

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

**ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN
KEFİR DANESİNDE GELİŞTİRİLMESİ**

Nilgün ÖZDEMİR

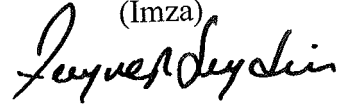
Danışman: Prof. Dr. Zeynep Banu SEYDİM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2012**

TEZ ONAYI

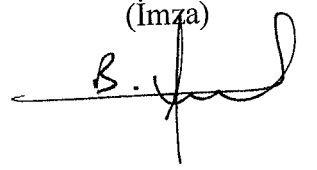
Nilgün ÖZDEMİR tarafından hazırlanan “**ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN KEFİR DANESİNDE GELİŞTİRİLMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Zeynep Banu SEYDİM
Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

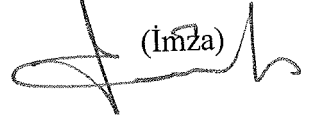
(İmza)


Jüri Üyeleri:

Yrd. Doç. Dr. Bedia ŞİMŞEK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

(İmza)


Yrd. Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı

(İmza)


Prof. Dr. M. Cengiz KAYACAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Kefirin Tanımı.....	4
2.2. Kefirin Tarihçesi	4
2.3. Kefir Danesi	5
2.3.1. Kefir ve Kefir dane mikrobiyolojisi	6
2.3.2. Kefir ve Kefir dane kimyası.....	10
2.4. Kefir Üretimi.....	12
2.5. Kefiran Ekzopolisakkarit Yapı.....	15
2.6. Kefir Üretiminde Yeni Teknolojik Gelişmeler	18
2.7. Kefirin Sağlık Üzerine Etkileri	20
2.8. Asetik Asit Bakterileri.....	26
2.8.1. Asetik asit bakterilerinin sistematik sınıflandırılması.....	27
2.8.2. Farklı kaynaklardan izole edilen ve tanımlanan asetik asit bakterileri	28
2.8.3. Asetik asit bakterilerinin selüloz üretimleri	31
2.8.4. Asetik asit bakterilerinin sağlık üzerine etkileri.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Kefir Danesi ve Sirke	35
3.2. Sirke Yapımı ve Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	35
3.2.1. Asetik asit bakterilerinin çoğaltılması.....	35
3.3. Kefir Üretimleri.....	35
3.3.1. Asetik asit bakterilerinin Kefir danesinde geliştirilmesi	35
3.3.2. Asetik asit bakterilerini içeren Kefir danesi kullanarak Kefir üretimi.....	37

3.4. KDA Danesi ve KA Örneğinde Asetik Asit Bakterilerinin PZR Yöntemi ile Belirlenmesi	38
3.5. Mikrobiyolojik Analizler	39
3.6. Kimyasal Analizler.....	40
3.6.1. pH.....	40
3.6.2. Titrasyon asitliği (% Laktik asit).....	40
3.6. 3. Kurumadde içeriği	40
3.6. 4. Kül içeriği.....	41
3.7. Organik Asit Bileşenlerin Belirlenmesi	42
3.8. Biyokütle Artışının Belirlenmesi	43
3.9. Ekzopolisakkarit Miktarının Belirlenmesi	44
3.9.1. Ekzopolisakkarit uygulamasında kullanılan çözeltiler.....	44
3.9.2. Ekzopolisakkarit ekstraksiyonunun ve konsantrasyonunun belirlenmesi.....	44
3.10. Kefir Örneklerinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	45
3.11. Duyusal Değerlendirme	45
3.12. İstatistik Analizi	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	49
4.1. KDA Örneğinde Asetik Asit Bakterilerinin PZR Analizi sonuçları.....	49
4.2. Mikrobiyolojik Analiz Bulguları	51
4.3. Kimyasal Analiz Bulguları.....	56
4.4. Organik Asit Bileşen İçeriği	58
4.5. Biyokütle Artışı Analiz Sonuçları.....	59
4.6. Kefir Örneklerinin Ekzopolisakkarit (EPS) İçeriği.....	61
4.7. Kefir Örneklerinin Reolojik Analiz Bulguları	63
4.8. Kefir Örneklerinin Duyusal Analiz Bulguları.....	65
5. SONUÇ	70
6. KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	90

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ASETİK ASİT BAKTERİLERİNİN KEFİR DANESİNDE GELİŞTİRİLMESİ

Nilgün ÖZDEMİR

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zeynep Banu SEYDİM

Son yıllarda yapılan araştırmalar fermente ürünlere ilgiyi artırmaktadır. Mikroorganizma faaliyetleri sonucu gerçekleşen fermantasyon, oluşan son ürüne bazı önemli fonksiyonel özellikler kazandırmaktadır. Kefir, Kefir danesinin süt ile fermantasyonu sonucunda elde edilen fermente bir süt ürünüdür. Kefir danesi, içerisinde başlıca laktik asit bakterilerini (LAB) ve mayaları belli oranlarda bulunduran kendine özgü bir mikrofloraya sahiptir. Bu mikroflora ile sütün fermantasyonu sonucu oluşan Kefir, sağlık üzerine yararlı etkilerinden dolayı fonksiyonel bir ürün olarak dikkat çekmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, Kefir danelerinde genellikle bulunmayan asetik asit bakterilerinin (AAB) dane mikroflorasında geliştirilmesi, bu kapsam içinde asetik asit bakterilerinin dane biyokütle artışına ve ekzopolisakkarit üretimine katkısının belirlenmesidir. Asetik asit bakterileri bulunduran Kefir danelerinden elde edilen Kefirin mikrobiyal, kimyasal, fiziksel ve duyuşsal özelliklerinin belirlenmesi de hedeflenmiştir.

Kullanılan spesifik primerler ile PZR ürünlerinin dizi analizi sonuçlarına göre geleneksel yöntemle üretilmiş elma sirkesinden elde edilen *Gluconacetobacter* cinsi AAB bakterileri Kefir danesinde geliştirilerek izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Uygulamanın biyokütle artışına etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,01$). Araştırmada, doğal Kefir danesinden üretilmiş Kefir örneği (KC) ve mikroflorasında AAB geliştirilen daneden üretilmiş Kefir örneğinden (KA) oluşan iki farklı uygulama bulunmaktadır. Kefir örneklerinin laktobasil içerikleri sırasıyla 9,02 ve 8,53 log kob/mL, laktokok içerikleri 9,28 ve 9,27 log kob/mL, maya içerikleri 2,08 ve 2,0 log kob/mL, *L acidophilus* içeriği 6,31 ve 6,19 log kob/mL ve *Bifidobacterium* spp. içeriği 5,98 ve 5,95 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. KA örneğinin AAB içeriği 3,86 log kob/mL olarak belirlenirken KC örneği AAB içermemektedir.

Kefir örneklerinin, sırasıyla pH değeri 4,70 ve 4,68; laktik asit değerleri %1,18 ve 1,53; %KM değerleri %12,56 ve 12,18; % kül miktarı %1,18 ve 1,26 olarak

bulunmuştur. Uygulamanın Kefir örneklerinin titrasyon asitliği üzerine önemli bir etkisi olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). KA ve KC örneklerinin ekzopolisakkarit (EPS) içerikleri sırasıyla 98,62;59,07 mg/L ve viskozite değerleri 330,9;195,4 mPas olarak belirlenmiştir ($P<0,05$). KA ve KC örneklerinin sırasıyla görünüş-tekstür puanı 30,9 ve 25,1; koku puanı 33,8 ve 23,6; tat puanı 31,1 ve 24,3 olarak tespit edilmiştir. Örnekler arasında tat puanı bakımından istatistik olarak farklılık önemlidir ($P<0,05$).

Bu tez sonucunda, Kefir danesinde AAB geliştirilmesinin Kefirin özelliklerine olumlu katkılar sağladığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kefir, asetik asit bakterileri (AAB), biyokütle artışı, viskozite

2012, 90 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

GROWTH OF ACETIC ACID BACTERIA IN KEFIR GRAIN

Nilgün ÖZDEMİR

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Zeynep Banu SEYDİM

In recent years, studies have been increased concern to fermented products. Fermentation, that occurs as a result of activities, contribute some important functional properties to final product. Kefir is fermented dairy product obtained from fermentation of milk with Kefir grain in milk. Kefir grain has specific microflora containing mainly Lactic Acid Bacteria (LAB) and yeasts. Kefir, occurring as a result of fermentation of this microflora, has been classified as a functional product due to affirmative effects on health.

The purpose of this thesis was to provide growth of Acetic Acid Bacteria (AAB) in Kefir grain in which AAB does not naturally exist. Furthermore, increment of grain biomass and exopolysaccharide production were determined. Microbial, chemical, physical and sensorial properties of Kefir samples produced with Kefir grains containing AAB were also carried out.

Genus *Gluconacetobacter* was isolated and identified according to sequence analysis of PCR products in Kefir grains. In this research, Kefir samples were produced using Kefir grain containing AAB (KA) and regular Kefir grains (control, KC). According to the results, AAB inoculation provided significant biomass increase ($P<0,01$). *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., yeast, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. contents of Kefir samples ranged between 9,02 and 8,53 log cfu/mL; 9,28 and 9,27 log cfu/mL; 2,08 and 2,0 log cfu/mL; 6,31 and 6,19 log cfu/mL; 5,98 and 5,95 log cfu/mL, respectively. AAB content of KA sample was 3,86 log cfu/mL.

pH values, lactic acid, dry matter and ash contents of Kefir samples were 4,70 and 4,68; 1,18% and 1,53%; 12,56% and 12,18%; 1,18 and 1,26 %, respectively. Exopolysaccharide (EPS) contents and viscosity values of Kefir samples (KA and KC) were 98,62 mg/L and 59,07 mg/L, 330,9 mPas and 195,4 mPas, respectively ($P<0,05$). Appearance-texture scores, odour scores and taste scores of Kefir samples were 30,9 and 25,1; 33,8 and 23,6; 31,1 and 24,3, respectively.

According to thesis results AAB growth in Kefir grains obtained affirmative effects on Kefir properties.

Key Words: Kefir, acetic acid bacteria (AAB), increasing biomass, viscosity

2012, 90 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgisiyle, öngörüsüyle benden desteğini esirgemeyen; bilim dünyasında çıktığım bu yolda bana ışık tutan, sevgisini ise hiç eksik etmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Banu SEYDİM'e sonsuz teşekkür ederim.

Her an yanımda olan bilgisiyle yol aldığım, sıcacık sevgisiyle huzur bulduğum hayatımda çok özel bir yere sahip olan hocam Yrd. Doç. Dr. Tuğba KÖK-TAŞ'a teşekkür ederim.

Önerileri ve bakış açısıyla her zaman ufkumu genişleten hocam Doç. Dr. Atıf Can SEYDİM'e, tez jüri üyesi olan hocalarım Yrd. Doç. Dr. Bedia ŞİMŞEK'e ve likit kromatografi kullanımında bana önemli katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY'a teşekkür ederim.

Her konuda; yanımda olan hocalarım Yrd. Doç. Dr. Havva Nilgün BUDAK'a, Öğretim Görevlisi İlhan GÜN'e, Araş. Gör. Bilge ERTEKİN-FİLİZ'e Araş. Gör. Dr. Özge Duygu OKUR'a, Dr. Gülçin ŞATIR'a,

Tez çalışmamda sağladıkları destekten dolayı Ünsüt Ltd. Şti, Gıda Müh. Burçin FİŞEKÇİ'ye ve Ali FİŞEKÇİ'ye

Ayrıca; yüksek lisans tezimin tamamlanmasında benden manevi desteklerini esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümündeki değerli hocalarıma,

2721-YL-11 no'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na

Laboratuvar çalışmalarımnda ve tez yazım aşamasında her zaman yanımda olan arkadaşlarım Gıda Yüksek Mühendisi Tolga KANKAYA ve Gıda Mühendisi Didem AKPINARA'ya

Tabii ki sabır ve sevgilerinden dolayı babam Ahmet ÖZDEMİR, annem Havva ÖZDEMİR, kardeşim Özgün ÖZDEMİR ayrıca; dayım Remzi TÖLÖ ve yengem Nefise TÖLÖ'ye

Sonsuz teşekür ederim...

Nilgün ÖZDEMİR
2012, ISPARTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kefir danesinin dış görünüşü	5
Şekil 2.2. Geleneksel Kefir üretimi.....	13
Şekil 2.3. Endüstriyel Kefir üretimi	14
Şekil 2.4. Kefiranın kimyasal yapısı	16
Şekil 3.1. Kefir danesinde asetik asit bakterilerinin geliştirilmesi.....	36
Şekil 3.2. KDA kullanılarak kefir üretiminin akış şeması	37
Şekil 3.3. Organik asit bileşen standart kromatogramı	43
Şekil 3.4. KA Kefir örneğinin organik asit bileşenlerine ait örnek kromatogram	43
Şekil 4.1. İzolantların filogenetik ağacı	50
Şekil 4.2. KA ve KC kefir örneklerinin mikrobiyal içerikleri	54
Şekil 4.3. KDA danesinin 25 gün süresince mikroflorasındaki AAB içeriği	56
Şekil 4.4. KDA ve KDC Kefir danelerinin biyokütle artış miktarı.....	60
Şekil 4.5 KA ve KC Kefir örneklerinin EPS içeriği	62
Şekil 4.6. KA ve KC Kefir örneklerinin viskozite değerleri.....	64
Şekil 4.7. KA ve KC örneklerinin genel duyuşal (tat, koku, tekstür) değerlendirme sonuçları	65
Şekil 4.8a. KA ve KC örneklerinin görünüm ve tekstür özellikleri ile ilgili duyuşal değerlendirme sonuçları	66
Şekil 4.8b. KA ve KC örneklerinin koku özellikleri ile ilgili duyuşal değerlendirme sonuçları	67
Şekil 4.8c. KA ve KC örneklerinin tat özellikleri ile ilgili duyuşal değerlendirme sonuçları	68
Şekil 4.9. KA ve KC örneklerinin hedonik test değerlendirme sonuçları.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kompleks Kefir dane mikroflorası	9
Çizelge 2.2. Kefirin kimyasal içeriği	11
Çizelge 2.3. Asetik asit bakterilerinin sınıflandırılması.....	28
Çizelge 3.1. Kefir duyusal değerlendirme formu.....	46
Çizelge 4.1. Spesifik primerler kullanılarak elde edilen PZR ürünün dizi analizi sonrası bazı bakteri isimleri ve genetik benzerlikleri.....	49
Çizelge 4.2. Kefir örneklerinin <i>Lactobacilli</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>L acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. ve Maya içerikleri.....	53
Çizelge 4.3. Kefir örneklerinin kimyasal analiz sonuçları.....	57
Çizelge 4.4. Kefir örneklerinin organik asit bileşen içerikleri.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAB	: Asetik asit bakterileri
LAB	: Laktik asit bakterileri
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
EPS	: Ekzopolisakkarit
<i>A</i>	: <i>Acetobacter</i>
<i>Ac</i>	: <i>Acidomonas</i>
<i>Am</i>	: <i>Ameyamaea</i>
<i>As</i>	: <i>Asaia</i>
<i>C</i>	: <i>Candida</i>
<i>G</i>	: <i>Gluconobacter</i>
<i>Ga</i>	: <i>Gluconacetobacter</i>
<i>Gr</i>	: <i>Granulibacter</i>
<i>K</i>	: <i>Kluyveromyces</i>
<i>Lb</i>	: <i>Lactobacillus</i>
<i>Leu</i>	: <i>Leuconostoc</i>
<i>Lc</i>	: <i>Lactococcus</i>
<i>N</i>	: <i>Neoasaia</i>
<i>Sacch</i>	: <i>Saccharomyces</i>
<i>S</i>	: <i>Saccharibacter</i>
<i>Str</i>	: <i>Streptococcus</i>
<i>Sw</i>	: <i>Swaminathania</i>
<i>T</i>	: <i>Tantichanoenia</i>

1.GİRİŞ

Her canlı yaşamını sürdürebilmek için enerjiye gereksinim duyar. Enerji elde etme yollarından birisi de fermantasyondur. Fermantasyon, enerji elde etmek amacıyla büyük moleküllü maddelerin, özellikle karbonhidratların mikroorganizmalar tarafından daha küçük moleküllü maddelere parçalanmasını sağlayan reaksiyonlarının genel adıdır. Fermantasyon; reaksiyona oksijen girip girmemesine göre anoksidatif fermantasyon (reaksiyona oksijen girmez) ve oksidatif fermantasyon (reaksiyona oksijen girer) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Etil alkol fermantasyonu, laktik asit fermantasyonu, propiyonik asit fermantasyonu, butirik asit fermantasyonu vb. anoksidatif fermantasyona; asetik asit fermantasyonu, sitrik asit fermantasyonu, okzalik asit fermantasyonu, fumarik asit fermantasyonu vb. oksidatif fermantasyona örnek gösterilebilir.

