiştir.).	37
Şekil 4.9: Amplikon dizileme (16S ve ITS1) ile belirlenen bakteriyel ve fungal cinslerin Kombucha örneklerinde bulunma oranları.	39
Şekil 4.10: Binler için birincil kümeleme analizi sonuçları.	40
Şekil 4.11: Binler için ikincil kümeleme analizi sonuçları.	41

Şekil 4.12: AS10_bin7 ve BS10_bin3 kontig dizilerinin <i>K. rhaeticus</i> ve <i>Z. bailii</i> referans genomları üzerindeki dağılımı.....	43
Şekil 4.13: Kombucha örneklerinde en bol bulunan GO terimleri (A-biyolojik işlem, B-moleküler fonksiyon, C-hücrel bileşen).....	45
Şekil 4.14: <i>Komagataeibacter</i> genom binlerindeki eksiksiz yolların Genome Properties kategorilerine göre dağılımı.	46
Şekil 4.15: <i>Z. bailii</i> genom binindeki eksiksiz yolların GenomeProperties kategorilerine göre dağılımı.	46
Şekil 4.16: Kombucha plazmid metagenomunda en bol bulunan ilk 20 yolk.....	47



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Kombucha'nın farklı dillerdeki yaygın kullanılan isimleri.....	3
Tablo 2.2: Kombucha'da varlığı en yaygın rapor edilen bazı bakteri ve funguslar.	5
Tablo 2.3: Kombucha mikrobiyomu üzerine gerçekleştirilmiş NGS temelli çalışmalar.....	17
Tablo 3.1: PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.	22
Tablo 3.2: PCR koşulları.	23
Tablo 4.1: DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları.	30
Tablo 4.2: Shotgun ve amplikon dizileme sonuçlarının genel istatistikleri.	32
Tablo 4.3: Kombucha örneklerindeki bakteri ve fungusların bulunma yüzdeleri ve BF oranları.....	38
Tablo 4.4: Kombucha örnekleri için genel kurulum istatistikleri.....	39
Tablo 4.5: Yüksek kalitedeki binler ve özellikleri.....	41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Mikro

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EBI	: European Bioinformatics Institute
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
ITS	: Internal Transcribed Spacer
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
LSU	: Large Subunit
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SSU	: Small Subunit
SSU-FÖ	: Small Subunit – Filtreleme öncesi
SSU-FS	: Small Subunit – Filtreleme sonrası

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KOMBUCHA'DAKİ (ÇAY MANTARI) MİKROBİYAL KOMPOZİSYONUN BİOİNFORMATİK ANALİZİ

Muzaffer ARIKAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL

Bakteri ve mayaların simbiyotik kültüründen oluşan fermente bir çay olan Kombucha, insan sağlığı üzerindeki potansiyel faydaları nedeniyle, son yıllarda, dünya çapında popülerite kazanmıştır. Dolayısıyla bu içeceğin biyokimyasal ve mikrobiyal kompozisyonu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kombucha mikrobiyomu üzerine bugüne kadar yapılan çalışmalar, kültür temelli metotlara ya da amplikon temelli dizilemelere dayanmaktadır. Bu yaklaşımlar, işlevsel analizlere imkan tanımamakta ve taksonomik analizlerde ise kısıtlı çözünürlükte sonuçlar vermektedir. Bu tez çalışmasında, hem tüm metagenom hem de amplikon (16S rRNA geni ve Internal Transcribed Spacers 1 (ITS1)) dizileme yöntemleri kullanılarak Kombucha'nın bakteriyel ve fungal çeşitliliği incelenmiştir. Fermentasyonun üç farklı gününde (3, 10, 15) taksonomik ve işlevsel profiller belirlenerek, sıvı ve pelikül fazları arasındaki benzerlik ve farklılıklar araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, Kombucha'da fermentasyon süresi boyunca ve her iki fazda da baskın bakteriyel cinsin *Komagataeibacter* (>%90) ve baskın fungal cinsin *Zygosaccharomyces* (>%95) olduğu belirlenmiştir. Tüm metagenom analizleri ile *Komagataeibacter* cinsine üye üç genom ve *Zygosaccharomyces bailii* türüne ait bir genom geri kazanılarak işlevsel açıdan incelenmiştir. Bu sayede, Kombucha'ya ait selüloz üretimi, B vitamini içeriği, metal biyosorpsiyonu ve antimikrobiyal üretimi gibi önemli özelliklerin genomik düzeydeki belirleyicileri gösterilmiştir. Ayrıca baskın türler arasındaki muhtemel metabolik etkileşimler incelenerek, fermentasyon sürecinin daha iyi anlaşılabilmesine katkı sunulmuştur. Bu proje ile Kombucha mikrobiyomunun taksonomik profili ve işlevsel

özellikleri, ilk defa hem shotgun hem de amplikon dizileme ile kapsamlı olarak ortaya konulmuştur.

Ağustos 2018, 100 sayfa.

Anahtar kelimeler: Kombucha, fermentasyon, dizileme, shotgun metagenomik.



SUMMARY

Ph.D. THESIS

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE MICROBIAL COMPOSITION IN KOMBUCHA (TEA FUNGUS)

Muzaffer ARIKAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL

Kombucha, a fermented tea composed of symbiotic culture of yeasts and bacteria, has gained popularity worldwide in recent years due to its potential beneficial effects on human health. Thus, many studies have been made on its biochemical properties and microbial composition. To date, culture-dependent methods and amplicon based sequencing have been used to study Kombucha microbiome. However, these methods have limited resolution for taxonomic analysis and do not allow functional profiling of microbial communities. Here, we applied whole metagenome and amplicon (16S rRNA and Internal Transcribed Spacers 1 (ITS1)) sequencing to investigate both bacterial and fungal community of Kombucha. We determined taxonomic and functional profiles at three time points of fermentation and investigated differences between biofilm and liquid phase. Taxonomic analysis indicated that *Komagataeibacter* becomes the baskın bacterial genus (>90%) in all samples while yeast community is dominated by *Zygosaccharomyces* (>95%) genus. Three genomes belonging to *Komagataeibacter* genus and one *Zygosaccharomyces bailii* genome were recovered by metagenome assembly analysis. Functional analysis of these dominant genomes revealed genomic level determinants of the characteristics of Kombucha such as vitamin production, metal biosorption, cellulose synthesis and antimicrobial production. Furthermore, the study revealed the metabolic interactions between dominant bacterial and yeast thus improved understanding of fermentation dynamics of Kombucha. Our results provide a comprehensive

picture of functional and taxonomic characteristics of Kombucha microbiome throughout fermentation process.

August 2018, 100 pages.

Keywords: Kombucha, fermentation, sequencing, shotgun metagenomics.



1. GİRİŞ

Çay, dünyada en yaygın tüketilen ikinci içecektir (Hayat ve diğ., 2015). Binlerce yıldır insanlar tarafından tüketilen bu içecek, *Camellia sinensis* adı verilen bitkiden elde edilmektedir (Chen ve Lin, 2015). Çay, üretiminde kullanılan tekniklere bağlı olarak dört gruba ayrılabilir: Oksidasyona uğramamış çay (beyaz çay, yeşil çay), yarı okside edilmiş çay (oolong), okside edilmiş çay (siyah çay) ve fermente çay. Geleneksel olarak, batı ülkelerinde daha çok siyah çay tercih edilirken, Asya ülkelerinde yeşil çay ve oolong tüketimi daha yaygındır (Mo ve diğ., 2008). Spesifik mikroorganizmaların rol aldığı fermentasyon süreci ile hazırlanan fermente çaylar ise özellikle son yıllarda tüketicilerin ilgisini daha çok çekmeye başlamıştır (Lv ve diğ., 2013; Jayabalan ve diğ., 2014). Gelişen iletişim ağları ve bu çaylara atfedilen sağlığa yararlı özellikler ise fermente çayların popülerleşmesini kolaylaştırmıştır (Mo ve diğ., 2008). Mikrobiyal fermente çaylar genel olarak üçe ayrılır: Siyah çaylar (Pu-erh, Fuzhuan, Liupao), çay turşusu ve Kombucha (Xiao ve diğ., 2015; Zhang ve diğ., 2013; Jayabalan ve diğ., 2014).

Kombucha, Çin’de 2000 yıldan uzun süredir tüketilen ve özellikle İkinci Dünya Savaşı sonrasında Avrupa’da kullanımı yaygınlaşan bir içecektir. Bu içeceğin bağışıklık sistemini güçlendirdiği, çeşitli hastalıklara karşı koruma sağladığı farklı gruplar ve bireyler tarafından rapor edilmiştir. Kombucha’ya atfedilen bu özelliklerin incelenmesi amacıyla, çeşitli bilimsel çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Kombucha’nın kimyasal kompozisyonunun yanı sıra mikrobiyal kompozisyonunu da inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Kombucha mikrobiyomu üzerine bugüne kadar yapılan çalışmalar, bölge, örnek alım günü, örnek alınan faz, fermentasyon koşulları gibi çeşitli değişkenler nedeniyle farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca kullanılan yöntemlere bağlı olarak elde edilen sonuçlar kısıtlı olmaktadır. Bu tez projesinde, Kombucha mikrobiyomunun taksonomik ve işlevsel özellikleri ile ilgili literatürdeki boşluğu doldurmak amacıyla ilk defa amplikon ve shotgun metagenomik yöntemleri bir arada kullanılarak detaylı metagenomik analizler gerçekleştirilmiştir. Böylece Kombucha’daki mikrobiyal komünitenin farklı zaman aralıklarında, farklı fazlarda ve mevcut en yeni analiz yöntemleriyle incelenmesi mümkün olmuştur. Elde edilen sonuçlar hem bugüne kadar yapılan çalışmalara ait sonuçların daha iyi değerlendirilebilmesini hem de bu fermente içeceğin mikrobiyal dinamiklerinin detaylı bir şekilde ortaya konulabilmesini sağlamıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KOMBUCHA FERMENTASYONU VE ÖZELLİKLERİ

Kombucha, hafif tatlı ve asidik yapıya sahip serinletici bir içecek olarak, dünya çapında tüketilmektedir (Dufresne ve Farnworth, 2000). Mikrobiyal fermente çaylar arasında yer alan bu içecek; siyah ya da yeşil çayın oluşturduğu bir sıvı fazdan ve genellikle sıvı fazın yüzeyini kaplayan selülozik yapıdaki bir pelikül tabakasından oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Kombucha'nın genel görünümü (Garten, 2007).

2.1.1. Kombucha'nın Kökeni

Kombucha'nın ilk tüketilmeye başlandığı yer ve zaman ile ilgili çeşitli iddialar mevcuttur. Ancak genel kabul gören kanıya göre bu içecek, yaklaşık 2000 yıl önce Çin'de tüketilmeye başlanmıştır. Blanc, (1996), bu içeceğin ilk defa milattan önce (M.Ö.) 220 yılında Mançurya'daki Çin Hanedenliği döneminde tüketildiğini öne sürmektedir. Sağlığa olumlu etkileri olduğu düşünülen ve tüketimi gittikçe yaygınlaşan Kombucha, 414 yılında Japonya'ya getirilmiştir (Jayabalan ve diğ., 2014). Daha sonra, ticaret yolları vasıtasıyla, Rusya'ya yayılan bu içecek, metabolik hastalıklar, hemoroid ve romatizma gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için tüketilmeye başlanmıştır (Greenwalt ve diğ., 2000). Özellikle İkinci Dünya Savaşı sonrasında Kombucha'nın Batı Avrupa'da da yaygınlaşmaya başladığı görülmektedir (Jayabalan ve diğ., 2014). 1950'li yıllarda Kombucha, Almanya, Fransa ve İtalya gibi Avrupa ülkelerinde ve Fransa'nın kontrolü altındaki Kuzey Afrika'da oldukça popüler hale gelmiştir (Blanc, 1996; Jayabalan ve diğ., 2014). Günümüzde ise bu popülerite daha da artmış ve dünya

çapında gıda marketlerinde satışı yapılmakta olan ve internetten de kültürü temin edilebilen bir içecek olmuştur (Jayabalan ve diğ., 2014).

Kombucha adının Japonca'daki deniz yosunu anlamına gelen “kombu” ve çay anlamına gelen “cha” kelimelerinden köken aldığı ileri sürülmekle birlikte bu konuda net bir bilgi bulunmamaktadır (Jarrell ve diğ., 2000). Bir başka görüşe göre ise “Kombu” adı bu içeceği ilk defa Japonya'ya getiren hekimin adından gelmektedir (Jayabalan ve diğ., 2014). Kombucha'ya botanikteki adı ise 1965 yılında Lindau tarafından *Medusomyces gisevii* olarak verilmiştir (Hesseltine, 1965). “Çay mantarı” adı, bakterilerin sentezledikleri yüzen selülozik tabakanın, sıvı yüzeyinde küf benzeri bir görüntü oluşturması sebebiyle, yanlışlıkla verilmiştir (Jayabalan ve diğ., 2014). Kombucha tüketimi dünyanın farklı bölgelerinde yaygınlaşırken, bu içecek için kullanılan isimler de çeşitlenmiştir. Çeşitli dillerde Kombucha için kullanılan adlar Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Kombucha'nın farklı dillerdeki yaygın kullanılan isimleri.

Dil	Kullanılan Adlar
Almanca	Indischer Teepilz, Gichtqualle, Kombuchagetränk, Teekvass, Teemost, Heldenpilz, Kombuchaschwamm
Bohemce	Olinka
Çince	Hong Cha Jun,
Fransızca	Champignon de longue vie, Combucha, Elixir de longue vie
Flemenkçe	Thee-Schimmel, Theebier, Komboecha-drink
İngilizce	Kombucha, Tea Fungus, Manchurian Mushroom, Tea Cider, Tea Beer
İspanyolca	Hongo
İtalyanca	Fungo cinese
Japonca	Reishi,
Letonca	Brinum-Ssene
Rusça	Japonski grib, Sakvasska, Cainii kvass, Cainiigrib,
Rumence	Chamboucho
Türkçe	Kombu çayı, kombuça, kombucha, çay mantarı

2.1.2. Kombucha'nın Hazırlanışı

Kombucha'nın hazırlanışı, tüketildiği yere bağlı olarak farklılıklar göstermekle birlikte, genel olarak şöyle özetlenebilir: Kaynatıldıktan sonra steril bir kaba alınan bir miktar içme suyunun içine şeker atılarak karıştırılır ve bir miktar çay eklenerek demlenmeye bırakılır. Demlenen çaydaki çay yaprakları uzaklaştırılır ve karışım oda sıcaklığına soğutulur. Oda sıcaklığındaki karışıma, daha önceki Kombucha fermentasyonlarından elde edilmiş ya da başka bir

kullanıcıdan temin edilmiş Kombucha sıvısı ve pelikülü eklenir. Kullanılan kabın ağzı, sinek, böcek vb. organizmaları uzak tutacak şekilde, hava geçiren bir havlu ya da tülbent ile kapatılır ve lastikle sabitlenir. Kombucha, genellikle 18 °C ile 28 °C arasında bir sıcaklıkta ve 7-10 gün süreyle, doğrudan güneş ışığına maruz kalmayan bir yerde fermente edilir. Fermentasyon başladıktan birkaç gün sonra sıvı yüzeyinde, selülozik yapıda bir pelikül tabakası oluşmaya başladığı ve gaz kabarcıkları çıktığı görülür. Bu pelikül tabakası, zamanla sıvı yüzeyini tamamen örter. Kombucha'nın tadı, fermentasyon süresine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Kısa süreli fermentasyonlarda hafif tatlı ve asidik bir tada sahipken, süre uzadıkça sirke benzeri asiditesi yüksek bir içeceğe dönüşür. Bu nedenle fermentasyon süresinin, kişinin damak zevkine göre ayarlanması gerekir.

2.1.3. Kombucha'nın Kimyasal Kompozisyonu

Kombucha, bakteri ve mayaların simbiyotik ilişkisine dayanan bir fermentasyon süreci ile üretilmektedir. Dolayısıyla bu süreçte çayın kimyasal kompozisyonu da değişime uğrayarak, bu içeceğe spesifik işlevsel özelliklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, Kombucha'nın hangi bileşikleri içerdiği hususunda önemli bilgiler sağlamıştır. Bununla birlikte, tespit edilen bu bileşiklerin konsantrasyonları, kullanılan çaydan fermentasyon koşullarına kadar birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir.

Kombucha'daki varlığı en yaygın rapor edilen organik asitler; asetik asit (Blanc, 1996; Chen & Liu, 2000; Jayabalan ve diğ., 2007; Chakravorty ve diğ., 2016; Coton ve diğ., 2017), laktik asit (Jayabalan ve diğ., 2007; Coton ve diğ., 2017), glukonik asit (Chen & Liu, 2000; Chakravorty ve diğ., 2016; Coton ve diğ., 2017) ve glukuronik asittir (Jayabalan ve diğ., 2007; Nguyen ve diğ., 2015; Coton ve diğ., 2017). Bunların yanı sıra sükroz, glukoz ve fruktoz gibi şekerler (Chen & Liu, 2000), B1, B2, B6, B12 ve C vitaminleri (Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000; Malbaşa ve diğ., 2011) de Kombucha'nın temel bileşenleri arasında sayılabilir. Ayrıca Kombucha fermentasyonu sırasında bakır, demir, manganez, nikel ve çinko gibi minerallerin artış gösterdiği de rapor edilmiştir (Bauer-Petrovska & Petrushevska-Tozi, 2000). Kombucha üzerine yapılan bir başka çalışmada ise fermentasyonun 7. gününde sülfat, klorür, iyodür, bromür, fosfat ve nitrat varlığı tespit edilmiştir (Kumar ve diğ., 2008). Bunlara ek olarak aminoasitler, purinler, pigmentler, lipidler, proteinler, hidrolitik enzimler, karbondioksit, fenol, çay polifenoller, mineraller de bu içekte bulunan kimyasallar arasındadır (Jayabalan ve diğ.,

2014). Bütün bu bileşenlerin yanında, Kombucha'daki bakteri ve mayaların ürettiği henüz karakterize edilmemiş metabolitlerin bulunması da muhtemeldir.

2.1.4. Kombucha'nın Mikrobiyal Kompozisyonu

Kombucha'nın genellikle mayalar ve asetik asit bakterilerinin simbiyotik kültüründen oluştuğu bilinmektedir (Jarrell ve diğ., 2000). Ancak diğer fermente içecekler gibi Kombucha'nın mikrobiyal kompozisyonu da çeşitli faktörlere göre değişkenlik gösterebilmektedir. Fermentasyon koşulları (sıcaklık, pH, vs.), çay mantarı, çay yaprakları ve sükroz miktarı gibi temel faktörler, Kombucha'daki mikrobiyal dinamikleri etkileyebilmektedir. Kombucha, genellikle ev koşullarında fermentasyonu gerçekleştirilen ve tüketilen bir içecek olduğu için de üretim koşullarında herhangi bir standardizasyon bulunmamaktadır. Kombucha'nın içerdiği mikrobiyal komünitenin tespitine yönelik ilk çalışmalarda, bu içeceğin temel olarak *Acetobacter* sp. NRRL B-2357, *Zygosaccharomyces* sp. NRRL YB-4810 ve *Candida* sp. NRRL YB-4882'ten oluştuğu belirlenmiştir (Hesseltine, 1965; Kozaki, 1972; Kaynak: Blanc, 1996). Daha sonra yapılan çalışmalarda da, *Acetobacteraceae* familyasına ait bakterilerin, Kombucha bakteriyel komünitesinin ana bileşenleri olduğu tespit edilmiştir (Jayabalan ve diğ., 2014). Kombucha'nın karakteristik özelliklerinden biri olan yüzeydeki selülozik pelikül tabakası da bu familyaya ait bakteriler tarafından üretilmektedir. Kombucha'daki fungal komüniteye yönelik araştırmalarda ise genellikle *Zygosaccharomyces*, *Pichia* ve *Brettanomyces/Dekkera* cinsleri rapor edilmiştir (Chakravorty ve diğ., 2016; Reva ve diğ., 2015; Marsh ve diğ., 2014; Coton ve diğ., 2017). Ayrıca laktik asit bakterilerinin tespit edildiği çalışmalar da mevcuttur (Marsh ve diğ., 2014; Coton ve diğ., 2017). Bugüne kadar Kombucha'daki varlığı en yaygın rapor edilmiş bakteri ve funguslardan bazıları Tablo 2.2'de özetlenmiştir:

Tablo 2.2: Kombucha'da varlığı en yaygın rapor edilen bazı bakteri ve funguslar.

Çalışma	Bakteri	Fungus
Hesseltine, 1965	<i>Acetobacter</i> sp.	<i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp.
Liu ve diğ., 1996	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i>
Mayser ve diğ., 1995	-	<i>Saccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Brettanomyces</i>
Reva ve diğ., 2015	<i>Komagataeibacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Burkholderia</i>	<i>Brettanomyces/Dekkera</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> , <i>Yarrowia</i>

Tablo 2.2 (devam): Kombucha’da varlığı en yaygın rapor edilen bazı bakteri ve funguslar.

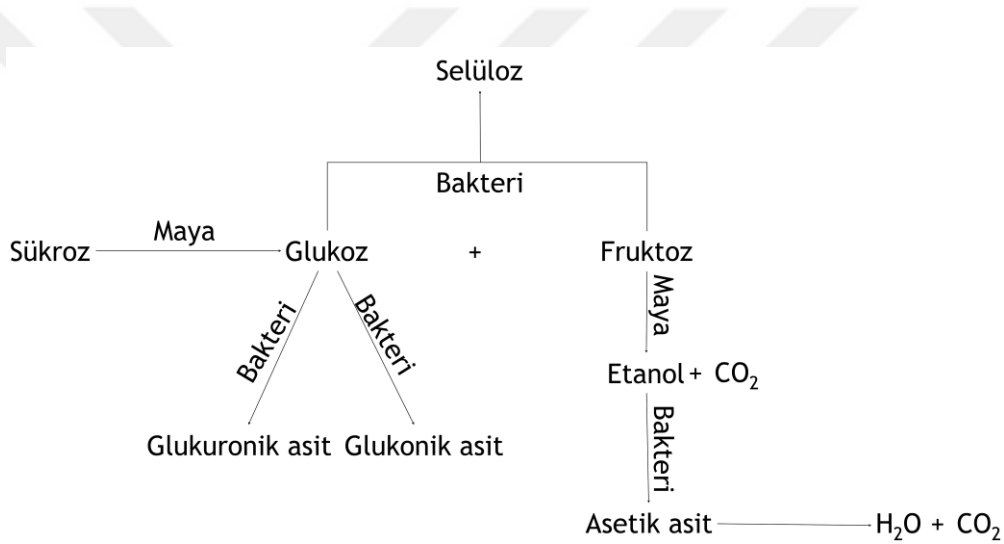
Marsh ve diğ., 2014	<i>Gluconacetobacter, Acetobacter, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Bifidobacterium, Thermus, Allobaculum, Ruminococcaceae Incertae Sedis, Propionibacterium, Enterococcus</i>	<i>Dekkera, Zygosaccharomyces, Davidiella, Wallemia, Lachancea, Leucosporidiella, Kluyveromyces, Naumovozyma, Meyerozyma, Saccharomyces, Hanseniaspora</i>
Chakravorty ve diğ., 2016	<i>Komagataeibacter, Gluconobacter, Lyngbya, Bifidobacterium, Collinsella, Enterobacter, Weissella, Lactobacillus</i>	<i>Candida, Lachancea, Kluyveromyces, Debaryomyces, Pichia, Waitea, Eremothecium, Meyerozyma, Zygowilliopsis, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Hanseniaspora, Kazachstania, Starmera, Merimbla, Sporopachydermia, Sugiyamaella</i>
Coton ve diğ., 2017	<i>Gluconacetobacter, Kluyvera, Leuconostoc, Hydrogenophilus, Rothia, Oenococcus, Gluconobacter, Enterobacter, Lactobacillus, Cellulosimicrobium, Pantoea/Enterobacter, Pseudochrobactrum</i>	<i>Hanseniaspora, Dekkera, Saccharomyces, Candida, Zygoascus, Torulaspora, Zygotorulaspora, Aspergillus, Kregervanrija, Wickerhamomyces, Clavispora, Pichia</i>

Bugüne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında, en yaygın rapor edilen bakteri cinsinin *Gluconacetobacter* ya da *Komagataeibacter* olduğu görülmektedir. *Gluconacetobacter* cinsi yakın zamanda *Nguyenibacter*, *Komagataeibacter* ve *Gluconacetobacter* cinslerine ayrılmıştır (Yamada ve diğ., 2012). Dolayısıyla bu durum, *Komagataeibacter* ya da *Gluconacetobacter* olarak sınıflandırılan türlerde yeniden sınıflandırmayı gerektirmiştir. Bu cinslere ait bazı bakteri türlerinin selüloz üretebildiği de bilinmektedir. Özellikle *Gluconacetobacter xylinus* türü verimli selüloz üretimi için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang ve diğ., 2018). Kombucha’daki mikrobiyal kompozisyonun tam olarak anlaşılabilmesi için, çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan türlerden çok, farklı Kombucha örneklerinde ortak olarak bulunan türler arasındaki etkileşim ve dinamiklerin incelenmesi önemlidir. Böylece temel fermentasyon süreci ve metabolik düzeydeki ilişkinin karakteristik özelliklerini bilmek ve faydalı özellikleri iyileştirilmiş içecekler elde etmek mümkün olabilir. Bu nedenle mikrobiyal kompozisyonu belirleme çalışmalarının, fermentasyon sürecindeki mikrobiyal etkileşimlerle ilişkilendirilmesi önem taşımaktadır.

2.1.5. Fermentasyon Süreci ve Mikrobiyal Etkileşimler

Kombucha fermentasyonu sırasında, mayalar başlangıçta ortama eklenen sükrozu metabolize ederek glukoz ve fruktoza çevirir. Üretilen glukoz ortamdaki asetik asit bakterileri tarafından

glukonik aside dönüştürülürken, fruktoz mayalar tarafından etanole çevrilir. Mayaların ürettiği etanol ise, yine bakteriler tarafından asetik aside dönüştürülür. Böylece ortamın asiditesi artar ve diğer mikroorganizmaların büyümeleri engellenmiş olur. Buna ek olarak, üretilen glukoz ve fruktozun bakteriler tarafından selüloz üretiminde kullanıldığı da bilinmektedir. Bakterilerin ürettiği bu selülozik pelikül, Kombucha sıvısı içinde yukarı doğru hareket ederek, sıvı yüzeyini kaplamaya başlar. Bu tabakanın sıvı yüzeyini tamamen kaplaması ile sıvı fazdaki mikroorganizmaların büyümesi yavaşlar ve durma noktasına gelir. Ayrıca ortamdaki besinlerin tükenmesi ve asiditenin toksik oranlara ulaşması da Kombucha'daki mikrobiyal ekosistemin olumsuz etkilenmesine neden olur. Kombucha'daki bu temel metabolik aktiviteler Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2: Kombucha fermentasyonu sırasında meydana gelen temel metabolik aktiviteler (Villarreal-Soto ve diğ., (2018)'den uyarlanmıştır.).

Kombucha'daki en önemli metabolik aktivitelerden biri, ortamdaki asetik asit bakterilerinin selüloz üretmesidir. Günümüzde çeşitli bakteri türlerinin selüloz üretebildiği yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia* spp., *Pseudomonas putida*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia chrysanthemi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter nataicola* ve *Komagataeibacter rhaeticus* selüloz üretebildiği bilinen bakteri türleri arasında yer almaktadır (Römling & Galperin, 2015; Florea ve diğ., 2016; Zhang ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2018). Kombucha, aynı zamanda, bu bakterilerin selüloz üretim mekanizmalarının anlaşılması ve verimliliğin artırılmasına yönelik pek çok çalışma için de önem taşımaktadır. Bu alandaki

alışmalar çeşitli araştırma grupları tarafından halen sürdüürlmektedir (Römling & Galperin, 2015).

2.1.6. Kombucha'nın Sağlık Üzerine Etkileri

Kombucha'nın insan sağlığı üzerindeki etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen, halen bu konuda kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu bu ieeğın sağlık üzerindeki olumlu etkileri üzerine olmakla birlikte, Kombucha'nın toksik özellik gösterdiği vakalar da literatürde mevcuttur.

Kombucha'ya atfedilen sağlığa faydalı özellikler, bu ieeğın fermentasyonu sırasında ortaya çıkan kimyasal bileşiklere ve mikrobiyal komünitesini oluşturan mikroorganizmalara dayanmaktadır. Kombucha'nın çeşitli vitaminler, mineraller, polifenoller ve organik asitler içermesinin, insan sağlığının korunması ve iyileştirilmesine katkı sunmasını sağladığı düşünölmektedir. Buradan hareketle, Kombucha'nın kardiyovasköler hastalıklara karşı koruyucu etki sağladığı, kolesterol metabolizmasını düzenlediğı, yüksek tansiyonu önlediğı, karaciğer detoksifikasyonunda rol aldığı belirtilmektedir (Martínez Leal ve diğ., 2018). Bu etkilerinin yanı sıra, fareler üzerinde yapılan farklı çalışmalarda Kombucha'nın, fermente edilmemiş siyah aya kıyasla, anti-diyabetik etkilerinin (Aloulou ve diğ., 2012) ve gastrik ülserin tedavisindeki olumlu etkisinin daha yüksek olduğı rapor edilmiştir (Banerjee ve diğ., 2010). Birçok hastalığa karşı olumlu etkileri olduğı belirtilen bu ieele ilgili kapsamlı çalışmalar ve klinik bulguların oldua kısıtlı olduğı not edilmelidir (Jayabalan ve diğ., 2014; Martínez Leal ve diğ., 2018). İçerdiği kimyasal bileşiklerin yanı sıra Kombucha mikrobiyomunun da probiyotik olarak önemli bir potansiyel taşıdığı düşünölmektedir. Dolayısıyla, prebiyotik ve probiyotik kombinasyonundan oluşan Kombucha'nın bir "sinbiyotik" olarak kullanılabileceğı öne sürölmektedir. Bu tanıma uygunluğu ise i) hem probiyotik bakteri ve mayalar hem de insan bağırsak mikrobiyomundaki faydalı mikroorganizmaların büyümesini kolaylaştıran prebiyotikler içermesi ii) bağırsıklık sistemini güçlendirici metabolitler içermesi, iii) birden fazla mikroorganizmanın etkileşimine dayanması nedeniyle tek suş probiyotiklerden daha avantajlı olması, iv) evresel stres faktörlerine karşı dayanıklı olması, v) sürekli yenilenebilmesi, vi) enerji sağlaması ve düşük maliyetli olması gibi özelliklere dayandırılmaktadır (Kozyrovska ve diğ., 2012). Bu sebeple, Kombucha'nın uzay araştırmaları sırasında astronotlar tarafından tüketilmesi gibi seçeneklerin dahi üzerinde durulmaktadır (Kozyrovska ve diğ., 2012).

Kombucha'nın sağlığa yararlı etkilerini rapor eden çalışmaların yanı sıra toksik etkilerine dair vakalar da rapor edilmiştir. Kombucha tüketimi sonrası kusma, baş ağrısı, baş dönmesi ve alerjik reaksiyonların görüldüğü kişilerin yanı sıra özellikle seramik kaplarda fermentasyona bağlı kurşun zehirlenmesi vakaları da rapor edilmiştir (Jayabalan ve diğ., 2014). Bunlara ek olarak, HIV pozitif bireylerde, hamilelerde ve çocuklarda tüketimin riskler taşıyabileceği de belirtilmektedir (Jayabalan ve diğ., 2014; Martínez Leal ve diğ., 2018). Kombucha üzerine yapılan çalışmaların özellikle son yıllarda hız kazanması sayesinde, yakın gelecekte, bu içeceğin sağlığa faydalı ya da zararlı özellikleri hakkında daha doğru ve kapsamlı bilgiler elde edilebilmesi mümkün olacaktır.