Fermantasyonda rol alan mikroorganizmalar sadece kendi yaşam döngüleri için enerji elde etmezler; aynı zamanda da fermantasyon sonucu oluşturdukları moleküler yapılar ile yeni bir gıda üretimini sağlarlar. Arkeolojik kanıtlar, gıdalarda fermantasyon işleminin binlerce yıl önce bir rastlantı sonucu ortaya çıktığını göstermektedir. Bilinen en eski fermente gıdalar arasında yoğurt, ayran, Kefir, sirke, şarap ve bira bulunmaktadır.

Kefir, Kefir danesinin süt ile fermantasyonu sonucunda elde edilen fermente bir süt ürünüdür. İlk olarak Kafkasya'da üretildiği ve orada yaşayan halkın sağlıklı olmasının düzenli Kefir tüketimi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Kefir; laktik asit ve etanol fermantasyonları sonucunda üretilen laktik asit, karbondioksit, etanol, asetaldehit ve diğer aroma bileşenlerini içeren, diğer fermente süt ürünlerine göre kendine özgü ve ferahlatıcı fermente süt içeceğidir.

Kefir, sütte bulunan besin maddelerinin hepsini bileşiminde bulundurmasının yanında, yapılan araştırmalarla, sindirim sistemine olumlu katkıları, anti-mutajen ve anti-kanserojen özellikleri belirlenmiş fonksiyonel bir üründür. Kefirin sağlık üzerine pozitif etkisi dane mikroflorasında bulunan probiyotik bakteri içeriği ve bu bakterilerin ürettiği metabolik ürünlerle ilişkilendirilmektedir (Zubillaga et al., 2001;

Otles and Cagindi, 2003; Farnworth, 2006; Terzi, 2007; Ershidat and Mazahreh 2009; Güzel-Seydim et al., 2010a). Bu nedenle Kefir dane mikroflorasında mikroorganizmaların içeriği ve oranı oldukça önemlidir.

Kefir danelerinde mikroflora farklılığı, kullanılan süt, üretim şekli, dane inokülasyon oranı ve orijini ile ilişkili olmakla beraber mikroflorada bulunan laktik asit bakterileri ve mayalar benzerlik gösterir. Kefir dane mikroflorasında olan değişim ürünün aroma maddelerinde ve duyuşsal özelliklerinde farklılıklara neden olabilmektedir (Güzel-Seydim vd., 2010a).

Son yıllarda fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesiyle önemi artan diğeri bir fermente ürün sirkedir. Sirke, mayaların fermente olabilen şekeri etanole dönüştürmesini takiben asetik asit bakterileri tarafından etanolün oksidasyonu sonucu asetik asit oluşumudur. Alkol içeren sıvının asetik asit bakterileri tarafından asetik asit ve suya okside olmasına asetik asit fermentasyonu denir (De Ory et al.,2002).

Yapılan çalışmalar sirkenin sağlık üzerine anti-tümör, anti-mikrobiyal, anti-oksidan, kardiovasküler ve kolesterol düşürücü gibi etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Nishikawa et al., 2001; Ninfali et.al., 2005; Johnston, 2006; Costa et al., 2009; Budak and Güzel-Seydim, 2010, Budak et al., 2011). Sirkenin sağlık üzerine olumlu etkisinin, içerdiği bileşenler ve/veya bu bileşenlerin fermentasyon ile oluşmasını sağlayan asetik asit bakterileri (AAB)'nden kaynaklandığı düşünülmektedir. Son yıllarda AAB ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. AAB'nin anti-mikrobiyal etkisi, dermatolojide kullanımı, sinirsel iletim üzerine ve deri bariyer fonksiyonu üzerine olumlu etkisi, bazı türleri tarafından üretilen selülozun yara tedavisinde kullanılması vb. yapılan çalışmalardan bazılarıdır (Fesq et al., 2001; Green et al., 2004; Stasiak and Blažejak, 2009; Fukami et al., 2010a; Oda et al., 2010; Zhao et al., 2010a;b).

Kefir danesi içerisinde doğal olarak bulunan asetik asit bakterileri (AAB)'nin tespit edildiği bazı araştırmalar vardır, ancak AAB ülkemizde bulunan Kefir danelerinde doğal olarak tespit edilmemiştir. Kefir danesinin AAB için uygun bir ortam oluşturduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının başlıca amaçları:

1. Mikroflorasında asetik asit bakterileri bulunmayan Kefir danesine AAB inoküle ederek AAB grubunun dane içerisinde geliştirilmesi ve AAB'nin dane mikroflorasında yer almasının sağlanması,
2. Dane mikroflorasında AAB geliştirilen Kefir danesi kullanılarak üretilen Kefirin kimyasal, fiziksel ve duyuşal özelliklerindeki değişiminin tespit edilmesi,
3. AAB'nin Kefir danesinin biyokütle artışına ve ekzopolisakkarit üretimine etkisinin belirlenmesidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kefir Tanımı

Çağın içeceği olarak tanımlanan Kefir, sütün doğal starter kültür olan Kefir daneleriyle ile fermantasyonu sonucunda elde edilen fermente bir süt ürünüdür. Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran en önemli özellik laktik asit bakterilerinin yanı sıra mayaların da metabolik aktiviteleri sonucu üretilmesidir (Gorski, 1994; Frengova et al., 2002).

2.2. Kefirin Tarihçesi

Kefir, yaklaşık 5000 yıllık bir geçmişe sahip, toplumların temel besin maddesi olan sütün Kefir danesiyle fermantasyonu sonucu oluşan ve sağlık iksiri olarak belirtilen bir süt ürünüdür. Kefir, uzun yıllardan beri Kafkasya’da bilinmekte ve bu bölgedeki uzun ve sağlıklı yaşamlarıyla tanınan insanlar tarafından yaygın olarak üretilip tüketilmektedir.

Kefir danesi ya da Kefirin ilk olarak ne zaman bulunduğu bilinmemekte ancak 18. yüzyıldan beri üretildiği tahmin edilmektedir (Yaygın, 1996). Bazı kaynaklar Kefir’in Orta Asya’da göçebe olarak yaşayan Türkler tarafından tesadüfen bulunduğunu belirtmektedir. Orta Asya’da göçebe olarak yaşayan Türkler göç sırasında ehlileştirdikleri hayvanların (koyun, keçi, inek vb.) sütlerini yine bu hayvanların derileri kullanarak taşımaktadırlar. Taşıma esnasında deri içinde oluşan pıhtıdaki süngerimsi yapının o bölgeden alınarak ilk Kefir üretiminde kullanıldığı sanılmaktadır. Sonraki Kefir üretimlerinde de kullanılan ve Kefir danesi olarak bilinen bu yapının her Kefir üretiminde tekrar tekrar kullanarak bir mücevher gibi nesilden nesile miras olarak aktarıldığı belirtilmektedir (Koroleva, 1988b; Stepaniak et al., 2002).

Kefir isminin Kafkas dillerinde “en iyi kalite”, Orta Asya Türkçesinde ve Arapçada keyif veren, coşturan anlamında “keyf” veya köpük anlamında “kef” sözcüklerinden türediği öne sürülmektedir (Güzel-Seydim, 2001). Ayrıca dünyanın birçok

bölgesinde üretilen Kefir; kephir, kiaphur, kefer, knapon, kefi ve kipi gibi farklı isimlerle kullanılmaktadır (Koroleva, 1988a; Kök-Taş; 2010).

Son yıllarda dünyada tüketimi yaygınlaşan Kefir Avrupa ülkelerinde de Kefir, sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel bir ürün olarak beğenilerek tüketilmektedir (Güzel-Seydim et al., 2010a).

2.3. Kefir Danesi

Kefir danesi, küçük karnabahar/mısır patlağı görünümünde, ortalama 1-3 cm çapında, yuvarlak, loplu, beyaz-krem renginde, elastik bir tekstüre sahiptir (Şekil 2.1. Özdemir, 2011), (La Rivie`re et al., 1967; Kosikowski and Mistry, 1997; Guzel-Seydim, 2000a; Farnworth, 2005; Gorsek and Tramsek, 2007). Kefir danesi % 85-90 su içermekte; kurumaddede % 57 karbonhidrat, % 33 protein, % 4 yağ ve % 3 kül bulunmaktadır. (Stepaniak et al., 2002). Danenin elastik olması, çabuk dağılmaması, yapışkan ve yumuşak olmaması fiziksel özelliğinin uygun olduğunun başlıca göstergesidir.

Kefir danesi; laktik asit bakterileri (LAB), asetik asit bakterileri (AAB) ve mayaları kapsayan kompleks bir mikrofloradan ve bu mikrofloranın oluşturduğu polisakkarit bir matriks yapıdan oluşmaktadır (Margulis, 1996; Seydim et al., 2001; Gönnevik, et al. 2011; Magalhães et al., 2011). Kefir daneleri her fermantasyon sonrasında büyür, çoğalır ve özelliklerini bir sonraki jenerasyona aktarırlar. Kefir danelerinin mikroflorası oldukça stabildir; eğer uygun kültürel ve fizyolojik koşullarda saklanırsa yıllarca aktivitelerini koruyabilirler.



Şekil 2.1. Kefir danesinin dış görünüşü
(Nilgün Özdemir tarafından fotoğraflanmıştır.)

2.3.1. Kefir ve Kefir dane mikrobiyolojisi

Kefir danesi; LAB, AAB ve mayaları içeren kompleks bir mikrofloraya sahiptir (Garrote et al., 1997). Dane mikroflorasında beraber canlılıklarını sürdüren mikroorganizmalar arasında simbiyotik bir ilişki bulunmaktadır. Kefir fermantasyonu sırasında ilk önce homofermentatif laktokoklar hızlı şekilde gelişerek ortam pH değerini düşürmekte ve pH'nın düşmesi laktobasillerin gelişimini etkinleştirirken laktokok sayısının azalmasına neden olmaktadır. Mayalar heterofermentatif laktokoklar ile beraber aroma bileşenlerin oluşumunu sağlamaktadır. Fermantasyon sürecindeki mikroorganizmaların simbiyotik ilişkisi, laktik asit bakteri gelişiminin maya ve asetik asit bakteri gelişimini desteklemesi şeklinde kendini göstermektedir (Koroleva, 1982; Güzel-Seydim et al. 2003).

Danenin mikrobiyal içeriğini görüntülemek ve var olan mikroorganizmaların dane içinde lokalize olduğu yeri belirlemek amacıyla kullanılan Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniği ile pek çok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırma sonuçları Kefir danesinin dış kısmı ile iç kısmındaki mikrofloranın değişim gösterdiğini belirtmektedir (Toba et al., 1990; Rea et al., 1996; Güzel-Seydim et al., 2005). Wouters vd. (2002), Kefir danesinin dış yüzeyinde laktobasillerin, dane merkezine doğru ise mayaların hakim olduğunu belirtmişlerdir. Jianzhong vd. (2009) yaptıkları çalışmada Tibet Kefir danesinde iç kısım mikrobiyal hücre yoğunluğunun dış kısım yoğunluğundan daha az olduğunu belirlemiş ve iç kısımda kısa zincirli Laktobasillerin, dış kısımda ise uzun zincirli Laktobasillerin baskın olduğunu tespit etmişlerdir. SEM kullanılarak, Türk Kefir danesinin yapısında bulunan laktik asit bakterileri, mayalar ve fibril yapıları gözlemlenmiştir; maya kolonizasyonunun özellikle Kefir danesinin orta kısımlarında yoğunlaştığı belirtilmiştir (Guzel-Seydim et al., 2005). Zhoua vd. (2009) SEM kullanılarak incelenilen Kefir danesinde, mikrofloranın suda çözünmeyen polisakkarit ve fibril yapı içinde bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca LAB ve mayaların danede buldukları bölgeler, Güzel-Seydim vd. (2005) tarafından yapılan çalışma ile uyum gösterdiğini de belirtmişlerdir.

Kefir danesinin mikrobiyal popülasyonunda genel olarak Laktik asit bakterileri (%65-80 oranında) baskınlık gösterirken (10^8 - 10^9), bunu maya (10^5 - 10^6) ve bazen de asetik asit bakteri (10^4 - 10^5) içeriği izlemektedir (Witthuhn, 2005; Farnworth, 2005).

Kefir dane mikroflorası, danenin orijinine göre çeşitlilik göstermektedir. Farklı orijinli danelerde farklı bakterileri cinsleri veya farklı bakteri türleri tespit edilmektedir. Miguel vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada farklı orijinli Kefir dane mikrobiyal içeriği incelenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) orijinli daneden *Lactobacillus satsumensis* ve Brezilya orijinli bir daneden ise bir asetik asit bakterisi olan *Acetobacter syzygii* bakterileri ilk kez bir Kefir danesinden izole edilmiştir.

Güney Afrika orijinli Kefir danesinden izolasyon sonucunda; *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* 2, *L. fermentum*, *Lc. lactis* spp. *lactis* 1, *L. lactis* bakterileri; *Zygosaccharomyces* spp., *Candida. kefir*, *C. lipolytica* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayaları tanımlanmış ve pediyokoklar, asetik asit bakterileri ve propiyonibakterler bulunmamıştır. Çalışmada kullanılan 8 farklı Kefir danesinin her birinin mikroflorası yukarıda bahsedilen mikroorganizmaların farklı kombinasyonlarını içerdiği belirtilmiştir (Witthuhn et al., 2004).

Irigojen vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada İspanya orijinli Kefir danesi kullanılmıştır. Laktobasil- Laktokok 10^8 kob/mL, maya 10^5 kob/mL ve AAB sayısı 10^6 kob/mL olarak belirlenmiş ve AAB popülasyonunun Rea vd. (1996) tarafından tespit edilen düzeyden daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada %1 ve %5 Kefir danesi inokülasyon oranının mikrobiyal açıdan oluşturduğu fark araştırılmıştır. Maya ve AAB içeriği, %5 inokülasyon oranında daha yüksek iken, Laktobasil- Laktokok cinsleri %1 inokülasyon oranında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum dane içindeki mikroflorasının mükemmel dengesine ışık tutmaktadır.

Arjantin orijinli dört farklı Kefir danesi kullanılarak üretilen Kefir örneklerinin mikrobiyolojik analizler sonuçlarında *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *L. parakefir*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leu. mesenteroides*, *Acetobacteriae* sp. ve *Saccharomyces cerevisiae* ile *Kluyveromyces marxianus* mayaları tespit edilmiştir (Garrote et al., 2001).

Kroger (1993) Avrupa orijinli Kefir örneklerinde streptokok içeriği 10^8-10^{10} kob/mL, termofilik laktobasil içeriği 10^5 kob/mL ve mezofilik laktobasil içeriği 10^2-10^3 kob/mL, maya içeriği 3×10^5 kob/mL bulunduğunu belirlemiştir.

İrlanda orijinli Kefirde 10^9 kob/mL laktokok, 10^8 kob/mL leukonostok, 5×10^6 kob/mL laktobasil, 10^5 kob/mL asetik asit bakteri ve 10^6 kob/mL maya bulunduğu belirtilmiştir (Rea et al., 1996).

Güzel-Seydim vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada Kefirin fermantasyon sonunda laktokok içeriği 8,64 log kob/mL olarak belirtilmiştir. Maya sayısı ise fermentasyonun beşinci saatinde 4,21 log kob/mL iken fermantasyon sonunda 6,16 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bir günlük depolama sonucunda LAB ve maya miktarları sırasıyla 9,19 ve 6,55 log kob/mL olarak tespit etmişlerdir. Türkiye orijinli Kefir danelerinde LAB/maya oranı $10^9/10^6$ olarak belirlenmiştir.

Gönnevik vd. (2011) tarafından yapılan araştırmada Norveç orijinli Kefir danesinden üretilen Kefir (ana kültür) %0,2 oranında starter kültür olarak kullanılarak Kefir üretilmiş ve üretilen Kefirin 8 haftalık soğuk depolama süresince mikrobiyal ve kimyasal özellikleri incelenmiştir. İlk 4 haftalık depolama sonucunda LAB sayısında 8 log kob/mL'den 2-3 log kob/mL'ye kadar bir azalma gözlemlenirken, son 4 haftada bu sayının değişmediği belirlenmiştir. Depolama süresince maya sayısında 3,3 log kob/mL'de 5 log kob/mL'ye kadar düzenli bir artış görülmüş buna paralel olarak da mayaların metabolizma ürünü olan CO₂ ve etanol miktarında artış gözlemlenmiştir.

Kefir dane mikroflorasında laktozu fermente edebilen mayalar (*Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *Candida kefir*, *Torula kefir*) ve laktozu fermente edemeyen mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*, *Sacch. unisporus*) birlikte bulunmaktadır (Marquina, et al. 2002; Irigojen, 2005). Kefirin maya içeriği 10^3-10^6 aralığında değişim gösterdiği çeşitli araştırmalarda belirtilmektedir (Kuo and Lin, 1999; Simova 2002; Farnworth, 2005; Guzel-Seydim, 2005; Kök-Taş, 2010; Zajsek and Gorsek, 2010). Güney Afrika orijinli Kefirin 8 log kob/mL olan maya miktarı bugüne kadar belirlenen en yüksek değerdir (Loteran et al., 2003).

Jianzhong vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada PCR-Denatüre Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) kullanılarak Tibet Kefir dane mikroflorası incelenmiş ve SEM kullanılarak görüntülenmiştir. Bakteriyel çeşitliliğin mayalara kıyasla daha fazla olduğu belirtilen bu çalışmada tespit edilen bakteriler; *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefiri*, *L. casei*, *Lc. lactis*, mayalar; *Sacch. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Kazachstania unispora*, *Kazachstania exigua*'dır.

Çizelge 2.1. Kompleks Kefir dane mikroflorası (Ottogalli et al.,1973; Rosi, 1978; Koreleva 1991; Pintado et al., 1996; Garrote et al., 2001; Simova et al., 2002; Marquina 2002; Santos et al., 2003; Yuksekdog et al., 2004; Witthun et al., 2005; Delfederico et al., 2006; Latorre Garcia et al., 2007; Terzi, 2007; Chen et al., 2008; Wang et al., 2008; Jianzhong et al., 2009; Miguel et al., 2010; Kök-Taş, 2010; Güzel-Seydim et al, 2010b).

Laktobasiller	Streptokoklar
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Streptococcus durans</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Asetik Asit Bakterileri
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Acetobacter sp.</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Acetobacter rascens</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Acetobacter syszgiai</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Mayalar
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Saccharomyces delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Lactobacillus fermentum.</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Candida holmii</i>

Çizelge 2.1. (devam)

<i>Lactobacillus satsumensis</i>	<i>Candida friedricchi</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>
Laktokoklar	<i>Candida kefir</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Lc. lactis subsp. lactis biovar. Diacetylactis</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i>	<i>Candida lambica</i>
Bifidobakterler	<i>Candida valida</i>
<i>Bifidobacter bifidum</i>	<i>Cryptococcus humicolis</i>
<i>Bifidobacter langum</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
<i>Bifidobacter breve</i>	<i>Kazachstania unispor</i>
	<i>Kazachstania exigua</i>

2.3.2. Kefir ve Kefir dane kimyası

Kefir danesinin ve Kefirin kimyasal içeriği; tıpkı mikrobiyal içeriği gibi dane orijinine, dane inokülasyon oranına, fermantasyon koşullarına (sıcaklık ve süre) ve fermantasyonda kullanılan süt çeşidine (inek, koyun, keçi, deve, bufalo, soya sütü) bağlı olarak değişmektedir. Tüm bu parametreler Kefirin pH, titrasyon asitliği, laktoz, yağ, protein oranı ve etanol içeriği gibi kimyasal özelliklerini, köpük oluşumu ve viskozite gibi fiziksel özelliklerini ve tat-koku-görünüş-tekstür gibi duyuşal özelliklerini etkilemektedir (Irigojen, 2005; Silva, et al., 2009; Kök-Taş, 2010).

Kefir danesi yaklaşık olarak; (ağırlık/hacim) %85-90 su, %0,2 yağ, %3 protein, %6 şeker, %0,7 kül, %0,1-0,3 asetik asit, %1-2 laktik asit ve % 0,1-1 alkol içermektedir (Garrote, et al., 2001; Wojtowski, et al., 2003; Silva, et al., 2009). Aynı zamanda Kefir, bazı esansiyel amino asitler (triptofan, fenilalanin lösin izolösin, metiyonin vb.), vitaminler (A, B₁, B₂, B₆ ve C vb.), mineraller (magnezyum, potasyum, kalsiyum, fosfor vb.), aromatik bileşenler (asetaldehit, diasetil, asetoin vb.) gibi makro ve mikro elementleri de içermektedir (Otlés, et al., 2003; Liut-Kevicius and Sarkinas, 2004; Grønnevik et al., 2011). Bu kusursuz optimal denge ve en mükemmel sinerjik sentez Kefir'i farklı bir süt ürünü yapmaktadır.

Çizelge 2.2. Kefirin kimyasal içeriği (Nayir, 2008)

Bileşenler	100g
Enerji	65 kkal
Su (%)	85-90
Protein (%)	3,5
Yağ (%)	2,8-3,3
Laktoz (%)	4,0
Süt asidi (g)	0,8
Laktik asit (g)	0,8-2
Etil alkol (g)	0,9-2,9
Esansiyel amino asit (g)	1,75
Vitaminler (mg)	2,1
Mineraller (g)	0,6-0,86

Kefirde tüm bu kimyasal bileşenlerin oluşumunda mikroorganizmalar önemli etkiye sahiptir; fermantasyonda mayalar, etanol ve karbondioksit üretimine katkılarından dolayı önemli bir yer tutar (Irigojen et al., 2005; Grønnevik et al., 2011). Kefirin kimyasal içeriğinin fermantasyon sonrası depolama sürecinde de değişimi mikroorganizmaların faaliyetinin devam ettiğinin göstergesidir. Depolama sürecinde maya sayısındaki artış ile etanol ve karbondioksit miktarlarındaki artış pozitif korelasyon göstermektedir (Beshkova et al., 2002; Grønnevik et al., 2011).

Karbondioksit (CO₂) içeriği Kefire ferahlatıcı, hafif köpüklü özellikler kazandırdığından dolayı Kefirin duyusal özelliğinin önemli bir tanımlayıcısıdır. Kefirin karbondioksit içeriğinin de maya aktivitesinin etkin olduğu belirtilmektedir. Daneden elde edilen Kefirin CO₂ içeriği 0,85-1,05 g/l aralığında değiştiği belirtilmektedir (Beshkova et al., 2002; Simova et al., 2002; Güzel- Seydim et al., 2005).

Asetaldehit, diasetil ve asetoin bileşenlerinin Kefir aromasına katkısından dolayı oldukça dikkat çekmektedir. Bu bileşenlerin konsantrasyonunda Kefir fermantasyonu süresince artış gözlemlenirken, depolama süresince asetaldehit konsantrasyonunda artma, asetoin konsantrasyonunda azalma belirlenmiştir (Güzel-Seydim et al., 2000a, 2000b).

Kefirin organik asit içeriği ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fermente süt ürünlerinde organik asitler genel olarak mikrobiyal metabolizma sonucu oluşan metabolik ürünlerdir. Bu organik asitler son ürünün organoleptik özelliklerinin

oluşumunda etkili olurken; aynı zamanda bazılarının sağlık üzerinde de pozitif etki gösterdikleri belirtilmektedir. Güzel-Seydim vd. (2000a) tarafından yapılan çalışmada kefirin 4°C'deki depolama süresince organik asit değerlerindeki değişimi (orotik, sitrik, pürivik, laktik, ürik, asetik, propionik, bütirik ve hippürik) 275 nm'de UV detektör kullanılarak HPLC ile belirlenmiştir. Depolama süresince sitrat miktarı 1438-1863 µg/g, ürik asit miktarı 27-33 µg değişim aralığında olduğu belirtilmiştir. Pürivik asit miktarı 0. günde 18 µg/g, orotik asit miktarı 21. günde 131 µg/g aralığında tespit edilmiştir. Kefirde asetik, propionik, bütirik ve hippurik asit depolama süresince tespit edilememiştir.

Kınık vd. (1998) tarafından Kefirin fermantasyonu ve depolama süresince organik asit bileşenleri belirlenmiştir. Pürivik, süksinik ve propionik asitlerin fermantasyonun 6. saatine kadar arttığı ve daha sonrasında depolama süresince azaldığı, orotik ve sitrik asit miktarlarının ise hem fermantasyon hem de depolama sürecinde azaldığı belirtilmiştir.

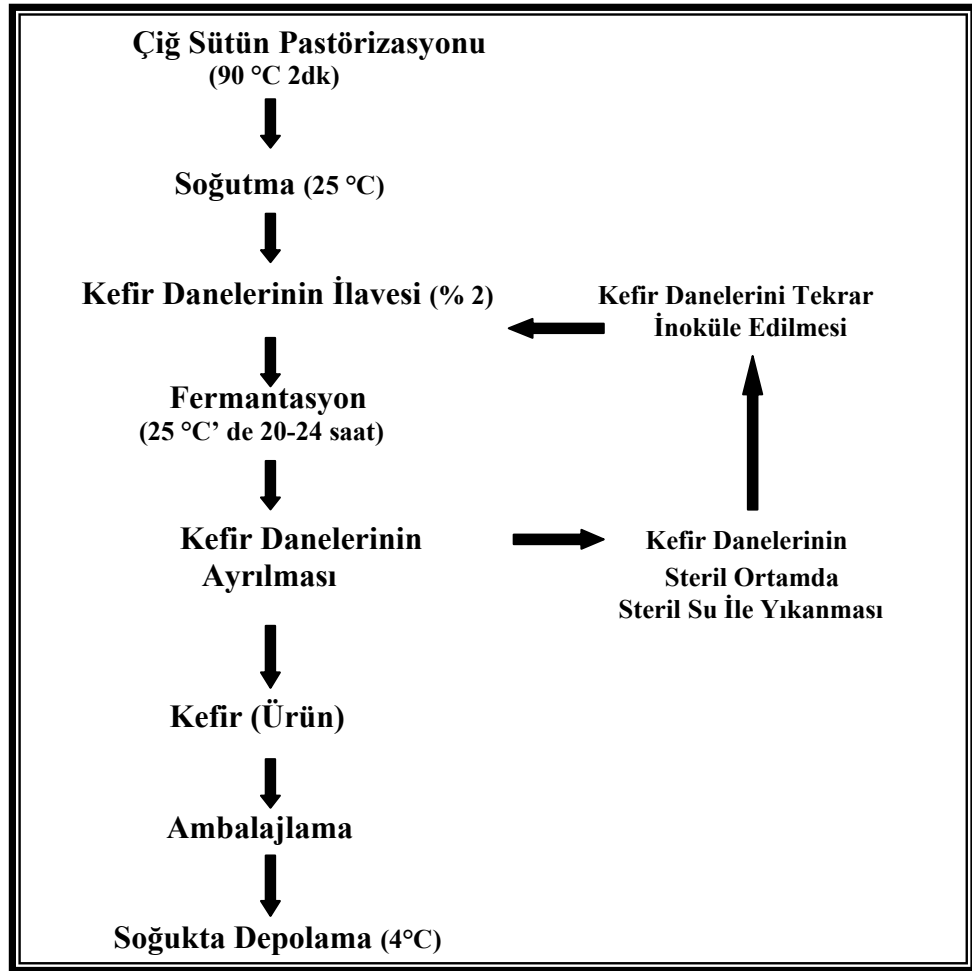
2.4. Kefir Üretimi

Kefir üretiminde genellikle hammadde olarak inek sütü kullanılmasına rağmen keçi, koyun, deve ve bufalo, hindistan cevizi, pirinç sütleri de kullanılabilir. Ayrıca soya sütü, Kefir üretiminde kullanılan bir hammaddedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar fonksiyonel özelliğinin yüksek olduğu bilinen keçi sütünün Kefirde kullanımı yönünde eğilim göstermektedir (Quiros et al. 2005; Şatır, 2011).

Kefir, geleneksel ve endüstriyel olmak üzere iki farklı şekilde üretilebilmektedir. Geleneksel Kefir üretimi, starter kültür olarak dane kullanılması ile diğer fermente süt ürünlerinin üretiminden farklılık göstermektedir (Simova et al., 2002).

Geleneksel Kefir üretiminde, 85-90 °C'de 20 dakika pastörize edilen ve 25 °C'ye kadar soğutulmuş sütte optimum %2 oranında Kefir danesi eklenir. Kefir danesi eklenen süt 25°C'de, 20- 24 saat inkübasyona bırakılır. Süre sonunda, pH 4,6 değerine ulaşıncaya pıhtı oluşur ve fermentasyon tamamlanır. Fermentasyon tamamlandığında karbondioksitin etkisiyle Kefir daneleri oluşan pıhtının yüzeyine doğru çıkmaktadır (Seydim, 2001). Oluşan pıhtı süzgeçten geçirilerek içerisindeki

Kefir danelerinin ayrılması sağlanır. Ayrılan daneler yeni bir fermantasyon/Kefir üretimi için süte eklenirken süzgeçten ayrılan sıvı kısım ise 4⁰C'de 1 günlük depolama (olgunlaşma) sonrası Kefir olarak tüketilebilmektedir (Şekil 2.2.). Geleneksel üretimde eklenen optimum dane oranının %2-3 aralığında değişim gösterdiği belirtilmektedir (Koroleva, 1991; Kök-Taş, 2010). Ayrıca eklenen dane oranı ile Kefirin inkübasyon süresinin negatif bir korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (Kuo and Lin, 1999).



Şekil 2.2. Geleneksel Kefir üretimi

Endüstriyel Kefir üretiminde ise pastörize edilen ve 25⁰C'ye soğutulan süte Kefir kültürü (starter) ilave edilir. 20-24 saat 25⁰C'de fermente edilir. Kefirin pH değeri 4,6 düzeyine ulaşınca fermantasyon sonlandırılır ve ürün karıştırılıp aseptik dolum yapılır. Ürün +4⁰C'de 1 günlük depolama sonrası tüketilebilir (Şekil 2.3), (Otlis and Cagindi, 2003; Kök-Taş, 2010).



Şekil 2.3. Endüstriyel Kefir üretimi

Endüstriyel üretimde ticari olarak üretilen starter kültürler kullanılmaktadır. Bu starter kültürler genelde daneden izole edilen mikroorganizmaların biyoteknolojik olarak geliştirilmesi ve sonrasında liyofilize edilmesi ile hazırlanmakta ve *Str. lactis*, *L. plantarum*, *Str. cremoris*, *L. casei*, *Str. diacetylactis*, *L. cremoris*, *Sacch. florentinus* vb. mikroorganizmalar içermektedir (Hertzler and Clancy 2003). Beshkova vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada Kefir danesinden izole edilen iki bakteri (*L. helveticus* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis*) ve bir maya (*Sacch. cerevisiae*)'nın iki yoğurt kültürü (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *St. thermophilus*) ile kombine edilerek starter kültür oluşturulması buna örnek olarak gösterilebilir. Ancak bu kültürlerden elde edilen Kefir, Kefir danesinden elde edilen Kefire özgü kimyasal özellikleri ve tat-aromayı tam anlamıyla son ürüne verememekte ayrıca; Kefirin fonksiyonel özelliğinin en önemli göstergesi olan probiyotik mikroorganizmaları da yeterli miktarda yapısında bulunduramamaktadır. Dane mikroflorasındaki mikrobiyal zenginlik ve mikroorganizmaların özelliği bunun nedeni olarak gösterilmektedir (Farnworth, 2005; Güzel-Seydim et al., 2010). Simova vd. (2002) Kefir danesinden üretilen Kefir-A, Kefir danesinden üretilen Kefir-B ve Kefir kültüründen üretilen Kefir-C mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri açısından karşılaştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre A, B ve C örneklerinde streptokoklarda %26-30 artış tespit edilirken, laktobasillerde %13-23 ve mayalarda da %10-17 azalma belirtilmiştir. Sonuçlar, Kefir üretimi için Kefir danesi kullanılması gerektiğini göstermektedir. Bozkurt vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada da geleneksel olarak Kefir danesinden üretilen Kefir ile piyasada ticari olarak satılan Kefirin fonksiyonel etkinliğinin en önemli kriteri olan mikrobiyal içerikleri, özellikle probiyotik içerikleri karşılaştırılmıştır. Araştırma bulguları geleneksel Kefirde tespit edilen mikroorganizma ve probiyotik bakteri içeriklerinin ticari olarak üretilen Kefir'e göre önemli düzeyde fazla olduğunu göstermiştir. Kefir üretiminde dane kullanımı Kefir'in fonksiyonel özelliğinden en üst düzeyde yararlanılmasını sağlamaktadır.