2.2. METAGENOMİK ANALİZ TEKNİKLERİ

2.2.1. Yeni Nesil Dizileme

DNA dizilemesi, incelenen bir DNA örneğindeki nükleotid sırasının belirlenmesi işlemini ifade eden bir terimdir. DNA dizilemesi alanındaki ilk büyük sıçrama, Sanger ve diğ., (1977) tarafından geliştirilen ve daha sonra "Sanger dizileme" olarak anılan yöntemle gerçekleşmiştir. Dideoksinükleotit trifosfatlar (ddNTP) ile zincir sonlandırılmasına dayanan Sanger dizileme, 2000'li yıllara kadar en yaygın kullanılan yöntem olmuştur. Ancak son 20 yılda, bu işlemin hızlı ve düşük maliyetle gerçekleştirilebilmesini sağlayan önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Yeni nesil dizileme (Next generation sequencing, NGS) terimi, çok sayıda DNA fragmanının aynı anda dizilenebilmesine olanak sağlayan teknikler için kullanılmaktadır. Bu teknikler sayesinde hem DNA dizilemenin maliyeti düşmekte hem de tek koşulda elde edilen veri miktarı artmaktadır. Bugüne kadar, bir çok farklı NGS platformu geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Günümüzde en yaygın kullanılan NGS platformları ikinci nesil dizileme olarak sınıflandırılmaktadır. İkinci nesil dizileme sistemlerinde temel işleyiş şu şekildedir: Dizileme için uygun uzunlukğa getirilen DNA örneklerinin ucuna kısa DNA dizileri (etiket diziler) eklenir (kütüphane hazırlama). Etiketlenen diziler çoğaltılarak, dizileme platformları tarafından tespit edebilecek kopya sayısına ulaşmaları sağlanır (amplifikasyon). Çoğaltılmış diziler, bir yüzeye sabitlenerek aynı anda dizilenir. Dizileme yüzeyindeki her bir spesifik koordinattan alınan bilgilerin bir DNA fragmanına ait olduğu kabul edilerek, elde edilen sinyaller kaydedilir ve işlenir (Arı ve Arıkan, 2016; Bentley ve diğ., 2008; Margulies ve diğ., 2005).

NGS teknolojileri, genomik alanındaki bir çok ihtiyaca cevap verecek şekilde gelişmeye devam etmektedir. Tüm genom, ekzom, transkriptom, metilom, ChIP, small RNA, *de novo* dizileme ve metagenomik gibi önemli alanlarda bu teknolojiler yaygın olarak kullanılmaktadır (McPherson, 2014; Morey ve diğ., 2013). Bu teknolojiler kullanılarak üretilen çıktılar ise hem yeni araştırmalara hem tıp ve biyoteknoloji gibi alanlara oldukça değerli bilgiler sağlamaktadır.

2.2.2. Metagenomik

Metagenom terimi ilk kez Handelsman ve diğ., (1998) tarafından, çevresel bir örnekteki mikrobiyal komüniteye ait kolektif genomu tanımlamak için kullanılmıştır. Metagenomik terimi ise bu kolektif genetik materyalin analizi anlamına gelmektedir. Metagenomik analizler temel olarak, incelenen bir örnekte hangi organizmaların bulunduğunu, bunların işlevsel özelliklerini ve bu özelliklerden sorumlu biyolojik mekanizmaları belirlemeyi amaçlar. Mikroorganizmaların kültür edilmeden incelenbilmesine olanak sağladığı için metagenomik, mikrobiyal ekoloji çalışmalarına büyük kolaylıklar sağlamıştır. Henüz kültür edilmemiş mikroorganizmaların genellikle çevresel bir örnekteki çeşitliliğin %99'undan fazlasını oluşturduğu dikkate alındığında, metagenomiğin sağladığı katkı daha iyi anlaşılmaktadır. Başlangıçta Sanger dizileme kullanılarak gerçekleştirilen metagenomik analizler, yeni nesil tarama ve dizileme teknolojileri sayesinde büyük ivme kazanmıştır. Metagenomik analizler iki farklı strateji izlenerek gerçekleştirilebilir: İşlevsel metagenomik ve dizileme temelli metagenomik.

2.2.3. İşlevsel Metagenomik

İşlevsel metagenomik, çevresel bir örnekten izole edilen metagenomik DNA fragmanlarının, uygun vektörlere klonlanıp başka konaklarda gen anlatım kütüphaneleri oluşturulmasını ve bu kütüphanelerin spesifik bir fenotip açısından taranmasını içerir (Mardanov ve diğ., 2018). Tarama işlemi genellikle bir matrikse sabitlenmiş birden fazla klona uygulanır ve kullanılan indikatör sayesinde incelenen fenotipi içeren klon belirlenir. Bu tür analizlerde, ilgili işlevsel protein ancak konak hücre tarafından hücre dışına salındığı takdirde tespit edilebilmektedir (Coughlan ve diğ., 2015). Metagenomik klonlar indikatör özelliğe sahip besi yerinde büyütülerek çeşitli işlevler açısından aktif olan klonlar görsel olarak belirlenebilir (Daniel, 2005). Uygulanan bir diğer yaklaşım da, aktif bir klondaki antimikrobiyal ya da inhibitör ajanların, indikatör mikroorganizmalar kullanılarak agar inhibisyon zonları üzerinden tespit

edilmesine dayanmaktadır (Banik ve Brady, 2010). Metagenomik kütüphanelerin belirli işlevsel özellikler üzerinden seçilime tabi tutulması da uygulanabilecek bir diğer yaklaşım olarak sayılabilir (Ekkers ve diğ., 2012). Örneğin; karbon kaynağı tercihi, antimikrobiyal ajanlara karşı direnç, ağır metal varlığında büyüebilme gibi spesifik özellikler seçim işlemiinde kullanılabilir (Coughlan ve diğ., 2015). Uygulanan bu yöntemler sayesinde, yeni antibiyotikler (Brady & Clardy, 2000; Gillespie ve diğ., 2002; Wilkinson ve diğ., 2002), hidrolitik enzimler (Cottrell ve diğ., 1999; Henne ve diğ., 2000; Lämmle ve diğ., 2007), degradatif enzimler (Healy ve diğ., 1995; Suenaga ve diğ., 2007) ve antibiyotik direnç enzimleri (Donato ve diğ., 2010) gibi önemli biyomoleküller tanımlanmıştır.

İşlevsel metagenomik, önemli bilgiler sağlamakla birlikte çeşitli kısıtlamalara da sahiptir. Bunlardan birincisi, taranabilecek işlevsel özelliklerin, yalnızca halihazırda mevcut tarama sistemlerinde bulunanlarla sınırlı olmasıdır. Bir diğer kısıtlama ise oluşturulabilecek metagenomik kütüphanelerinin boyutuyla ilişkilidir. Çevresel örneklerdeki çeşitlilik dikkate alındığında, taranabilen kısım oldukça kısıtlı kalabilmektedir (Curtis ve diğ., 2002). Ayrıca oluşturulan metagenomik kütüphanelerinin büyük olması, ilgilenilen spesifik genin tespitini de zorlaştırmaktadır (Uchiyama ve Miyazaki, 2009). İşlevsel metagenomik alanındaki en önemli kısıtlamalardan bir diğeri de, gen anlatımı için kullanılabilecek konak seçeneklerinin kısıtlı olmasıdır. Dolayısıyla, farklı çevresel örneklerden elde edilmiş hedef genin kullanılan konakta anlatımında ya da üretilen proteinin paketlenmesinde problemler yaşanabilmektedir (Uchiyama ve Miyazaki, 2009; Banik ve Brady, 2010). Bu konuda yapılan araştırmalar, aynı metagenomik kütüphanesindeki aktif işlevsel özelliklerin kullanılan konaklara göre farklı profiller gösterdiğini belirlemiştir (Craig ve diğ., 2010; Biver ve diğ., 2013). Dolayısıyla tarama işlemlerinin birden fazla konak üzerinden gerçekleştirilmesi daha sağlıklı sonuçlar elde edilebilmesi için önem taşımaktadır (Coughlan ve diğ., 2015). Belirtilen kısıtlamalara ek olarak, konak hücredeki gen anlatımını etkileyen önemli faktörlerden biri de klonlanan DNA fragmanının işlevsel bir operon içermeyecek kadar kısa olmasıdır. Dolayısıyla, büyük DNA fragmanlarının klonlanabileceği vektörlerin kullanımı da önem kazanmaktadır (Streit ve Schmitz, 2004).

Son yıllarda, metagenomik kütüphanelerin taranabileceği uygun konak alternatiflerini çoğaltmak için farklı mikroorganizmalar denenmektedir (Kumar ve diğ., 2015). Ayrıca metagenomik kütüphanesi tarama hızını arttırmak için geliştirilen yeni nesil yüksek çıktı

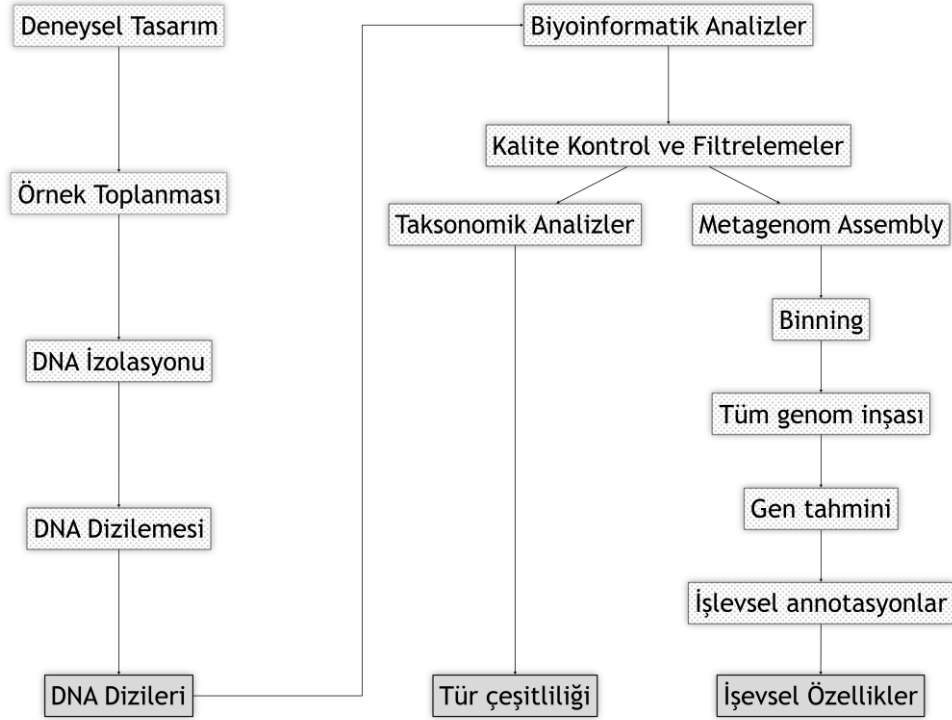
tarama sistemleri sayesinde saniyede 50,000 klon taramak mümkün hale gelmiştir (Wenzel ve Müller, 2005). İşlevsel metagenomik alanındaki bu gelişmeler, hem metagenomik çalışmalarından elde edilerek kullanılan biyomolekül sayısını hem de çeşitliliğini oldukça arttırmıştır. Uygulanan yöntemlerin ilerlemesi ile ticari alanda da önemli başarılar yakalanabilmiştir (Kumar ve diğ., 2015).

2.2.4. Dizileme Temelli Metagenomik (Shotgun Metagenomik)

Dizileme temelli metagenomik terimi, çevresel bir DNA örneğinin dizilenmesini ve biyoinformatik analizler yoluyla işlevsel özelliklerinin belirlenmesini ifade etmektedir. Bu yöntem sayesinde tüm genomu belirlenen mikroorganizmaların bulundukları ortamdaki aktiviteler ile ilişkilendirilebilmesi kolaylaşmıştır. Shotgun metagenomik alanındaki ilk çalışmalar, Sanger dizileme ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin çevresel örneklerden elde edilmiş DNA'ya ilk uygulandığı, 2004 yılında yayınlanan iki çalışma ile başlamıştır. Bunlardan ilki, Tyson ve diğ., (2004) tarafından Kaliforniya'daki bir asit maden drenajının yüzeyindeki biyofilm tabakasının incelendiği çalışmasıdır. Bu çalışmada, biyofilm tabakasını oluşturan iki mikrobiyal türün tüm genomları dizilenerek yeniden inşa edilebilmiştir. Aynı yıl yayınlanan Venter ve diğ., (2004) çalışmasında ise Sargasso Denizi'nde alınan örneklerde tüm genom shotgun dizileme uygulanmış ve daha önce bilinmeyen 1.2 milyondan fazla gen tespit edilmiştir. Bu yöntemin mikrobiyal çeşitliliğin tespiti ve mikrobiyal etkileşimlerin anlaşılabilmesi için büyük olanaklar sunduğu görülünce de, Dünya Mikrobiyom Projesi (Earth Microbiome Project, EMP) (Gilbert ve diğ., 2010) ve İnsan Mikrobiyom Projesi (Human Microbiome Project, HMP) (Turnbaugh ve diğ., 2007) gibi uluslararası işbirliklerine dayanan geniş kapsamlı projeler başlatılmıştır. 2000'li yılların sonuna doğru NGS teknolojilerinin ortaya çıkması ve yaygınlaşması, dizileme temelli metagenomik alanında büyük değişimleri de beraberinde getirmiştir. NGS sistemlerinin taşıdığı avantajlar ve dezavantajlar, shotgun metagenomik alanındaki deneysel ve biyoinformatik analiz araçlarını da şekillendirmiştir (Breitwieser ve diğ., 2017).

Shotgun metagenomik çalışmaları, genel olarak aynı temel basamakları izleyen bir iş akışına sahiptir (Şekil 2.3). Buna göre, öncelikle çalışmanın hedeflerine uygun olarak, deneysel ve biyoinformatik analiz akışları tasarlanır. Daha sonra çevresel örnekler belirlenmiş zaman, miktar ve sayıda toplanır ve bu örneklerden metagenomik DNA izole edilir. İzole edilen DNA örnekleri, kütüphane hazırlama adı verilen işleminden geçirilerek, NGS platformlarında

dizilenmeye hazır hale getirilir. Dizileme sonucunda elde edilen verilerin kalite kontrolleri gerçekleştirilir ve düşük kaliteli diziler filtrelendir. Temiz dizilerden filogenetik belirteç genleri kodlayanlar ayrılarak, daha önce rapor edilmiş dizileri içeren referans veri tabanları ile karşılaştırılır. Böylece çevresel örneklerdeki mikrobiyal çeşitlilik belirlenmiş olur. Bir diğer biyoinformatik analiz basamağı ise NGS platformlarının ürettiği kısa dizilerin bir araya getirilmesi ile daha uzun diziler elde edilmesini içerir. Daha sonra bu uzun diziler, köken aldıkları mikroorganizmalara göre gruplara ayrılırlar. Bu işlem mikrobiyal komüniteyi oluşturan her bir mikroorganizmanın tüm genom düzeyinde analizini sağlar. Gen tahminleri ve işlevsel anotasyonlar yoluyla, çevresel örnekteki mikrobiyal türlerin muhtemel işlevsel özellikleri belirlenir. Elde edilen sonuçlar, istatistiksel ve biyolojik analizlerle değerlendirilir ve yeni deneysel süreçler tasarlanarak valide edilir (Quince ve diğ., 2017).



Şekil 2.3: Shotgun metagenomik çalışmalarının genel basamakları.

Günümüzde shotgun metagenomik çalışmalarındaki temel aşamaların her biri için uygulanabilecek çok sayıda alternatif araç ve yöntem mevcuttur. Bu durum, yapılan çalışmaların sayısını ve hızını arttırmakla birlikte, elde edilen sonuçların standardizasyonunda problemlere de sebep olabilmektedir. Örneğin; metagenomik DNA izolasyonunda kimyasal, mekanik ya da enzimatik yöntemlere dayanan ticari ve ticari olmayan birçok alternatif protokol

mevcuttur (Quince ve diğ., 2017). Bu protokollerin, izole edilen metagenomik DNA'nın kompozisyonuna etki edebildiği de bilinmektedir. Dolayısıyla kullanılan DNA izolasyon yönteminin, hedef çevresel örneğe uygun ve farklı mikrobiyal türler üzerinde etkili olması, daha doğru sonuçlara ulaşılabilmesine yardımcı olur. Metagenomik DNA örneğinin dizilendiği NGS platformu ve kullanılan protokoller de uygulanan DNA izolasyon yöntemiyle uyumlu olmalıdır. NGS platformlarının ürettiği veri miktarı ve özellikleri farklılıklar gösterdiği için, bu verilerin analizinde kullanılan biyoinformatik araçlar da değişebilmektedir. Dolayısıyla çalışma tasarımının uygulanacak her basamaktaki alternatifler gözden geçirilerek yapılması, belirlenen hedeflere ulaşılmasında büyük öneme sahiptir.

Dizileme maliyetlerindeki düşüş ve biyoinformatik alanındaki ilerlemeler shotgun metagenomik temelli analizlerin yaygınlaşmasındaki en önemli etkenlerdir. Bu yöntemin uygulandığı ilk yıllarda, referans veri tabanlarının küçük ve veri analiz araçlarının yetersiz olması, sonuçların değerlendirilmesini kısıtlarken, özellikle son yıllarda hızla büyüyen veri tabanları ve çeşitlenen veri analiz araçları bu problemlerin aşılmasına katkı sunmuştur. Son yıllarda, shotgun metagenomik analizlerinde önemli darboğazlardan biri olarak görülen mikrobiyal genomların ayrıştırılarak yeniden inşası konusunda da önemli gelişmeler ilerlemeler kaydedilmiştir (Breitwieser ve diğ., 2017). Geliştirilen biyoinformatik araçları sayesinde, karışık bir metagenomik DNA dizileme verisindeki, aynı mikroorganizmaya ait olan dizileri ayırmak ve bir mikrobiyal komüniteyi oluşturan mikroorganizmaların tüm genomlarını ayrı ayrı incelemek mümkün hale gelmiştir. Literatürdeki shotgun metagenomik çalışmalarının bu araçlarla yeniden analiz edilmesi, daha önce tespit edilememiş binlerce yeni genomun tespitini sağlamıştır (Parks ve diğ., 2017). Böylece referans genom veri tabanlarındaki büyüme de ivme kazanmıştır. Metagenom binning adı verilen bu yeni yöntemlerle üretilen genom dizilerinin kalite standartları da Genomic Standards Consortium (GSC) tarafından 2017 yılında belirlenmiştir (Bowers ve diğ., 2017). Metagenom verilerinden tek tek mikrobiyal genomların inşası için kullanılan bu stratejilerin de hızla çeşitlenmeye başlandığı düşünülürse, mikrobiyal ekoloji alanındaki gelişmelerin daha da hız kazanacağı söylenebilir (Sedlar ve diğ., 2017).

2.2.5. Amplikon Dizileme ile Mikrobiyom Analizleri

Dizileme temelli metagenomik terimi, dar anlamıyla, mikrobiyal bir komünitedeki genetik potansiyele dair bütüncül bilgi veren analizleri kapsadığı için yalnızca shotgun metagenomik analizlerini içerir. Bu nedenle, yalnızca spesifik bir hedef gene dayalı mikrobiyom analizleri

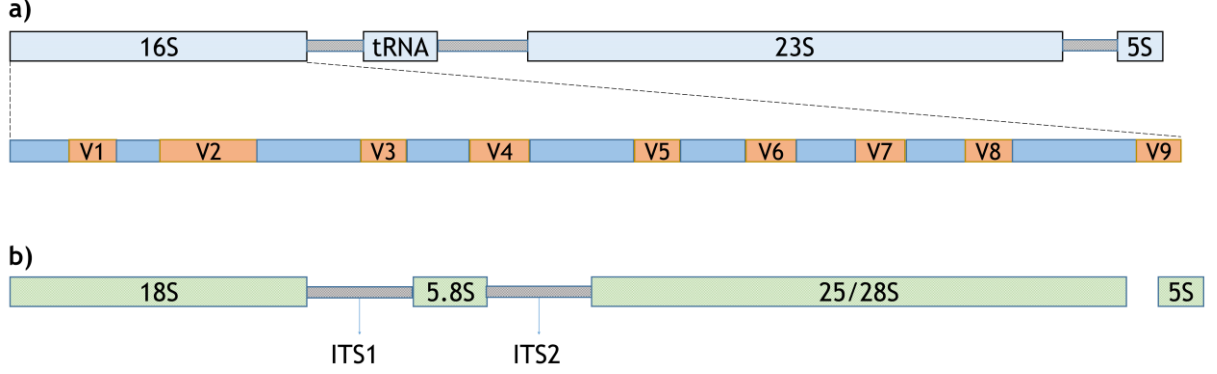
genellikle metagenomik terimi içinde sayılmamaktadır (Riesenfeld ve diğ., 2004). Ancak mikrobiyom profillerini belirlemekte kullanılan bu analizler, sıklıkla diğer metagenomik analizleri ile birlikte kullanılarak tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir (Mardanov ve diğ., 2018).

Amplikon temelli mikrobiyom analizleri, bir klad (clade) içindeki bütün organizmalarda ortak olan filogenetik belirteç genlerin çoğaltılması ve dizilenmesine dayanmaktadır. Bu genler, hem türler arasında korunmuş bölgeler hem de değişken bölgeler içerdikleri için, taksonomik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanışlı olmaktadır (Bragg ve Tyson, 2014). Burada korunmuş gen bölgeleri, türler arası ayrımı sağlayan değişken gen bölgelerinin çoğaltılabilmesini sağlar. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR) gibi amplifikasyon tekniklerinde primer dizileri, bu korunmuş gen bölgeleri hedeflenerek tasarlanır. Dolayısıyla PCR ile primerlerin bağlandığı korunmuş bölgelerin arasındaki değişken gen bölgeleri de çoğaltılmış olur. Daha sonra bu PCR amplikonları dizilenir ve mevcut referans gen veritabanları ile karşılaştırılarak analiz edilir. Bu sayede çevresel örnekteki mikrobiyal çeşitlilik belirlenir.

NGS temelli amplikon dizileme kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyom analizlerinin genel işleyişi şu şekildedir: İncelenecek mikrobiyal türlere uygun filogenetik belirteç gen seçilir. Bu genin, NGS platformlarına uygun uzunluktaki (250-600) hedef bir bölgesi belirlenir. Bu hedef gen bölgesinin sınırlarını belirleyen korunmuş bölgelere bağlanacak primer dizileri tasarlanır. PCR ile hedef gen bölgeleri çoğaltılır ve dizilenir. Elde edilen dizileme sonuçlarının taksonomik analizi; SILVA (Quast ve diğ., 2013), Greengenes (DeSantis ve diğ., 2006), RDP (Cole ve diğ., 2014), ITSoneDB (Santamaria ve diğ., 2018), ITS2 Database (Schultz ve diğ., 2006) ve UNITE (UNITE Community, 2017) gibi daha önceden rapor edilmiş filogenetik belirteç gen dizilerini içeren referans veri tabanları ile yapılan karşılaştırmalar yoluyla tamamlanır.

Mikrobiyom analizlerinde, genellikle, çeşitliliği yüksek mikrobiyal komüniteler içeren çevresel örnekler incelenmektedir. Dolayısıyla yapılacak analizlerde hangi mikroorganizma grubuna odaklanılacağı, filogenetik belirteç gen seçimini doğrudan belirlemektedir. Örneğin, bir örnekteki bakteriyel kompozisyonun tespitinde en yaygın kullanılan belirteç gen 16S ribozomal RNA genidir (Ramazzotti ve Bacci, 2018). Bütün bakteri genomlarında mevcut olması ve hem korunmuş hem de değişken bölgeler içermesi (Şekil 2.4a), 16S rRNA genini mikrobiyom analizlerinde oldukça kullanışlı yapmaktadır (Lane ve diğ., 1985). Ökaryotik türlerin analizinde ise genellikle 16S rRNA geninin homologu olan 18S rRNA geni kullanılır (Wooley ve diğ.,

2010). Spesifik olarak fungal türlerin incelenmesi için ise sıklıkla Internal transcribed spacer (ITS) dizileri tercih edilir (Schoch ve diğ., 2012) (Şekil 2.4b).



Şekil 2.4: Prokaryotik (a) ve ökaryotik (b) ribosomal RNA genlerinin genel yapısı.

Amplikon temelli analizlerin temel dezavantajları şöyle sıralanabilir: i) Tasarlanan primerler, incelenen örnekteki bütün bakteri 16S rRNA genlerine bağlanamayabilmektedir (Mardanov ve diğ., 2018). Bu durumda, çoğaltılamayan bakteri türleri ile ilgili sonuç elde edilememektedir. ii) Primerlerin bazı mikroorganizmalara ait hedef gen dizilerini diğerlerinden daha verimli çoğaltması nedeniyle tespit edilen mikrobiyal kompozisyonda bulunma sapmaları ortaya çıkabilmektedir (Tremblay ve diğ., 2015). iii) İncelenen türlerin tanımlanması, ancak kullanılan referans veri tabanında yakın türlere ait dizilerin bulunmasına bağlıdır. Bu nedenle, mevcut iyi bilinen mikrobiyal türlere uzak yeni türlerin sınıflandırılmasında problem yaşanabilmektedir (Mardanov ve diğ., 2018). iv) Seçilen filogenetik belirteç genin genom kopya sayısı türler arasında değişkenlik gösterebilmekte (Klappenbach ve diğ., 2001) ve tespit edilen mikrobiyal kompozisyonda sapmalara yol açabilmektedir (Ramazzotti ve Bacci, 2018). Bu sorunların aşılması için çeşitli yöntemler geliştirilmeye devam edilmektedir. Kullanılan referans veri tabanlarının düzenlenmesi ve genişletilmesi, referans bağımsız taksonomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi, genom kopya sayısı ile ilgili veri tabanlarının ve bunu dikkate alan analiz araçlarının kullanılmaya başlanması gibi ilerlemeler bu kapsamda sayılabilir.

2.3. KOMBUCHA'DA METAGENOMİK ANALİZLER

Son yıllarda Kombucha mikrobiyomun analizi için NGS teknolojileri kullanılmaya başlanmış ve bu çalışmalar sayesinde önemli bilgiler elde edilmiştir. Bugüne kadar Kombucha mikrobiyomu üzerine gerçekleştirilmiş olan NGS temelli amplikon dizileme çalışmaları Şekil 2.3'te gösterilmiştir:

Tablo 2.3: Kombucha mikrobiyomu üzerine gerçekleştirilmiş NGS temelli çalışmalar.

Çalışma Adı	Hedef Bölge		Sıcaklık (°C)	Örneklem Günü	
	Bakteriyel	Fungal		Pelikül	Sıvı
Marsh ve diğ., (2014)	V4-V5	ITS1	23	10	3, 10
Reva ve diğ., (2015)	V1-V3	26S rDNA	28	14	14
Chakravorty ve diğ., (2016)	V3	ITS2, 26S rDNA	28±2	7	7
Coton ve diğ., (2017)	V1-V3	26S rDNA	-	0, 2, 4, 8	0, 2, 4, 8
De Filippis ve diğ., (2018)	V1-V3	-	20, 30	1, 7, 9, 14, 21	1, 21

Marsh ve diğ., (2014), farklı coğrafik bölgelerden (Kanada, Birleşik Krallık, Amerika Birleşik Devletleri, İrlanda) topladıkları 5 Kombucha örneğindeki mikrobiyal çeşitliliği NGS temelli ampikon analizleri ile incelemiştir. Bu çalışmada, hem bakteriyel hem de fungal komünite, 16S rRNA geni ve ITS1 bölgesi hedeflenerek analiz edilmiştir. Fermente edilen çayların sıvı fazından 3. ve 10. günde, pelikül fazından ise 10. günde örnekler alınarak metagenomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *Gluconacetobacter* (görece bulunma yüzdesi çoğu örnekte >%85) cinsinin bütün örneklerde baskın bakteri cinsi olduğu belirlenmiştir. Fungal komünitenin analizi ise tüm örneklerde baskın cinsin *Zygosaccharomyces* (görece bulunma yüzdesi tüm örneklerde >%95) olduğunu göstermiştir. Bunların yanında değişen oranlarda *Lactobacillus* ve *Lactococcus* varlığı da tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Kombucha'da temel olarak iki mikrobiyal cinse ait mikroorganizmaların baskın olduğunu göstermiştir. Sıvı fazdaki bakteriyel çeşitliliğin 3. günde daha yüksek olduğu belirlenen çalışmada, pelikül örneklerinin ise sıvı faz örneklerine kıyasla daha yüksek çeşitliliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Bu cinslere ek olarak, *Leuconostoc*, *Allobaculum*, Ruminococcaceae *Incertae Sedis* ve *Enterococcus* gibi Kombucha'daki varlıkları daha önceki çalışmalarda rapor edilmiş cinsler de tespit edilmiştir. Fungal komünitede ise *Zygosaccharomyces* cinsinin yanında, *Dekkera*, *Pichia* ve *Kazachstania* cinslerinin varlığı da tespit edilmiştir. Bu çalışma, Kombucha fermentasyonunun farklı günlerindeki bakteriyel ve fungal komünite değişimlerini göstermiş ve baskın cinslerin belirlenmesini sağlamıştır.

Reva ve diğ., (2015), Kombucha mikrobiyomunun büyüme koşullarına bağlı olarak farklılık gösterdiğini ancak temel bakteriyel komünite üyelerinin *Komagataeibacter* ve *Gluconobacter* cinsine üye oldukları, maya komünitesinde ise *Brettanomyces/Dekkera* ve *Pichia* cinslerinin

baskın olduğu rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak, *Herbaspirillum* spp. ve *Halomonas* spp. cinslerinin varlığı da tespit edilmiştir. 14. günde alınan örneklerin analiz edildiği çalışmada bakteriyel komünitenin görece stabil olduğu, maya komünitesinin ise büyük değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Kombucha'daki mikrobiyal komünitenin temel bileşenlerine ek olarak *Lactobacillus* bakterilerinin de bulunabileceği ve bu sayede içeceğin probiyotik özelliğinin artabileceği belirtilmiştir.

Chakravorty ve diğ., (2016), fermentasyonun 7. gününde pelikül ve sıvı fazdan alınan örneklerde bakteriyel ve fungal komüniteyi incelemiştir. Bu çalışmada, sıvı fazdaki çeşitliliğin pelikül fazından daha yüksek olduğu belirtilmiştir. *Komagataeibacter*'in hem pelikül hem de sıvı fazda baskın bakteriyel cins olduğu, *Candida*'nın ise baskın maya cinsi olduğu belirlenmiştir. Maya komünitesinin pelikül fazında değişkenlik göstermemekle birlikte sıvı fazda önemli değişkenlikler gösterebildiği rapor edilmiştir. Kombucha'daki mikrobiyal komünitenin biyokimyasal kompozisyonun şekillenmesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

Endüstriyel düzeyde yeşil çay ya da siyah çay ile fermente edilen Kombucha örneklerinin analiz edildiği Coton ve diğ., (2017) çalışmasında, beş farklı gündeki (0, 2, 4, 6, 8) mikrobiyal kompozisyon hem pelikül hem de sıvı fazda incelenmiştir. Hem kültür bağımlı hem de NGS temelli analizlerin gerçekleştirildiği çalışmada, baskın bakteriyel türlerin *Acetobacteraceae* familyasına üye olduğu, daha az oranda ise *Lactobacteriaceae* familyasının bulunduğu belirlenmiştir. Maya komünitesindeki temel cinslerin, fermentasyon süresi boyunca, *Dekkera*, *Hanseniaspora* ve *Zygosaccharomyces* olduğu tespit edilmiştir. *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconobacter oxydans*, *G. saccharivorans* ve *Acetobacter peroxydans*'ın baskın asetik asit bakterileri olduğu yapılan analizlerle ortaya konulmuştur. Yeşil çay ve siyah çay arasındaki karşılaştırmalarda, *Oenococcus oeni* adlı laktik asit bakterisinin yeşil çay ile ilişkili olduğu görülmüştür. Çay çeşidinin maya komünitesi üzerinde ise etki göstermediği belirlenmiştir. Kombucha'daki baskın maya türlerinin *Dekkera bruxellensis*, *D. anomala*, *Zygosaccharomyces bailii* ve *Hanseniaspora valbyensis* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Kombucha'daki çekirdek mikrobiyal komünite varlığına işaret eden bu çalışma, bu içeceğin standardizasyonu için önemli olanakların bulunduğunu göstermektedir.

De Filippis ve diğ., (2018), fermentasyon sıcaklığının Kombucha'daki mikrobiyal komünitenin farklılaşmasına neden olduğu rapor edilmiştir. 20 °C ve 30 °C'de fermente edilen Kombucha örneklerinden alınan örneklerde yapılan analizlerde farklı *Gluconacetobacter* türlerinin baskın

hale geldiği belirlenmiştir. Bu durumun da farklı glukonik asit ve glukuronik asit konsantrasyonlarına neden olduğu tespit edilmiştir.

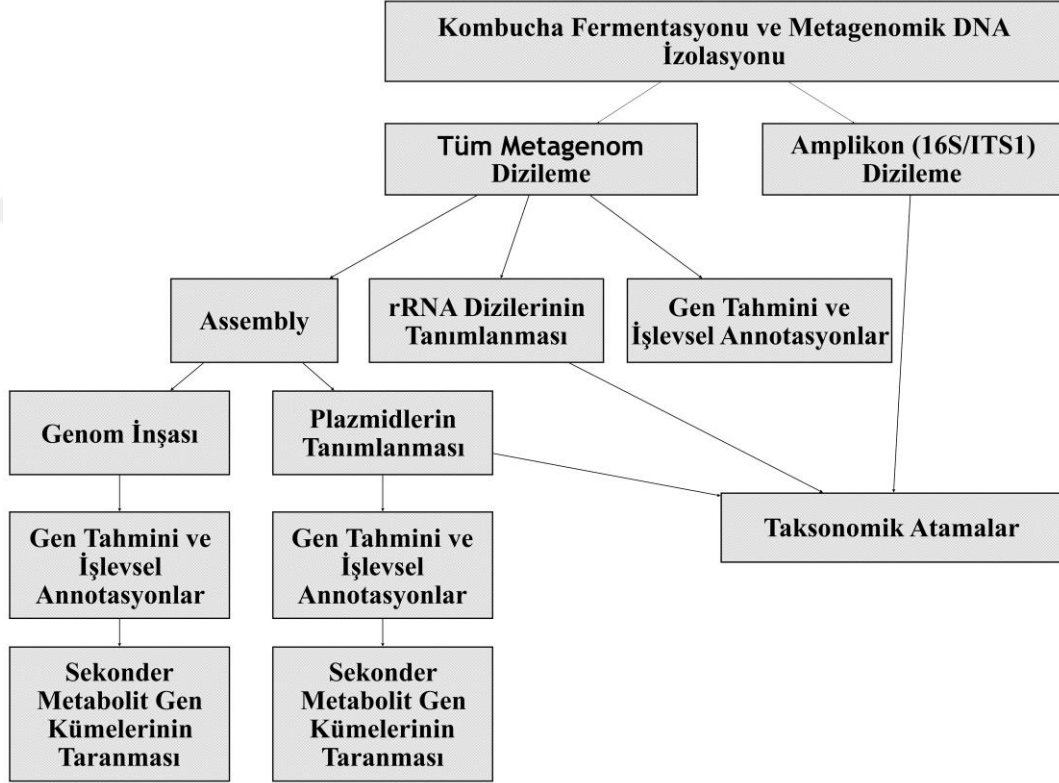
Bugüne kadar yapılan alışmalar Kombucha ile ilgili önemli bilgiler sağlamıştır. Ancak Kombucha'nın shotgun metagenomik yoluyla analiz edildiği bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu tez projesinde, Kombucha örneklerinden izole edilen metagenomik DNA dizileri, hem amplikon hem de shotgun metagenomik yöntemleriyle dizilenmiş, Kombucha'daki mikrobiyal komünite taksonomik ve işlevsel açıdan analiz edilmiştir. Bu çalışmada, hem fermentasyon sürecindeki değişimler hem de pelikül-sıvı faz mikrobiyomundaki farklılıklar izlenmiştir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA TASARIMI

Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel ve biyoinformatik analiz basamakları Şekil 3.1’de özetlenmiştir:



Şekil 3.1: Uygulanan deneysel ve biyoinformatik analiz basamakları.

3.2. KOMBUCHA MATERYALİ VE FERMENTASYONU

Bu çalışmada, Adana yöresinde yerel olarak tüketilen iki Kombucha örneği kullanılmıştır. Bu iki Kombucha örneği, fermentasyonun 7. gününde, 250 ml’lik kaplarda pelikül ve sıvı fazlarıyla birlikte temin edilmiştir. Oda sıcaklığında laboratuvara transfer edilen bu örnekler, deneyler için kullanılmıştır.

Kombucha örneklerinin fermentasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 1350 ml içme suyu kaynatıldı, üzerine 150 g süktroz eklenerek çözünene kadar karıştırıldı.

- 9 g çay yaprağı (Lipton) eklenerek 10 dakika demlenmeye bırakıldı.
- Demlenme sonrası çay yaprakları ortamdan uzaklaştırıldı ve çay oda sıcaklığına soğutuldu.
- Temin edilmiş Kombucha'nın sıvı fazından 150 ml alınarak yeni hazırlanmış olan çaya eklendi.
- Hazırlanan bu yeni çay, üç ayrı 500 ml'lik steril cam kavanoza alındı.
- Temin edilmiş Kombucha'nın pelikül fazından ise 1x2 cm boyutlarında üç parça, steril bistüri yardımıyla, kesilerek ayrı kavanozlardaki 500ml'lik yeni çaylara eklendi.
- Kavanozların ağzı, steril gazlı bez ile kapatıldı ve lastikle sabitlendi.
- Örnekler etüvde, 28 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.

3.3. METAGENOMİK DNA İZOLASYONU

Adana'dan temin edilmiş iki Kombucha örneğinden üçer adet 500 ml'lik yeni çaylar hazırlanmıştır. Bu çayların her biri, belirlenmiş örnek alım zamanlarından yalnızca birinde DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Metagenomik DNA izolasyonları 3., 10., ve 15. günlerde gerçekleştirilmiştir.

Belirtilen örneklem günlerinde, sıvı faz örneklerinden metagenomik DNA izolasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Kombucha'nın sıvı fazı (500 ml) pelikül fazından ayrıldı ve 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 2 ml TE buffer eklenerek vortekslendi.
- 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 250 u Lyticase (Sigma), 25 u Mutanolysin (Sigma) ve 1000 u Lysozyme (Sigma) içeren 1 ml TES buffer [50 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8), %8.7 süzkroz] eklendi.
- Karışım 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine PF1 lizis tampon çözeltisinden (Powerfood Microbial DNA Isolation Kit) 450 µl eklenerek pellet çözöldü.
- Karışım Powerfood Mikrobiyal DNA İzolasyon Kit'inin mikro boncuk içeren tüplerine konularak üzerine %2 (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP) eklendi.

- 70 °C’de 1 saat inkübe edildi ve her 10 dakikada bir vortekslendi.
- İnkübasyonu tamamlanan örneğin üzerine 100 µl PF2 tampon çözeltisi (Powerfood Mikrobiyal DNA İzolasyon Kiti) eklendi.
- Sonraki aşamalar Powerfood Mikrobiyal DNA İzolasyon Kiti’nde belirtilen standart protokol uygulanarak tamamlandı.

Pelikül örneklerinden metagenomik DNA izolasyonu için ise aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- Yeni oluşan pelikül tabakası eskisinden ayrılarak steril bir blendera eklendi.
- Üzerine 200 ml asetat tampon çözeltisi (1M, pH:5) eklenerek 30 saniye fiziksel parçalamaya tabi tutuldu.
- Karışım blenderdan alınarak üzerine 500 u selüloz (Sigma) eklendi ve 40 °C’de 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 6000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Bundan sonraki aşamalar ise sıvı faz için uygulanan metagenomik DNA izolasyon protokolünün aynısı uygulanarak gerçekleştirildi.

3.4. YENİ NESİL DİZİLEME ANALİZLERİ

Örneklerdeki bakteriyel çeşitliliğin ampikon dizileme ile analizi için 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesini çoğaltan ve daha önce Klindworth ve diğ., (2013) tarafından önerilen F- 5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3' ve R-5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' primerleri kullanılmıştır. Bu primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonun koşulları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmiştir:

Tablo 3.1: PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen adı	Stok	Hacim (µl)	Final
ddH ₂ O	-	16.4	-
Tampon	10x	2.5	1x
MgCl ₂	25 mM	2	2 mM
dNTP	10 mM	1	0.4 mM
İleri Primer	10 µM	1	0.4 µM
Geri Primer	10 µM	1	0.4 µM
DNA	10 ng/µl	1	1 ng/µl
DNA Polimeraz	5 U/µl	0.1	0.02 U/µl
Toplam		25	

Tablo 3.2: PCR koşulları.

PCR Döngüleri	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94	3 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	30
Bağlanma	53	40 sn	
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	5dk	1

Fungal çeşitliliğin amplicon dizileme ile analizi için ise ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') ve ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') primerleri kullanılmıştır. PCR için Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de belirtilen miktar ve koşullar uygulanmıştır. PCR sonucu elde edilen ampliconlar agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) kiti kullanılarak üretici tarafından önerilen protokol izlenerek saflaştırılmıştır. İleri primerlerinde barkod dizilerini taşıyan farklı örneklere ait saflaştırılmış bu ampliconların DNA konsantrasyonları ölçülmüş ve her amplicondan eşit miktarda içeren bir amplicon havuzu oluşturulmuştur. Bir havuzda toplanan ampliconlar, Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) kullanılarak ve üretici tarafından önerilen protokol izlenerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ampliconlar, Illumina Truseq DNA Library Preparation kiti kullanılarak ve üretici tarafından önerilen protokol izlenerek dizilemeye hazır hale getirilmiştir. Örnekler, Illumina MiSeq platformunda, 2x300 bp Paired End Dizileme kiti kullanılarak dizilenmiştir.

Shotgun metagenomik örnekleri ise Illumina Nextera XT Library Preparation kiti kullanılarak dizilemeye hazırlanmıştır. Bu kit, DNA örneklerinin Illumina platformlarında dizilenmeye uygun uzunluklara getirilecek şekilde rasgele kesilmesini ve uçlarına örneklere özgü barkod dizilerinin eklenmesini sağlamaktadır. Kütüphanesi hazırlanan örneklerin kalite kontrolü yapıldıktan sonra dizileme işlemine geçilmiştir. Kütüphane hazırlama işlemi sonrası kalite kontrol analizlerinin sonuçları EK-1'de gösterilmiştir. Kalite kontrolü geçen örneklerin dizilenmesi için Illumina HiSeq X Ten cihazı ve 2x150 bp Paired End Dizileme kiti kullanılmıştır.

3.5. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

3.5.1. Kalite Kontrol ve Filtrelemeler

Shotgun dizileme ile elde edilen DNA dizileri, EBI Metagenomics (EMG) Pipeline 4.1 (Mitchell ve diğ., 2018) kullanılarak kalite kontrol aşamalarından geçirilmiş ve filtrelenmiştir. Buna göre öncelikle paired-end olarak elde edilen diziler SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>) programının varsayılan parametreleri kullanılarak birleştirilmiştir. Birleştirilen dizilerdeki adaptör dizilerinin kaldırılması, dizilerin uzunluklarına göre filtrelenmesi, trimlenmesi ve belirsiz bazlar içerenlerin elenmesi aşamalarında ise Trimmomatic (Bolger ve diğ., 2014) programı kullanılmıştır. Bu filtrelemelerde uzunluğu 100 bp'den kısa olan ya da %10'dan fazla belirsiz baz içeren diziler elenmiştir. Ayrıca dizilerin uçları kalite skor değeri 15'in altına düşen pozisyondan itibaren trimlenmiştir.

BP3 örneği için elde edilen ilk shotgun dizileme sonuçlarında, SSU rRNA ve LSU rRNA temelli analizlerin büyük farklılıklar gösterdiği tespit edilince, bu farklılıkların muhtemel nedenleri araştırılmıştır. Normal şartlarda beklenenin aksine, SSU rRNA dizi sayısının LSU rRNA dizi sayısına kıyasla oldukça yüksek olması, BP3 örneğinde 16S rRNA geni amplikon konyaminasyonu olabileceğini düşündürmüştür. Bu ihtimalin test edilmesi için, SSU rRNA geni dizilerinin, Infernal programı (Nawrocki & Eddy, 2013) ve Rfam 12.2 (CL00111 (SSU) ve CL00112 (LSU) klanlarını içeren aileler) (Nawrocki ve diğ., 2015) kullanılarak oluşturulan bir 16S rRNA geni referans kalıbı üzerindeki başlangıç ve bitiş koordinatları belirlenmiştir. Belirlenen bu koordinatlara göre de başlangıç ve bitiş noktalarının coverage dağılımları belirlenmiştir. Bu analizin gerçekleştirilmesindeki amaç, kalıp üzerindeki herhangi bir başlangıç ya da bitiş noktasında uniform coverage dağılımını bozacak şekilde tepe noktaları bulunup bulunmadığını araştırmaktır. Shotgun dizilemelerde, DNA örnekleri rasgele noktalardan kırıldığı için bu örneklerle ait dizilerin bir gen kalıbı üzerindeki dağılımının da uniform olması beklenir. 16S rRNA gen amplikonu kontaminasyonu olduğunda ise kontaminant amplikonların başlangıç ve bitiş noktaları aynı olacağı için coverage dağılımında tepe noktaları oluştururlar. BP3 örneğinde, beklenildiği şekilde, 338-344 ve 644-700 pozisyonlarında tepe noktaları tespit edilmiştir. Başlangıç veya bitiş koordinatları bu pozisyonlarda olan dizilerin çıkarılmasından sonra tekrarlanan SSU rRNA temelli taksonomik analiz sonuçlarının LSU rRNA temelli sonuçlar ile uyumlu hale geldiği görülmüştür. Böylece BP3 örneğinde, 16S rRNA geni amplikon kontaminasyonu olduğu doğrulanmıştır. Tüm

örneklerin taranmasıyla, dört farklı örneğin (BP3, BP10, BP15, AS15) daha aynı pozisyonda tepe noktaları içerdiği tespit edilmiştir. Tespit edilen bu örneklerden dördü (BP3, BP10, BP15, BS3) için shotgun dizilemeler tekrarlanmış ve yeni dizileme sonuçlarda herhangi bir kontaminasyon olmadığı teyit edilmiştir. Diğer taraftan, mevcut DNA materyali yeterli olmadığından AS15 örneği için dizilemeyi tekrarlamak mümkün olmamıştır. Bu örnekteki kontamine 192,767 dizi, yukarda açıklanan dekontaminasyon protokolü ile ham verilerden uzaklaştırılmış ve 205,987,301 diziden oluşan temiz diziler, Avrupa Nükleotid Arşivi'ne (ENA) yüklenmiştir. Uygulanan bu dekontaminasyon protokolünün verimliliği ise, yeniden dizilenen dört örneğe ait dekontaminasyon protokolü uygulanmış sonuçlarla yeni dizileme sonuçları arasındaki karşılaştırmalarla teyit edilmiştir.

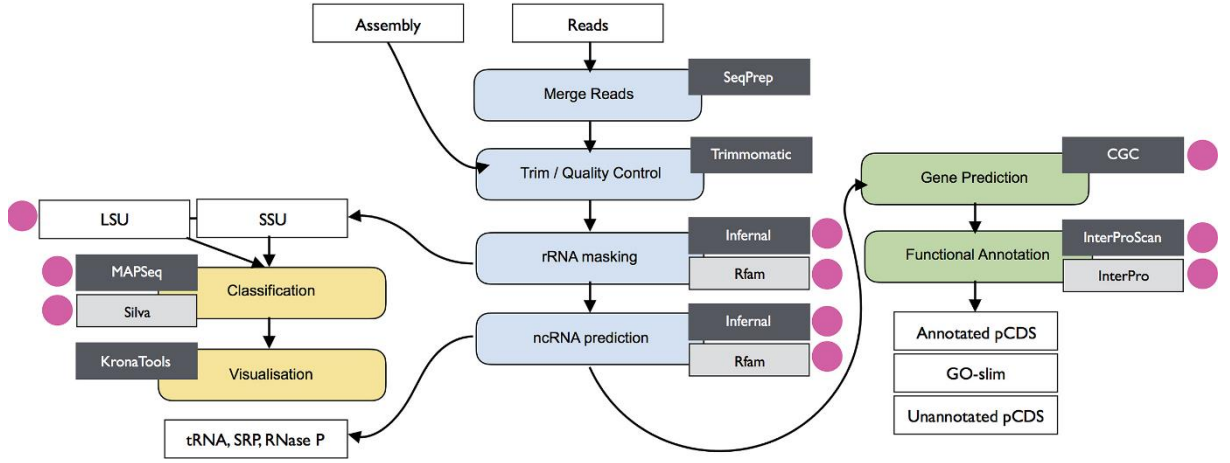
Amplikon dizileme sonuçlarının kalite kontrol analizleri ise QIIME2 ile gerçekleştirilmiş ve analizlerde varsayılan parametreler kullanılmıştır.

Bu çalışmada üretilen amplikon dizileme (16S rRNA geni ve ITS1) sonuçları ERP104502, shotgun dizileme sonuçları ise ERP024546 erişim numaraları altında ENA'da mevcuttur. Bu çalışma kapsamında analiz edilen her örneğe ait ENA erişim numaraları EK-2'de sunulmuştur.

3.5.2. Taksonomik Analizler

Shotgun dizileme verilerinin taksonomik analizinde EMG Pipeline 4.1 (<http://www.ebi.ac.uk/metagenomics>) kullanılmıştır (Şekil 3.2). Buna göre öncelikle kalite kontrolden geçen dizilerden rRNA genlerini kodlayanlar tespit edilerek diğerlerinden ayrılmıştır. Ayrılan bu rRNA gen dizilerinin sınıflandırılması için MAPSeq programı (Matias Rodrigues ve diğ., 2017) ve SILVA v128 veri tabanı (Quast ve diğ., 2013) kullanılmıştır. Ek olarak, shotgun metagenomik verisinden ITS temelli taksonomik analizler de gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle ITSx adlı program kullanılarak, ham verilerden ITS dizileri ayrılmıştır (Bengtsson-Palme ve diğ., 2013). Ayrılan bu ITS dizilerinin analizinde ise QIIME (Caporaso ve diğ., 2010) ve UNITE QIIME (versiyon 7.2) veri tabanı (UNITE Community, 2017) kullanılmıştır.

16S rRNA gen amplikon dizilerinin analizinde QIIME2 (<https://qiime2.org/>) ve SILVA v128 veri tabanı (Quast ve diğ., 2013), ITS1 amplikon analizinde QIIME (Caporaso ve diğ., 2010) ve UNITE QIIME (versiyon 7.2) veri tabanı (UNITE Community, 2017) kullanılmıştır.



Şekil 3.2: EBI Metagenomics analiz akışı (Mitchell ve diğ., 2018).

3.5.3 Metagenom Kurulum (Assembly) Analizleri

Metagenom kurulum analizlerinde, metaSPAdes v3.12.0 (Nurk ve diğ., 2017) programının varsayılan parametreleri kullanılarak kontig dizileri elde edilmiştir. Daha sonra varsayılan parametrelerle BWA (Li & Durbin, 2009) programı kullanılarak, ham veriler elde edilen kontiglere sıralanmıştır. Böylece her bir kontigin sahip olduğu ortalama coverage belirlenmiştir. Belirlenen bu coverage değerleri, kontiglerin tetranükleotid frekansları ile birlikte, aynı genomdan geldiği düşünülen kontiglerin gruplanmasında kullanılmıştır. “Binning” adı verilen bu analiz MetaBat2 (Kang ve diğ., 2015) programı ile gerçekleştirilmiş ve minimum kontig uzunluğu olarak 2000 bp seçilmiştir. Binning analizi sonucunda, aynı genomdan geldikleri tahmin edilen kontigleri içeren ve “bin” adı verilen kontig kümeleri oluşturulmuştur. Oluşturulan binlerin sonraki analiz basamaklarında kullanılması için öncelikle kalite kontrollerinin yapılması gerekmektedir. Bir binin mevcut referans veri tabanlarındaki filogenetik belirteç gen setlerini ne oranda içerdiği onun tamlığını, bu belirteç genlerin mevcut filogenetik ağaca uyumluluğu ise kontaminasyon oranını tespit etmeye yaramaktadır. Bu çalışmada elde edilen binlerin tamlık ve kontaminasyon oranları, CheckM (Parks ve diğ., 2015) programı ile belirlenmiştir. Böylece oluşturulan binlerin kalitelerine göre değerlendirilebilmesi mümkün olmuştur. Bunun için bütün örneklerden elde edilen binler bir havuzda toplanmıştır. Böylece farklı örneklem zamanlarında tekrar eden binlerin de tespit edilebilmesi ve en yüksek kaliteye sahip olanın seçilerek kullanılması (dereplikasyon) amaçlanmıştır. dRep (Olm ve diğ., 2017) kullanılarak gerçekleştirilen bu analizlerde, birincil kümeleme için %60 benzerlik oranı, ikincil kümeleme için ise %95 benzerlik oranının kullanılmıştır. İkincil kümeleme için kullanılan %95 benzerlik oranı aynı türe ait olan binler arasından en yüksek kalitede olanı

seçmek için kullanılan standart parametredir. Dereplikasyon analizi ile elde edilen yüksek kaliteli binlerin mevcut referans veri tabanlarındaki genomlar ile ne kadar benzerlik gösterdiği, incelenen örneklerdeki türlerin tespiti için önem arz etmektedir. Bu nedenle elde edilen yüksek kaliteli binler, 2018 yılı Ocak ayına kadar rapor edilmiş NCBI referans bakteriyel ve fungal genomlar ile karşılaştırılmıştır. Mash (Ondov ve diğ., 2016) programı ile gerçekleştirilen bu analizlerde, bu binlere en yakın referans genomlar tespit edilmiştir. Binlerin, tespit edilen en yakın referans genomla benzerlik oranları ise dnadiff (Kurtz ve diğ., 2004) programı ile hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sayesinde, elde edilen binlerin daha önce rapor edilmiş herhangi bir bakteriyel ya da fungal türe ait olup olmadığı belirlenebilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, aynı türe ait olan genomlar arasındaki ortalama benzerlik oranının %95'in üzerinde olması (Jain ve diğ., 2017) ve referans genomun en az %60'ı ile eşleşmenin gerçekleşmesi gerektiği (Varghese ve diğ., 2015) rapor edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma kapsamındaki analizlerde de bu kıstaslar takip edilerek analizler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her bindeki kontigler, QUAST (Gurevich ve diğ., 2013) programıyla en fazla benzerlik gösterdiği referans genoma sıralanarak görselleştirilmiştir. Böylece Mash ve dnadiff sonuçları görsel olarak da incelenerek, taksonomik değerlendirmeler yapılmıştır. Taksonomik analizlerden sonra belirlenmiş bu en yüksek kalitedeki binlerin gen tahminleri ve işlevsel analizlerine geçilmiştir. dRep programı sadece bakteriyel binlerin kümelenmesinde kullanılabildiği için fungal genomların bu program ile kümelenmesi mümkün olmamıştır. Bunun yerine, oluşturulan binlerin tamamı fungal referans genomlar ile karşılaştırılmış ve genom benzerlik oranları belirlenmiştir. En yüksek kaliteli fungal binin seçiminde ise referans genomu kaplama oranı dikkate alınmıştır.

3.5.4. Plazmid Metagenom Analizleri

Kontig dizileri en yakın referans genom olan *K. rhaeticus* AF1'e sıralandığında, referans genom ile eşleşmenin olmadığı bazı boşluk bölgelerinin varlığı dikkat çekmiştir. Bu bölgelerin referans genom üzerindeki birden fazla kopya halinde bulunan rRNA genleri ya da tekrar bölgelerinden kaynaklı olup olmadığını anlamak için referans genom üzerindeki rRNA geni kodlayan bölgeler ile tekrar bölgelerinin koordinatları belirlenmiştir. Bu analizler için BLAST (Altschul ve diğ., 1990) ve Tandem Repeats Finder (Benson, 1999)'dan yararlanılmıştır. Ayrıca metagenom binning işlemi ile oluşturulan genomlara plazmidlerin dahil edilemediği bilindiği için (Beaulaurier ve diğ., 2018) referans izolat genomunun içerdiği muhtemel plazmid dizilerinin

bu boşluklara sebep olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle de *K. rhaeticus* AF1 referans genomundaki plasmidler PlasFlow (Krawczyk ve diğ., 2018) programı ile araştırılmıştır.

Metagenom kurulum sonuçlarındaki muhtemel plasmid kontigleri de yine PlasFlow ile belirlenmiş ve diğer kontiglerden ayrı analiz edilmiştir. Bu plazmidlerin taksonomik profilleri, NCBI Plasmid Genom Veri Tabanı'ndaki 6113 plasmid genomu ile yapılan karşılaştırmalarla belirlenmiştir. BLAST kullanılarak gerçekleştirilen bu karşılaştırmalarda, minimum benzerlik oranı %95, minimum eşleşen baz sayısı ise minimum 90 olarak belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2011).

3.5.5. İşlevsel Analizler

Kombucha metagenomlarının gen tahmini ve işlevsel anotasyonları, hem ham dizi temelli hem de kontig temelli yöntemler kullanılarak tamamlanmıştır:

Ham dizilere dayanan yöntemde EMG Pipeline v4.1 kullanılmıştır. EMG Pipeline kalite kontrolden geçmiş ham verilerde, FragGeneScan (Rho ve diğ., 2010) ile kodlayan dizi tahminini içermektedir. Daha sonra InterPro 64.0 veritabanına dayanan InterProScan (Jones ve diğ., 2014) programıyla da bu kodlayan dizilerin işlevsel anotasyonlarını ve GO terim atamaları yapılmaktadır. InterProScan'ın ürettiği sonuçlar, GO-slim (Courtot ve diğ., 2016) ile derlenerek öne çıkan GO terimleri özetlenmiştir.

Kontig temelli yöntemde ise kurulum işlemi ile elde edilen kontiglerin işlevsel anotasyonları yapılmıştır. Bu yöntem, inşa edilmiş yüksek kaliteli binlerde ve plasmid metagenomunda gen tahmini ve işlevsel anotasyonlar için kullanılmıştır. Gen tahminleri, bakteriyel binler ve plasmid metagenomunda Prokka 1.4.0 (Seemann, 2014), fungal genomda ise WebAUGUSTUS (Hoff & Stanke, 2013) ile gerçekleştirilmiştir. Tahmin edilen genlerin işlevsel karakterizasyonu ve rol aldıkları önemli yolların belirlenmesinde ise GhostKOALA (Kanehisa ve diğ., 2016) modülleri ve GenomeProperties (Haft ve diğ., 2013) kategorileri kullanılmıştır. Elde edilen GhostKoala sonuçları GAEV ile derlenerek tahmin edilen genlerin en fazla hangi KEGG yollarını zenginleştirdiği de incelenmiştir (Huynh ve Xu, 2018).

3.5.6. Sekonder Metabolit Gen Kümelerinin Taranması

İşlevsel analizlerde sekonder metabolit sentez yollarının zenginleştiği belirlendikten sonra, yüksek kaliteli genom binlerinin ile plazmidlerin içerdiği muhtemel sekonder metabolit gen

kümelerinin incelenmiştir. Bu analizler için, genom binleri ve her bir örneğe ait plazmidler antiSMASH 4.0 (Blin ve diğ., 2017) kullanılarak incelenmiştir. Tahmin edilen sekonder metabolit gen kümeleri derlenerek muhtemel işlevleri ve daha önce rapor edilmiş gen kümeleri ile benzerlikleri değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. FERMENTASYON VE METAGENOMİK DNA İZOLASYONU

Kombucha örneklerinin fermentasyonu 15 gün sürdürülmüştür. Fermentasyon sürecinde, sıvı yüzeyinde yeni bir selülozik pelikül tabakası oluşmaktadır. Örnek alım günlerindeki pelikül gelişimi Şekil 4.1’de gösterilmiştir:



Şekil 4.1: Kombucha fermentasyonunun 3., 10. ve 15. günlerindeki pelikül gelişimi.

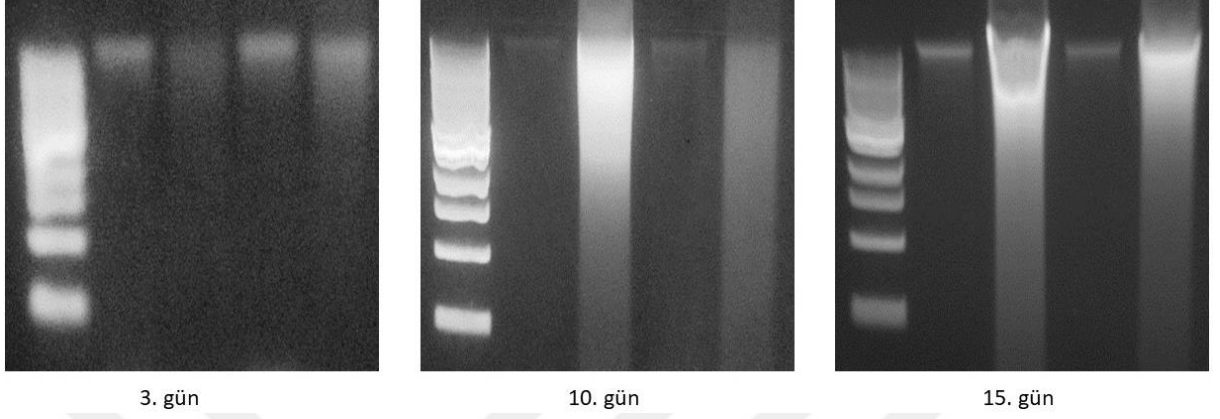
Metagenomik DNA izolasyonları, fermentasyonun 3., 10. ve 15. günlerinde, hem sıvı fazdan hem de pelikülden örnekler alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerden izole edilen DNA’ların konsantrasyonları, spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları.