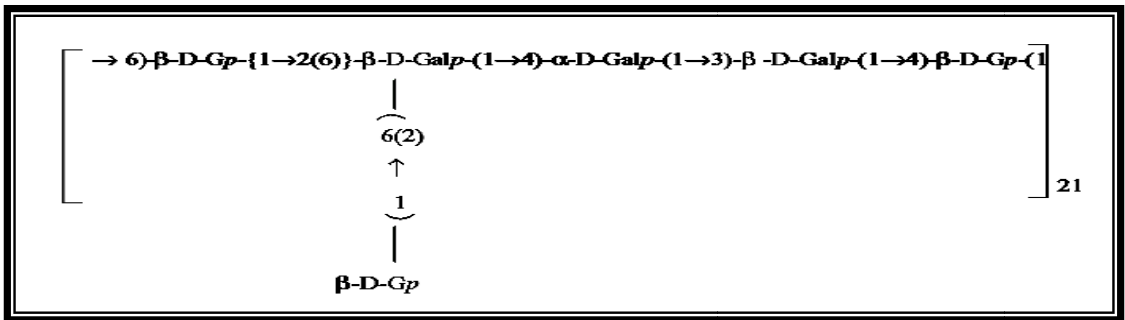
2.5. Kefiran-Ekzopolisakkarit Yapı

Kefiran; Kefir danesinin içerisindeki mikroflora tarafından üretilen ekzopolisakkarit bir yapıdır (Rimada and Abraham, 2001; Mukai et al., 1998; Micheli et al., 1999).

Mikroorganizmalar intraselüler (depo) polisakkaritler, ekstraselüler polisakkaritler ve yapısal formdaki polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türü sentezlemektedirler. Ekzopolisakkarit (EPS) formları hücre duvarı ile birleşmiş olan kapsüller şeklinde üretilebildiği gibi büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan salgılar şeklinde de üretilebilen yapılardır (Sutherland, 1998; Ramesh and Tharanathan, 2003).

EPS, glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit yapıda, bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarit yapıdadır (Kenne and Lindberg, 1983). EPS; uzun zincirli, molekül ağırlığı yüksek, suda çözünmeyen ya da yoğunluk vererek dağılan, jel özelliğinde yapılardır. Bu yapı mikroorganizmalar için enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılsa da mikroorganizmalar tarafından oluşturulan özellikle fermente ürünlerin tekstürü ve reolojisi gibi kendine özgü fiziksel özelliklerinin yapılanmasında etkilidir (Frengova, 2002).

Bir fermente içecek olan Kefirin fiziksel özelliklerinin oluşumunda etkili olan ve Kefir danesinde var olan mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS yapı ise 'Kefiran' olarak adlandırılır. Kefiran suda çözünemeyen, eşit miktarda D- glukoz ve D- galaktozdan oluşan glukogalakattan yapıda dallanmış heteropolisakkarit bir yapıdır. HPLC ile belirlenen molekül ağırlığının 10^7 Da'dan fazla olduğu belirtilmiştir (Kooiman, 1968; Micheli et al., 1999; Piermaría et al., 2009). Kefiranın kimyasal yapısı NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) tekniğiyle belirlenmiştir. Yapı hekzaheptasakkaritin tekrarlanarak dallanmış biriminden oluşmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kefiranın kimyasal yapısı (Farnworth, 2005)

Fermente süt rnlerindeki EPS yapının sentezlenmesinde üretiminde kullanılan laktik asit bakterilerinin (LAB) rolünün büyük olduğu bilinmektedir ve LAB tarafından üretilen EPS'in güvenli olduğu yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Dubac and Mollet, 2001).

Kefiranın, Kefir danesine özgü *L. kefiranofaciens*, *L. kefir*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, bakteri türleri tarafından üretilen bir EPS olduğu bilinmektedir (Kooiman, 1968; Kandler, 1983; Fujisawa, 1988; Yokoi, 1991; Takizawa et al., 1994; Cheirsilp et al., 2003; Wang et al., 2008).

Yapılan araştırmalarda Kefir mikroflorasında bulunan bazı bakterilerin EPS üretebilme yeteneği ve üretme miktarı incelenmiştir. Van Geel-Schutten vd., (1999) *L. reuteri* LB121 tarafından üretilen EPS miktarını 9800 mg/l olarak belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada Kefir danesinden elde edilen *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *Str. thermophilus* bakterilerinin bazı suşlarının tek tek EPS üretebilme yeteneği belirlenmiş ve bu bakteriler arasında en yüksek EPS retimi 460,27 mg/l olarak, *L. bulgaricus* HP1'e aittir. Bu çalışmada incelenen bakteri suşlarının ürettiği EPS yapıda glukoz ve galaktoz oranları değişiklik göstermektedir. *L. helveticus* tarafından sentezlenen EPS'lerin glukoz:galaktoz oranı 2:1'dir. İncelenen bakterilerden sadece *L. bulgaricus* suşlarının ürettiği EPS eşit oranda (1:1) glukoz ve galaktoz içerdiği için Kefiran yapısındadır (Frengova et al., 2005; Wang et al., 2009). *L. plantarum* KF5'in ürettiği heteropolimerik polisakkarit mannoz, glukoz ve galaktozu sırasıyla 1:4,99:6,90 oranında içermektedir (Wang et al., 2010). Ayrıca maya ve LAB birlikteliğinin Kefiran üretimine pozitif etki gösterdiği bilinmektedir (Mitsue et al., 1999). Mitsue vd. (1999) Kefiran üreten bakteri *L. kefiranofaciens* ile *Torulaspota delbrueckii* mayası kombine edildiğinde Kefiran retim miktarının arttığı tespit edilmiştir. Cheirsilp vd. (2003), *L. kefiranofaciens* retilen Kefiran ve *L. kefiranofaciens* ile *Sacch. cerevisiae* tarafından birlikte üretilen Kefiranın miktarları karşılaştırmıştır; *Sacch. cerevisiae* ile birlikte geliştirilen kültürün Kefiran miktarının (49 mg/L), *L. kefiranofaciens* kültürünün ürettiği Kefiran miktarından (25 mg/L) nemli düzeyde fazla olduğu tespit edilmiştir.

Kefiran ekzopolisakkaritinin sağlığı dzenleyici/desteleyici ozellikleri (immunomodulator, epitelyum koruyucu anti-tumor etki vb.) yapılan arastirmalarla desteklemektedir. Antibakteriyel ozellige sahip olduğu, bağırsak bağışıklık sistemini teşvik ettiği ve *Bacillus cereus*'a karşı epitel hucreleri koruduğu belirtilmiştir (Vinderola, 2006; Medrano, 2009). Vinderola (2006) tarafından yapılan bir çalışmada kefirde elde edilen EPS'nin goğus kanserine etkisi incelenmiş ve fareler uzerinde yapılan bir deney sonucunda kanser hucrelerini azalttığı tespit edilmiştir. Fareler uzerinde yapılan başka bir çalışmada ise Kwon vd. (2008) tarafından Kefir danesinden izole edilen Kefiranın alerjik bronş astımı ve akciğer dokusunun iltihaplanmasının tedavisinde terapötik etkiye sahip olabilirliği belirlenmiştir. Piermaría vd. (2009) yaptıkları bir çalışmada Kefiran polisakkaritinden uze edilen filmlerin gıda endüstrisinde ambalaj materyali olarak kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

2.6. Kefir Üretiminde Yeni Teknolojik Gelişmeler

Kefir, yararlı mikrobiyal ve kimyasal içeriği nedeniyle arastirmacılar ve dolaylı olarak bilinçli tüketiciler tarafından her geçen gün daha fazla dikkat çekmektedir (Güzel-Seydim et al., 2010a). Kefirin aroması ve kompozisyonu yapımında kullanılan danenin orijinine göre değişmesinin yanı sıra kullanılan sütün çeşidine, teknolojik işleme göre de değişmektedir. Kefir yapımında Kefir danesi ilave edilerek fermente edilebilen birçok substrat kullanılmaktadır. Bunların arasında süt en iyi ortamı sağlayan bir substrattır, ayrıca su, pirinç, peynir altı suyu gibi ortamlar kullanılarak Kefir ve Kefire benzer içecekler elde edilebilmektedir (Magalhães, et al., 2010b). Peynir altı suyu proteinleri geniş spektrumlu kimyasal, fiziksel ve biyolojik ozellikleri bulunan zengin bir protein karışımıdır. Orta ağda peynir altı suyu proteinlerinin insanları hastalıklara karşı koruyucu ve terapötik ozelliklerinin bulunduğu ve bazı hastalıkların tedavisinde bu maddenin sıkça kullanıldığı belirtilmektedir. Oligosakkaritler ve peyniraltı suyundaki yağlar (sfingolipitler) gibi peynir suyunun protein olmayan bileşikleri değerli sütçülük katkıları olarak nitelendirilebilir ve fonksiyonel gıdalarda ticari olarak kullanılabilirler. Örneğin, peynir altı suyunda bulunan prebiyotik ozellikteki galakto oligosakkaritler Kefire probiyotik ozellik kazandıran mikroorganizmalardan *Bifidobacteria* cinsi bakterilerin

gelişimini ve/veya aktivitesini desteklemektedirler. Yine peynir altı suyunda bulunan sfingolipitler biyolojik olarak aktif ve anti-karsinojeniktir (Anonymous, 1998; German et al., 2001). Son yıllarda yapılan araştırmalar ise peynir altı suyunun Kefir ve Kefir benzeri ürün yapımında kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır. Ayrıca Kefir yapımında substrat olarak peynir altı suyu ve/veya deproteinize peynir altı suyu kullanımı ile geleneksel olarak süt kullanımı arasında fermentasyon süresince oluşan uçucu bileşenler ve biyokimyasal değişimler bakımından benzerlik göstermektedir. Anti-bakteriyel ve anti-viral, anti-oksidant, anti-karsinojenik aktivitelerine sahip peynir altı suyunun Kefirin fonksiyonel özellikleri ile birleştirilmesi üretilen ürünün önemine katkı sağlamaktadır.

Koutinas vd. (2009) peynir altı suyu kullanarak ürettikleri Kefiri sert-tip peynir üretiminde starter kültür olarak kullanmışlardır. Substrat olarak peynir altı suyu kullanılarak üretilen Kefire, danelerinden ayrıldıktan sonra endüstriyel kurutma odalarında 38 °C ısı kurutma uygulanmış ve sert-tip peynire starter kültür olarak ilave edilmiştir. Üretilen peynir ticari olarak üretilen rennet peynirine kıyasla organoleptik özellikleri daha gelişmiş ve tuz ilavesine gerek duymadan raf ömrü uzadığı belirlenmiştir.

Ertekin ve Güzel-Seydim (2010) tarafından Dairy Lo[®] yağ ikame maddesi ve inulin prebiyotiği kullanımının yağsız Kefir kalite kriterleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada; tam yağlı süte (TY), % 2 Dairy Lo[®] içeren süte (DL), % 2 inülin içeren süte (İNÜ) ve yağsız süte (YK) % 2 oranında Kefir danesi inokülasyonu ile Kefir elde edilmiştir. Elde edilen ürünlerin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyusal analizleri yapılmıştır. Örneklerin (TK, DL, İNU, YK) pH değeri 4,29-4,40 aralığında bulunurken; laktik asit eşdeğerinde titrasyon asitliği ve kurumadde değerleri sırasıyla % 0,70-0,82 ve % 8,6-10,9 olarak tespit edilmiştir. Asetaldehit konsantrasyonları 5,2-7,16 mg/L, etanol konsantrasyonları 151-1075 mg/L arasında tespit etmiştir. Ayrıca 7 günlük depolama uygulanan örneklerde depolamanın birinci gününde, görünür viskozite TY örneğinde 977 mPas ile en yüksek, İNU örneğinde 528 mPas ile en düşük bulunmuştur. Bütün örneklerde laktobasil sayısı 9,1-9,4; laktokok sayısı 9,3-9,8; maya sayısı 5,3-5,6 log (kob/mL) arasında bulunmuştur. Duyusal değerlendirmede TY diğer örneklerden önemli farklılıkta yüksek puanlar almıştır.

Dairy-Lo kullanımının da Kefirin duyusal özelliklerini olumlu etkilediği belirlenmiştir.

Tayland'da yapılan bir çalışmada inek sütü ve pirinç sütü kullanılarak Kefir üretilmiştir. Her iki üretimde de iki farklı kompozisyonda liyofilize Kefir starter kültürü (Kefir A ve Kefir B) kullanılmış ve toplamda dört üretim yapılmıştır. Üretilen Kefirler antioksidan aktivitesi ve bakteriyel inhibisyon aktivitesi açısından birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçları; kullanılan süt çeşidinin genel olarak bakteriyel inhibisyon aktivitesi bakımından belirgin fark oluşturmadığını göstermektedir. Bakteriyel inhibisyon etki bakımından farkın test edilen mikroorganizmaya göre değiştiği, tüm üretimlerde en kuvvetli etkinin *Escherichia coli*'ye karşı olduğu belirtilmiştir. Antioksidan aktivite bakımından BHA (yapay kuvvetli bir antioksidan madde) ile pirinç sütünden elde edilmiş Kefir karşılaştırılmış ve radikal inhibisyon oranları birbirine benzer bulunmuştur. Böylece pirinçten elde edilen Kefirin hem kuvvetli hem de doğal antioksidan bileşenler içeren bir gıda olduğu gösterilmektedir (Sirirat and Jelena, 2010).

Wróblewska vd (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, transglutaminaz ilavesinin Kefirin duyusal kalitesi ve süt proteinlerinin immuno reaktivitesi üzerine etkili olduğu belirtilmiştir. Yapılan test (yarışmalı eliza yöntemi) sonucunda transglutaminaz ilave edilerek üretilen kefir azalmış immuno reaktif özelliği ve artmış duyusal özelliğiyle karakterize edilmiş ve alejik insanlar için önerilmiştir.

2.7. Kefirin Sağlık Üzerine Etkileri

Kefir; yapımında kullanılan sütün laktoz, protein, yağ, mineraller ve vitaminler gibi oldukça zengin besin içeriğini yapısına alırken fermente ürün olması nedeniyle yapımında kullanılan kompleks dane mikroflorasını, bu mikrofloranın ürettiği metabolitleri ve biyoaktif bileşenleri (bazı serbest amino asitler, kojuge olmuş linoleik asitler, biyoaktif peptitler) de yapısında bulundurmaktadır. Bu nedenle fonksiyonel bir gıda olarak gösterilen Kefirin sağlık üzerine etkisi bilimsel araştırmalarda öne çıkan bir konudur.

Kefir fermantasyonu sırasında oluşan biyoaktif peptitlerin bağışıklık sistemini düzenleyici etkisi, Kefir danesinden elde edilen polisakkarit yapının akciğer kanserinin yayılmasını ve tümör oluşumunu engelleyici etkisi, dane mikroflorasındaki bazı mikroorganizmaların β -galaktozidaz aktivitesi sayesinde laktoz intoleransı gösterenlere karşı olumlu etkisi, dane içindeki bazı laktobasiller tarafından üretilen organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriosin gibi bileşenlerin anti-mikrobiyal etkisi ve hipokolesterolemik etkisi gibi kefirin sağlık üzerine faydalarından dolayı diyet ile tüketimi oldukça önemlidir (Furuwava et al., 1991; Zacconi et al., 1995; Tamai et al., 1996; Zubillaga et al., 2001; Farnworth, 2006; Terzi, 2007; Güzel-Seydim et al., 2010a).

Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda; Kefirin ve Kefir danelerinin anti-kanserojen etkisi araştırılmıştır (Shiomi et al.; 1982; Fernandes and Welch, 1987; Furukawa, 1990; Furukawa et al., 1991; Çevikbaş et al., 1994; Karagözlü and Bayarar, 2004; Güzel-Seydim et al. 2006). Kefirin içerdiği mikroorganizmaların, fekal enzim aktivitesini büyük ölçüde düşürmesi sonucunda, özellikle kolon kanseri riskini azaltıcı etki gösterdiği belirtilmiştir (Fernandes and Welch, 1987). Grishina vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; genotoksik olduğu bilinen ve insan kolon hücrelerinde DNA'nın zarar görmesine neden olan fekal su örnekleri üzerinde Kefir ve ayranın antigenotoksik etkisi incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda fekal suyun genotoksitesini Kefir ve ayranın önemli derecede azalttığı gözlemlenmiş ve bu antigenotoksik etkinin sebebi olarak Kefir ve ayranın içerdiği kısa zincirli yağ asitlerinin miktarı gösterilmiştir.

Kefir, yararlı mikroorganizmaları içerisinde bulundurması (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. lactis*; *B. bifidum*, *B. langum*, *B. breve* vb.) ve bu mikroorganizmaların tüketim sırasında insan bünyesine canlı olarak alınabilmesi ve sağlık üzerine pozitif etkilerinin olması ile fonksiyonel bir gıda olduğu bilinmektedir (Otlés and Cagindi, 2003; Gönülateş, 2008; Ershidat and Mazahreh 2009; Kök-Taş, 2010).

Bekar vd. (2010) mide kanseri için bir risk faktörü olarak gösterilen ve rol oynayan *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tedavisinde probiyotik bakteri içeriğinden dolayı kefir ilavesinin pozitif etki gösterdiğini belirtmişlerdir. *H. pylori* enfeksiyonunun

tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliği oldukça zordur. Yapılan alışmada *H. pylori* ile enfekte olan kişiler ikiye gruba ayrılmış ve bir gruba antibiyotik tedavisi uygulanmakta iken diğer guruba antibiyotik tedavisine ilave olarak 250 mL Kefir 14 gün süresince uygulanmıştır. Sonuçlar Kefir verilmeyen grupta mikroorganizma tahrip oranı % 50 iken Kefir verilen grupta % 78,2 olduğunu göstermektedir. Yücel, (2000) *H. Pylori*'nin antibiyotiklere karşı direnç göstermesi, antibiyotikler midenin asidik pH değerinde stabil etkiyi sağlayamaması ve midenin boşalması ile midede kalış sürelerinin oldukça kısa olması gibi nedenlerden dolayı enfeksiyonun tedavisinin zor olduğunu belirtmiştir.

Broilerde Kefirin probiyotik olarak kullanılması üzerine yapılan bir çalışmada içme suyuna Kefir ilave edilmiştir. Deneme sonucunda Kefir ilaveli içme suyu tüketenlerde canlı ağırlık kazancı önemli düzeyde artarken, karkas randımanı da suya eklenen Kefir oranı ile pozitif korelasyon göstermektedir. Çalışma sonucunda broilerde Kefirin probiyotik olarak kullanılmasının büyüme performansını artırdığı sonucuna varılmıştır (Karademir and nal, 2009). Böylece probiyotik bakteri içeren ürünlerin sadece insanlar için değer aynı zamanda da hayvan için beslenme ve gelişiminde, hayvan sağlığında (kanatlıları *Salmonella*'dan koruma, inekleri sütten kesilme gibi stres bağlı çeşitli sağlık sorunlarından koruma vb.) başarılı bir şekilde kullanılabildiği belirtilmiştir.

Ayrıca Kefir danesindeki probiyotik bakteriler antimutajen aktiviteleri bakımından da önemlidir. *Lactobacillus acidophilus* türü ve *Bifidobacteria* cinsi bakterilerin bazı suşları ile bu probiyotik bakteriler tarafından üretilen organik asitlerin (zellikle bütirik asit ve bunu takiben asetik asit vb.) mutajenlere karşı yüksek inhibitör etkisi gösterdiği bilinmektedir (Lankaputhra and Shah, 1998). Yapılan alışmalar *L. acidophilus*'un tümör hücreleri inhibe ettiği, prokarsinojen maddelerin karsinojen maddelere dönüşmesine neden olan mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Nayir, 2008). Kök-Taş vd. (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada da probiyotik bakterilerden biri olan *B. bifidum* S17 PRL2010 suşu ilk kez bir kefir danesinden izole edilmiştir.

Gönülateş (2008) tarafından yapılan bir *in vivo* çalışmada Kefirin insanlar üzerindeki immünomodülatör etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmaya 18 gönüllü kişi katılmıştır. Gönüllüler, fermente ürünlerden yoksun bir diyetle 2 hafta beslenmeleri sonrası 6 hafta süresince hafta içi her gün 200 mL Kefir ilaveli bir diyetle beslenmişlerdir. Laboratuvar testleri için, Kefir verilmeden önce (0. hafta), Kefir vermeye başlandıktan sonra (3. ve 6. haftalarda) ve Kefir verilmesi durdurulduktan 3 hafta sonra (9. hafta) kan ve serum örnekleri toplanmıştır. Yapılan test sonuçları değerlendirildiğinde lenfosit (değişik antijenik yapıları özellikli olarak tanıyıp birbirinden ayıran bağışıklık sistemi hücre topluluğudur; B lenfositler ve T lenfositler) sayılarında Kefir tüketimiyle paralel olarak artış gözlemlenmiş hatta gönüllülere Kefir verilmesinin kesilmesinden sonra da artan bu değerlerin korunduğu tespit edilmiştir. Lenfosit alt gruplarının (Cluster Designation, lenfosit yüzeylerde bulunan ve bu hücrelerin tanımlanmasını sağlayan hücre yüzey moleküllerine göre adlandırma sistemi) akım sitometri yöntemiyle aktivitesine bakılmış CD8 (sitoksik T lenfositler) ve CD19 (aktivasyon reseptörü taşıyan B lenfositler) bağışıklık sistemi hücrelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu da Kefirin bağışıklık sistemini enfeksiyonlara karşı hazır tuttuğunu göstermektedir. Ayrıca, sitokin (bağışıklık sisteminde rol oynayan hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyen protein yapıdaki moleküller) üretimi üzerine de Kefirin supernatantının etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Kefir supernatantının pro-inflammatory sitokinlerin üretimini artırdığını göstermiştir (Hong et al., 2009).

Gönnevik vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada Norveç orijinli Kefir danesinden üretilen Kefirin 8 haftalık depolama süresince glutamik asit miktarında bir azalma gözlemlenirken bu amino asidin dekarboksilasyon ürünü olan γ - aminobütirik asit (GABA) miktarında artış gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar GABA'nın sağlık üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermektedir. Inoune vd. (2003) 12 haftalık bir periyotta günlük olarak 10 mg GABA içeren fermente bir süt ürününün tüketimi hafif dereceli hipertansif hastalarda kan basıncını düşürücü etkiye sahip olduğu tespit etmişlerdir.

Kefirin lipid peroksidasyonuna etkisinin araştırıldığı fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise karbontetraklorür (CCl₄)'ün olumsuz etkisi üzerine Kefirin etkisi

araştırılmıştır. Deney hayvanları 4 gruba ayrılarak 1. gruba standart fare yemi, 2. gruba 1,5 mL/kg CCl₄, 3. gruba 1,5 mL/kg CCl₄+30 mL Kefir, 4. gruba 1,5 mL/kg CCl₄+vitamin E 250 mL/kg verilmiştir. Sonuçta Kefir ve vitamin E uygulanan gruplarda plazma MDA (lipid peroksidasyonunun bir belirteci) düzeyinde anlamlı derecede düşük, GSH (glutatyon) düzeyi ve GSH-P_x (glutatyon peroksidaz) ve CAT (katalaz) aktiviteleri ise yüksek bulunmuştur. Ayrıca Kefirin GSH, GSH-P_x ve CAT üzerinde indükleyici rol oynadığı ve lipid peroksidasyonunu azalmanda vitamin E' den daha etkin olduğu belirtilmiştir. Böylece Kefirin, özellikle Kefirde bulunan laktik asit bakterilerinin, hem serbest radikal toplayıcı hem de antioksidan enzimleri artırıcı yönde etki göstererek birçok dejeneratif hastalığın nedeni olan oksidatif stresi engellediği belirtilmektedir (Güven et al., 2004). Başka bir çalışmada antioksidan olan kefirin deneysel sepsis sonucu meydana gelen organ (akciğer, karaciğer, böbrek, dalak ve kalın bağırsak) hasarını azalttığı belirtilmekte ve organ fonksiyon bozukluğunda kefirin yararlı bir tedavi olabileceğini düşünmektedir (Öresin, 2008).

Quiros vd. (2005) tarafından keçi sütünden elde edilen Kefirin HPLC/MS-MS' de yapılan analizi sonucunda fermantasyon sırasında oluşmuş bazı düşük molekül ağırlıklı peptitler belirlenmiştir. Bu peptitler Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü (ACE) aktivitesi göstermektedir. Karaciğerde bileşimlenen Anjiyotensinojen ile böbrek üstü bezinde salgılanan renin hormonu birleşip Anjiyotensin-I' i oluşturur. Anjiyotensin-I Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim yardımıyla Anjiyotensin-II' i oluşturur. Anjiyotensin-II kalp damarlarında kan basıncını düzenler; ancak aşırı salgılanması hipertansiyona sebep olurken hipertansiyonun ileri evresi kalp krizi, kalp yetmezliği gibi hastalıkların nedeni olarak gösterilmektedir.

Yapılan bir çalışmada Tibet Kefirinden izole edilen *L. plantarum* MA2'nin yüksek kolesterol diyeti ile beslenen farelerin bağırsak mikroflorasına ve lipid metabolizmasına etkisi incelenmiştir. Fareler iki gruba ayrılıp bir grup yüksek kolesterol diyeti, diğer grup ise yüksek kolesterol diyetine ilave fizyolojik tuzlu suda çözündürülmüş liyofilize *L. plantarum* MA2'nin her fareye 10¹¹ hücre/günde doz şeklinde ayarlanan diyeti ile 5 hafta beslenmiştir. Sonuçlar *L. plantarum* MA2 ile beslenen farelerde serum kolesterol ve LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)

kolesterol seviyesini önemli derecede azaldığını; ancak HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyesinde değişim olmadığını göstermiştir. Ayrıca bu bakteri ile beslenen grubun bağırsak florasında laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerin popülasyonunda bir artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar bağırsak probiyotik içeriğini artıran ve kolesterol düzenleyici etki gösteren *L. plantarum* MA2 suşunun probiyotik özellikte olduğunu göstermektedir (Wang, et al., 2009).

Kefir danesindeki mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmalar tarafından üretilen laktik asit, asetik asit, etanol, biyoaktif peptitler ve diğer biyoaktif bileşenler gibi ikincil metabolik ürünler bazı patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör etki göstermektedir (Silva et al. 2009). Marquina vd. (2002) farelerin bağırsak mikrobiyal aktivitelerinde Kefir tüketiminin etkisi incelemişlerdir. Yapılan çalışma, Kefirin *in vitro* ortamda bağırsak mikroflorasında laktik asit bakterileri popülasyonunu önemli düzeyde arttırarak LAB karşı sinerjik etki gösterdiğini ve *Escherichia coli* popülasyonunu ise azaltarak hastalık etmeni bakterilere karşı antagonist etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Raja vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada Kefir danesinden izole edilen *L. lactis cremoris* 'in gıda zehirlenmesine neden olan mikroorganizmalara (*E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. vb.) karşı antimikrobiyal etkisi farklı pH değerlerinde (4,5-6,5-8,5) araştırılmıştır. En iyi etki pH 4,5-6,5 aralığında gözlemlenerek tüketim pH değeri 4,6 olan Kefirin antimikrobiyal özelliği vurgulanmıştır. Brucella bakterilerinin Kefirde canlı kalma süresinin araştırıldığı bir çalışmada ise *Brucella melitensis* 16M ve *Brucella abortus* 544 suşlarından hazırlanan bakteriler Kefir içerisindeki üç farklı bakteri yoğunluğunda ilk 0-24 saat aralığında canlılıklarını sürdürürken, 24 saatten itibaren üreme yeteneklerini kaybettikleri belirtilmiştir (Taşkın, 2007).

Sadece kefirin değil kefiranın da sağlık üzerine etkileri oldukça fazladır. Maeda vd. (2004) yaptıkları çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda 30 günlük kefiran verilmesi sonucunda serum ve karaciğer lipid düzeylerinin (toplam-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserit, fosfolipid) kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

2.8. Asetik Asit Bakterileri

Gıda mikrobiyolojisinde pH 5 değerinin altındaki pH değerlerinde gelişebilen, bu nedenle genelde asidik gıdalarda bulunan bakterilere asidi seven anlamında 'Asidofilik bakteriler' denir. Bu bakteriler laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileri olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadır

Asetik asit bakterileri (AAB) doğada yaygın olarak bulunan bir bakteri grubudur. Bu bakteri grubunun en dikkat çeken yönü ise bazı gıda/içecek ürünlerinin üretimini (sirke vb.) sağlarken; bazı gıda/içecek ürünlerinin (şarap vb.) bozulmasına neden olmalarıdır (Siever and Swings, 2005). AAB ile ilgili sadece gıda biliminde değil farklı disiplinlerde de araştırmalar yapılmakta, kimyasalların (D-glukonik asit, L-sorboz, dihidroksiaseton) ve biyopolimerlerin (selüloz, asetan) endüstriyel üretiminde kullanılmaktadır (Kerstens et al., 2006; Şengül and Karabıyıklı, 2011).

AAB'nin boyutları 0,4-1 µm genişliğinde 0,8-4,5 µm uzunluğunda değişim göstermektedir. Bu bakteri grubu; gram negatif veya gram değişken özellik gösterirler. Bu bakteri grubu elipsoidal veya kıvrımlı bir şekle sahip; hareketli, polar veya peritrik flagellaya sahiptir ve endospor oluşturmazlar. Oksijen (O₂) tercihlerine göre incelendiğinde ise aerobik özellik göstermekte, solunum metabolizmasında oksijen yakalayıcı olarak rol oynamaktadır. Ancak uygun olmayan koşullarda anaerobik veya oksijeni düşük konsantrasyonda olan ortamlarda alternatif elektron alıcı olarak kullanılabilir. AAB'nin optimum gelişme sıcaklığı 25-30 °C optimum pH değeri 5-6 aralığında olup pH 4'ün altındaki değerlerde de gelişim gösterebildiği belirtilmektedir (De ley et al., 1984).

AAB, şeker ve/veya etanol içeren substratlarda (şarap, bira, sirke, bal, meyve suları; elma, üzüm) gelişim göstermektedirler. Etanolü asetik aside dönüştürerek sirke yapımında kullanılmasından dolayı bu ismi almışlardır. Ancak glikozu glukonik aside, galaktozu galaktonik aside, arabinozu arabonik aside dönüştürebilirler. Sirke yapımı haricinde sorbitolu sorboza dönüştürme, selüloz üretimi gibi farklı endüstriyel uygulamaları vardır. Alkol fermantasyonu için yan ürün olan gliserol, AAB için karbon kaynağıdır.

2.8.1. Asetik asit bakterilerinin sistematik sınıflandırılması

Asetik Asit bakterileri ilk sistematik sınıflandırmasında *Acetobacter* ve *Gluconobacter* iki ana cinse ayrılmıştır (Buchanan and Gibbons, 1974). *Acetobacter* cinsi bilinen hiç bir ailede yer almazken, *Gluconobacter* cinsinin *Pseudomonadaceae* ailesine ait olduğu düşünülmüştür. Gelişen teknoloji ile birçok taksonomik kriter ve moleküler testler (yağ asidi kompozisyonu, çözülebilir protein elektroforezi, guanin-sitozin GC içeriği, DNA-DNA hibridizasyonu vb.) temelinde yapılan yeni sınıflandırmada *Acetobacter* ve *Gluconobacter* cinslerinin yüksek filogenetik benzerliğe sahip olduğu belirtilmiş ve bunun sonucu olarak da “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” kitabında *Acetobacter* ve *Gluconobacter* cinsi bakteriler *Acetobacteraceae* ailesine dahil edilmiştir. *Acetobacter* cinsi 4 tür (*Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. hansenii*); ve *Gluconobacter* cinsi sadece 1 tür (*Gluconobacter oxydans*) belirtilmiştir. İki ana cins arası en önemli fark *Acetobacter* etanolü asetik aside ve sonrasında tamamen karbondioksit ve suya kadar oksitleyebilir; ancak *Gluconobacter* asetik asidi tamamen karbondioksit ve suya kadar oksitleyemez (Guillamón and Mas, 2011).