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280	260/230
AS3	52	2,01	1,60
AP3	18	1,70	1,49
BS3	45	1,96	1,47
BP3	26	1,79	1,56
AS10	38	1,86	1,58
AP10	68	1,94	1,45
BS10	19	1,77	1,58
BP10	40	2,05	1,55
AS15	22	1,92	1,71
AP15	251	1,90	1,82
BS15	25	1,99	1,52
BP15	165	1,84	1,66

*Örnek adlandırmalarında; ilk harf iki Kombucha örneğinden (A ve B) hangisi olduğunu, ikinci harf çalışılan fazı (Sıvı ya da Pelikül), sondaki sayılar ise örnek alınan günleri (3, 10, 15) göstermektedir.

Spektrofotometre ölçümlerine ek olarak, metagenomik DNA izolasyon sonuçları, %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: DNA izolasyon sonuçlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri (sağdan sola; lane 1: 1k ladder (NEB), lane 2: A örneği sıvı faz, lane 3: A örneği pelikül, lane 4: B örneği sıvı faz, lane 5: B örneği pelikül).

Metagenomik DNA izolasyonu aşaması tamamlandıktan sonra, örnekler NGS amplicon ve shotgun dizilemeleri için ikiye ayrılmıştır. Amplicon dizileme örnekleri, hedef gen bölgelerini çoğaltılabilmesini sağlayan ve örneğe spesifik etiket diziler taşıyan primerler ile çoğaltılmış, bir amplicon havuzunda toplanmış ve Illumina MiSeq platformunda dizilenmiştir. Shotgun dizileme örnekleri ise dizilemeye uygun uzunlukta fragmanlara kırıldıktan sonra, kütüphane hazırlama ve kalite kontrol aşamaları uygulanmıştır. Örneklerin dizilemeye uygun olduğunu teyit eden kalite kontrol sonuçları EK-1'de gösterilmiştir. Kalite kontrolü geçen shotgun dizileme örnekleri Illumina HiSeq X Ten platformunda dizilenmiştir.

4.2. BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI

4.2.1. Kalite Kontrol ve Filtreleme

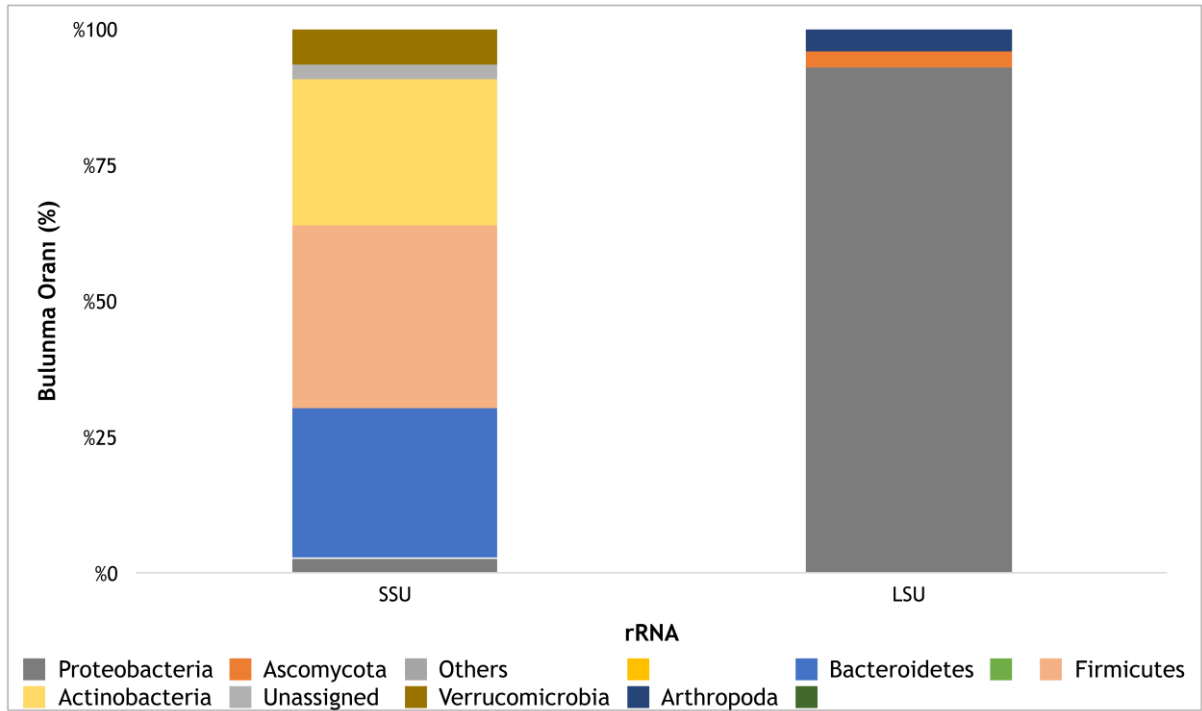
Shotgun dizilemeler sonucunda toplam yaklaşık 2.3 milyar DNA dizisi elde edilirken, 16S rRNA geni amplicon dizilemesinden yaklaşık 1.9 milyon, ITS1 amplicon dizilemesinden ise yaklaşık 1.8 milyon DNA dizisi elde edilmiştir. Örnek başına elde edilen ham dizi sayısı ve kalite kontrol filtrelemeleri sonrasında kalan dizi sayısı Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Buna göre ham shotgun dizilerinin ortalama %13'ü, 16S rRNA amplicon dizilerinin %5'i ve ITS amplicon dizilerinin %2'si kalite kontrol aşamalarında filtrelenmiştir.

Tablo 4.2: Shotgun ve ampikon dizileme sonuçlarının genel istatistikleri.

Örnek	Gün	Faz	Toplam Dizi Sayısı (M)			Kalan Dizi Sayısı (M)		
			WMS	16S	ITS	WMS	16S	ITS
AS3	3	Sıvı	194.51	0.18	0.15	172.80	0.17	0.15
AP3	3	Pelikül	195.96	0.23	0.15	174.43	0.22	0.15
BS3	3	Sıvı	189.89	0.16	0.14	174.41	0.15	0.14
BP3	3	Pelikül	235.82	0.20	0.14	206.73	0.19	0.13
AS10	10	Sıvı	208.10	0.11	0.12	169.91	0.10	0.12
AP10	10	Pelikül	211.19	0.16	0.17	185.57	0.16	0.16
BS10	10	Sıvı	152.60	0.13	0.16	123.97	0.12	0.16
BP10	10	Pelikül	151.28	0.16	0.17	138.07	0.15	0.17
AS15	15	Sıvı	205.99	0.09	0.14	178.39	0.09	0.14
AP15	15	Pelikül	208.18	0.15	0.13	182.37	0.14	0.13
BS15	15	Sıvı	172.38	0.11	0.15	144.83	0.11	0.15
BP15	15	Pelikül	149.55	0.17	0.18	139.97	0.16	0.18

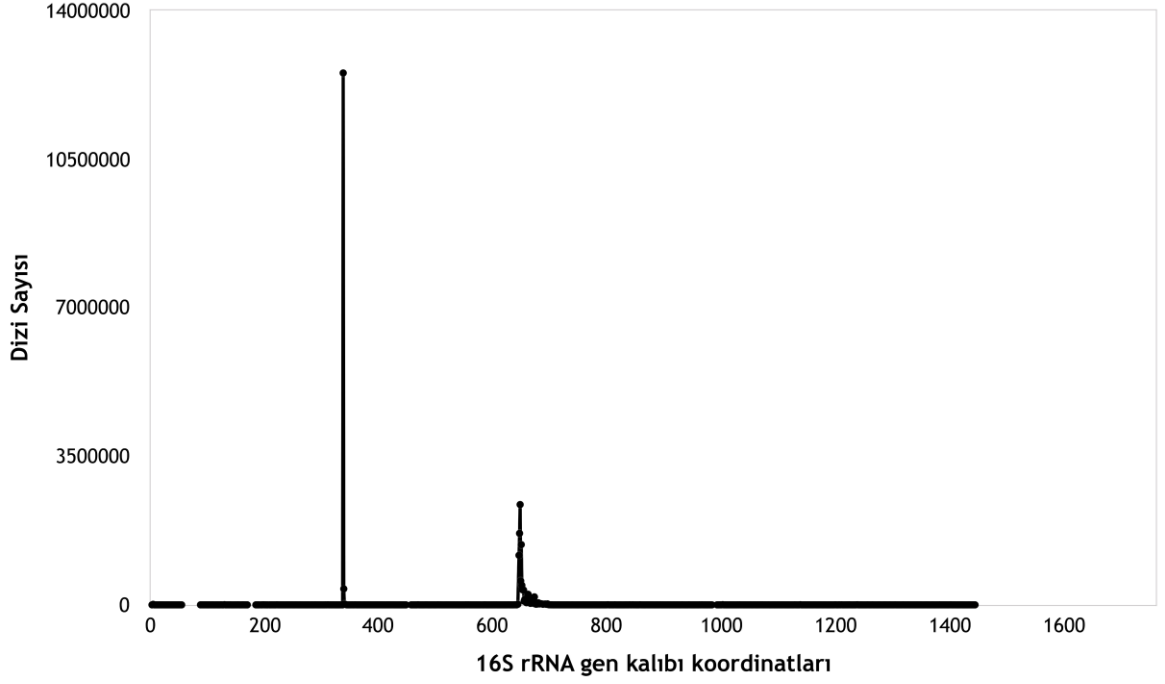
*WMS: Tüm metagenom (shotgun) dizileme, ITS: Internal Transcribed Spacer, M: milyon

Kalite kontrol analizleri sonrasında yapılan ilk taksonomik analizlerde, BP3 örneğine ait SSU rRNA geni temelli sonuçlar ile LSU rRNA geni temelli sonuçlar arasında uyumsuzluk olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

**Şekil 4.3:** BP3 için SSU ve LSU rRNA geni temelli taksonomik analiz sonuçları.

Şekil 4.3'te görülen bu uyumsuzluğun muhtemel nedenlerini belirlemek amacıyla, bu örneğe ait rRNA gen dizileri detaylı incelenmiştir. SSU rRNA gen dizi sayısının, shotgun dizileme

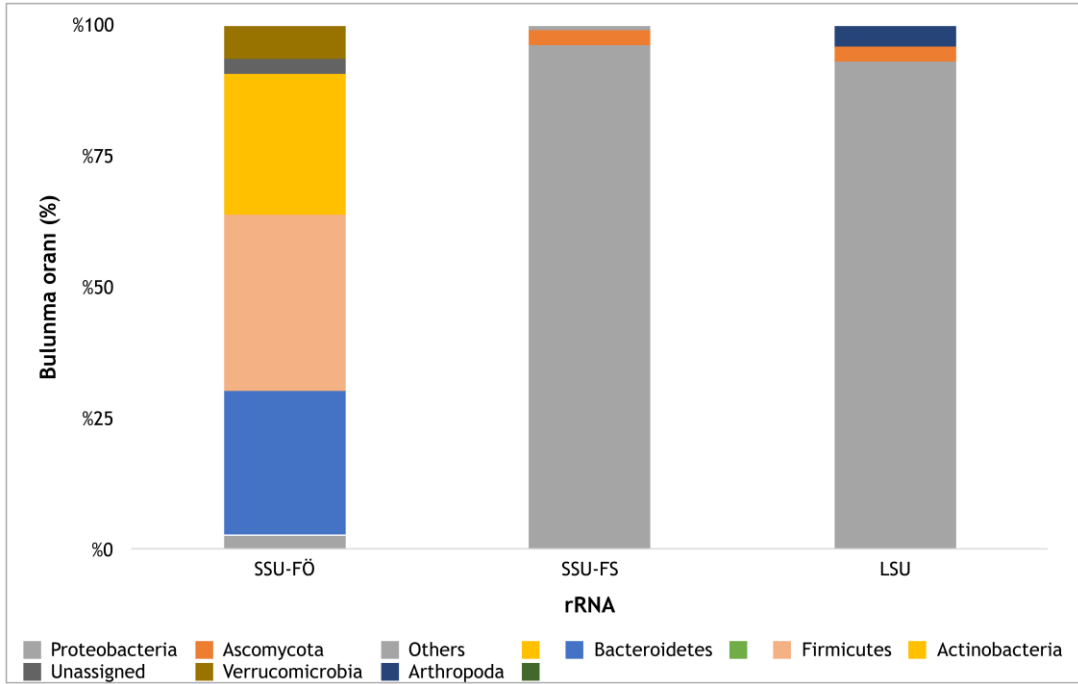
sonuçlarında ortalama %0.2 oranında bulunması beklenirken BP3 örneğinde bu oranının %13 oranında olması, muhtemel bir 16S rRNA geni ampikon kontaminasyonu varlığını düşündürmüştür. Bu nedenle, BP3 örneğindeki rRNA gen dizileri tespit edilerek diğer dizilerden ayrılmıştır. Daha sonra bu dizilerin, bir 16S rRNA gen kalıbı üzerindeki başlangıç-bitiş koordinatları belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Shotgun dizileme örneklerinde elde edilen dizilerin başlangıç ve bitiş koordinatlarının dağılımı.

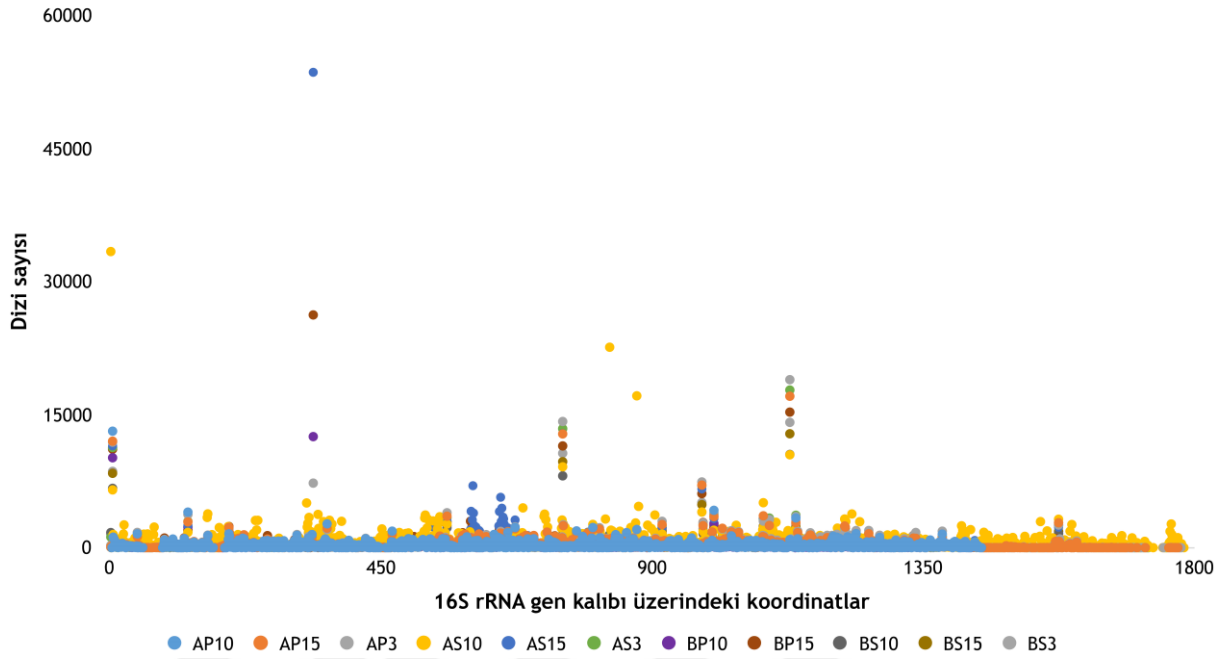
Koordinat dağılımında görülen tepe noktaları, oldukça yüksek sayıda başlangıç (338-344) ve bitiş koordinatları (644-704) aynı olan rRNA gen dizilerinin varlığını göstermiştir. Bu durum BP3 örneğinde, 16S rRNA geni ampikon kontaminasyonuna işaret etmektedir.

BP3 örneğinde, başlangıç ya da bitiş koordinatları yukarıda belirtilen tepe noktalarında olan rRNA gen dizileri filtrelenerek taksonomik analizler tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, SSU ve LSU rRNA geni temelli analiz sonuçlarının uyumlu hale geldiğini göstermiştir (Şekil 4.5).



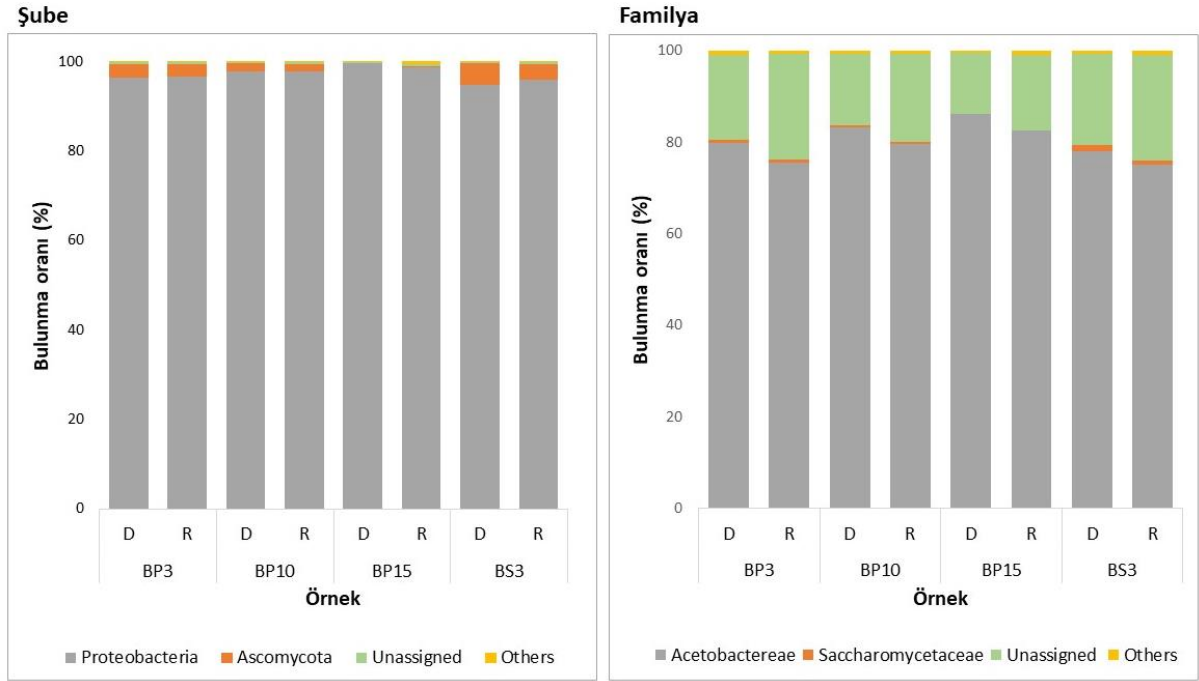
Şekil 4.5: BP3 örneğinde filtreleme öncesi (SSU-FÖ) ve filtreleme sonrası (SSU-FS) SSU ile LSU rRNA geni temelli temelli analiz sonuçları.

BP3 örneğinde belirlenen tepe noktalarının diğer örneklerde de bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla, bütün shotgun örnekleri aynı yöntemle taranmıştır (Şekil 4.6). rRNA gen dizilerinin koordinat dağılımları incelendiğinde, BP10, BP15, BS3 ve AS15 örneklerinde de benzer tepe noktalarının varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6: BP3 örneği çıkarıldıktan sonra koordinat dağılımları.

Yapılan bu analizler ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda, 5 shotgun örneği için dizilemenin tekrarlanmasına karar verilmiştir. Böylece BP3, BP10, BP15 ve BS3 örnekleri yeniden dizilerek analiz edilmiştir. Ancak yeterli metagenomik DNA bulunmadığı için AS15 örneğini yeniden dizilemek mümkün olmamıştır. Bu nedenle, AS15 örneğindeki kontaminant ampikon dizilerinin yukarıda açıklanan dekontaminasyon protokolü ile filtrelenmesine karar verilmiştir. Uygulanan bu protokolün ne kadar verimli çalıştığı ve sonuçlarda herhangi bir sapmaya neden olup olmadığı ise yeniden dizilenmiş 4 shotgun örneğine (BP3, BP10, BP15 ve BS3) ait taksonomik analiz sonuçlarının, aynı örneklere ait dekontaminasyon protokolü sonrası taksonomik analiz sonuçlarıyla karşılaştırmalar yapılarak incelenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: BP3, BP10, BP15, BS3 örnekleri için dekontaminasyon ve yeniden dizileme sonuçları (D: Dekontaminasyon uygulanmış örnek, R: Yeniden dizilenmiş örnek).

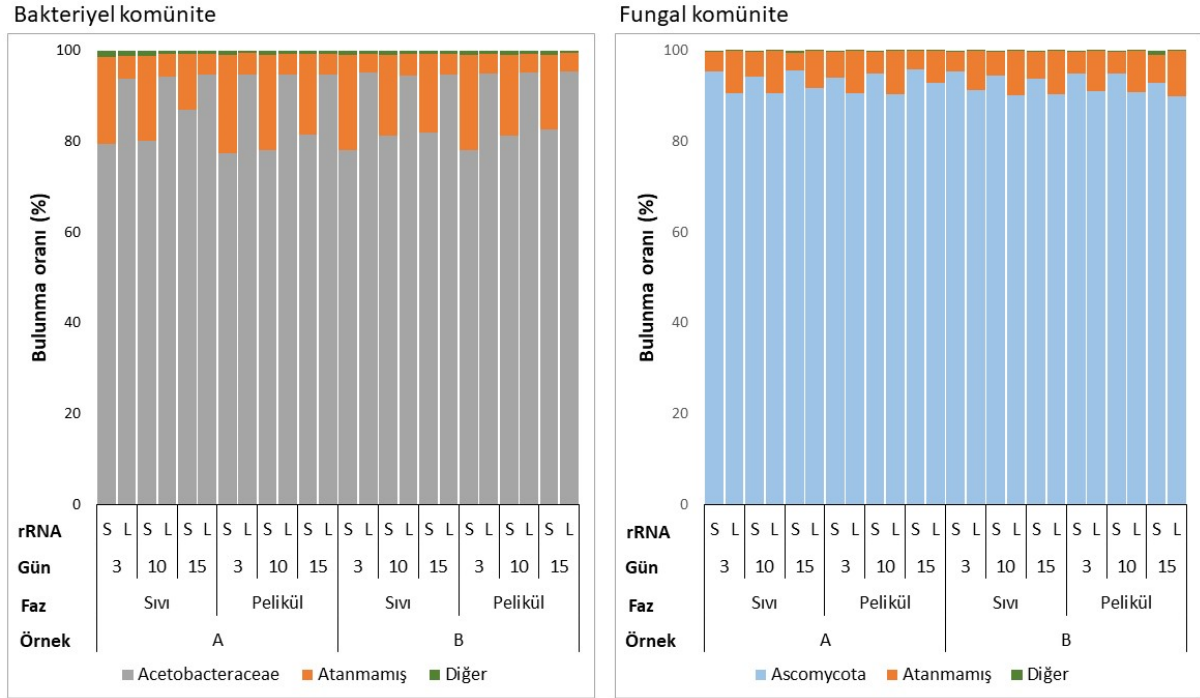
Yapılan karşılaştırmalar, dekontaminasyon protokolü sonrası taksonomik analizler sonuçlarının, yeniden dizileme verileri kullanılarak yapılan taksonomik analiz sonuçları ile uyumlu olduğunu ve herhangi bir sapmaya yol açmadığını teyit etmiştir. Böylece ham AS15 verilerine dekontaminasyon protokolü uygulanması ve temizlenmiş ham verilerin sonraki analiz basamaklarında kullanılması uygun görülmüştür. AS15 örneğine ait temizlenmiş ham veriler ENA veri tabanına yüklenmiştir.

4.2.2. Taksonomik Analizler

Shotgun dizileme verilerinin taksonomik analizleri için EMG Pipeline 4.1 (Mitchell ve diğ., 2018b) kullanılmıştır. LSU rRNA ve SSU rRNA gen dizilerinin analizine dayanan bu yöntemle elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Buna ek olarak, spesifik olarak fungal komünitenin analizi için ITS temelli taksonomik analizler de gerçekleştirilmiştir.

Hem LSU rRNA hem de SSU rRNA geni temelli taksonomik analizler, incelenen örneklerde 8 farklı bakteriyel şubenin varlığını göstermiştir (En az bir örnekte minimum 50 okuma alt limit olarak alınmıştır): *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. Bütün fermentasyon günlerinde ve fazlarda %99’un üzerinde bulunan baskın şube olarak ise *Proteobacteria* öne

çıkıştır. Bakteriyel komünitenin rRNA temelli taksonomik analizlerinde cins düzeyinde çözünürlüğe ulaşamadığı için ailya düzeyindeki sonuçlar incelenmiştir (Şekil 4.8). rRNA gen dizilerinin ortalama %82'si ailya düzeyinde sınıflandırılabilmiş ve sınıflandırılabilen bu okumaların %99'unun *Acetobacteraceae* ailyasına ait olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.8: Kombucha örneklerindeki bakterilerin (ailya düzeyinde) ve fungusların (şube düzeyinde) görece bulunma oranları (Bulunma yüzdesi herhangi bir örnekte %1'in üzerinde olan ailya ve şubeler gösterilmiştir.).

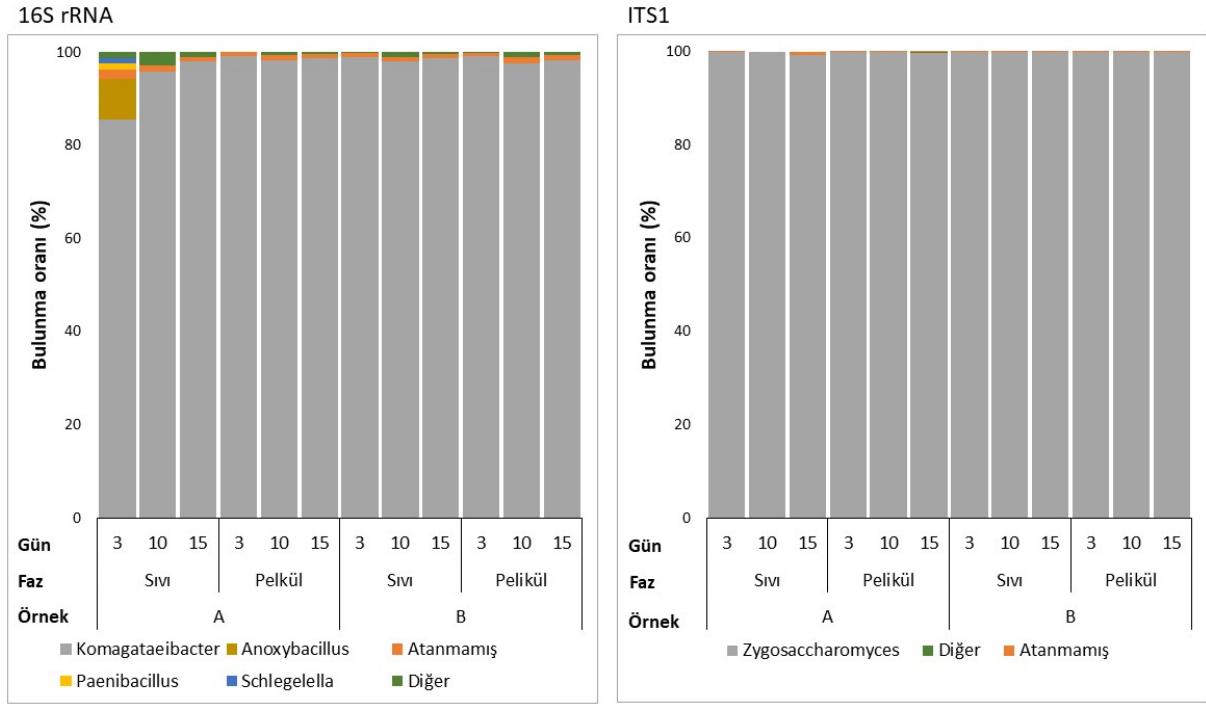
Hem LSU rRNA hem de SSU rRNA temelli fungal taksonomik analizler, incelenen Kombucha örneklerinin tüm gün ve fazlarında, *Ascomycota* (>80%) şubesinin baskın olduğunu göstermiştir (Şekil 4.9). ITS temelli analizlerle ise daha yüksek çözünürlük elde edilerek, *Zygosaccharomyces* cinsinin bütün örneklerde %99'un üzerinde bulunduğu belirlenmiştir.

Shotgun dizileme yöntemiyle bakteriyel ve fungal çeşitliliğin aynı anda incelenebilmesi mümkün olduğu için farklı fermentasyon günlerindeki bakteri/fungus (BF) oranları da izlenebilmiştir. Yapılan analizlerde BF oranının, örnekler yada fazlar arasında tutarlı değişimler göstermediği belirlenmiştir (Tablo 4.3). A örneğinin sıvı fazında, 3. ve 10. fermentasyon günleri arasında önemli oranda düşüş gösteren BF oranı, 10. ve 15. günler arasında ise tekrar yükselmiştir. Değişim miktarı görece daha düşük olmakla birlikte benzer bir değişim trendi A örneğinin pelikül fazı ile B örneğinin sıvı fazında da gözlenmiştir. Buna karşılık B örneğinin pelikül fazında, farklı fermentasyon günlerinde herhangi bir değişim görülmemiştir.

Tablo 4.3: Kombucha örneklerindeki bakteri ve fungusların bulunma yüzdeleri ve BF oranları.

Örnek	Faz	Gün	rRNA	Bakteri (%)	Fungus (%)	BF
A	Liquid	3	SSU	95,13	4,10	23,20
			LSU	95,23	3,76	25,33
		10	SSU	25,93	68,32	0,38
			LSU	27,08	61,33	0,44
		15*	SSU	98,33	1,08	91,05
			LSU	98,65	1,04	94,86
	Pellicle	3	SSU	98,63	1,08	91,32
			LSU	98,62	1,13	87,27
		10	SSU	88,09	9,90	8,90
			LSU	88,09	9,90	8,90
		15	SSU	99,68	0,23	433,39
			LSU	99,68	0,23	433,39
B	Liquid	3	SSU	95,82	3,61	26,54
			LSU	95,99	3,39	28,32
		10	SSU	87,31	11,36	7,69
			LSU	88,17	9,91	8,90
		15	SSU	97,80	1,59	61,51
			LSU	98,21	1,46	67,27
	Pellicle	3	SSU	96,57	2,93	32,96
			LSU	96,93	2,59	37,42
		10	SSU	97,66	1,83	53,37
			LSU	98,04	1,59	61,66
		15	SSU	98,72	0,26	379,69
			LSU	99,64	0,23	433,22

Shotgun dizileme temelli taksonomik analizlerin alternatif bir yöntemle karşılaştırılabilmesi amacıyla amplikon temelli taksonomik analizler uygulanmıştır. 16S rRNA geni ve ITS1 bölgesi hedeflenerek yapılan amplikon temelli taksonomik analiz sonuçlarının, shotgun dizileme temelli taksonomik analiz sonuçları ile büyük oranda örtüştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Amplikon dizileme (16S ve ITS1) ile belirlenen bakteriyel ve fungal cinslerin Kombucha örneklerinde bulunma oranları.

Yalnızca AS3 örneğinde *Firmicutes* şubesinin oranı, 16S rRNA geni ampikon analiz sonuçlarında %10.72 olarak tespit edilirken shotgun dizileme sonuçlarında %0.4 olarak belirlenmiştir. AS3 dışındaki bütün örneklerdeki ampikon temelli analizlerde, shotgun dizileme sonuçlarıyla uyumlu olarak, *Proteobacteria* şubesinin %99 oranında bulunduğu belirlenmiştir. Ampikon dizileme temelli detaylı taksonomik analizler, bu dizilerin *Acetobacteraceae* familyasının *Komagataeibacter* cinsine (maksimum:%99.3, min: %85.6) ait olduğunu göstermiştir. ITS temelli ampikon analizlerinde de, shotgun dizileme sonuçlarıyla uyumlu olarak, fungal komünitede baskın cinsin *Zygosaccharomyces* (>%99) olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2. Metagenom Kurulum (Assembly) Analizleri

Kombucha örnekleri için elde edilen metagenom kurulum sonuçlarının özellikleri Tablo 4.4'te gösterilmektedir:

Tablo 4.4: Kombucha örnekleri için genel kurulum istatistikleri.

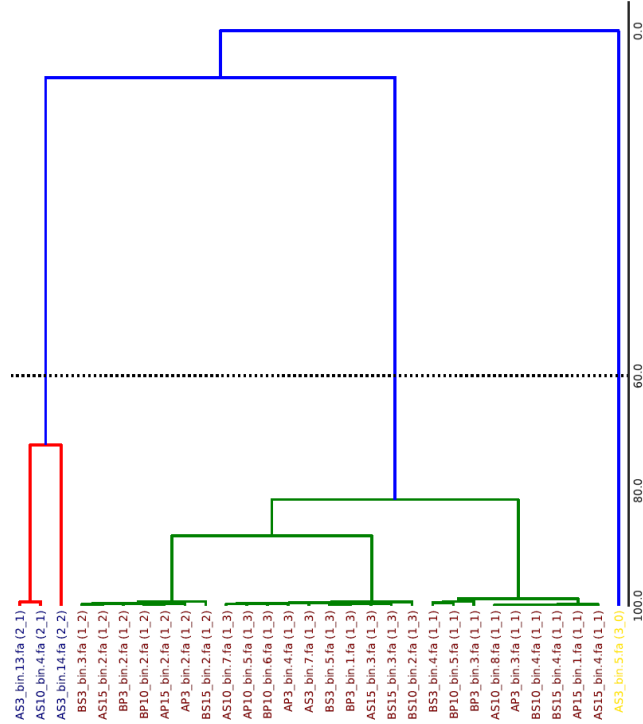
Örnek	Kontig sayısı (>500 bp)	N50	N75	En Uzun Kontig (bp)	Singleton (%)
AS3	12787	23301	3558	260795	0.50
AS10	13207	20937	1544	467680	1.90

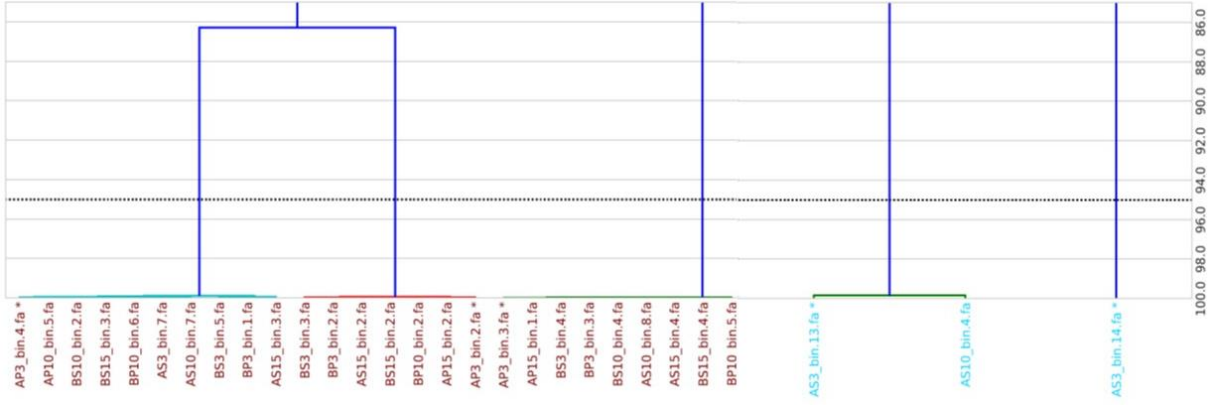
Tablo 4.4 (devam): Kombucha örnekleri için genel kurulum istatistikleri.

AS15	14854	2365	1023	179085	0
AP3	5554	10474	2800	590008	0.48
AP10	7570	25397	4945	288053	0.74
AP15	3588	2193	891	47615	0
BS3	1917	39281	18734	369353	0.58
BS10	5317	57465	14537	234360	1.58
BS15	6479	8558	3124	351057	1.16
BP3	2750	44790	19715	328305	0
BP10	12687	5134	1345	262321	0.71
BP15	1732	58640	22105	351057	0.54

Oluşturulan kontigler taksonomik binning işlemi için kullanılmış ve böylece her örnekteki bin sayısı ve bunların taksonomik özellikleri belirlenmiştir (EK-3).

Binning işleminden sonra dereplikasyon analizi uygulanarak farklı örneklerdeki özdeş binler belirlenmiş ve bu özdeş binler arasından en yüksek kaliteye sahip olan seçilmiştir. Her iki Kombucha örneğinde bütün gün ve faz örneklerinden oluşturulan 75 binden, dereplikasyon analizi 7 yüksek kaliteli bin elde edilmiştir. Dereplikasyon analizlerinde, birincil (minimum %60 benzerlik) ve ikincil (minimum %95 benzerlik) kümeleme analizleri için oluşturulan dendogramlar Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir:

**Şekil 4.10:** Binler için birincil kümeleme analizi sonuçları.



Şekil 4.11: Binler için ikincil kümeleme analizi sonuçları.

Elde edilen yüksek kaliteli 7 binin en fazla benzerlik gösterdiği referans genomlara sıralanma (alignment) yüzdeleri, benzerlik oranları, tamlık oranları ve kontaminasyon yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Yüksek kalitedeki binler ve özellikleri.

Bin	Tamlık (%)	Kontaminasyon (%)	Referans	Mash Score	AF (%)	gANI
AS3_bin2	95.83	0	Vibrio vulnificus	0.30	0	0
AS3_bin3	96.50	0	Komagataeibacter nataicola	0.08	65.57	92.38
AS3_bin5	91.88	1.71	Solibacter usitatus	0.24	0.27	83.21
AS3_bin13	100	0.93	Methylibium petroleiphilum	0.21	12.20	83.96
AS3_bin14	82.66	1.01	Lysobacter antibioticus	0.16	12.72	84.72
AS10_bin7	97.16	0.27	Komagataeibacter rhaeticus	0.01	70.15	99.63
AS10_bin8	97.91	0.66	Komagataeibacter xylinus	0.18	18.84	84.29

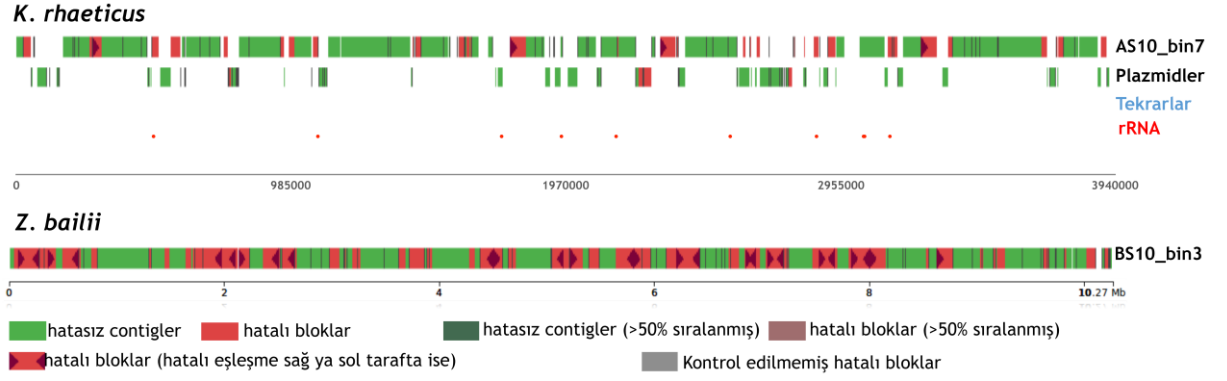
*AF: Aligned Fraction, gANI: Genome Average Nucleotide Identity

Yapılan karşılaştırmalar ve analizler sonucunda, yüksek kaliteli binlerden üçünün (AS3_bin3, AS10_bin7, AS10_bin8), CheckM analizlerinde *Gluconaceobacter*, Mash ve dnadiff analizlerinde *Komagataeibacter* olarak sınıflandırıldığı görülmüştür. *Komagataeibacter* cinsi yakın zamanda *Gluconacetobacter*'den ayrılan bir cins olduğu için biyoinformatik araçlar arasında kullanılan referans veri tabanlarının güncelliğine bağlı olarak böyle bir farklılık ortaya çıkmıştır. Mash analizlerinde genellikle Mash Score değeri 0.05'in altında olan genomların aynı türe ait olduğu tahmin edilir. Buna ek olarak, dnadiff ile karşılaştırılan iki genomun aynı türe ait olması için minimum AF>%60, gANI>%95 benzerlik değerlerine sahip olması beklenir. Bu kıstaslar dikkate alındığında, Kombucha'daki üç *Komagataeibacter* bininden yalnızca birinin (AS10_bin7) daha önce rapor edilmiş bir *Komagataeibacter* rhaeticus genomuna aynı türde olacak kadar benzerlik gösterdiği görülmüştür. Diğer iki *Komagataeibacter* bini ise daha önce

rapor edilmiş *Komagataeibacter* türlerine ait genomlarla aynı tür düzeyinde benzerlik göstermemiştir. Bu binlerin yanında AS3 örneğinde, CheckM analizinde *Bacteria*, *Rubrivivax*, *Lysobacter* ve *Acidobacteriales* olarak sınıflandırılan dört yüksek kalitede bin daha elde edilmiştir. Bu dört bin referans genom veri tabanı ile karşılaştırıldığında, daha önce rapor edilmiş herhangi bir genoma aynı türde düzeyinde benzerlik göstermediği belirlenmiştir. Mash analizlerinde *Vibrio vulnificus*, *Solibacter usitatus*, *Methylibium petroleiphilum* ve *Lysobacter antibioticus* genomlarına atanmakla beraber, bu referans genomlarla oldukça düşük benzerlik oranlarına sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu dört bin yalnızca AS3 örneğinde tespit edildiği için Kombucha'daki işlevsel analizlerde detaylı olarak incelenmemiştir.

Dereplikasyon analizleri için kullanılan biyoinformatik araçlar ökaryotik genomları işlemediği için oluşturulmuş bütün binlerin, kalite değerleri dikkate alınmaksızın, referans fungal genom veri tabanı ile de karşılaştırılmasına karar verilmiştir. Böylece Kombucha örneklerindeki fungal genomların geri kazanılıp kazanılmadığı araştırılmıştır. Mash ve dnadiff ile yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda, bazı binlerin *Zygosaccharomyces bailii* genomu ile kümelendikleri belirlenmiştir. Bu binler arasından en yüksek kaliteye sahip olanı, *Z. bailii* referans genomuna sıralanma oranına göre seçilmiştir. Böylece BS10 örneğine ait bin3'ün en yüksek kaliteli bin olduğu tespit edilmiştir. Bu binin, ortalama %99.78 benzerlik gösterdiği *Z. bailii* CLIB 213^T referans genomunun %98.74'ünü kapladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla binning işlemi ile hem bakteriyel hem de fungal baskın genomların geri kazanılması mümkün olabilmıştır.

Oluşturulan binlerin taksonomik analizleri, bütün Kombucha fermentasyonu boyunca baskın olan ve Kombucha'daki temel metabolik etkileşimleri belirlediği düşünülen üç adet *Komagataeibacter* cinsine ait bakteriyel genom ile bir adet *Z. bailii* genomunun varlığını göstermiştir. Baskın bakteriyel genomlardan birinin *K. rhaeticus* türüne ait olduğu tespit edilirken, diğer iki genomun daha önce rapor edilmiş türlere ait genomlarla benzerlik göstermeyen iki yeni genom olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla öncelikle *K. rhaeticus* ve *Z. bailii* türüne ait genomlarla yüksek benzerlik gösteren binlere ait kontiglerin, referans genomlar üzerindeki dağılımı QUASt aracılığıyla incelenmiş ve genomik özellikleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: AS10_bin7 ve BS10_bin3 kontig dizilerinin *K. rhaeticus* ve *Z. bailii* referans genomları üzerindeki dağılımı.

4.2.3. Plazmid Metagenom Analizleri

Referans genomlar ile yapılan karşılaştırmalarda oluşturulan baskın maya genom bininin, *Z. bailii* CLIB 213T (Galeote ve diğ., 2013) referans genomunun %98'inden fazlasını kapladığı görülmüştür (Şekil 4.12). Öte yandan *K. rhaeticus* AF1 (dos Santos ve diğ., 2014) referans genomu ile yapılan karşılaştırmalarda, oluşturulan genom bininin referans genomun yalnızca %70.15'ünü kapladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Elde edilen yüksek coverage ve her iki çalışmada da kullanılan platformların aynı olmasına rağmen bu oranın düşük kalmasının nedeni araştırılmıştır. Yapılan sıralama analizleri sonrasında, kontiglerle eşleşmeyen referans genom bölgelerinin karakterize edilmesi için, tekrar bölgeleri ve rRNA bölgelerinin referans genom üzerindeki dağılımı Tandem Repeats Finder (TRF) ve BLAST kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Buna ek olarak referans genom, muhtemel plazmid dizilerinin varlığı için de PlasFlow programı kullanılarak incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, sıralama analizleri sırasında referans genom üzerinde kalan boşlukların plazmid dizileri olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan referans genomun rapor edildiği çalışmada, BLAST ve Bowtie yoluyla kromozomal kurulum analizinin optimize edildiği ve plazmid dizilerinin temizlendiği belirtilse de bu işlemin bütün plazmid dizilerini temizlemediği görülmektedir. Dolayısıyla referans genomdaki bu plazmid scaffoldları ayırdıktan sonra sıralama işlemi tekrarlanmış ve inşa edilen genom bininin *K. rhaeticus* referans genomunun %90.42'ini kapladığı gözlenmiştir.

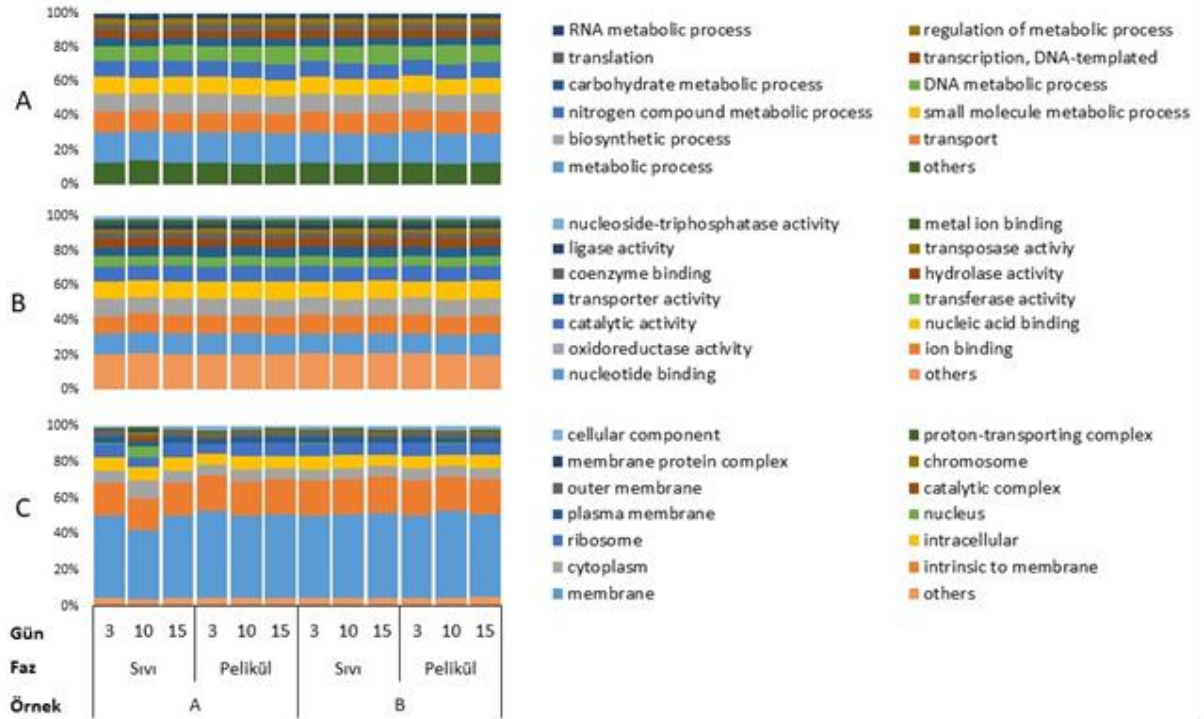
Daha sonra metagenom kurulum sonuçlarındaki plazmid kontigleri, PlasFlow kullanılarak tespit edilmiş ve diğer kontiglerden ayrılarak taksonomik analize tabi tutulmuştur. Bunun için, 11337 plazmid kontig, 6113 plazmid genomu içeren NCBI Plazmid Genom Veri Tabanı ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre incelenen Kombucha örneklerinde tespit edilen plazmid

contgilerinin %10.6'ü veri tabanındaki bir genom ile eşleşirken, sıralanma uzunluğu 90 bp ile 24,104 bp arasında değişmiştir. Veri tabanındaki eşleşen 119 plazmid genomunun ait olduğu cinsler ise şunlardır: *Gluconacetobacter* (942), *Acetobacter* (107), *Gluconobacter* (43), *Thermus* (21), *Sphingomonas* (24), *Sphingobium* (14), *Enterobacter* (5), *Geobacillus* (4), *Klebsiella* (4), *Ochrobactrum* (4), *Novosphingobium* (3), *Phenylobacterium* (4), *Pseudomonas* (5), *Mycobacterium* (3), *Burkholderia* (3), *Ralstonia* (3), *Sphingopyxis* (2), *Thauera* (2), *Acidovorax* (1), *Acinetobacter* (1), *Alicyclophilus* (1), *Bacillus* (1), *Cupriavidus* (1), *Erwinia* (1), *Mesorhizobium* (1), *Methylobacterium* (1), *Tistrella* (1), *Variovorax* (1), *Xylella* (1). Plazmid kontiglerinin taksnomik analiz sonuçları, rRNA geni temelli taksnomik analiz sonuçları ile uyumlu olarak *Acetobacteraceae* familyasının Kombucha mikrobiyomunda baskın olarak bulunduğunu göstermiştir.

4.2.4. İşlevsel Analizler

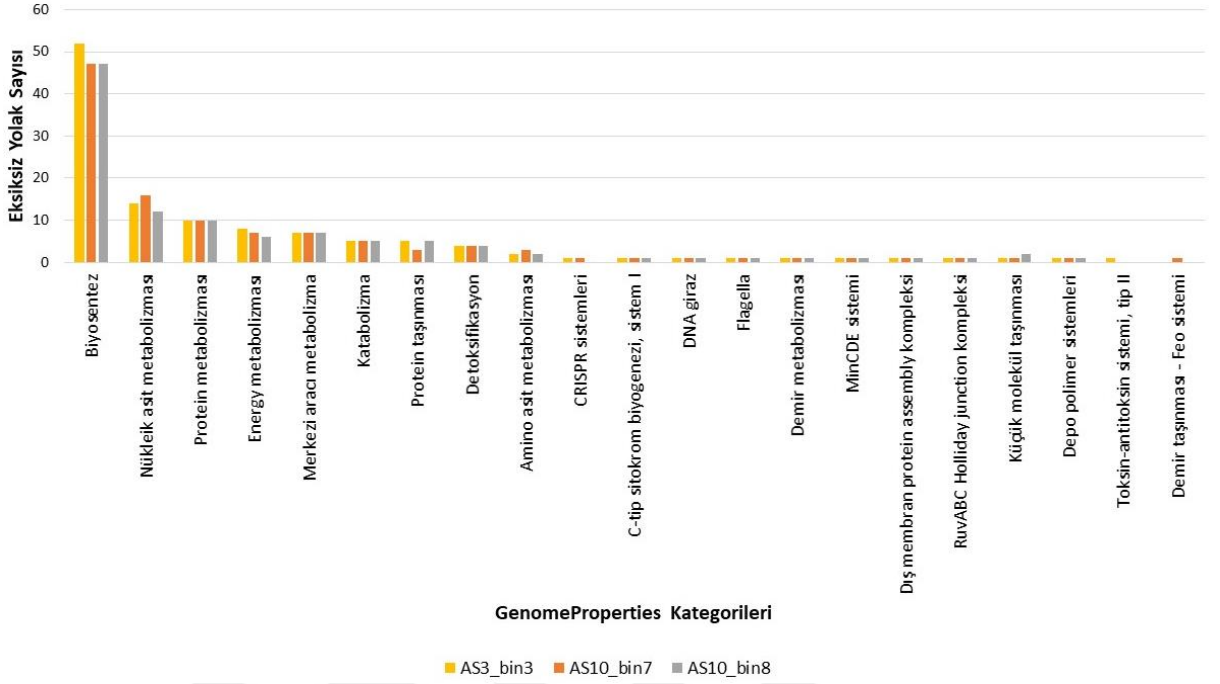
Gen tahmini ve işlevsel anotasyonlar iki farklı yöntem ile tamamlanmıştır:

Ham dizi verilerine dayanan birinci yöntem ile Kombucha örneklerindeki en baskın biyolojik işlem, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşen terimleri belirlenmiştir (Şekil 4.14). Metabolik işlem, transport, biyosentetik işlem kategorileri en bol bulunan biyolojik işlem kategorileri olurken nükleotit bağlanması, iyon bağlanması ve oksidoredüktaz aktivitesi en bol bulunan moleküler fonksiyon terimleri olarak not edilmiştir. Bu sonuçların, devam eden fermentasyon süreci ve selüloz üretimine bağlı olarak, Kombucha'daki yüksek metabolik aktiviteye işaret ettiği söylenebilir. GO terim profillerinin Kombucha örnekleri arasında farklılık göstermediği de tespit edilmiştir. Yalnızca AS10 örneğinde, diğer örneklerden farklı olarak, çekirdek ve katalitik kompleks kategorileri de en bol bulunan hücresel bileşen terimleri arasında yer almaktadır. Bunun muhtemel nedeni ise AS10 örneğinde diğer örneklerle kıyasla çok daha yüksek oranda maya bulunmasıdır (Şekil 4.13).

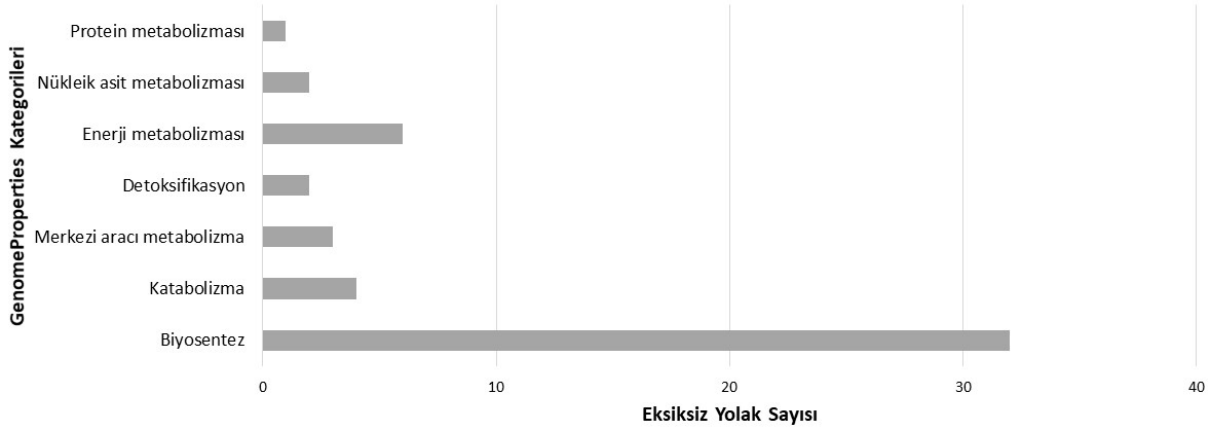


Şekil 4.13: Kombucha örneklerinde en bol bulunan GO terimleri (A-biyolojik işlem, B-moleküler fonksiyon, C-hücresel bileşen).

Uygulanan ikinci yöntem olan kontig temelli işlevsel analizlerde ise Kombucha'daki baskın genom binlerinin anotasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu genomlardaki eksiksiz yollar GhostKoala ve GenomeProperties analizleri ile belirlenmiştir. Eksiksiz kodlanan yolların GenomeProperties kategorilerine göre özetlenmiş hali Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de, analiz edilen bütün yolların sonuçları ise EK 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14: *Komagataeibacter* genom binlerindeki eksiksiz yolların Genome Properties kategorilerine göre dağılımı.



Şekil 4.15: *Z. bailii* genom binindeki eksiksiz yolların Genome Properties kategorilerine göre dağılımı.

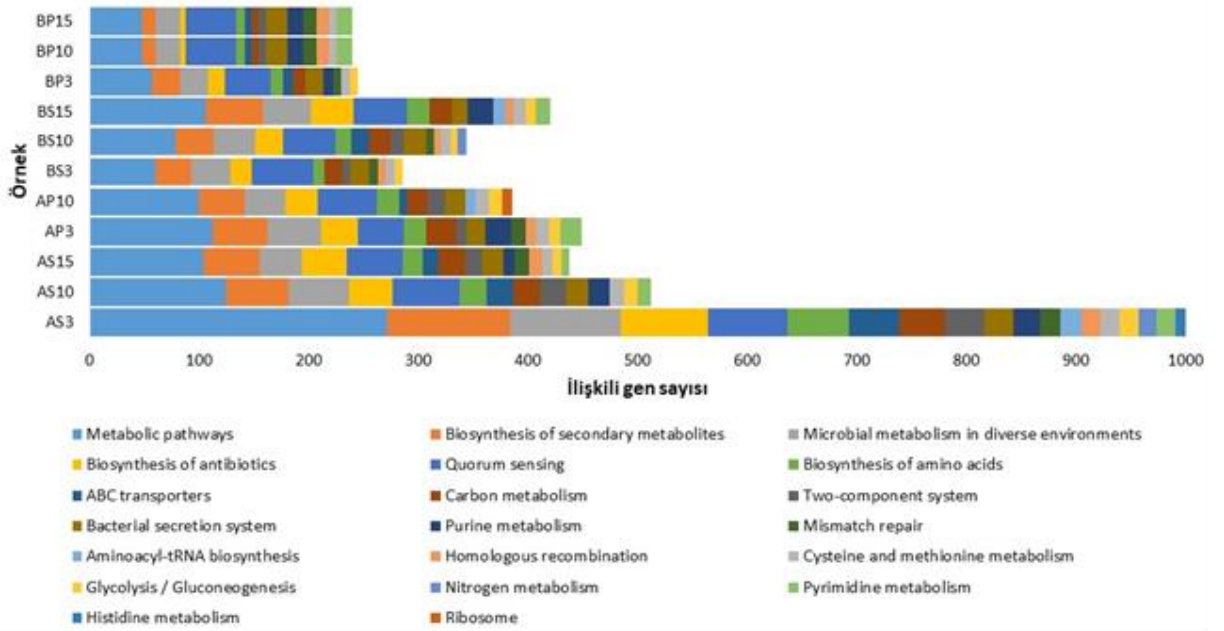
Tespit edilen yollar arasında, özellikle, Kombucha'ya ait karakteristik özelliklerde ya da baskın türler arasındaki etkileşimlerde rol oynaması muhtemel olanlar detaylı incelenmiştir.

Kombucha'nın en karakteristik özelliklerinden biri, bu içecekteki baskın bakterilerin fermentasyon sırasında selülozik bir tabaka oluşturmalarıdır. Dolayısıyla öncelikle metagenom analizleri kapsamında geri kazanılan *Komagataeibacter* cinsine üye genom binlerindeki selüloz sentaz operonlarının yapısı incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, AS3_bin3 genom bininde 4, AS10_bin7 genom bininde 4, AS10_bin8 genom bininde ise 3 selüloz sentaz

operonunun varlığı tespit edilmiştir. *Komagataeibacter* cinsine ait genom binlerinde tespit edilen önemli özellikler arasında, B1, B7 ve B12 vitaminlerinin biyosentezinden sorumlu yollar da sayılabilir.

Yapılan analizler, *Z. bailii*'nin genom binindeki önemli yolların incelenebilmesine de olanak tanımıştır. Bu maya türünün genomunda tespit edilen önemli yollardan biri, *S. cerevisiae*'da oksidatif stres toleransında önemli rol oynadığı bilinen GABA (gamma-aminobutyrate) shunt'tır. *Z. bailii* genom bininde, ayrıca selülotik enzimleri kodlayan genler ile kitin sentaz genlerinin varlığı da tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, *Z. bailii* genom bininde hem asetik asit hem de bakır stresinin kontrolünden sorumlu olan ZbHAA1 adlı transkripsiyon faktörünü kodladayan gen de tespit edilmiştir.

Plazmid kontiglerinin anotasyonu da Kombucha ile ilgili muhtemel önemli özelliklerin incelenebilmesine olanak sağlamıştır. Kombucha plazmid metagenomunda, ilişkilendirilen gen sayısına göre belirlenen ilk 20 yolk Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16: Kombucha plazmid metagenomunda en bol bulunan ilk 20 yolk.

Plazmid metagenomu için belirlenen ilk 20 yolağın kromozomal *Komagataeibacter* genom binlerinde öne çıkan yollardan farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin plazmid metagenomunda, quorum sensing en fazla zenginleşen terimler arasında bulunmaktadır. Quorum sensing terimi ile ilişkilendirilmiş genlerin detaylı analizi, plazmid DNA'sının

konjugatif transferi, DNA alımı ya da transferi ve effektör makromoleküllerin translokasyonu gibi aktivitelerden sorumlu olan Tip IV salgılama sistemi'nin (T4SS) varlığı tespit edilmiştir.