Son yıllarda moleküler tekniklere (DNA-DNA veya DNA-RNA hibridizasyonu ve 16S rDNA analiz vb.) bağlı yapılan çalışmalarla mikroorganizmaların sınıflandırılması tekrar gözden geçirilmektedir. Son sınıflandırmaya göre AAB *Alpha-proteobacteria* sınıfının bir üyesidir. *Alpha-proteobacteria* sınıfının bir ailesi olan *Acetobacteraceae* altında 2’si önceden tanımlanan 12 cins belirlenmiştir. Bu cinsler; *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas* (Urakami et al., 1989), *Gluconacetobacter* (Yamada et al., 1997), *Asaia* (Yamada et al., 2000), *Kozakia* (Lisdiyanti et al., 2002), *Saccharibacter* (Jojima et al., 2004), *Swaminathania* (Loganathan and Nair 2004), *Neoasaia* (Yukphan et al., 2005), *Granulibacter* (Greenberg et al., 2006), *Tanticharoenia* (Yukphan et al., 2008) ve *Ameyamaea*’dır. Ayrıca bu cinsler altında da birçok tür belirlenmiştir.

Çizelge 2.3. Asetik asit bakterilerinin sınıflandırılması (Guillomón and Mas, 2011)

Cins	Tür	Cins	Tür
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i> <i>A. cerevisiae</i> <i>A. cibirongensis</i> <i>A. estunensis</i> <i>A. indonesiensis</i> <i>A. lovaniensis</i> <i>A. malorum</i> <i>A. nitrogenifigens</i> <i>A. oeni</i> <i>A. orientalis</i> <i>A. orleanensis</i> <i>A. pasteurianus</i> <i>A. peroxydans</i> <i>A. pomorum</i> <i>A. syzygii</i> <i>A. tropicalis</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Ga. azotocaptans</i> <i>Ga. diazotrophicus</i> <i>Ga. entanii</i> <i>Ga. europaeus</i> <i>Ga. hansenii</i> <i>Ga. intermedius</i> <i>Ga. johannae</i> <i>Ga. liquefaciens</i> <i>Ga. nataicola</i> <i>Ga. oboediens</i> <i>Ga. rhaeticus</i> <i>Ga. sacchari</i> <i>Ga. saccharivorans</i> <i>Ga. swingsii</i> <i>Ga. xylinus</i> <i>Ga. persimmonis</i>
<i>Acidomonas</i>	<i>Ac. methanolica</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>G. albidus</i> <i>G. cerinus</i> <i>G. frateurii</i> <i>G. japonicus</i> <i>G. kondonii</i> <i>G. oxydans</i> <i>G. roseus</i> <i>G. assaii</i> <i>G. sphaericus</i> <i>G. thailandicus</i> <i>G. wancherniae</i> <i>G. kanchanalouriensis</i>
<i>Asaia</i>	<i>As. bogorensis</i> <i>As. krungthrpensis</i> <i>As. lannensis</i> <i>As. siamensis</i> <i>As. spathodeae</i>		
<i>Ameyamaea</i>	<i>Am. Chiangmaiensis</i>		
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>		
<i>Neosasaia</i>	<i>N. Chiangmaiensis</i>		
<i>Saccharibacter</i>	<i>S. floricola</i>	<i>Granulibacter</i>	<i>Gr. Bethesdensis</i>
<i>Swaminathania</i>	<i>Sw. Salitolerans</i>	<i>Tanticharoenia</i>	<i>T. sakaeratensis</i>

2.8.2. Farklı kaynaklardan izole edilen ve tanımlanan asetik asit bakterileri

AAB ve asetik asit fermantasyonun kaynağı olarak ilk bilinen madde sirke olsa da aslında asetik asit bakterilerinin izole edildiği birçok kaynak vardır. Doğada yaygın şekilde bulunan, genelde geleneksel fermente ürünlerin üretiminde kullanılan (sirke üretimi, kambu çayı üretimi vb.) AAB çeşitli kaynaklardan izole edilmekte ve farklı yöntemler ile tanımlanabilmektedir.

AAB izolatlarında, *Acetobacter* cinsine ait olan AAB'nin oranı diğerlerinden daha fazladır. Bu durum *Acetobacter* cinsinin daha yaygın olduğunu göstermektedir. Yamada vd. (1999) Endenozya bulunan bazı fermente gıdalar, meyveler, çiçekler gibi farklı kaynaklardan AAB grubuna ait olan 64 bakteri izole etmiş ve izolatlardan

45'inin *Acetobacter* suşu, 11 izolatın *Gluconobacter* suşu, 8 izolatın *Gluconacetobacter* suşu olduğunu belirlemiştir.

AAB için kahve (*Ga. diazotrophicus*, *Ga. azotocaptans*, *Ga. johannae*), fermente kakao tanesi (*A. pasteurianus*, *A. syzygii*, *A. malonum*, *G. oxydans*), hindistan cevizi, mango ve sapodilla gibi tropik meyveler (*A. orleanensis*, *A. lovaniensis*, *A. indonesiensis*, *G. frateuri*, *Ga. hansenii*) farklı izolasyon kaynaklarıdır (Fuentus-Rámiez et al., 2001; Lisdiyanti et al., 2003; Madhaiyana et al., 2004; Nielsen et al., 2007; De Vuyst et al., 2008). Ayrıca, kirazdan (*G. cerius*) çilekten (*G. fraterurii*), şeker kamışından (*Ga. diazotrophicus*) ve biradan da (*A. cerevisia*) AAB izolasyonu yapılmıştır. (Yamada and Akida, 1984; Mason ve Claus, 1989; Yamada et al., 1997; Cleenwerck et al., 2002; Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003).

Tayland'da yapılan bir çalışmada yine farklı bir izolasyon kaynağı olan baldan 4 termotolerant (CMU1, CMU2, CMU3, CMU4) asetik asit bakterisi izole edilmiştir. İzolatların cinsi *Gluconobacter* olarak belirlenmiştir. Ayrıca; izolatların 30 °C ve 37 °C'de etanol ve asetik asit toleransı araştırılmıştır. Sonuçlar izolatların hepsinin sadece %1 (v/v) asetik asit konsantrasyonunda ve 30 °C sıcaklığı kadar gelişebildikleri göstermiş ancak; CMU4 suşunun 30 °C'de % 10 (hacim/hacim) etanol konsantrasyonuna, 37 °C'de % 9 (hacim/hacim) etanol konsantrasyonuna kadar gelişerek etanol için en yüksek toleransı gösterdiği belirtilmiştir (Kappeng and Pathom-Aree, 2009).

Debasree ve Gachhui (2007) fermente bir ürün olan kambuça çayından (Kombucha tea) izole edilen RG3^T suşunun, 16S rRNA gen dizilimi yöntemiyle belirlenmiştir. Analiz sonucunda *Gluconacetobacter* cinsine ait olduğu, ayrıca hem nitrojen bağlayabilen hem de selüloz üretebilen yeni bir tür olduğu belirtilmiştir. Bu suşun *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov. olarak adlandırılması önerilmiştir.

Bir fermente süt ürünü olan Kefirin mikroflorası üzerine yapılan bazı çalışmalarda da bazı AAB'nin doğal olarak bulunduğu tespit edilmiştir. *Acetobacter spp.* *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti* Kefir danesinden izole edilmiştir. (Ottogalli et al., 1973; Rosi 1978; Koreleva 1991; Garrote et al., 2001).

Magalhães vd. (2010a) tarafından yapılan bir çalışmada su Kefiri üretiminde kullanılan Brezilya orijinli kefir danesinin mikroflorası incelenmiş ve PCR –DGGE tekniği ile tanımlama yapılmıştır. Analiz sonucunda, AAB grubuna ait *Acetobacter lovaniensis* isimli bakteri tanımlanmıştır. Bu bakteri daha önce sütü fermente edebilen Kefir danelerinde tanımlanmamıştır.

Asetik asit bakterileri genellikle sirkeden izole edilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, geleneksel üzüm sirkesinden *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus*; endüstriyel sirkeden *A. oboediens*, *A. pomorum*, *A. intermedius*, *Ga. entanii*; geleneksel balzamik sirkeden *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Ga. xylinus*, *Ga. hansenii*; pirinç sirkesinden *A. pasteurianus* gibi türler izole edilmiştir (Sievers et al., 1992; Harruta et al., 2006; Gullo and Giudici 2008; Ilabaca et al., 2008; Vegas et al., 2010).

Elma sirkesinden asetik asit bakterileri izolasyonu yapılan bir çalışmada *A. pasteurianus*, *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus* ve *Ga. xylinus* türleri izole edilmiştir. İzole edilen popülasyonun % 35,3'ünü *Ga. europaeus* ve *Ga. xylinus* türlerinden oluştuğu belirtilmiş ve bu orana göre elma sirkesi fermantasyonundan *Gluconacetobacter* cinsinin sorumlu olduğunu gösteren ilk çalışma olarak belirtilmektedir (Fernández-Pérez et al., 2010).

Birçok farklı kaynaktan izole edilen AAB'nin tanımlanması için çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada İspirto sirkesinden elde edilen izolatlara RAPD–PCR moleküler yöntemi uygulanmış ve *Acetobacter* sp. türlerinden 13 farklı tür analiz edilmiştir. Bu metotla tanımlanan bakteriler *A. aceti*, *A. hansenii* ve *A. xylinus* olarak tespit edilmiştir (Trcek and Raspor, 1999).

De Vero ve Giudici (2008) PCR-DGGE moleküler yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada sirkeden elde edilen izolatların başlıca 3 cins (*Acetobacter*, *Gluconobacter* ve *Gluconacetobacter*) altında toplamıştır.

Dellaglio vd. (2005) İtalya-Alpler bölgesinde elma suyundan 2 adet bakteri (DST GL02^T, DST GL01^T) izole etmişler ve bu bakterilerin fenotipik ve kemotaksonomik özelliklerinin belirlenmesi ve 16S rRNA gen dizilimi yöntemine dayanan filogenetik analiz ile *Gluconacetobacter* cinsine ait 2 yeni tür olduğu belirlenmiştir.

Gluconacetobacter swingsii sp. nov. ve *Ga. rhaeticus* sp. nov. olarak adlandırılması önerilmiştir.

Papalexandratov vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, (GTG)₅-PCR tekniği AAB'nin 158 suşuna uygulanmış ve filogenetik ağacı çıkarılmıştır. Sonuçlar bu tekniğin AAB'nin tür ve suş seviyesindeki sınıflandırma için oldukça uygun olduğunu göstermiştir. *A. pasteurianus* LMG 1547 suşu ile *A. orientalis* LMG 21417^T suşu arasındaki benzerlik (GTG)₅-PCR tekniği ile % 85'den fazla, DNA-DNA hibridizasyon tekniği ile benzerlik % 100, AFLP-DNA tekniği ile ≈ % 55 olduğu için LMG 1547 suşunun *A. orientalis* olarak tekrar sınıflandırılması gerektiğini belirtilmiştir.

2.8.3. Asetik asit bakterilerinin selüloz üretimleri

Selüloz dünyada çok fazla kullanılan ve önemli ekonomik değere sahip maddelerden biridir. Genellikle selüloz bitkisel kaynaklardan üretilmektedir. Kâğıt tüketiminin sürekli artması, ağaç ve bitkilerden selüloz üretiminin devam etmesi dünya çapında ciddi tehlike sinyalleri vermektedir. Bu nedenle selüloz üretiminde alternatif bir yol olarak mikroorganizmalar kullanılıp biyoteknolojik olarak endüstriyel boyuta geçirilmesi gerekmektedir.

Bakteriyel selüloz diğer kaynaklardan elde edilen selüloza göre yüksek kaliteye ve bu özellikler; ince ağ yapısı, uzun zincir yapısı, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek kristalize değer, önemli mekaniksel direnç önemli özelliklere sahiptir. Ayrıca bakteriyel selülozun kâğıt endüstrisinde kullanımı (kağıt, peçete vb.) gibi farklı alanlarda geniş kullanımı vardır. Telekomünikasyon sektöründe (mikrofonlar ve stereo kulaklıklarda) kullanımı, laboratuvar/araştırma kurumlarında kullanımı (DNA'nın elektroforetik ayrımı), kozmetik sanayide kullanımı (kremlerde ve toniklerde), tıpta; zarar görmüş deri ve organların tedavisinde, yapay doku sentezinde, yapay deri ve yara tedavisinde kullanımı bunlara örnek gösterilebilir. Ayrıca gıda endüstrisinde emülsüfyer, absorbant ve ambalaj materyali olarak kullanımı vardır (Jonas and Farah, 1998; Czaja et al., 2007; Poyrazoğlu-Çoban, 2007; Poyrazoğlu-Çoban and Bıyık, 2008).

Selüloz üreten birçok mikroorganizma (*Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sarcina* vb.) vardır. En iyi bilineni *Acetobacter* cinsine ait türlerdir ve özellikle *A. xylinum* ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. İlk defa 1886 yılında A.J. Brown tarafından *A. xylinum*'un bakteriyel selüloz ürettiği belirlenmiş ve sonrasında Yamada vd. (1997) tarafından yapılan yeni sınıflandırma ile *Gluconacetobacter xylinus* olarak isimlendirilmiştir (Kornmann et al. 2003; Poyrazoğlu and Bıyık 2008). Bakterilerin selüloz üretiminde ortamın karbon ve azot konsantrasyonları, pH ve sıcaklık parametreleri etkilidir. Bu etki bakteri türlerine hatta suşlarına göre farklılık göstermektedir (Kaya, 2007). Yapılan bir çalışmada birçok besi ortamında asetik asit bakteri grubuna ait bazı suşların selüloz üretim verimi incelenmiştir. Sonuçlara göre; *Ga. xylinus* DSM 46604 suşunun en yüksek selüloz üretim verimi gösterdiği, *A. aceti* DSM 3508 ve *A. lovaniensis* HBB5 suşlarının ise en düşük selüloz üretim verimi gösterdiği belirtilmiştir (Poyrazoğlu-Çoban, 2007).

Asetik asit bakterilerinden elde edilen selülozun üretim verimliliği, fiziksel ve kimyasal özellikleri, bakteriyel selülozun önemi de göz önüne alınarak son yıllarda çalışma yapılan konuların başında gelmektedir.

2.8.4. Asetik asit bakterilerinin sağlık üzerine etkileri

Son yıllarda özellikle uzak doğu ülkelerinde (Japonya, Çin Tayvan vb.) yapılan çalışmalar asetik asit bakterilerinin sağlık üzerine oldukça önemli etkilerinin olduğunu göstermektedir. Uzak doğu ülkelerinin asetik asit bakterilerine yönelme sebebi ise geleneksel olarak ürettikleri fermente gıdalarda asetik asit bakterilerinin sıklıkla kullanılmasıdır. Bu konu batı ülkelerin de ilgisini çekmeye başlamış ve konuyla ilgili araştırmalar son yıllarda artış göstermektedir.

AAB (bazı gram negatiflerle sınırlı olarak) yapısında bulunan karakteristik bazı lipid bileşenlerine sahiptir. Bunlar fosfolipidler, coenzim Q ve alkali stabil lipidler (ASL) olarak ifade edilebilir. ASL ise hopanoid (terponoid bileşenler), sfingolipidler (dihidroseramid ve sfinganin), amino lipidler ve serbest yağ asitlerinden oluşur. AAB'nde bir sfingolipid öncüsü olan dihidroseramid yapılar bulunmaktadır. Sifingo lipidler beyin ve sinir hücre membranlarının önemli bileşenlerdir. Fukami vd. (2010a) tarafından sirkeden izole edilen *Acetobacter* cinsinden dihidroseramid içeren

bakterilerden ASL ekstrakte edilmiş ve 14 gün sürecince bunama gibi zihinsel işlev bozuklukları olan farelere vücut ağırlığına oranla 165-1650 mg/kg uygulanmıştır. Sonuçlar ASL oral alımının bunama görülen fareler üzerinde bilinçsel fonksiyonun önemli derecede geliştiğini göstermiştir. Fukami vd. (2010b) tarafından yapılan bir önceki ile bağlantılı diğer bir çalışmada, yaşlı farelerde sinaptik fonksiyon (sinirsel iletim) ve hafıza koruma üzerinde AAB'nin düzenli tüketiminin etkisi araştırılmıştır. Özellikle öğrenme fonksiyonunu geliştirme özelliğine sahip dihidroseramidi yüksek yoğunlukta (kuru hücre ağırlığının % 0,72'ni oluşturur.) bulunduran *Acetobacter malorum* bir suşu (NC 11 683 (S24)) yaşlı farelere uygulanmıştır. Çalışma sonucunda AAB'nin hafıza korunması ve sinir iletimi üzerine olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir.