4.2.5. Sekonder Metabolit Gen Kümeleri

İşlevsel anotasyonların hem baskın genomlarda hem de plazmid metagenomunda en fazla bulunan kategorilerden birinin sekonder metabolit biyosentezi olduğunu göstermesi nedeniyle, Kombucha metagenomundaki sekonder metabolit gen kümelerinin muhtemel varlığı antiSMASH web server (Cuadrat ve diğ., 2018) ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *Komagataeibacter* genom binlerinde ve plazmid metagenomunda bakteriyosin gen kümelerinin varlığını göstermiştir. Buna ek olarak, *K. rhaeticus* ve *Z. bailii* genomlarında terpen ve plazmid metagenomunda ise metanobaktin genleri tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kombucha, atfedilen sağlığa faydalı özellikleri nedeniyle, bütün dünyada tüketimi gittikçe yaygınlaşan fermente bir çay türüdür. Bugüne kadar Kombucha mikrobiyomu üzerine yapılan kültür temelli analizler ya da NGS temelli amplikon dizilemeleri önemli bilgiler sağlamakla birlikte, taksonomik ve işlevsel özelliklerin tespitinde kısıtlı kalmıştır. Bu tez çalışmasında ise ilk defa, Kombucha'daki mikrobiyal kompozisyon, hem shotgun metagenomik hem de amplikon dizileme metotları kullanılarak araştırılmıştır. Böylece Kombucha mikrobiyomu profilinin taksonomik ve işlevsel özelliklerinin daha kapsamlı analiz edilebilmesi mümkün olmuştur. Tez çalışması kapsamında öncelikle, aynı yöreden alınmış iki Kombucha örneği fermente edilmiş ve 3 farklı fermentasyon gününde (3, 10, 15) hem pelikül hem de sıvı fazdan örnekler alınarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Örnek alımı için bu günlerin seçilmesinin nedenleri şöyle sıralanabilir: 1) Fermentasyon sürecinin ilk aşamalarında ortamdaki besinin bolluğu nedeniyle hızlı bir şekilde çoğalan mikroorganizmaların büyüme hızı, bir süre sonra ortamda birikmeye başlayan inhibitörler tarafından baskılanmaya başlanır (Caldwell, 2000). Daha önce Goh vd. (2012) tarafından Kombucha üzerine yapılan çalışmada bu değişimin 90 gr/l ve 110 gr/l süktroz konsantrasyonlarında 4. günde gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise 100 gr/l süktroz konsantrasyonu kullanılacağı için bu değişimden önceki mikrobiyal kompozisyonun analizi için 3. günün seçilmesi uygun görülmüştür. 2) Kombucha fermentasyonu geleneksel ve yaygın olarak 7-10 gün sürdürülmektedir (Greenwalt ve diğ., 2000). Bu nedenle 10. günde örnek alınarak bu aşamadaki mikrobiyal komünitenin tespitinin, yaygın kullanımdaki halinin sağlık üzerine etkisini incelemek bakımından önemli olacağı düşünülmüştür. 3) Son olarak Kombucha üzerine Chu ve Chen (2006) tarafından yapılan çalışmada ise bu içeceğin antioksidan aktivitesinin 15. günde önemli oranda artış gösterdiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla Kombucha'nın sahip olduğu bu tür muhtemel aktivitelerle ilgili ilişkili genlerin ve mikroorganizmaların da araştırılması planlanmıştır. İzole edilen metagenomik DNA örnekleri, shotgun ve amplikon dizileme için kullanılmıştır. Shotgun dizileme yöntemiyle Kombucha'daki mikroorganizmalar tüm genom düzeyinde hem taksonomik hem de işlevsel açıdan incelenirken, 16S rRNA geni ve ITS1 hedefli amplikon dizileme ile karşılaştırma amaçlı taksonomik analizler gerçekleştirilmiştir.

Hem shotgun hem de amplikon dizileme yöntemine dayalı taksonomik analizler, Kombucha fermentasyonunun tüm fazlarında ve günlerinde, bakteriyel komünitede *Acetobacteraea*

familyasının, fungal komünitede ise *Saccharomyces* familyasının baskın olduğunu göstermiştir. Bu iki yöntemle dayalı taksonomik analiz sonuçları birbiriyle büyük ölçüde örtüşmekle birlikte, yöntemsel özelliklere bağlı olduğu düşünülen bazı farklılıklar da tespit edilmiştir. Örneğin; bakteriyel komünitenin taksonomik analizinde -diğer örneklerdeki komünite profili uyumlu olmakla birlikte- AS3 örneğindeki görece bulunma oranlarının farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. 16S rRNA geni amplikon analizinde, *Anoxybacillus* (%8.7), *Paenibacillus* (%1.3) ve *Schlegelella* (%1.2) cinsleri, shotgun metagenomik sonuçlarına kıyasla çok daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Ancak shotgun dizileme sonuçlarında, bu cinslerin ait olduğu bakteri familyalarının (*Bacillaceae*, *Paenibacillaceae* ve *Comamonadaceae*) bulunma yüzdelerinin örnekler arası dağılımı motifi incelendiğinde, bulunma yüzdeleri çok daha düşük olmakla birlikte, 16S rRNA geni amplikon analizleri ile uyumlu oldukları tespit edilmiştir. NGS temelli 16S rRNA geni amplikon analizlerindeki amplifikasyon aşamasının belirlenen komünite profilinde sapmalara neden olduğu bilinmektedir (Tremblay ve diğ., 2015). Dolayısıyla iki yöntem arasındaki bu farklılığın, NGS temelli 16S rRNA geni amplifikasyonundan neden olduğu sapmalar nedeniyle ortaya çıktığı söylenebilir. Buna ek olarak, 16S rRNA geni amplikon analizlerinin shotgun dizileme analizlerine kıyasla daha yüksek taksonomik çözünürlük sağladığı da yapılan karşılaştırmalar sonucu görülmüştür. 16S rRNA geni analizleri, shotgun dizileme ile familya düzeyinde *Acetobacteraea* olarak tespit edilen baskın bakterilerin *Komagataeibacter* cinsine ait olduğunu ortaya çıkarmıştır. ITS1 hedefli amplikon analizleri de fungal komünitedeki baskın fungusların *Zygosaccharomyces* (>99%) cinsine ait olduğunu ortaya koymuştur. Kombucha mikrobiyomunun taksonomik analizleri bu içeceğin oldukça düşük çeşitliliğe sahip, stabil bir komüniteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca baskın bakteri ve fungusların da fazlar arasında farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Fermente gıdaların, diğer çevresel örneklerle kıyasla (toprak, insan, vs.) daha düşük çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir (Wolfe & Dutton, 2015). Bu gıdalardaki sürekli yenilenme ve besin takviyesinin ortamdaki avantajlı türlerin gittikçe daha da baskın hale gelmesine neden olduğu düşünülmektedir (Mittelbach ve diğ., 2001). Daha önce yapılan amplikon temelli analizlerde, Kombucha mikrobiyomunun fermentasyonun ilk günlerinde daha yüksek çeşitliliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Marsh ve diğ., 2014). Kombucha'daki baskın bakteri ve funguslar, diğer mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyerek çeşitliliğin ilerleyen fermentasyon günlerinde düşmesine neden olmaktadır (Villarreal-Soto ve diğ., 2018).

Bu çalışmada uygulanan shotgun metagenomik yöntemi sayesinde, Kombucha'daki bakteri ve fungusların fermentasyonun farklı günlerindeki profilini aynı anda izleyebilmek de mümkün olmuştur. Bu sayede bakteri ve fungusların Kombucha'daki görece bulunma oranlarının değişimi takip edilebilmiştir. Elde edilen sonuçlar, BF oranının Kombucha örnekleri ve fazları arasında tutarlı değişimler göstermediğini ortaya koymuştur. A örneğinin sıvı fazında, 10. günde bakteri/fungus oranının büyük düşüş gösterdiği kaydedilirken, pelikül fazında bu düşüş oldukça sınırlı olmuştur. B örneğinin sıvı fazında da 10. günde oldukça kısıtlı bir düşüş görülürken, pelikül örneğinde BF oranı sabit kalmıştır. Elde edilen sonuçlar, 15 günlük fermentasyon sonucunda BF oranının her iki fazda da düştüğünü göstermekle birlikte, 10. güne kadar olan değişim örnekler ve fazla arasında tutarlılık göstermemiştir. Literatürde Kombucha'daki hem bakteri hem de fungus komünitesinin aynı anda izlendiği çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Kombucha'daki bakteri ve fungus popülasyonunun fermentasyonun ilk 6-8 gününde artış gösterdiği ancak daha sonra ortam asiditesi ve besin yokluğu nedeniyle düşmeye başladığı rapor edilen bu çalışmalarda, bakteri ve fungus popülasyonundaki azalmanın başlangıç zamanı ve ilerleyiş şekli ile ilgili olarak farklı Kombucha örnekleri arasında büyük değişkenlikler gözlenmiştir (Chen & Liu, 2000; Coton ve diğ., 2017).

Kombucha'daki mikrobiyal komünitenin, filogenetik belirteç genlere dayalı taksonomik analizi tamamlandıktan sonra shotgun dizileme verilerinin tüm genom düzeyinde analizine geçilmiştir. Bu analizlerde, shotgun dizileri kurulum işlemine tabi tutularak kontigler elde edilmiştir. Shotgun metagenomik alanındaki önemli sorunlardan biri elde edilen karışık kontig dizilerinin hangi mikroorganizmalara ait olduğunu belirlemekte yaşanan güçlüklerdir. Ancak son yıllarda biyoinformatik alanında yaşanan gelişmeler sayesinde, bu analizleri yapabilmek mümkün hale gelmiştir. Binning adı verilen bu analizlerde kontigler, içerdikleri tetranükleotid yapısı, coverage değerleri ya da benzerlik gösterdikleri referans genomlara göre kümelere ayrılabilir. Dolayısıyla aynı mikroorganizmadan geldiği farz edilen kontiglerin oluşturduğu bu kümelere de "bin" adı verilmektedir. Bu tez çalışmasında, Kombucha mikrobiyomunu oluşturan mikroorganizmaların tüm genomlarını geri kazanmak amacıyla binning analizi uygulanmıştır. Bu analiz sonucunda, Kombucha örneklerinden *Komagataeibacter* cinsine üye üç adet bakteriyel genom ve *Z. bailii* türüne üye bir adet fungal genom geri kazanılmıştır. Geri kazanılan üç *Komagataeibacter* genomundan birinin *K. rhaeticus* türüne ait olduğu belirlenirken, diğer iki genomun daha önce rapor edilmiş *Komagataeibacter* genomlarına tür düzeyinde benzerlik göstermeyen yeni genomlar olduğu

tespit edilmiştir. Bu sayede filogenetik belirteç genler ile cins düzeyinde sınıflandırılabilen bu mikroorganizmaların tür düzeyinde sınıflandırılabilmesi mümkün olmuştur.

Komagataeibacter türleri genellikle meyvelerin üzerinde bulunmaktadır ve ürettikleri selülozik tabaka, hem bitkilere bağlanmayı kolaylaştırmakta hem de UV gibi zararlı çevresel faktörlere karşı koruma sağlamaktadır (Williams & Cannon, 1989). *K. rhaeticus* selüloz ürettiği bilinen ve Kombucha'daki varlığı daha önce rapor edilmiş bir türdür (dos Santos ve diğ., 2014; Semjonovs ve diğ., 2017). Bunun yanında, *K. rhaeticus*, *Acetobacteraceae* familyasının üyesi olarak, asetik asit üretebilmekte ve bu sayede bulunduğu ortamdaki rakip türlere karşı avantaj kazanabilmektedir (Yamada ve diğ., 2012). Kombucha örneklerinde tespit edilen diğer iki *Komagataeibacter* genomunun da selüloz sentaz operonları taşıdığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla Kombucha fermentasyonunda bu üç farklı *Komagataeibacter* türüne ait bakterilerin önemli rol oynadığı söylenebilir.

Z. bailii, çevresel stres koşullarına yüksek tolerans gösterebilen fermentatif bir maya türüdür. Bu özellikleri dolayısıyla da şarap ve bira üreticileri tarafından gıda bozucu bir maya olarak görülmektedir (Kuanyshev ve diğ., 2017). Diğer taraftan, *Zygosaccharomyces* cinsi Kombucha mikrobiyomu üzerine yapılan çalışmalarda varlığı en fazla rapor edilen mayalar arasında yer almaktadır (Jayabalan ve diğ., 2014; Marsh ve diğ., 2014; Villarreal-Soto ve diğ., 2018). Özellikle son yıllarda *Z. bailii*'nin potansiyel yararlı özelliklere sahip olabileceği ile ilgili çalışmalar da yayınlanmıştır (Ciani ve diğ., 2010; Jolly ve diğ., 2017; Kuanyshev ve diğ., 2017; Zuehlke, 2013). Dolayısıyla bugüne kadar yapılan genomik temelli çalışmalara rağmen, *Z. bailii*'nin fermente gıdalardaki rolü ve potansiyel etkileri henüz detaylı ve net bir şekilde ortaya konulamamıştır (Kuanyshev ve diğ., 2017).

Tespit edilen baskın türlerden yola çıkılarak Kombucha fermentasyonu sırasında meydana gelen metabolik aktiviteler şöyle özetlenebilir: *Z. bailii*, fermentasyon başlangıcında eklenen sükrozu metabolize ederek glukoz ve fruktoza çevirir. *Z. bailii*'nin ortamda fruktoz ve glukoz bulunduğunda öncelikli karbon kaynağı olarak fruktozu tercih ettiği bilinmektedir (Merico ve diğ., 2003). Dolayısıyla fruktozu tüketerek etanol üretir. Üç farklı *Komagataeibacter* türüne ait bakteriler ise glukozu kullanarak glukonik asit, etanolü kullanarak da asetik asit üretir. Böylece Kombucha'nın asiditesi artar ve ortamdaki diğer mikroorganizmaların büyümesi engellenmiş olur. Diğer taraftan, ilginç bir bulgu olarak, *Z. bailii*'nin düşük asetik asit ya da laktik asit içeren ortamlarda daha hızlı büyüdüğü de rapor edilmiştir (Dang ve diğ., 2009). Bunlara ek olarak, *K.*

rhaeticus ve diğer iki *Komagataeibacter* türüne ait bakteriler, ortamdaki glukoz ve fruktozu kullanarak selülozik yapıdaki pelikül tabakasını üretmeye başlar. Yeni oluşmaya başlayan bu tabaka, sıvı yüzeyine doğru hareket eder ve bakterilerin oksijene erişimini artırarak, selüloz üretimini daha da fazla stimüle eder (Chang ve diğ., 2001). Ortamdaki asidite toksik hale geldiğinde ve besin miktarı azaldığında ise hem *Komagataeibacter* hem de *Z. bailii* popülasyonunda düşüş başlar.

Kombucha fermentasyonundaki temel metabolik aktivitelerin yanında, tüm genomları yeniden geri kazanılan bu baskın türlerin taşıdığı diğer önemli potansiyel işlevsel özellikler de incelenmiştir. Öncelikle, geri kazanılan *Komagataeibacter* genomlarından birinin daha önce Kombucha'dan izole edilerek rapor edilmiş *K. rhaeticus* AF1 suşuna büyük benzerlik gösterdiği (>%99) tespit edilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar, geri kazanılan fungal genomun ise daha önce sirkeden izole edilip rapor edilmiş *Z. bailii* CLIB213^T suşu ile büyük benzerlik (>%99) taşıdığını göstermiştir. Bu bulgular, mevcut bakteri ve maya izolatların kontrollü ve standardize Kombucha üretimine ve faydalı özelliklerin arttırılmasına katkı sunabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca Kombucha'nın takip edilebilir bir ekosistem olarak mikrobiyal etkileşimlerin ve dinamiklerin incelenmesinde önemli bir aday olduğunu da ortaya koymaktadır. *Komagataeibacter* genomlarının işlevsel anotasyonu, bu üç farklı türe ait bakterilerin B1, B7 ve B12 vitaminlerinin biyosentezinden sorumlu yolları eksiksiz taşıdığını göstermiştir. Kombucha'da B grubu vitaminlerin varlığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Jayabalan ve diğ., 2014). Dolayısıyla bu vitaminlerin *Komagataeibacter* türleri tarafından üretildiği söylenebilir. Buna ek olarak, *Z. bailii*'nin de B grubu vitaminlerine ihtiyaç duyduğu ve ancak bu vitaminlerin bulunduğu ortamlarda çoğalabildiği de bilinmektedir (Stratford & Capell, 2003). Bu bilgilere dayanarak Kombucha'daki *Komagataeibacter* türleri tarafından gerçekleştirilen vitamin biyosentezinin ve bu vitaminlerin *Z. bailii* tarafından tüketilmesinin bu iki tür arasındaki önemli metabolik etkileşimlerden biri olduğu söylenebilir.

Kombucha örneklerinden geri kazanılan *Z. bailii* genomunun işlevsel anotasyonu, bu türün GABA (gamma-aminobutyrate) shunt yolağını taşıdığını göstermiştir. Bu yolağın *S. cerevisiae*'da oksidatif stres tolarensında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Coleman ve diğ., 2001). GABA'nın kan beyin bariyerini geçip geçemediği ve dolayısıyla takviye gıda olarak faydalı olup olmadığı konusunda çelişkili çalışmalar bulunmakla birlikte, bu bileşiğin fermente gıdalarda zenginleştirilmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir (Dhakal ve diğ., 2012;

Boonstra ve diğ., 2015). Ayrıca *Z. bailii* genomunda selülotik enzim kodlayan genler de tespit edilmiştir. Bu selülotik enzimler sayesinde *Z. bailii*, çay üretiminin oksidasyon aşamasında rol alarak aromatik bileşiklerin ortaya çıkmasını sağlamakta ve çayın kalitesini yükseltmektedir (Murugesan ve diğ., 2002).

Komagataeibacter türleri tarafından üretilen selülozik tabakanın, bu bakterilerin *Z. bailii* ile etkileşimlerinde önemli bir rol oynaması da muhtemeldir. Selüloz üreten başka bir bakteri olan *Salmonella enterica* ile fitopatojenik bir fungus olan *Aspergillus niger* arasındaki etkileşim incelendiği bir çalışmada, bu iki tür arasındaki ilişkinin ilk olarak bakteriyel selüloz ile fungal hücre duvarında bulunan kitin arasındaki etkileşime dayandığını ortaya çıkarmıştır (Brandl ve diğ., 2011). İşlevsel anotasyonlar, *Z. bailii* genomunda da kitin sentaz geni bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, Kombucha'nın pelikül fazında *Komagataeibacter* türleri ile *Z. bailii* arasında da benzer bir etkileşimin olabileceği tahmin edilmektedir.

İşlevsel anotasyonlarda, hem baskın genomlarda hem de plazmid metagenomunda en fazla bulunan kategorilerden birinin sekonder metabolitlerin biyosentezi olması nedeniyle, Kombucha metagenomunda sekonder metabolit gen kümelerinin muhtemel varlığı antiSMASH web server (Cuadrat ve diğ., 2018) ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *Komagataeibacter* genomlarında ve plazmid metagenomunda bakteriyosin gen kümelerinin bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla bu bakterilerin, Kombucha'daki ortam asiditesini arttırmanın yanında, diğer türlere karşı bu tür antimikrobiyal peptidleri de kullandığı tahmin edilmektedir. Buna ek olarak, baskın bakteriyel ve fungal genomlarda, Kombucha'ya spesifik koku oluşumunda görev alabileceği düşünülen terpen gen kümeleri de bulunmuştur (Audrain ve diğ., 2015).

Plazmid kontiglerinin incelenmesi ile de Kombucha'daki önemli işlevsel özelliklerin tespiti mümkün olmuştur. Örneğin, sekonder metabolit gen kümelerinin taranması sonucu, Kombucha'daki plasmidlerde metanobaktin genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu genlerin kodladığı peptidlerin bakır bağlama özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak, Kombucha'nın da bakır biyosorbsiyon özelliği de daha önce rapor edilmiştir (Razmovski & Šćiban, 2008). Ayrıca Kombucha'nın metal kaplarda fermente edildiğinde toksik özellik gösterdiği de bilinmektedir (Jayabalan ve diğ., 2014). Dolayısıyla Kombucha'nın plazmid metagenomunda kodlanan metanobaktin genlerinin Kombucha'nın bakır biyosorbsiyon özelliğinden sorumlu olduğu söylenebilir. *Z. bailii* genomunun da hem asetik asit hem de bakır

stresinin kontrolünden sorumlu olan ZbHAA1 adlı transkripsiyon faktörünü kodlayan geni içermesi de (Palma ve diğ., 2017), bu iki tür arasındaki uyumun başka bir işareti görülebilir.

Bu tez çalışmasında, Kombucha'nın mikrobiyal kompozisyonu ve bu içecekteki mikrobiyal türlerin muhtemel işlevleri ile ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Taksonomik analizler Kombucha'nın, fermentasyon süresince değişmeyen stabil ve düşük çeşitliliğe sahip bir mikrobiyal ekosisteme sahip olduğunu göstermiştir. Kombucha'daki mikrobiyal komünitenin *Komagataeibacter* cinsine üye üç farklı bakteri türü ve *Z. bailii* adlı maya türü tarafından domine edildiği belirlenmiştir. Baskın bakteriyel genomlardan birinin *K. rhaeticus* türüne ait olduğu tespit edilmekle birlikte, diğer iki bakteriyel genomun daha önce rapor edilmiş *Komagataeibacter* türlerine ait genomlara tür düzeyinde benzerlik göstermediği belirlenmiştir. Yeniden inşa edilen baskın tür genomları ve plazmid metagenomu için gerçekleştirilen gen tahminleri ve işlevsel anotasyonları, Kombucha mikrobiyomunun sahip olduğu çeşitli özelliklerin anlaşılabilmesine de olanak tanımıştır. Bu önemli işlevsel özellikler arasında vitamin biyosentezi, bakır bağlanması, asidik ortamlara tolerans, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi ve selüloz üretimi sayılabilir. Elde edilen bu sonuçlar, Kombucha'daki mikrobiyal etkileşimlere ve fermentasyon sırasındaki mikrobiyal dinamiklere dair önemli bilgiler sağlamıştır. Gelecekte yapılacak yeni çalışmalarda, metagenomik ve metabolomik yaklaşımları birlikte kullanılarak Kombucha mikrobiyomu ve işlevleri hakkında daha detaylı ve kapsamlı bilgi edinebilmek mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D., Ali, M.B., Hargafi, K., Jaouadi, B., Ayadi, F., Elfeki, A., Ammar, E., 2012, Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 63.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990, Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Ari, Ş., Arıkan, M., 2016, *Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future*, Plant Omics: Trends and Applications, In: Hakeem, K., Tombuloğlu, H., Tombuloğlu, G. (eds), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, ISBN: 978-3-319-31703-8, 109–135.
- Banerjee, D., Hassarajani, S.A., Maity, B., Narayan, G., Bandyopadhyay, S.K., Chattopadhyay, S., 2010, Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action, *Food and Function*, 1, 284–293.
- Banik, J.J., Brady, S.F., 2010, Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules, *Current Opinion in Microbiology*, 13, 603–609.
- Bauer-Petrovska, B., Petrushevska-Tozi, L., 2000, Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 201–205.
- Beaulaurier, J., Zhu, S., Deikus, G., Mogno, I., Zhang, X.S., Davis-Richardson, A., Canepa, R., Triplett, E.W., Faith, J.J., Sebra, R., Schadt, E.E., 2018, Metagenomic binning and association of plasmids with bacterial host genomes using DNA methylation, *Nature Biotechnology*, 36(1), 61.
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., Amend, A.S., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y.J.K., Sanli, K., Eriksson, K.M., Vik, U., Veldre, V., Nilsson, R.H., 2013, Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data, *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 914–919.
- Benson, G., 1999, Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences, *Nucleic Acids Research*, 27, 573–580.
- Bigot, C., Meile, J., Remize, F., Strub, C., Bigot, C., Meile, J., Remize, F., Strub, C., 2017, *Applications of Metagenomics to Fermented Foods*, Fermented Foods, Part I (Biochemistry and Biotechnology), Montet, D., Ramesh, C. R. (eds), Chapter 18, CRC Press, Florida, USA, 334–348.
- Biver, S., Portetelle, D., Vandenbol, M., 2013, Characterization of a new oxidant-stable serine

- protease isolated by functional metagenomics, *Springerplus*, 2, 410.
- Blanc, P.J., 1996, Characterization of the tea fungus metabolites, *Biotechnology Letters*, 18, 139–142.
- Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M.G., Lu, X., Schwalen, C.J., Kautsar, S.A., Suarez Duran, H.G., de los Santos, E.L.C., Kim, H.U., Nave, M., Dickschat, J.S., Mitchell, D.A., Shelest, E., Breitling, R., Takano, E., Lee, S.Y., Weber, T., Medema, M.H., 2017. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Research*, 45, W36–W41.
- Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2012, Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations, *BMB Reports*, 45, 377–389.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, 30, 2114–2120.
- Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L.S., Alkemade, A., Forstmann, B.U., Nieuwenhuis, S., 2015, Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in Psychology*, 6, 1520.
- Bowers, R.M., Kyrpides, N.C., Stepanauskas, R., Harmon-Smith, M., Doud, D., Reddy, T.B.K., Schulz, F., Jarett, J., Rivers, A.R., Eloie-Fadrosch, E.A., Tringe, S.G., Ivanova, N.N., Copeland, A., Clum, A., Becraft, E.D., Malmstrom, R.R., Birren, B., Podar, M., Bork, P., Weinstock, G.M., Garrity, G.M., Dodsworth, J.A., Yooseph, S., Sutton, G., Glöckner, F.O., Gilbert, J.A., Nelson, W.C., Hallam, S.J., Jungbluth, S.P., Ettema, T.J.G., Tighe, S., Konstantinidis, K.T., Liu, W.-T., Baker, B.J., Rattei, T., Eisen, J.A., Hedlund, B., McMahon, K.D., Fierer, N., Knight, R., Finn, R., Cochrane, G., Karsch-Mizrachi, I., Tyson, G.W., Rinke, C., Kyrpides, N.C., Schriml, L., Garrity, G.M., Hugenholtz, P., Sutton, G., Yilmaz, P., Meyer, F., Glöckner, F.O., Gilbert, J.A., Knight, R., Finn, R., Cochrane, G., Karsch-Mizrachi, I., Lapidus, A., Meyer, F., Yilmaz, P., Parks, D.H., Eren, A.M., Schriml, L., Banfield, J.F., Hugenholtz, P., Woyke, T., 2017, Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea, *Nature Biotechnology*, 35, 725–731.
- Brady, S.F., Clardy, J., 2000, Long-Chain N-Acyl Amino Acid Antibiotics Isolated from Heterologously Expressed Environmental DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 122, 12903–12904.
- Bragg, L., Tyson, G.W., 2014, *Metagenomics Using Next-Generation Sequencing*, Environmental Microbiology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), In: Paulsen, I., Holmes A. (eds), Chapter 15, Humana Press, Totowa, NJ, 183–201.
- Breitwieser, F.P., Lu, J., Salzberg, S.L., 2017, A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly, *Briefings in Bioinformatics*, 1–15.
- Caldwell, D.R., 2000, *Microbial Physiology and Metabolism*, 2nd ed., Star Publishing Company, USA.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., Srikumar, S., 2017, A Review on the Applications

of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies, *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–16.

- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. a, Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. a, McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W. a, Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature Methods*, 7, 335–336.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R., 2016, Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63–72.
- Chang, A.L., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., Gilles-Gonzalez, M.-A., 2001, Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, Is a Heme-Based Sensor, *Biochemistry*, 40, 3420–3426.
- Chen, C., Liu, B.Y., 2000, Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 834–839.
- Chen, G., Chen, C., Lei, Z., 2017, Meta-omics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods, *Trends in Food Science and Technology*, 65, 23–31.
- Chen, Z., Lin, Z., 2015, Tea and human health: biomedical functions of tea active components and current issues, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 16, 87–102.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010, Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non- *Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 123–133.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014, Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis, *Nucleic Acids Research*, 42, 633–642.
- Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J., Moye-Rowley, W.S., 2001, Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 244–50.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., Coton, E., 2017, Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods, *FEMS Microbiology Ecology*, 93, 1–16.
- Cottrell, M.T., Moore, J.A., Kirchman, D.L., 1999, Chitinases from uncultured marine microorganisms, *Applied Environmental Microbiology*, 65, 2553–2557.

- Coughlan, L.M., Cotter, P.D., Hill, C., Alvarez-Ordóñez, A., 2015, Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology*, 6, 672.
- Craig, J.W., Chang, F.Y., Kim, J.H., Obiajulu, S.C., Brady, S.F., 2010, Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria, *Applied Environmental Microbiology*, 76, 1633–1641.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., Scannell, J.W., 2002, Estimating prokaryotic diversity and its limits, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 10494–10499.
- Dang, T.D.T., Vermeulen, A., Ragaert, P., Devlieghere, F., 2009, A peculiar stimulatory effect of acetic and lactic acid on growth and fermentative metabolism of *Zygosaccharomyces bailii*, *Food Microbiology*, 26, 320–327.
- Daniel, R., 2005, The metagenomics of soil, *Nature Reviews Microbiology*, 3, 470–478.
- De Filippis, F., Troise, A.D., Vitaglione, P., Ercolini, D., 2018, Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation, *Food Microbiology*, 73, 11–16.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006, Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB, *Applied Environmental Microbiology*, 72, 5069–5072.
- Dhakal, R., Bajpai, V.K., Baek, K.H., 2012, Production of gaba (γ -Aminobutyric acid) by microorganisms: a review, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1230–1241.
- Donato, J.J., Moe, L.A., Converse, B.J., Smart, K.D., Berklein, F.C., McManus, P.S., Handelsman, J., 2010, Metagenomic analysis of apple orchard soil reveals antibiotic resistance genes encoding predicted bifunctional proteins, *Applied Environmental Microbiology*, 76, 4396–401.
- dos Santos, R.A.C., Berretta, A. a, Barud, H.D.S., Ribeiro, S.J.L., Gonzalez-Garcia, L.N., Zucchi, T.D., Goldman, G.H., Riano-Pachon, D.M., 2014, Draft Genome Sequence of *Komagataeibacter rhaeticus* Strain AF1, a High Producer of Cellulose, Isolated from Kombucha Tea, *Genome Announcements*, 2, e00731-14.
- Ekkers, D.M., Cretoiu, M.S., Kielak, A.M., van Elsas, J.D., 2012, The great screen anomaly-a new frontier in product discovery through functional metagenomics, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1005–1020.
- Ercolini, D., 2013, High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology, *Applied Environmental Microbiology*, 79, 3148–3155.
- Florea, M., Hagemann, H., Santosa, G., Abbott, J., Micklem, C.N., Spencer-Milnes, X., de Arroyo Garcia, L., Paschou, D., Lazenbatt, C., Kong, D., Chughtai, H., Jensen, K.,

- Freemont, P.S., Kitney, R., Reeve, B., Ellis, T., 2016, Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 113, E3431–E3440.
- Fu, J., Lv, H., Chen, F., 2016, Diversity and Variation of Bacterial Community Revealed by MiSeq Sequencing in Chinese Dark Teas, *PLoS One*, 11, e0162719.
- Galeote, V., Bigey, F., Devillers, H., Neuvéglise, C., Dequin, S., 2013, Genome Sequence of the Food Spoilage Yeast *Zygosaccharomyces bailii* CLIB 213^T, *Genome Announcements*, 1, e00606-13.
- Gilbert, J.A., Meyer, F., Jansson, J., Gordon, J., Pace, N., Tiedje, J., Ley, R., Fierer, N., Field, D., Kyrpides, N., Glöckner, F.-O., Klenk, H.-P., Wommack, K.E., Glass, E., Docherty, K., Gallery, R., Stevens, R., Knight, R., 2010, The Earth Microbiome Project: Meeting report of the “1st EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6th 2010, *Standards in Genomic Sciences*, 3, 249–253.
- Gillespie, D.E., Brady, S.F., Bettermann, A.D., Cianciotto, N.P., Liles, M.R., Rondon, M.R., Clardy, J., Goodman, R.M., Handelsman, J., 2002, Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA, *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4301–4306.
- 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, *International Food Research Journal*, 19(1), 109.
- Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H., Ledford, R.A., 2000, Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects, *Journal of Food Protection*, 63, 976–81.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013, QAST: quality assessment tool for genome assemblies, *Bioinformatics*, 29, 1072–1075.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998, Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, *Chemistry and Biology*, 5, R245-9.
- Haft, D.H., Selengut, J.D., Richter, R.A., Harkins, D., Basu, M.K., Beck, E., 2012, TIGRFAMs and genome properties in 2013, *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D387-D395.
- Hayat, K., Iqbal, H., Malik, U., Bilal, U., Mushtaq, S., 2015, Tea and its consumption: benefits and risks, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 939–54.
- Healy, F.G., Ray, R.M., Aldrich, H.C., Wilkie, A.C., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 1995, Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 667–674.
- Henne, A., Schmitz, R.A., Bömeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R., 2000, Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on

- Escherichia coli*, *Applied Environmental Microbiology*, 66, 3113–3116.
- Hoff, K. J., Stanke, M., 2013, WebAUGUSTUS—a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes, *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W123–W128.
- Huynh, T., Xu, S., 2018, Gene Annotation Easy Viewer (GAEV): Integrating KEGG’s Gene Function Annotations and Associated Molecular Pathways, *F1000Research*, 7.
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., Aluru, S., 2017, High-throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries, *bioRxiv*, 225342.
- Jarrell, J., Cal, T., Bennett, J.W., 2000, The Kombucha consortia of yeasts and bacteria, *Mycologist*, 14, 166–170.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Sathishkumar, M., 2014, A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538–550.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K., 2007, Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation, *Food Chemistry*, 102, 392–398.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2017, The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15–39.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, Siew-Yit, Lopez, R., Hunter, S., 2014, InterProScan 5: genome-scale protein function classification, *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. 2016, BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences, *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 726–731.
- Kang, D.D., Froula, J., Egan, R., Wang, Z., 2015, MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities, *PeerJ*, 3, e1165.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., Schmidt, T.M., 2001, rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database, *Nucleic Acids Research*, 29, 181–184.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Research*, 41, e1–e1.
- Kozyrovska, N.O., Reva, O.M., Goginyan, V.B., de Vera, J.-P., 2012, Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology, *Biopolymers and Cell*, 28, 103–113.
- Krawczyk, P.S., Lipinski, L., Dziembowski, A., 2018, PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures, *Nucleic Acids Research*, 46, e35–e35.

- Kuanyshev, N., Adamo, G.M., Porro, D., Branduardi, P., 2017, The spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*: Foe or friend?, *Yeast*, 34, 359–370.
- Kumar, S., Krishnani, K.K., Bhushan, B., Brahmane, M.P., 2015, Metagenomics: Retrospect and Prospects in High Throughput Age, *Biotechnology Research International*, 121735.
- Kumar, S.D., Narayan, G., Hassarajani, S., 2008, Determination of anionic minerals in black and kombucha tea using ion chromatography, *Food Chemistry*, 111, 784–788.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A.L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., Salzberg, S.L., 2004, Versatile and open software for comparing large genomes, *Genome Biology*, 5, R12.
- Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., Rupp, S., 2007, Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning, *Journal of Biotechnology*, 127, 575–592.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 82, 6955–6959.
- Li, H., Durbin, R., 2009, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform, *Bioinformatics*, 25, 1754–1760.
- Li, H., Li, M., Yang, X., Gui, X., Chen, G., Chu, J., He, X., Wang, W., Han, F., Li, P., 2018, Microbial diversity and component variation in Xiaguan Tuo Tea during pile fermentation, *PLoS One*, 13, e0190318.
- Li, Q., Huang, J., Li, Y., Zhang, Y., Luo, Y., Chen, Y., Lin, H., Wang, K., Liu, Z., 2017, Fungal community succession and major components change during manufacturing process of Fu brick tea, *Scientific Reports*, 7, 6947.
- Liu, C.H., Hsu, W.H., Lee, F.L., Liao, C.C., 1996, The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation, *Food Microbiology*, 13, 407–415.
- Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., Zhong, C., 2018, Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation, *Scientific Reports*, 8, 6266.
- Luo, Z.M., Ling, T.J., Li, L.X., Zhang, Z.Z., Zhu, H.T., Zhang, Y.J., Wan, X.C., 2012, A new norisoprenoid and other compounds from Fuzhuan brick tea, *Molecules*, 17, 3539–3546.
- Lv, H., Zhang, Y., Lin, Z., Liang, Y., 2013, Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review, *Food Research International*, 53, 608–618.
- Lyu, C., Chen, C., Ge, F., Liu, D., Zhao, S., Chen, D., 2013, A preliminary metagenomic study of puer tea during pile fermentation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3165–3174.

- Ma, Y., Duan, S., Zhang, D., Su, X., Zhang, D., Lv, C., Zhao, M., 2017, Microbial Succession and the Dynamics of Chemical Compounds during the Solid-State Fermentation of Pu-erh Tea, *Applied Sciences*, 7, 166.
- Malbaša, R. V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Čanadanović-Brunet, J.M., 2011, Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage, *Food Chemistry*, 127, 1727–1731.
- Mao, Y., Wei, B., Teng, J., Huang, L., Xia, N., 2017, Analyses of fungal community by Illumina MiSeq platforms and characterization of Eurotium species on Liupao tea, a distinctive post-fermented tea from China, *Food Research International*, 99, 641–649.
- Mardanov, A. V., Kadnikov, V. V., Ravin, N. V., 2018, *Metagenomics: A Paradigm Shift in Microbiology*, Metagenomics Perspectives, Methods, and Applications (1st Edition), In: Nagarajan, M. (ed.), Chapter 1, Elsevier, London, UK, 1–13.
- Marsh, A.J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2014, Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples, *Food Microbiology*, 38, 171–178.
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J., Escalante-Aburto, A., 2018, A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites, *CyTA - Journal of Food*, 16, 390–399.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Dewell, S. B., 2005, Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *Nature*, 437(7057), 376.
- Matias Rodrigues, J. F., Schmidt, T. S., Tackmann, J., von Mering, C., 2017, MAPseq: highly efficient k-mer search with confidence estimates, for rRNA sequence analysis, *Bioinformatics*, 33(23), 3808–3810.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, G., Gründer, K., 1995, The yeast spectrum of the ‘tea fungus Kombucha’, *Mycoses*, 38, 289–295.
- Merico, A., Capitanio, D., Vigentini, I., Ranzi, B.M., Compagno, C., 2003, Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*, *FEMS Yeast Research*, 4, 277–283.
- McPherson, J.D., 2014, A defining decade in DNA sequencing, *Nature Methods*, 11(10), 1003.
- Mitchell, A.L., Scheremetjew, M., Denise, H., Potter, S., Tarkowska, A., Qureshi, M., Salazar, G.A., Pesseat, S., Boland, M.A., Hunter, F.M.I., Ten Hoopen, P., Alako, B., Amid, C., Wilkinson, D.J., Curtis, T.P., Cochrane, G., Finn, R.D., 2018, EBI Metagenomics in 2017: enriching the analysis of microbial communities, from sequence reads to assemblies, *Nucleic Acids Research*, 46, D726–D735.
- Mittelbach, G.G., Steiner, C.F., Scheiner, S.M., Gross, K.L., Reynolds, H.L., Waide, R.B., Willig, M.R., Dodson, S.I., Gough, L., 2001, What Is the Observed Relationship between Species Richness and Productivity?, *Ecology*, 82, 2381.

- Mo, H., Zhu, Y., Chen, Z., 2008, Microbial fermented tea - a potential source of natural food preservatives, *Trends in Food Science and Technology*, 19, 124–130.
- Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J. M., Couce, M. L., Cocho, J. A., 2013, A glimpse into past, present, and future DNA sequencing, *Molecular Genetics and Metabolism*, 110(1), 3–24.
- Murugesan, G., Angayarkanni, J., Swaminathan, K., 2002, Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea, *Food Chemistry*, 79, 411–417.
- Nawrocki, E.P., Burge, S.W., Bateman, A., Daub, J., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Floden, E.W., Gardner, P.P., Jones, T.A., Tate, J., Finn, R.D., 2015, Rfam 12.0: updates to the RNA families database, *Nucleic Acids Research*, 43, D130–D137.
- Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., 2013, Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches, *Bioinformatics*, 29, 2933–2935.
- Nguyen, N.K., Nguyen, P.B., Nguyen, H.T., Le, P.H., 2015, Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid, *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1149–1155.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., Pevzner, P.A., 2017, metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler, *Genome Research*, 27, 824–834.
- Olm, M.R., Brown, C.T., Brooks, B., Banfield, J.F., 2017, dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication, *ISME Journal*, 11, 2864–2868.
- Ondov, B.D., Treangen, T.J., Melsted, P., Mallonee, A.B., Bergman, N.H., Koren, S., Phillippy, A.M., 2016, Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash, *Genome Biology*, 17, 132.
- Palma, M., Dias, P.J., Roque, F. de C., Luzia, L., Guerreiro, J.F., Sá-Correia, I., 2017, The *Zygosaccharomyces bailii* transcription factor Haa1 is required for acetic acid and copper stress responses suggesting subfunctionalization of the ancestral bifunctional protein Haa1/Cup2, *BMC Genomics*, 18, 75.
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2015, CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes, *Genome Research*, 25, 1043–1055.
- Parks, D.H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P., Woodcroft, B.J., Evans, P.N., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2017, Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life, *Nature Microbiology*, 2, 1533–1542.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013, The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Research*, 41, 590–596.

- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J., Segata, N., 2017, Shotgun metagenomics, from sampling to analysis, *Nature Biotechnology*, 35, 833–844.
- Ramazzotti, M., Bacci, G., 2018, *16S rRNA-Based Taxonomy Profiling in the Metagenomics Era*, Metagenomics Perspectives, Methods, and Applications (1st Edition), In: Nagarajan, M. (ed.), Chapter 5, Elsevier, London, UK, 103–119.
- Razmovski, R., Šćiban, M., 2008, Biosorption of Cr(VI) and Cu(II) by waste tea fungal biomass, *Ecological Engineering*, 34, 179–186.
- Reva, O.N., Zaets, I.E., Ovcharenko, L.P., Kukharensko, O.E., Shpylova, S.P., Podolich, O. V, de Vera, J.-P., Kozyrovska, N.O., 2015, Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments, *AMB Express*, 5, 35.
- Rho, M., Tang, H., Ye, Y., 2010, FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads, *Nucleic Acids Research*, 38(20), e191-e191.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J., 2004, Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities, *Annual Review of Genetics*, 38, 525–552.
- Römling, U., Galperin, M.Y., 2015, Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions, *Trends in Microbiology*, 23, 545–557.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 74, 5463–5467.
- Santamaria, M., Fosso, B., Licciulli, F., Balech, B., Larini, I., Grillo, G., De Caro, G., Liuni, S., Pesole, G., 2018, ITSoneDB: a comprehensive collection of eukaryotic ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) sequences, *Nucleic Acids Research*, 46, D127–D132.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, 2012, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 109, 6241–6.
- Schultz, J., Müller, T., Achtziger, M., Seibel, P.N., Dandekar, T., Wolf, M., 2006, The internal transcribed spacer 2 database--a web server for (not only) low level phylogenetic analyses, *Nucleic Acids Research*, 34, W704-707.
- Sedlar, K., Kupkova, K., Provaznik, I., 2017, Bioinformatics strategies for taxonomy independent binning and visualization of sequences in shotgun metagenomics, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 48–55.
- Seemann, T., 2014, Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Semjonovs, P., Ruklisha, M., Paegle, L., Saka, M., Treimane, R., Skute, M., Rozenberga, L., Vikele, L., Sabovics, M., Cleenwerck, I., 2017, Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 1003–1012.

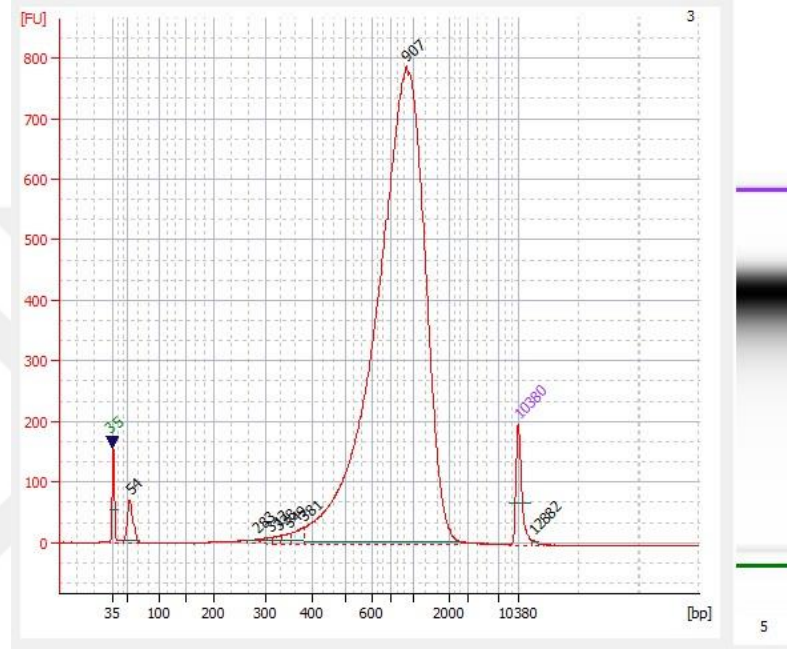
- Stratford, M., Capell, C.J., 2003, *Soft Drinks: microbiology*, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), In: Caballero, B., Finglas, P., Toldr, F. (eds), ISBN: 9780122270550, 5358–5366.
- Streit, W.R., Schmitz, R.A., 2004, Metagenomics – the key to the uncultured microbes, *Current Opinions in Microbiology*, 7, 492–498.
- Suenaga, H., Ohnuki, T., Miyazaki, K., 2007, Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds, *Environmental Microbiology*, 9, 2289–2297.
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E.S., He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J.L., Tringe, S.G., 2015, Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–15.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007, The human microbiome project, *Nature*, 449, 804–10.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V. V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F., 2004, Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment, *Nature*, 428, 37–43.
- Uchiyama, T., Miyazaki, K., 2009, Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening, *Current Opinions in Biotechnology*, 20, 616–622.
- UNITE Community, 2017, UNITE QIIME release, <https://unite.ut.ee/repository.php>, [Ziyaret tarihi: 10.01.2018].
- van Hijum, S.A.F.T., Vaughan, E.E., Vogel, R.F., 2013, Application of state-of-art sequencing technologies to indigenous food fermentations, *Current Opinions in Biotechnology*, 24, 178–186.
- Varghese, N. J., Mukherjee, S., Ivanova, N., Konstantinidis, K. T., Mavrommatis, K., Kyrpides, N. C., Pati, A., 2015, Microbial species delineation using whole genome sequences, *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6761-6771.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J. a, Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., Smith, H.O., 2004, Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, 304, 66–74.
- Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., Taillandier, P., 2018, Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review, *Journal of Food Science*, 83, 580–588.
- Wilkinson, D.E., Jeanicke, T., Cowan, D.A., 2002, Efficient molecular cloning of environmental DNA from geothermal sediments, *Biotechnology Letters*, 24, 155–161.

- Williams, W.S., Cannon, R.E., 1989. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*, *Applied Environmental Microbiology*, 55, 2448–52.
- Wolfe, B.E., Dutton, R.J., 2015, Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems, *Cell*, 161, 49–55.
- Wooley, J.C., Godzik, A., Friedberg, I., 2010, A primer on metagenomics, *PLoS Computational Biology*, 6, e1000667.
- Xiao, P., Huang, Y., Yang, W., Zhang, B., Quan, X., 2015, Screening lactic acid bacteria with high yielding-acid capacity from pickled tea for their potential uses of inoculating to ferment tea products, *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6727–6734.
- Xu, A., Wang, Y., Wen, J., Liu, P., Liu, Z., Li, Z., 2011, Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea, *International Journal of Food Microbiology*, 146, 14–22.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Lan Vu, H.T., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., 2012, Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*), *Journal of General Applied Microbiology*, 58, 397–404.
- Zhang, H., Xu, X., Chen, X., Yuan, F., Sun, B., Xu, Y., Yang, J., Sun, D., 2017, Complete genome sequence of the cellulose-producing strain *Komagataeibacter nataicola* RZS01, *Scientific Reports*, 7, 4431.
- Zhang, L., Zhang, Z., Zhou, Y., Ling, T., Wan, X., 2013, Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities, *Food Research International*, 53, 600–607.
- Zhang, T., Zhang, X.-X., Ye, L., 2011, Plasmid Metagenome Reveals High Levels of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Activated Sludge, *PLoS One*, 6, e26041.
- Zhang, W., Wang, X., Qi, X., Ren, L., Qiang, T., 2018, Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618, *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 705–713.
- Zhang, Y., Skaar, I., Sulyok, M., Liu, X., Rao, M., Taylor, J.W., 2016, The Microbiome and Metabolites in Fermented Pu-erh Tea as Revealed by High-Throughput Sequencing and Quantitative Multiplex Metabolite Analysis, *PLoS One*, 11, e0157847.
- Zhao, M., Zhang, D., Su, X., Duan, S., Wan, J., 2015, An Integrated Metagenomics / Metaproteomics Investigation of the Microbial Communities and Enzymes in Solid-state Fermentation of Pu-erh tea, *Scientific Reports*, 5, 10117.
- Zuehlke, J.M., 2013, *Influence of Zygosaccharomyces and Brettanomyces on wine quality and their control during vinification.*, Thesis (PhD), Washington State University.

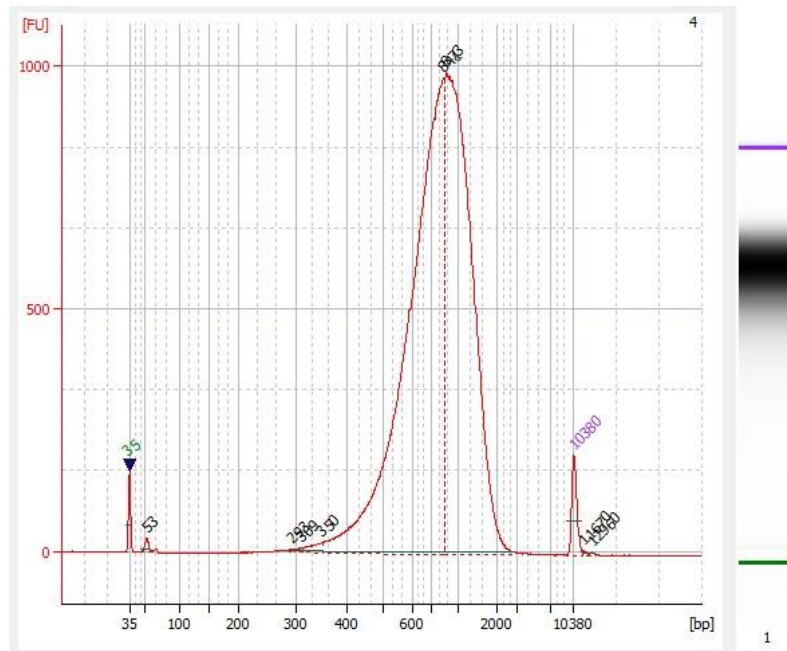
EKLER

EK 1. Tüm metagenom dizileme için hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrol sonuçları.

AS3

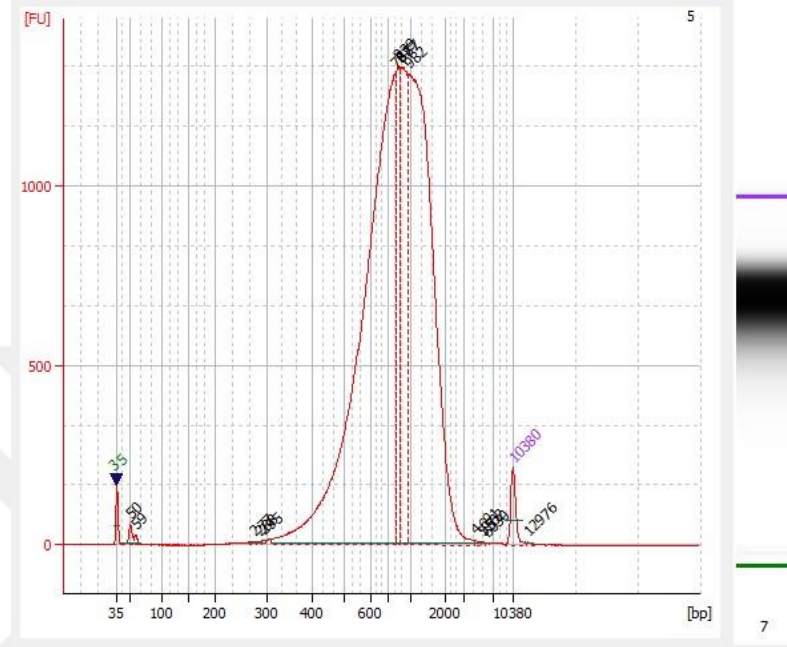


AP3

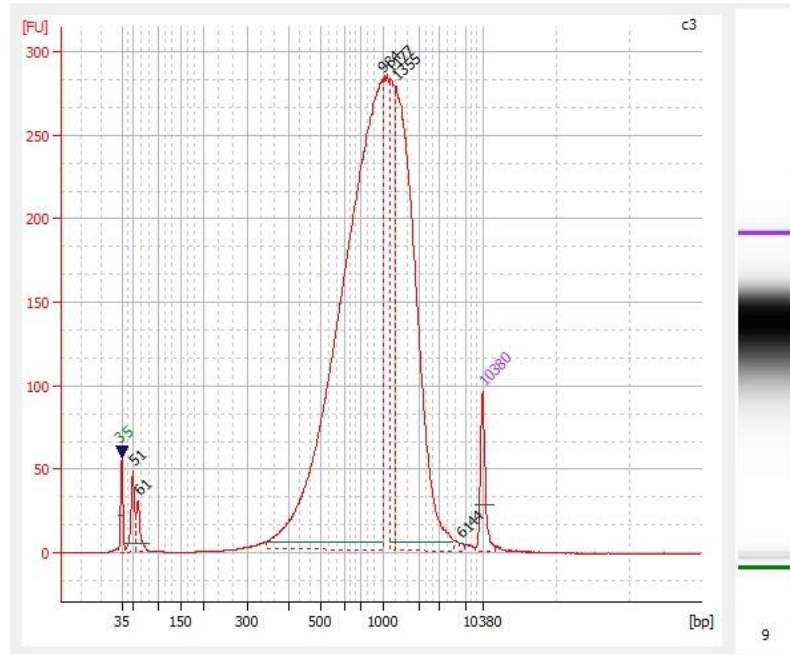


EK 1 (devam). Tüm metagenom dizileme için hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrol sonuçları.

AP10

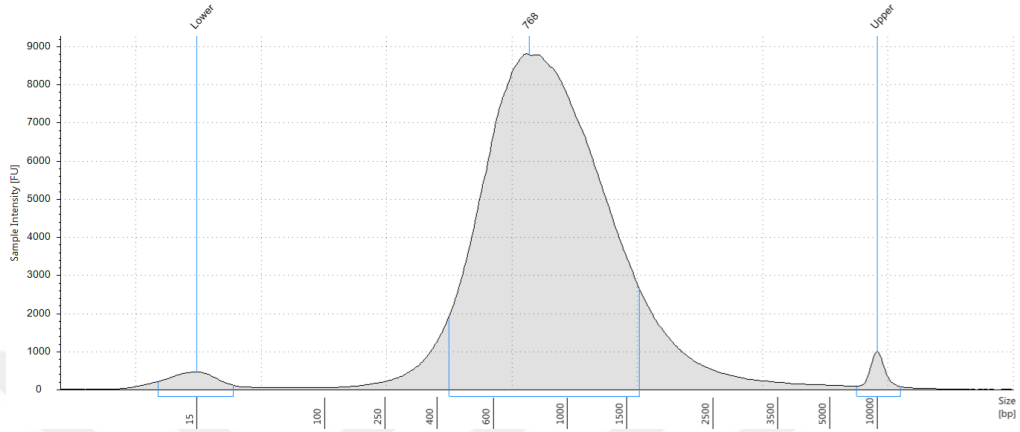


AS10

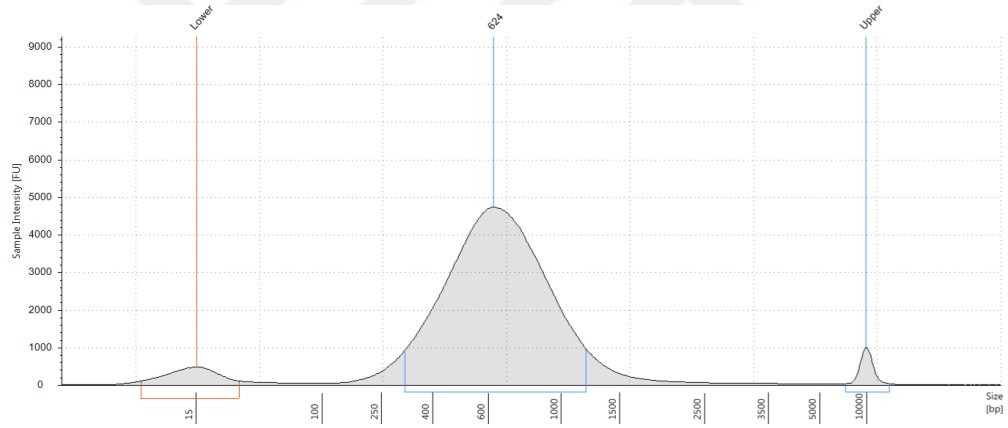


EK 1 (devam). Tüm metagenom dizileme için hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrol sonuçları.

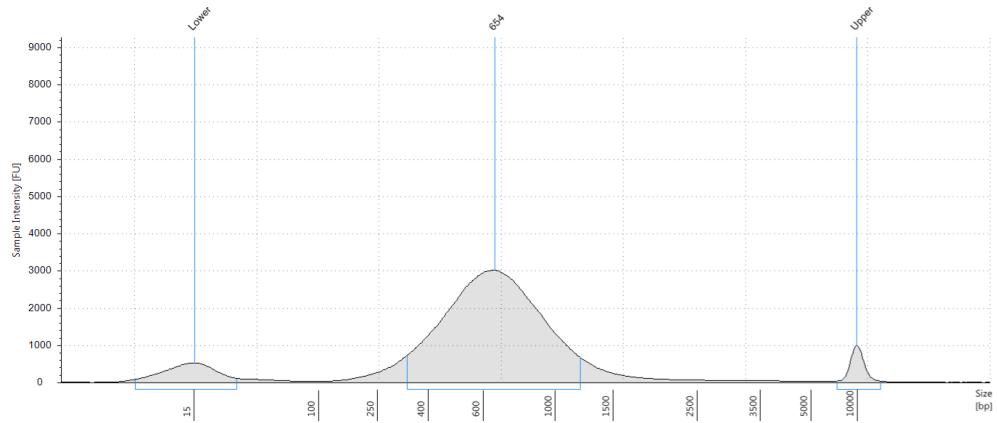
BP3



BS3

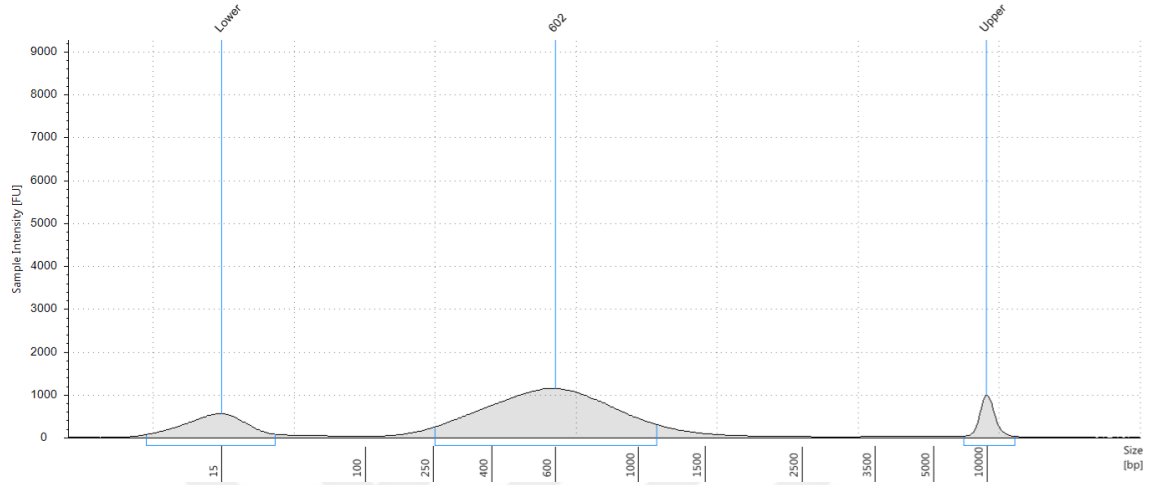


BP10

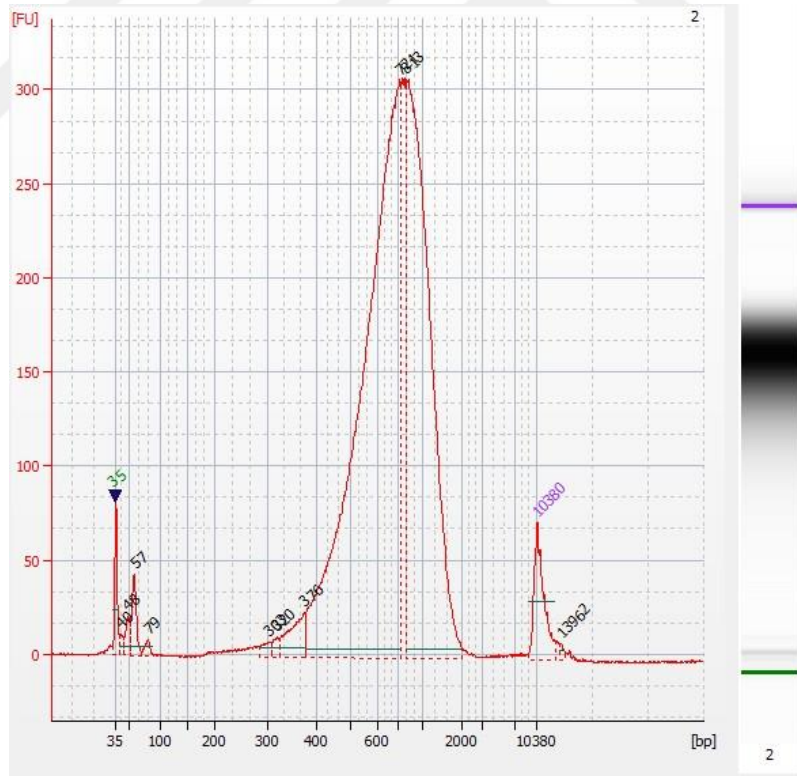


EK 1 (devam). Tüm metagenom dizileme için hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrol sonuçları.