Sugiyama vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada yoğun eksersiz sonrası kaslarda meydana gelen hasara fermente sütlerden elde edilen asetik asit bakterilerinin oral yolla alımının etkisi araştırılmıştır. Araştırmada %7,4 kurutulmuş bakteri AAB (*A. malorum* NCI 1683, *A. molarum* LMG 1746T), % 73 soya yağı ve % 17 bal mumu ile kapsül hazırlanmış ve vücut/kütle indeksi 22,6 kg/m² olan 40 (16 erkek, 24 kadın) kişi üzerinde uygulanmıştır. Yirmi kişilik bir gruba günde içerisinde 111mg asetik asit bakterisi bulunan kapsül; diğer yirmi kişilik gruba (kontrol grubu) ise mısır nişastasından yapılan kapsül 1 hafta süresince verilmiştir. Son gün 60 dakikalık yürüyüş yaptırılarak asetik asit bakterisinin kaslarda meydana gelen hasarı azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir.

Zhao vd. (2010b) tarafından saf hale getirilmiş fibroblast hücreleri (bağ dokunun ana maddesi ve yaraların iyileşmesinde işlevi olan kolajen adlı proteinin yapımından sorumlu hücrelerdir) iki gruba ayrılmış ve bir gruba *Ga. xylinum*'un ürettiği selüloz uygulanmıştır; bu gruptaki fibroblast hücre sayısında ise artış gözlemlenmiştir. Sonuçlar *Ga. xylinum*'un ürettiği selülozun fibroblast hücreler üzerinde etkili olduğunu gösterirken bu selülozun yaraların iyileşmesi, doku oluşumunda yararlı etki gösterebileceğini de belirtmektedir. Zhao vd. (2010a) kültüre edilmiş insan deri fibroblast hücrelerindeki kolajen sentezi üzerine *Ga. xylinum*'un ürettiği selülozun olumlu etki gösterdiği bir diğer çalışmalarında belirtmişlerdir.

Ayrıca AAB'nin sağlık üzerine dolaylı etkileri de vardır. Bazı AAB (*Acetobacter* gibi) membranlarında bulunan gliseroldehidrogenaz enzimi, gliserolün bir ketotrioz (3 karbonlu keton grubu) olan dihidroksiaseton (DHA)'a dönüşümünü sağlar. DHA insan derisi ile etkileşimi sonucu renk bileşenleri oluşturan bir maddedir (Draelos and Zoe, 2002). Bu nedenle kozmetik alanında bronzlaştırıcı kremlere ilave edilerek güneşlenme hasarına karşı alternatif ve güvenli krem elde edilir. Ayrıca tıpta, dermatoloji alanında lökoderma (deride pigment kaybı, beyazlaşma) tedavisinde kullanılmaktadır (Fesq et al., 2001; Green et al., 2004; Stasiak and Blażejak, 2009). Oda vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada deri bariyer fonksiyonu üzerine seramid içeren *A. malorum* NCI 1683 (S24) suşunun oral yolla alımı ile etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar seramid ve seramid içeren asetik asit bakterilerinin deri bariyer fonksiyonunu düzenleyici etkide kullanılabileceğini belirtmiştir.

AAB grubunda yer alan *Gluconobacter oxydans*'ın patulinin toksitesini azaltıcı etki gösterdiği bilinmektedir. Patulin; kasılmalara, ülsere, sinirsel hasarlara, bağışıklık sistem bozukluklarına ve tümör oluşumuna neden olabilen sağlık açısından oldukça tehlikeli bir mikotoksindir (Ricelli et al. 2007). AAB metabolik ürünü olan asetik asidin %3 oranında kullanımının bazı patojenlere karşı anti-mikrobiyal özellik gösterdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Ryssel, 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kefir Danesi ve Sirke

Bu çalışmada Kefir üretimi için Kefir danesi Danem Süt ve Süt Ürünleri Ltd.Şti. (Göller Bölgesi Teknokenti Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta)'den ve pastörize süt Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ünsüt Süt İşletmesi'den temin edilmiştir. Kefir danesinde asetik asit bakterilerinin geliştirilmesi amacıyla şarap ve sirke Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde üretilmiştir.

3.2. Sirke Üretimi ve Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Kefir danesinde asetik asit bakterilerinin geliştirilmesi amacıyla AAB izolasyonu için sirke kullanılmıştır. Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden sağlanan elma şarabı ve elma sirkesi 3:1 oranında karıştırılıp geleneksel yöntemle sirke üretilmiştir (Budak, 2010). Sirke üretiminin 5. gününde YGC agar (Merck) kullanılarak AAB izole edilmiştir.

3.2.1. Asetik asit bakterilerinin çoğaltılması

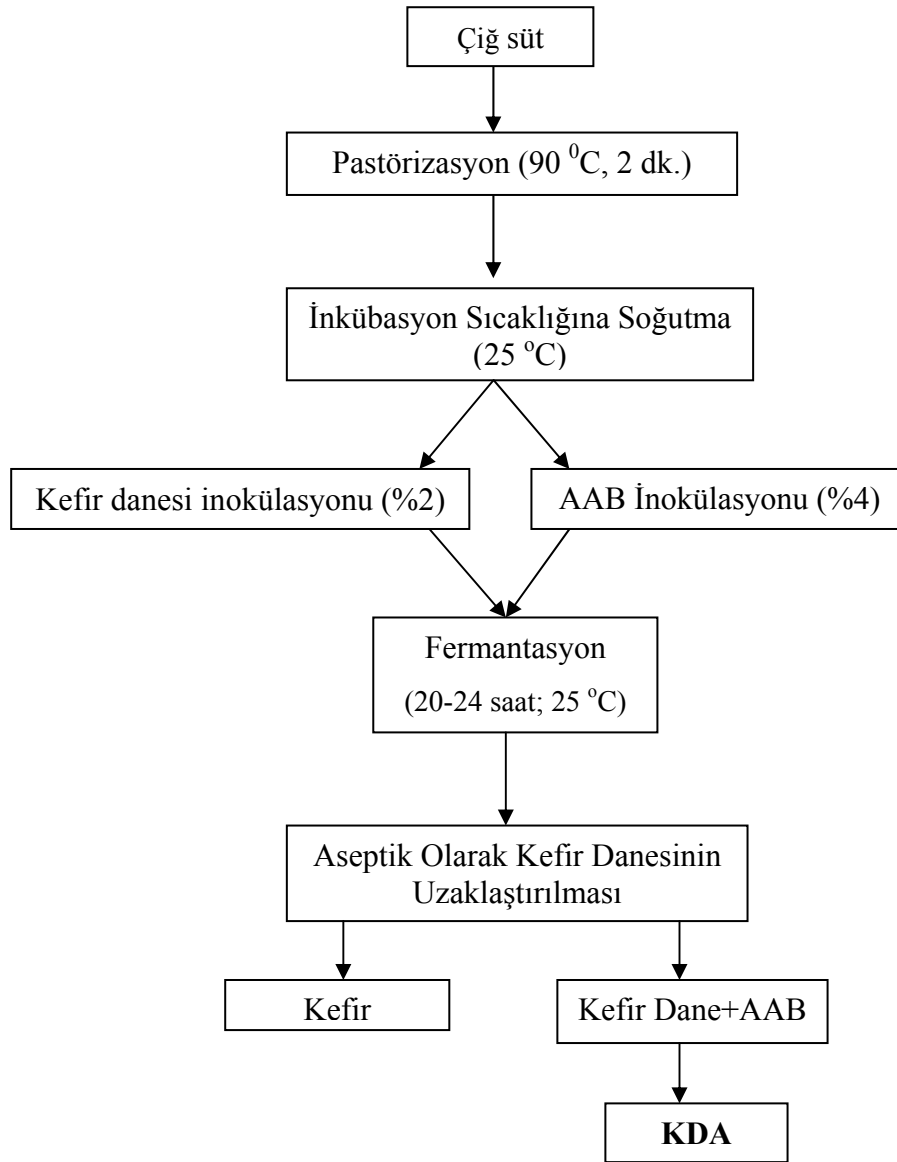
Asetik asit bakterileri YGC agarda geliştirilmiştir (Budak, 2010). İnkübasyon sıcaklık ve süre parametreleri Bölüm 3.5.'da belirtilmektedir. Elde edilen koloniler Yeast Glucose Broth (YG-broth; %5 glikoz, %1 yeast ekstrakt)'da zenginleştirilmiştir (İrigoyen et al., 2005; Pérez-Fernández et al., 2010). YG-broth 30°C'de 72 sa inkübe edilmiş ve YG-broth'un AAB içeriği YGC agar üzerinde sayım yapılarak belirlenmiştir.

3.3. Kefir Üretimi

3.3.1. Asetik asit bakterilerinin Kefir danesinde geliştirilmesi

Sıcaklığı 25 °C'ye ayarlanmış pastörize inek sütüne %2 oranında Kefir danesi ve %4 oranında 7,36 log kob/ml AAB içerikli broth inoküle edilip fermantasyon işlemi

yapılmıştır. Fermantasyon işlemi 25 °C’de pH 4.6’da sonlandırılmıştır. Aseptik koşullar sağlanarak Kefir daneleri ayrılmış ve steril su ile yıkanmıştır (Şekil 3.1). Kullanılan tüm ekipman ve yıkama suyu sterilize edilmiş, aktarma işlemleri UV steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 15 gün süresince aralıksız tekrarlanmıştır. 15 günlük süre sonunda mikroflorası modifiye edilmiş asetik asit bakterileri içeren Kefir danesi (KDA) elde edilmiştir.

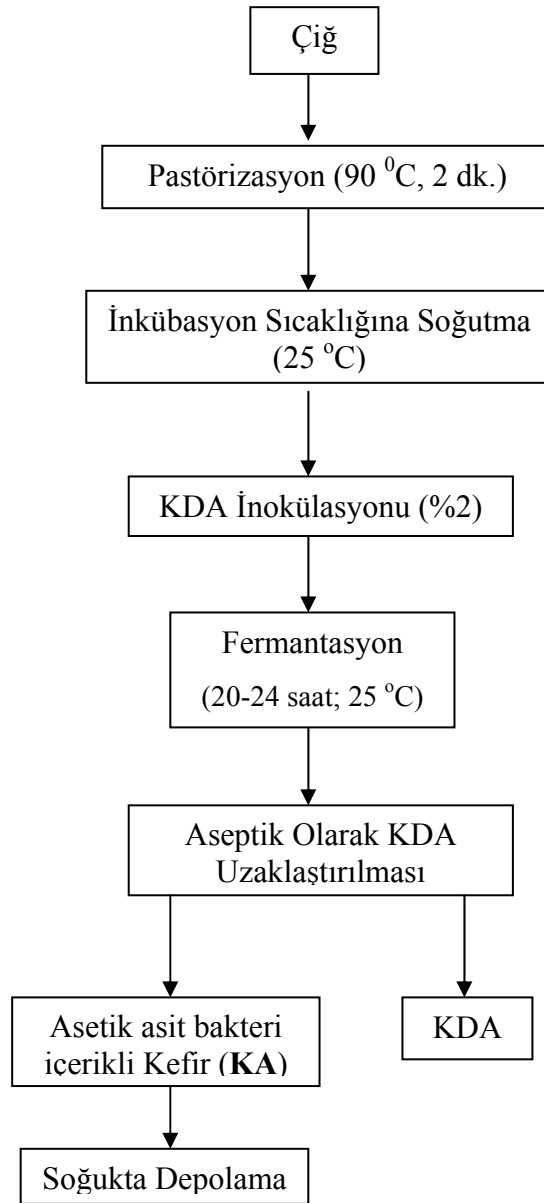


Şekil 3.1. Kefir danesinde asetik asit bakterilerinin geliştirilmesi
(**KDA:** AAB'nin Kefir danesinde geliştirilmesi ile elde edilen dane)

Asetik asit bakterileri geliştirilmiş Kefir danelerinde asetik asit bakterilerinin düzeyi 25 gün (1., 5., 10., 15., 25. günlerde yapılan analizlerle) süresince belirlenmiştir.

3.3.2. Asetik asit bakterilerini içeren Kefir danesi kullanılarak Kefir üretimi

Asetik asit bakterileri içeren Kefir danesi kullanılarak kefir üretimi Şekil 3.2.'de sunulmuştur.



Şekil 3.2. KDA kullanılarak Kefir üretimi akış şeması
(KA: KDA kullanılarak üretilen Kefir örneği)

3.4. KDA Danesinde ve KA Kefir Örneğinde Asetik Asit Bakterilerinin PZR Yöntemi ile Belirlenmesi

İzole edilen asetik asit bakterilerinde ve KDA örneğinde asetik asit bakteri türlerinin belirlenmesinde 16S rDNA tekniği kullanılmıştır. İzole edilen DNA'lar seçici primerler yardımıyla optimize edilmiş şartlar altında PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'de çoğaltılmıştır. PZR analizi ve dizi analizi REFGEN (Ankara) firmasına tarafından yapılmıştır.

1. Spesifik seçici besiyerlerinde geliştirilen AAB kolonileri steril öze yardımıyla alınmıştır. Seçici besiyerlerinin hazırlanışı inkübasyon sıcaklık ve süreleri Bölüm 3.5.'da belirtilmiştir. DNA izolasyonu için Qiagen DNeasy Tissue&Blood izolasyon kiti kullanılmıştır.
2. *Acetobacter aceti* spesifik primer olarak;
NuniADHfw
5'-TGG(T/C)(A/T)CGG(C/T)AT(T/C)CC(G/C)GG-3'
NuniADHrev
5'-GT(G/C/A)GCGTC(A/G)TA(A/G)GC(A/G)TGGAA-3' kullanılmıştır (Trcek, 2005).
3. Hazırlanan solüsyonlardan PZR'de kullanılmak üzere son konsantrasyonu 50 ng/l olacak şekilde yeniden dH₂O ile dilüsyon hazırlanmıştır. 50 µL hacimde; 1x Buffer, 1.5 mM MgCL, 0,2 mM dNTP, 0,4 pmol primer 1,5 U Taq polimeraz (Fermantase) kullanılmıştır. Bu araştırmada kullanılan PZR (Applied biosystems 9700) döngü programı 94 °C'de 30s, 55 °C'de 30s ve 72 °C'de 30s olmak üzere 30 döngü yapılmıştır.
4. Dizi analizi reaksiyonunda Bigdye Cycle Sequencing Kit V.3.1 kullanılmıştır. Reaksiyon sonunda ürünler ABI 3130XL Genetic Analyzer'da yürütülmüştür. Dizi analizi sonrası sonuçlar, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> internet adresi kullanılarak BLAST programında değerlendirilmiştir.