BP15

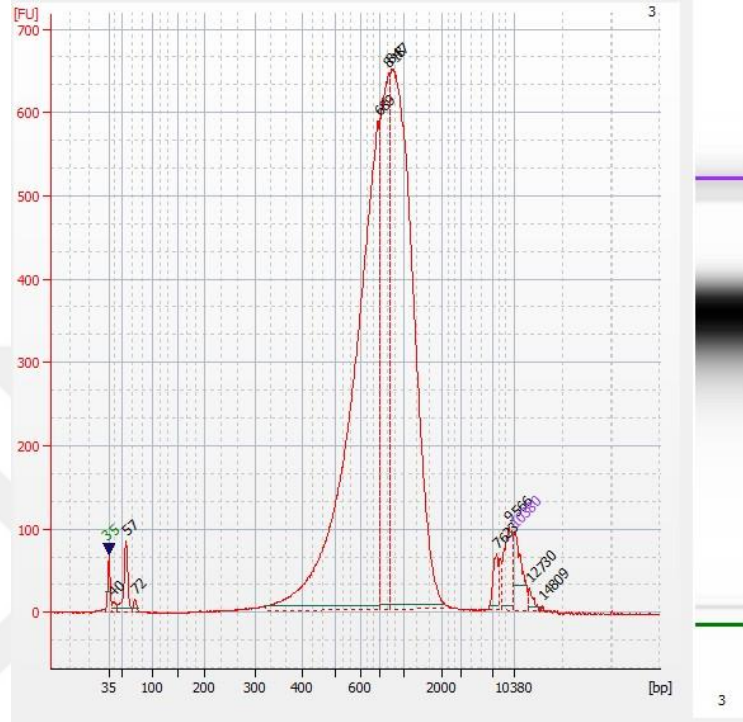


AS15

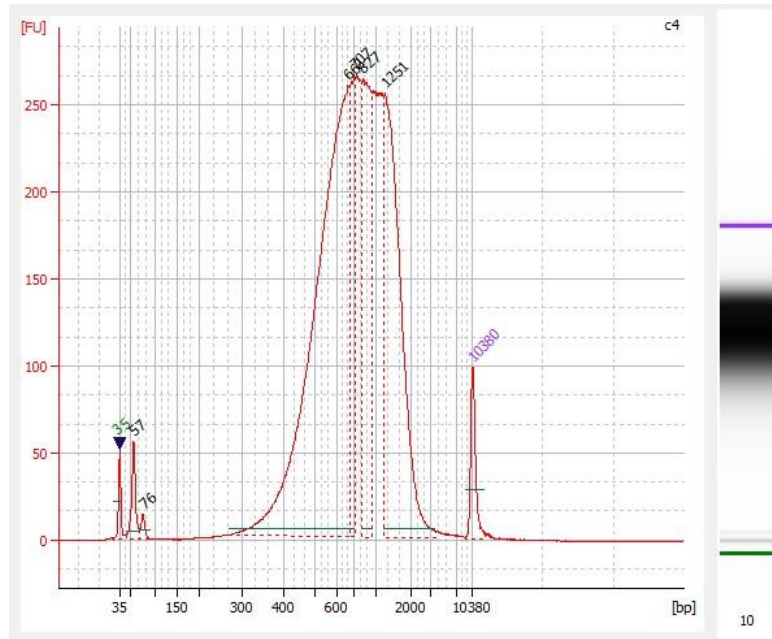


EK 1 (devam). Tüm metagenom dizileme için hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrol sonuçları.

BS10

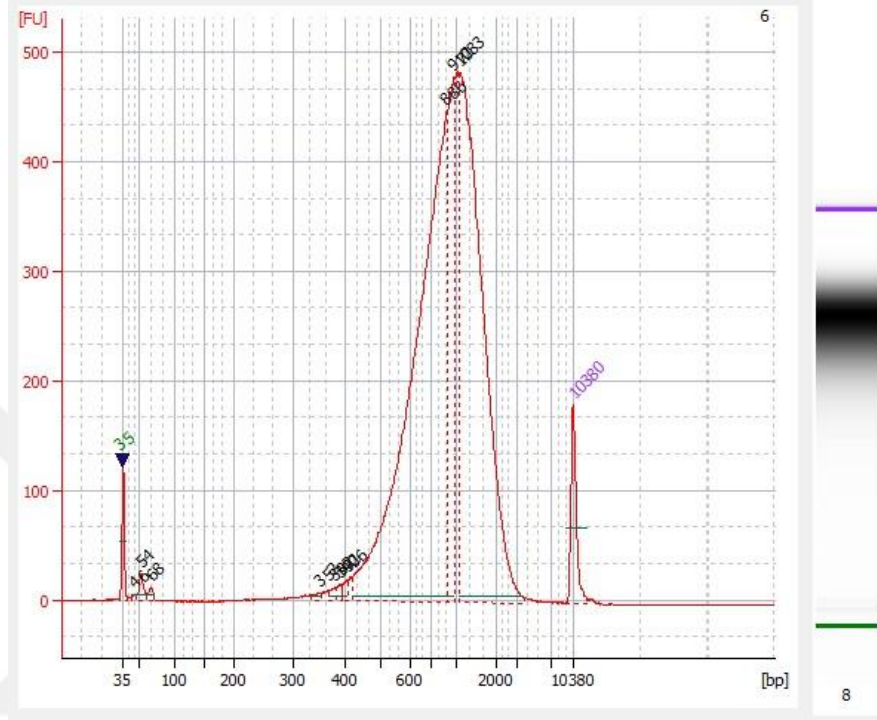


BS15



EK 1 (devam). Tüm metagenom dizileme için hazırlanan kütüphanelerin kalite kontrol sonuçları.

AP15



EK 2. ENA yüklenen dizilerin erişim numaraları.

Yöntem/Hedef Bölge	Örnek	Kaynak	Erişim No.
Amplikon / 16S rRNA geni	AS3	ENA	ERR2139368
	AP3	ENA	ERR2139369
	BS3	ENA	ERR2139370
	BP3	ENA	ERR2139371
	AS10	ENA	ERR2139372
	AP10	ENA	ERR2139373
	BS10	ENA	ERR2139374
	BP10	ENA	ERR2139375
	AS15	ENA	ERR2139376
	AP15	ENA	ERR2139377
	BS15	ENA	ERR2139378
	BP15	ENA	ERR2139379

EK 2 (devam). ENA yüklenen dizilerin erişim numaraları.

Amplikon / ITS1	AS3	ENA	ERR2138755
	AP3	ENA	ERR2138756
	BS3	ENA	ERR2138757
	BP3	ENA	ERR2138758
	AS10	ENA	ERR2138759
	AP10	ENA	ERR2138760
	BS10	ENA	ERR2138761
	BP10	ENA	ERR2138762
	AS15	ENA	ERR2138763
	AP15	ENA	ERR2138764
	BS15	ENA	ERR2138765
	BP15	ENA	ERR2138766
Shotgun / Tüm metagenom	AS3	ENA	ERR2135518
	AP3	ENA	ERR2135449
	BS3	ENA	ERR2401482
	BP3	ENA	ERR2401479
	AS10	ENA	ERR2135519
	AP10	ENA	ERR2102261
	BS10	ENA	ERR2437613
	BP10	ENA	ERR2401480
	AS15	ENA	ERR2437614
	AP15	ENA	ERR2126384
	BS15	ENA	ERR2135457
	BP15	ENA	ERR2401481

EK 3. Taksonomik binning sonuçları.

Örne k	Bin	Tamlık (%)	Kontaminasyon (%)	Suş heterojenitesi	Taksonomi
AP3	bin.1	51.57	22.21	1.75	Archaea (root)
	bin.2	98.46	1.49	100.00	Gluconacetobacter
	bin.3	99.50	0.50	0.00	Gluconacetobacter
	bin.4	97.59	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.5	0.00	0.00	0.00	NA
AP10	bin.1	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.2	24.14	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.3	60.89	28.63	1.22	Bacteria (root)
	bin.4	71.03	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.5	93.20	1.74	100.00	Gluconacetobacter
	bin.6	70.82	0.00	0.00	Gluconacetobacter

EK 3 (devam). Taksonomik binning sonuçları.

AS3	bin.1	95.88	0.66	0.00	Gluconacetobacter
	bin.2	95.83	0.00	0.00	Bacteria
	bin.3	96.50	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.4	73.23	0.64	0.00	Thermus_scotoductus
	bin.5	91.88	1.71	0.00	Acidobacteriales
	bin.6	32.76	9.56	60.00	Methyloversatilis
	bin.7	84.30	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.8	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.9	51.38	3.79	50.00	Anoxybacillus_flavithermus
	bin.12	48.03	0.00	0.00	Propionibacterium_acnes
	bin.13	100.00	0.93	0.00	Rubrivivax
	bin.10	59.17	27.76	0.00	Bacteria (root)
	bin.11	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.14	82.66	1.01	50.00	Lysobacter
AS10	bin.1	60.69	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.2	60.89	27.76	0.00	Bacteria (root)
	bin.3	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.4	80.30	0.21	50.00	Rubrivivax
	bin.5	8.33	0.00	0.00	NA
	bin.6	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.7	97.16	0.27	100.00	Gluconacetobacter
	bin.8	97.91	0.66	0.00	Gluconacetobacter
AS15	bin.1	9.19	0	0	Archaea (root)
	bin.2	94.31	1.12	66.67	Gluconacetobacter
	bin.3	83.66	0.5	0	Gluconacetobacter
	bin.4	94.32	0.66	0	Gluconacetobacter
	bin.5	14.27	0	0	Rubrivivax
	bin.6	2.3	0	0	Archaea (root)
	bin.7	0	0	0	NA
AP15	bin.1	81.50	0.86	0.00	Gluconacetobacter
	bin.2	99.11	1.49	33.33	Gluconacetobacter
BS3	bin.1	60.89	27.76	0.00	Bacteria (root)
	bin.2	4.17	0.00	0.00	NA
	bin.3	95.41	1.09	100.00	Gluconacetobacter
	bin.4	85.45	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.5	85.39	0.50	0.00	Gluconacetobacter
BS10	bin.1	20.96	0.47	0.00	Rubrivivax
	bin.2	95.67	18.98	56.60	Gluconacetobacter
	bin.3	60.89	27.76	0.00	Bacteria (root)
	bin.4	95.12	0.75	33.33	Gluconacetobacter
	bin.5	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.6	37.86	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.7	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.8	29.31	0.00	0.00	Gluconacetobacter

EK 3 (devam). Taksonomik binning sonuçları.

BS15	bin.1	50.39	19.51	0.00	Bacteria (root)
	bin.2	89.55	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.3	86.35	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.4	97.39	1.41	0.00	Gluconacetobacter
	bin.5	0.00	0.00	0.00	NA
BP3	bin.1	80.91	0.50	0.00	Gluconacetobacter
	bin.2	95.80	3.98	58.33	Gluconacetobacter
	bin.3	78.11	0.00	0.00	Gluconacetobacter
	bin.4	60.89	27.76	0.00	Bacteria (root)
	bin.5	8.33	0.00	0.00	NA
BP10	bin.1	5.17	0.00	0.00	Variovorax_paradoxus
	bin.2	98.58	3.73	44.44	Gluconacetobacter
	bin.3	53.68	24.31	0.00	Bacteria (root)
	bin.4	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.5	88.65	0.50	0.00	Gluconacetobacter
	bin.6	92.43	0.25	0.00	Gluconacetobacter
BP15	bin.1	65.00	4.31	100.00	Gluconacetobacter
	bin.2	0.00	0.00	0.00	NA
	bin.3	4.17	0.00	0.00	NA
	bin.4	52.07	0.00	0.00	Gluconacetobacter

EK 4. GenomeProperties sonuçları.

AS3_bin3 genom bininde eksiksiz bulunan yollar
Chorismate biosynthesis via shikimate
Glutathione biosynthesis
TCA cycle
Tryptophan biosynthesis from ribose-5-phosphate
IPP biosynthesis
NAD(P) biosynthesis from L-aspartate and DHAP
Lipoprotein system lgt/lsp/Int
Histidine biosynthesis from ribose-5-phosphate
Purine (inosine-5'-phosphate) biosynthesis from ribose-5-phosphate
Proline biosynthesis from glutamate
Arginine biosynthesis from ornithine, carbamoyl-p and aspartate
Ornithine biosynthesis from glutamate, acetylated branch
Pentose phosphate cycle
Lysine biosynthesis via diaminopimelate (DAP)
F1/F0 ATPase
Transcription termination/antitermination Nus factors
NADH dehydrogenase complex I

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

Iron-sulfur cluster kurulum SUF system
Threonine biosynthesis from aspartate semialdehyde
Aspartate semialdehyde biosynthesis from aspartate
Isoleucine biosynthesis from threonine and pyruvate
Valine biosynthesis from pyruvate
Leucine biosynthesis from pyruvate and acetyl-CoA
MinCDE system
Coenzyme A biosynthesis from pantothenate
Glycine cleavage system
Reduction of oxidized methionine
dTDP-L-rhamnose biosynthesis from dTDP-4-dehydro-L-rhamnose
GatABC aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase complex
Phosphate ABC transporter (pstSCAB-phoU)
RuvABC Holliday junction complex
Lysine biosynthesis
Sec system preprotein translocase
Resistance to Reactive Oxygen Species (ROS)
Acetyl-CoA carboxylase complex
SOS response
Cysteine biosynthesis from serine
Uroporphyrinogen III biosynthesis from 5-aminolevulinate
Protoheme from protoporphyrin IX
5-aminolevulinate biosynthesis from succinyl-CoA and glycine
Mismatch repair
Phosphonate catabolism
Chaperone system: DnaK-DnaJ-GrpE
Chaperone system: GroEL/GroES
Hydroxymethylpyrimidine pyrophosphate (HMP-P) biosynthesis from aminoimidazole ribotide
Thiamine pyrophosphate (TPP) biosynthesis from HMP-PP and HET-P
5-aminolevulinate biosynthesis
Thiamine pyrophosphate (TPP) de novo biosynthesis
RNA polymerase, bacterial
Trehalose biosynthesis, TreYZ pathway
Coenzyme B12 biosynthesis from cob(II)yrinate diamide
Pyruvate fermentation to acetoin
Prokaryotic N-terminal cleavage/methylation, type IV pilin-like
Cysteine biosynthesis
Toxin-antitoxin system, type II
Restriction enzyme system, type I
Entner-Doudoroff pathway
AddAB pathway
Formaldehyde detoxification, glutathione-dependent
Aerobic respiration
Aerobic electron transfer (transport) chain, ETC
Cytochrome c reductase

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

Cytochrome c based oxygen reduction and quinone re-oxidation
Single complex oxygen reduction and quinone re-oxidation
Cytochrome (quinone) oxidase, bd type
Cytochrome (quinone) oxidase, bo type
Spermidine biosynthesis from putrescine and S-adenosylmethionine
Putrescine biosynthesis
Cellulose biosynthesis
Alkylhydroperoxide reductase AhpCF (peroxiredoxin)
Queuosine (Q-tRNA) biosynthesis from preQ0
C-type cytochrome biogenesis, system I
Glycolysis
Guanine monophosphate (GMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
Purine catabolism via urate, xanthine and allantoin
Outer membrane protein kurulum complex
Methionine salvage from methylthioadenosine
Translation initiation, bacterial
Translation elongation, bacterial
Glyoxalase pathway, glutathione dependent
Lipoyl-protein attachment
Translation termination, bacterial
Adenosine monophosphate (AMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
UDP-N-acetylglucosamine biosynthesis from fructose-6-phosphate
Acetate production from acetylphosphate
Lysine biosynthesis via diaminopimelate (DAP), succinylated branch
Homocysteine regeneration from S-adenosylhomocysteine
Ribosome biogenesis proteins, bacteria
Encapsulin proteinaceous organelle
Rho-dependent termination
ATP-dependent protease HslVU
1-acylglycerol-3-phosphate biosynthesis, PlsX/Y pathway
Polyphosphate kinase/exopolyphosphatase system
2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase
Pyridoxal phosphate biosynthesis, PdxA/PdxJ pathway
Flagellar motor stator complex
OMP chaperone system: SurA-Skp-DegP
dTDP-4-dehydro-6-deoxy-alpha-D-glucose biosynthesis from glucose-1-phosphate
Biosynthesis of UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid (UDP-ManNAcA)
GDP-D-mannose biosynthesis from b-D-fructose-6-phosphate
dTDP-4-dehydro-L-rhamnose biosynthesis from dTDP-4-dehydro-6-deoxy-alpha-D-glucose
tRNA N6-threonylcarbamoyladenine modification
Type V secretion
16S rRNA C1402 m(4)Cm modification
Exodeoxyribonuclease VII
Acyl carrier protein phosphopantetheinylation

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

AS10_bin7 genom bininde eksiksiz bulunan yollar
Chorismate biosynthesis via shikimate
Glutathione biosynthesis
TCA cycle
Tryptophan biosynthesis from ribose-5-phosphate
IPP biosynthesis
NAD(P) biosynthesis from L-aspartate and DHAP
Lipoprotein system lgt/lsp/lnt
Histidine biosynthesis from ribose-5-phosphate
Purine (inosine-5'-phosphate) biosynthesis from ribose-5-phosphate
Proline biosynthesis from glutamate
Arginine biosynthesis from ornithine, carbamoyl-p and aspartate
Ornithine biosynthesis from glutamate, acetylated branch
Pentose phosphate cycle
Lysine biosynthesis via diaminopimelate (DAP)
Transcription termination/antitermination Nus factors
NADH dehydrogenase complex I
Iron-sulfur cluster kurulum SUF system
Threonine biosynthesis from aspartate semialdehyde
Aspartate semialdehyde biosynthesis from aspartate
Valine biosynthesis from pyruvate
MinCDE system
Coenzyme A biosynthesis from pantothenate
Glycine cleavage system
Reduction of oxidized methionine
dTDP-L-rhamnose biosynthesis from dTDP-4-dehydro-L-rhamnose
Pyrimidine (uridine-5'-phosphate) de novo biosynthesis
GatABC aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase complex
Phosphate ABC transporter (pstSCAB-phoU)
RuvABC Holliday junction complex
Lysine biosynthesis
Sec system preprotein translocase
Resistance to Reactive Oxygen Species (ROS)
SOS response
Cysteine biosynthesis from serine
Uroporphyrinogen III biosynthesis from 5-aminolevulinate
Protoheme from protoporphyrin IX
5-aminolevulinate biosynthesis from succinyl-CoA and glycine
Mismatch repair
Phosphonate catabolism
Chaperone system: DnaK-DnaJ-GrpE
Chaperone system: GroEL/GroES
ClpXP degradation machine
Hydroxymethylpyrimidine pyrophosphate (HMP-P) biosynthesis from aminoimidazole ribotide
Thiamine pyrophosphate (TPP) biosynthesis from HMP-PP and HET-P

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

5-aminolevulinate biosynthesis
Thiamine pyrophosphate (TPP) de novo biosynthesis
RNA polymerase, bacterial
Trehalose biosynthesis, TreYZ pathway
Coenzyme B12 biosynthesis from cob(II)yrinate diamide
Pyruvate fermentation to acetoin
Ethanolamine degradation proteinaceous organelle
Cysteine biosynthesis
Restriction enzyme system, type I
Entner-Doudoroff pathway
AddAB pathway
Formaldehyde detoxification, glutathione-dependent
Aerobic respiration
Aerobic electron transfer (transport) chain, ETC
Cytochrome c reductase
Cytochrome c based oxygen reduction and quinone re-oxidation
Single complex oxygen reduction and quinone re-oxidation
Cytochrome (quinone) oxidase, bd type
Cytochrome (quinone) oxidase, bo type
2-oxoglutarate dehydrogenase system
Xanthine dehydrogenase
Spermidine biosynthesis from putrescine and S-adenosylmethionine
Putrescine biosynthesis
Cellulose biosynthesis
Alkylhydroperoxide reductase AhpCF (peroxiredoxin)
Queuosine (Q-tRNA) biosynthesis from preQ0
C-type cytochrome biogenesis, system I
Glycolysis
Guanine monophosphate (GMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
Xanthine catabolism to urate
DNA gyrase
Purine catabolism via urate, xanthine and allantoin
Outer membrane protein kurulum complex
Methionine salvage from methylthioadenosine
Glyoxalase pathway, glutathione dependent
Lipoyl-protein attachment
Translation termination, bacterial
Adenosine monophosphate (AMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
UDP-N-acetylglucosamine biosynthesis from fructose-6-phosphate
Acetate production from acetylphosphate
Lysine biosynthesis via diaminopimelate (DAP), succinylated branch
Homocysteine regeneration from S-adenosylhomocysteine
Ribosome biogenesis proteins, bacteria
Replication initiation, bacterial
ATP-dependent protease HslVU

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

1-acylglycerol-3-phosphate biosynthesis, PlsX/Y pathway
Polyphosphate kinase/exopolyphosphatase system
2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase
Pyridoxal phosphate biosynthesis, PdxA/PdxJ pathway
Flagellar motor stator complex
OMP chaperone system: SurA-Skp-DegP
dTDP-4-dehydro-6-deoxy-alpha-D-glucose biosynthesis from glucose-1-phosphate
Biosynthesis of UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid (UDP-ManNAcA)
GDP-D-mannose biosynthesis from b-D-fructose-6-phosphate
dTDP-4-dehydro-L-rhamnose biosynthesis from dTDP-4-dehydro-6-deoxy-alpha-D-glucose
tRNA N6-threonylcarbamoyladenine modification
Ferrous iron transport Feo system
16S rRNA C1402 m(4)Cm modification
Exodeoxyribonuclease VII
Acyl carrier protein phosphopantetheinylation

AS10_bin8 genom bininde eksiksiz bulunan yollar

Chorismate biosynthesis via shikimate
Glutathione biosynthesis
Tryptophan biosynthesis from ribose-5-phosphate
IPP biosynthesis
NAD(P) biosynthesis from L-aspartate and DHAP
Lipoprotein system lgt/lsp/lnt
Histidine biosynthesis from ribose-5-phosphate
Purine (inosine-5'-phosphate) biosynthesis from ribose-5-phosphate
Proline biosynthesis from glutamate
Arginine biosynthesis from ornithine, carbamoyl-p and aspartate
Ornithine biosynthesis from glutamate, acetylated branch
Pentose phosphate cycle
Lysine biosynthesis via diaminopimelate (DAP)
NADH dehydrogenase complex I
Threonine biosynthesis from aspartate semialdehyde
Aspartate semialdehyde biosynthesis from aspartate
Isoleucine biosynthesis from threonine and pyruvate
Valine biosynthesis from pyruvate
Leucine biosynthesis from pyruvate and acetyl-CoA
MinCDE system
Coenzyme A biosynthesis from pantothenate
Glycine cleavage system
Reduction of oxidized methionine
dTDP-L-rhamnose biosynthesis from dTDP-4-dehydro-L-rhamnose
GatABC aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase complex
Phosphate ABC transporter (pstSCAB-phoU)

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

RuvABC Holliday junction complex
Lysine biosynthesis
Sec system preprotein translocase
Resistance to Reactive Oxygen Species (ROS)
Acetyl-CoA carboxylase complex
SOS response
Cysteine biosynthesis from serine
Uroporphyrinogen III biosynthesis from 5-aminolevulinate
Protoheme from protoporphyrin IX
5-aminolevulinate biosynthesis from succinyl-CoA and glycine
Mismatch repair
Phosphonate catabolism
Chaperone system: DnaK-DnaJ-GrpE
Chaperone system: GroEL/GroES
Hydroxymethylpyrimidine pyrophosphate (HMP-P) biosynthesis from aminoimidazole ribotide
Thiamine pyrophosphate (TPP) biosynthesis from HMP-PP and HET-P
5-aminolevulinate biosynthesis
Thiamine pyrophosphate (TPP) de novo biosynthesis
Trehalose biosynthesis, TreYZ pathway
Coenzyme B12 biosynthesis from cob(II)yrinate diamide
Pyruvate fermentation to acetoin
Prokaryotic N-terminal cleavage/methylation, type IV pilin-like
Cysteine biosynthesis
Entner-Doudoroff pathway
AddAB pathway
TonB-dependent transport
Formaldehyde detoxification, glutathione-dependent
Aerobic respiration
Aerobic electron transfer (transport) chain, ETC
Cytochrome c reductase
Cytochrome c based oxygen reduction and quinone re-oxidation
Single complex oxygen reduction and quinone re-oxidation
2-oxoglutarate dehydrogenase system
Putrescine biosynthesis
Cellulose biosynthesis
Alkylhydroperoxide reductase AhpCF (peroxiredoxin)
Queuosine (Q-tRNA) biosynthesis from preQ0
C-type cytochrome biogenesis, system I
Glycolysis
Guanine monophosphate (GMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
Purine catabolism via urate, xanthine and allantoin
Outer membrane protein kurulum complex
Methionine salvage from methylthioadenosine
Translation initiation, bacterial
Glyoxalase pathway, glutathione dependent

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

Lipoyl-protein attachment
Translation termination, bacterial
Adenosine monophosphate (AMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
UDP-N-acetylglucosamine biosynthesis from fructose-6-phosphate
Acetate production from acetylphosphate
Lysine biosynthesis via diaminopimelate (DAP), succinylated branch
Ribosome biogenesis proteins, bacteria
Replication initiation, bacterial
Encapsulin proteinaceous organelle
Rho-dependent termination
ATP-dependent protease HslVU
1-acylglycerol-3-phosphate biosynthesis, PlsX/Y pathway
Polyphosphate kinase/exopolyphosphatase system
2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase
Pyridoxal phosphate biosynthesis, PdxA/PdxJ pathway
Flagellar motor stator complex
OMP chaperone system: SurA-Skp-DegP
dTDP-4-dehydro-6-deoxy-alpha-D-glucose biosynthesis from glucose-1-phosphate
Biosynthesis of UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid (UDP-ManNAcA)
GDP-D-mannose biosynthesis from b-D-fructose-6-phosphate
dTDP-4-dehydro-L-rhamnose biosynthesis from dTDP-4-dehydro-6-deoxy-alpha-D-glucose
tRNA N6-threonylcarbamoyladenine modification
Type V secretion
16S rRNA C1402 m(4)Cm modification
Exodeoxyribonuclease VII
Acyl carrier protein phosphopantetheinylation

BS15_bin3 genom bininde eksiksiz bulunan yollar

Chorismate biosynthesis via shikimate
Glyoxylate shunt
Glutathione biosynthesis
Tryptophan biosynthesis from ribose-5-phosphate
IPP biosynthesis
IPP biosynthesis via mevalonate
Histidine biosynthesis from ribose-5-phosphate
Purine (inosine-5'-phosphate) biosynthesis from ribose-5-phosphate
Proline biosynthesis from glutamate
Arginine biosynthesis from ornithine, carbamoyl-p and aspartate
Ornithine biosynthesis from glutamate, acetylated branch
Pentose phosphate cycle
Threonine biosynthesis from aspartate semialdehyde
Aspartate semialdehyde biosynthesis from aspartate
Isoleucine biosynthesis from threonine and pyruvate

EK 4 (devam). GenomeProperties sonuçları.

Valine biosynthesis from pyruvate
Leucine biosynthesis from pyruvate and acetyl-CoA
Glycine cleavage system
Reduction of oxidized methionine
Pyrimidine (uridine-5'-phosphate) de novo biosynthesis
tRNA-Gln direct aminoacylation
Lysine biosynthesis
Resistance to Reactive Oxygen Species (ROS)
Uroporphyrinogen III biosynthesis from 5-aminolevulinate
Protoheme from protoporphyrin IX
5-aminolevulinate biosynthesis from succinyl-CoA and glycine
Chaperone system: GroEL/GroES
Thiamine pyrophosphate (TPP) biosynthesis from HMP-PP and HET-P
5-aminolevulinate biosynthesis
tRNA-Asn direct aminoacylation
Trehalose biosynthesis, OtsAB pathway
Class I (aerobic) ribonucleotide reductase
Acetyl-CoA biosynthesis from acetate, direct
Formaldehyde detoxification, glutathione-dependent
Aerobic respiration
Cytochrome c based oxygen reduction and quinone re-oxidation
Single complex oxygen reduction and quinone re-oxidation
2-oxoglutarate dehydrogenase system
Putrescine biosynthesis
Allantoin catabolism to glyoxalate and urea
Glycolysis
Glucose utilization as fructose-1,6-bisphosphate
Guanine monophosphate (GMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
Purine catabolism via urate, xanthine and allantoin
Lipoyl-protein attachment
Adenosine monophosphate (AMP) biosynthesis from inosine monophosphate (IMP)
Homocysteine regeneration from S-adenosylhomocysteine
Urea utilization
2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Muzaffer ARIKAN
Doğum Yeri	Dicle
Doğum Tarihi	19.09.1987
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	muzafferarikan@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	23.06.2010

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Anabilim Dalı	Genetik
Programı	Genetik

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Cen, O., Kannan, K., Sappal, J.H., Yu, J., Zhang, M., Arıkan, M., Uçur, A., Üstek, D., Cen, Y., Gordon, L., 2018, Longnecker, R., Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor TAK-659 Prevents Splenomegaly and Tumor Development in a Murine Model of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma, <i>mSphere</i> , 3(4):e00378-18.	
Kilic, S., Birdsell, D.N., Karagöz, A., Çelebi, B., Bakkaloglu, Z., Arıkan, M., Sahl, J.W., Mitchell, C., Rivera, A., Maltinsky, S., Keim, P., Üstek, D., Durmaz, R., Wagner, D.M., 2015, Water as Source of Francisella tularensis Infection in Humans, Turkey, <i>Emerging Infectious Diseases</i> , 21(12):2213.	
Abacı, N., Arıkan, M., Tansel, T., Sahin, N., Cakiris, A., Pacal, F., Sırma Ekmekci, S., Gök, E., Üstek, D., 2015, Mitochondrial mutations in patients with congenital	

- heart defects by next generation sequencing technology, *Cardiology in the Young*, 25(4):705-711.
- Gurses, C., Azakli, H., Alptekin, A., Cakiris, A., Abaci, N., Arikan, M., Kursun, O., Gokyigit, A., Ustek, D., 2014, Mitochondrial DNA profiling via genomic analysis in mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis, *Gene*, 538(2):323-327.
- Azakli, H., Gurses, C., Arikan, M., Aydoseli, A., Aras, Y., Sencer, A., Gokyigit, A., Bilgic, B., Ustek, D., 2013, Whole mitochondrial DNA variations in hippocampal surgical specimens and blood samples with high-throughput sequencing: A case of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, *Gene*, 529(1):190-194.
- Mese, S., Arikan, M., Cakiris, A., Abaci, N., Gumus, E., Kursun, O., Onel, D., Ustek, D., Kaymakoglu, S., Badur, S., Yenen, O.S., Bozkaya, E., 2013, The role of INNO-LiPA HBV DR and ultra-deep pyrosequencing in detecting the resistance mutations to nucleoside/nucleotide analogues in viral samples isolated from chronic hepatitis B patients, *Journal of General Virology*, 94(12):2729-2738.
- Kara, B., Arikan, M., Maraş, H., Abacı, N., Cakiris, A., Ustek, D., 2012, Whole mitochondrial genome analysis of a family with NARP/MILS caused by m.8993T>C mutation in the MT-ATP6 gene, *Molecular Genetics and Metabolism*, 107(3):389-393.
- Ustek, D., Sirma, S., Gumus, E., Arikan, M., Cakiris, A., Abaci, N., Mathew, J., Emrence, Z., Azakli, H., Cosan, F., Çakar, A., Parlak, M., Kurşun, O., 2012, A genome-wide analysis of lentivector integration sites using targeted sequence capture and next generation sequencing technology, *Infection Genetics and Evolution*, 12(7):1349-1354.
- Sogutcu, E., Emrence, Z., Arikan, M., Cakiris, A., Abaci, N., Oner, E.T., Ustek, D., Arga, K.Y., 2012, Draft Genome Sequence of Halomonas smyrnensis AAD6T, *Journal of Bacteriology*, 194(20):5690-5691.
- Ari, Ş., Arikan, M., 2016, *Next generation sequencing: advantages, disadvantages and future*, Plant Omics: Trends and Applications, In Hakeem, K., Tombuloğlu, H., Tombuloğlu, G., (eds.), Chapter 5, Springer International Publishing, Switzerland.
- Arikan, M., Ari, Ş., 2015, An investigation of gene level interactions of herbal products, *15th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology*, 05-08 May 2015, Petra Jordan.
- Arikan, M., Mitchell, A., Finn, R.D., Gürel, F., 2018, Microbial composition of Kombucha determined using amplicon and shotgun metagenomics, *26th International ICFMH Conference*, 03-06 Sep 2018, Berlin Germany.