3.5. Mikrobiyolojik Analizler

***Lactobacillus* spp. İçeriği:** Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek steril petri kutularına pipetlendikten sonra, 45°C' ye kadar soğutulmuş 15 mL MRS Agar (Merck) petri kutusuna ilave edilmiştir. İnkübasyon 37°C'de 3 gün %6'lık CO₂ inkübatörde (CO-150, New Brunswick Scientific, ABD) inkübe edilerek, 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

***Lactococcus* spp. İçeriği:** Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek petri kutularına pipetlendikten sonra, 45°C' ye kadar soğutulmuş 15 mL M17 Agar (Merck) petri kutusuna ilave edilmiştir. İnkübasyon 37°C'de 2 gün %6'lık CO₂ inkübatörde gerçekleştirilerek, 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

***L. acidophilus* İçeriği:** Kefir örneklerinde *L. acidophilus* kolonilerini saymak amacıyla MRS-Sorbitol (Sigma) agar kullanılmıştır. %10 'luk hazırlanan salicin 0,43 µm olan steril filtreden geçirilerek, 50°C' ye kadar soğutulmuş MRS agar içerisine ilave edilip karıştırılmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek steril petri kutularına alınarak üzerine 15 mL MRS-salicin agar petri kutusuna ilave edilmiştir. İnkübasyon 37°C 'de 2 gün %6'lık CO₂ inkübatörde gerçekleştirilerek, 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

***Bifidobacterium* spp. İçeriği:** Kefir örneklerinde *Bifidobacterium* spp. kolonilerini saymak amacıyla MRS-NNLP agar seçici besiyeri kullanılmıştır. NNLP karışımı, Neomisin sülfat (Merck) (100 mg/L), nalidisik asit (Merck) (50 mg/L), lityum klorit (Merck) (3000 mg/L), paronomisin sülfat (Merck) (200 mg/L) tartılarak, üzerine 100 mL saf su ilave edilmiş ve 35°C karıştırıcıda çözündürülmüştür. Steril filtereden 0,43 µm geçirilerek, %20 oranında MRS agar içerisine ilave edilmiştir. Hazırlanan örnek dilüsyonlarından 1 mL steril petri kutularına alınarak ve 45°C' ye kadar soğutulmuş 15 mL MRS-NNLP agar inoküle edilmiştir (Özer et al., 2008). İnkübasyon 37°C 'de 3 gün %6'lık CO₂ inkübatörde gerçekleştirilerek 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

Maya-Küf İçeriği: Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek petri kutularına alınarak, 45°C' ye kadar soğutulmuş PDA (Potato Dextrose Agar, Merck) 'dan 15 mL petri

kutusunda ilave edilmiştir; 25 °C 'de 5 gün inkübe edilerek, 30-300 koloni bulunduran petrilerde sayımlar yapılmıştır.

Asetik asit bakteri İçeriği: YGC agar (Yeast Glucose Chloramphenicol, Merk) kullanılmıştır (Pérez-Fernández et al., 2010) ve maya inhibitörü olarak 4 mg/L cycloheximide hazırlanıp steril filtreden 0,45 µm geçirilerek ilave edilmiştir (Marquina et al., 2002; Irigoyen et al., 2005). Hazırlanan dilüsyonlardan 100 µl örnek YGC-cycloheximide agar bulunan petri kutularına ilave edilmiştir. Yayma yöntemi kullanılmıştır. 30°C 'de 5 gün inkübe edilerek, 30-300 koloni bulunduran petrilerde sayımlar yapılmıştır. Ayrıca içerisinde AAB geliştirilen YG-broth için de YGC agar kullanılmış ve 30°C 'de 5 gün inkübe edilmiştir.

3.6. Kimyasal Analizler

Kefir örneklerinde; asitlik, pH, titrasyon asitliği, kuru madde ve kül içerikleri AOAC (1996)' ya göre belirlenmiştir.

3.6.1. pH

Örneklerin pH değerleri Inolab (WTW, Measurement System, FL, ABD) pH metre kullanılarak belirlenmiştir.

3.6.2. Titrasyon asitliği (% Laktik asit)

Kefir örneklerinde asitlik tayininde 25 mL kefir, fenolfitalein varlığında 0,25 N NaOH çözeltisi ile titre edilerek; titrasyon sonucunda harcanan miktar büretten kaydedilerek titrasyon asitliği sonucu bulunmuştur. Elde edilen titrasyon asitliği değeri 0,0225 faktörü ile çarpılarak % laktik asit hesaplanmıştır.

3.6.3. Kuru madde içeriği

Bütün numuneler için önceden etüvde kurutulup, tartımı alınan kurutma kabı içerisine 5 g Kefir örneği alınmış ve etüvde 105 °C' de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur. Kurutulan örnekler desikatör içine yerleştirilerek oda sıcaklığına

getirilmiştir. Tartımlar hassas terazi (Metler Toledo, AB204, İsviçre) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar yüzde olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ KM} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} \times 100$$

(3.1.)

M=Kurutma kabı ağırlığı (g)

M1=Kurutma kabı ve kalıntının ağırlığı (g)

M2=Numune ve kurutma kabı ağırlığı (g)

3.6.4. Kül içeriği

Bütün numuneler için önceden 400 °C'de kül fırınında kurutulup, tartımı alınan krozeler içerisine 5 g Kefir örneği alınmış ve 525 °C'de kül fırınında örnekler beyaz kül oluncaya kadar yakılmıştır. Örnekler desikatör içine yerleştirilerek oda sıcaklığına getirilmiştir. Tartımlar hassas terazi (Metler Toledo, AB204, İsviçre) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar yüzde olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kül Miktarı} = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \times 100$$

(3.2.)

m=Kroze ağırlığı (g)

m₁=Kroze ve yanma sonucu kalan kül ağırlığı (g)

m₂=Kroze ve tartılan örnek ağırlığı (g)

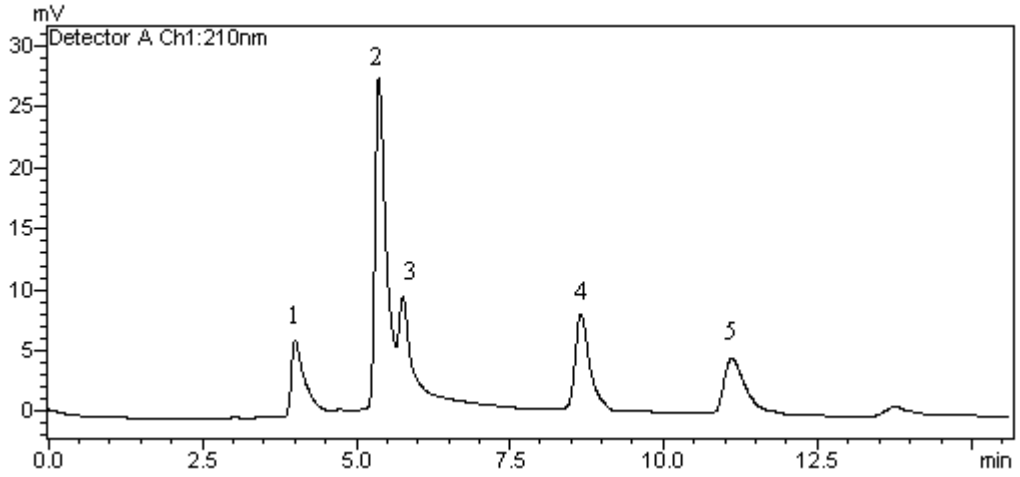
3.7. Organik Asit Bileşenlerinin Belirlenmesi

Kefir örneklerinde organik asit bileşenleri HPLC’de belirlenmiştir. HPLC cihazında, sistem kontrol ünitesi (LC- 20AT), pompa (LC- 20AT), UV dedektör (SPD-10Avp), kolon fırını (CTO-10Avp), otomatik örnekleyici (SIL-20AC) ve gaz giderme birimi (DGU- 20A5) bulunmaktadır. Organik asitlerin belirlenmesinde laktik asit (Sigma), asetik asit (Sigma), sitrik asit (Sigma), formik asit (Sigma) ve pürivik asit (Sigma) standartları kullanılmıştır.

Kefir örnekleri organik asit tayini için 5 g tartılarak üzerine 5 mL %2’lik H_3PO_4 ilave edilip homojenize edilmiştir. Karışım 2 dakika 14500 rpm’de santrifüj edilmiş ve santrifüj edilen örneklerin üst fazı alınmıştır. Üst fazın 1mL alınıp 3 mL ekstraksiyon çözeltisi ile seyreltilip bir karışım hazırlanmıştır. Ekstraksiyon çözeltisi olarak pH’sı $8,00\pm 0,05$ ’e ayarlanmış olan 0,01 M KH_2PO_4 çözeltisi kullanılmıştır. Organik asitleri tayin etmek için 1 mL karışım, 3 mL metanol ile şartlanmıştır, 10 mL saf su ile yıkanan kartuştan (Süpelco C18 katı faz kartuşu) geçirilip eluat bir tüpe alınmış ve kartuş 2 mL ekstraksiyon çözeltisi ile yıkanmıştır. Eluatlar birleştirilmiş ve enjeksiyon hacmi 20 μ L olacak şekilde HPLC’ye enjeksiyon yapılmıştır (Alhendawi et al. 1997).

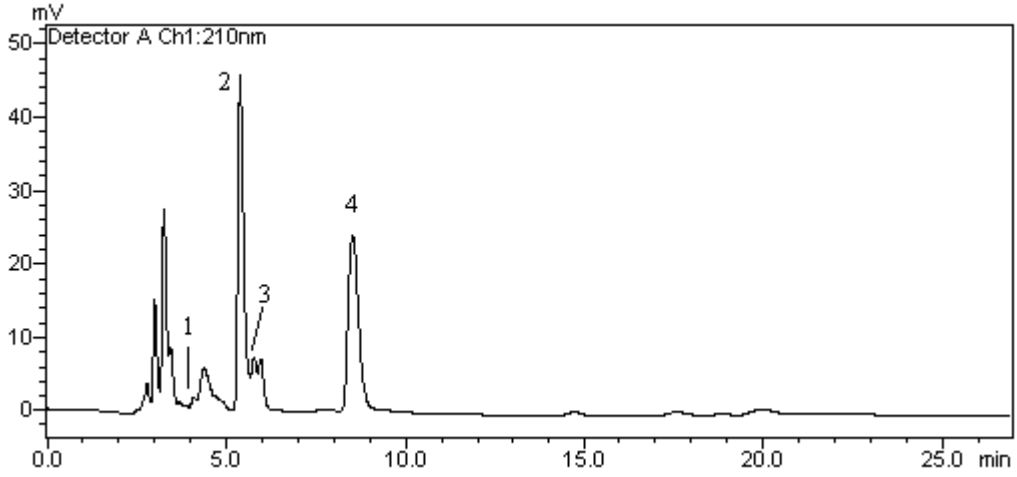
Organik asitlerin ayrımı Luna C18 (250 x 4,6 mm) 5 μ m boyutlarındaki kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde hareketli faz olarak H_3PO_4/H_2O (pH 2,5) çözeltisi kullanılmıştır. Analitik koşullar; kolon sıcaklığı 30 $^{\circ}$ C, hareketli faz akış hızı 0,8 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 μ l ve analiz süresi 30 dk olarak belirlenmiştir. Organik asitlerin kromatogramları 210 nm dalga boyunda UV-VIS dedektör kullanılarak gözlemlenmiştir. Kantitatif olarak formik asit, laktik asit, asetik asit, sitrik asit ve pürivik asit tayin edilmiştir.

Organik asit bileşenlerine ait standart kromatogramı Şekil 3.3.’de ve KA Kefir örneğinin organik asit bileşenlerine ait örnek kromatogramı Şekil 3.4.’de sunulmuştur.



Şekil 3.3. Organik asit bileşen standart kromatogramı

(1-Formik asit, 2-Laktik asit, 3-Asetik asit, 4-Sitrik asit, 5-Pirüvik asit)



Şekil 3.4. KA Kefir örneğinin organik asit bileşenlerine ait örnek kromatogram

(1-Formik asit, 2-Laktik asit, 3-Asetik asit, 4-Sitrik asit, 5-Pirüvik asit)

3.8. Biyokütle Artışının Belirlenmesi

Kefir danesine AAB içeriği belirlenmiş brotdan %4 oranında ilave edilerek 15 gün aktifleştirilmiştir. Kefir daneleri aseptik koşullar sağlanarak steril kağıt pedler üzerinde 10 dakika bekletilerek fazla suları alınmıştır. Kefir dane ağırlıkları 15 günlük aktifleştirme sürecinde her beş günde bir hassas terazide (A&D Comp, Japonya) tartılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak biyokütle artışı oranı tespit edilmiştir.

3.9. Ekzopolisakkarit Miktarının Belirlenmesi

3.9.1. Ekzopolisakkarit uygulamasında kullanılan çözeltiler

Trikloroasetik asit (TCA) Çözeltisi: 20 g TCA (Merck) tartılıp, 100 mL saf su ile tamamlanmıştır.

Alginate Çözeltisi: 0,25 g alginate tartılır ve hacmi 250 mL ye saf su ile tamamlanmış (0,25g/250 mL). Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için kullanılmıştır.

Fenol Çözeltisinin Hazırlanışı: 80 g fenol (Fluka) tartılıp ve hacmi 100 mL ye saf su ile tamamlanmıştır. Fenol geç çözüldüğü ve kanserojen olduğu için çeker ocakta 4-5 saat tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

3.9.2. Ekzopolisakkarit ekstraksiyonu ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Örneklerin EPS miktarlarını belirlemek amacıyla, Zisu ve Shah (2003)'ın EPS ekstraksiyonu modifiye edilerek uygulanmıştır (Amatayakul et al., 2006). EPS konsantrasyonu Dubois vd. (1956)'un fenol-sülfirik metoduna göre aşağıda sunulduğu gibi belirlenmiştir.

- 100 mL kefir örneğine 2 mL %20 TCA ilave edilerek protein uzaklaştırılmıştır.
- 6500 RPM'de 30 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- 4 M NaOH ile süpernatant pH'sı 6,8 ayarlanmıştır.
- Serum proteinlerini uzaklaştırmak için 100 °C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
- 6500'de 30 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Karbonhidrat uzaklaştırmak için süpernatant miktarı kadar etanol (Merck) ilave edilmiştir.
- 1 gece 4 °C'de bekletilmiştir.
- 6500 RPM'de 30 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen pelete 10 mL dH₂O ilave edilmiştir.
- Oda sıcaklığında 1 saat sonikasyon banyosunda bekletilmiştir.

- 12 kDa diyaliz tüplerine alınmıştır.
- 2 hafta boyunca hergün tüplerin bulunduğu su değiştirilmiştir (4 °C)
- Numuneler için okuma yapılırken 2 mL standart alginat yerine EPS ekstraksiyonu için hazırlanmış numeneden 2 mL konulmuştur.
- Üzerine önce 50 mL fenol ve 5 mL H₂SO₄ eklenmiştir.
- 10 dakika beklenmiştir.
- Tüpler vortekslenmiştir.
- 35°C'lik etüvde 15 dakika bekletilmiştir.

Standart kalibrasyon grafiğinin belirlenmesi: Alginat çözeltisi ile uygun dilusyonlar hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için 2 mL saf su bulunan 3 deney tüpü hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için hazırlanan deney tüplerine farklı konsantrasyonda alginat çözeltileri 2 mL konup, üzerine önce 50 mL fenol ve 5 mL H₂SO₄ eklenmiştir. 10 dakika beklenip, tüpler vortekslenmiştir. 35 °C'lik etüvde 15 dakika bekletilip, hazırlanan tüplerin absorbanları spektrofotometrede (UV 1700, Shimadzu, Japonya) 480 nm'de okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi çizilip eğim ve kesim değeri belirlenmiştir (R²:0,9942).

3.10. Kefir Örneklerinin Reolojik Özelliğinin Belirlenmesi

Reolojik analizler Brookfield Rotational Rheometer (DV-II Pro LV, Brookfield Engineering Laboratories, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kefir örneklerinde 100 rpm'de viskozite değerleri spindle DV-4 ile belirlenmiştir (Kok-Taş and Guzel-Seydim, 2010; Ertekin and Guzel-Seydim, 2010).

3.11. Duyusal Değerlendirme

Kefir örnekleri duyusal analiz açısından tecrübeli olan Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyeleri ve öğrencilerinden oluşan 12 panelist tarafından değerlendirilmiştir. Kefiri severek tüketen ve özelliklerini bilen, sıklıkla duyusal değerlendirme yapan panelistler seçilmiştir (Lawless and Heymann, 1999; Ertekin and Guzel-Seydim, 2010). Ön denemelerle belirlenmiş dış görünüş, koku, tat, tekstür kriterleri duyusal değerlendirmede kullanılmıştır. Duyusal değerlendirme formu Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. Örnekler panelistlere 1 gün 4

⁰C’de soğuk depolama sonrası plastik bardaklarda 120 mL su ve kraker ile soğuk olarak sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kefir duyusal değerlendirme formu

Panelist adı :	Tarih:		
Duyusal Değerlendirme Formu			
Deney Adı: Kefir Dane Mikroflorasındaki Değişimin Kefirin Bazı Nitelikleri Üzerine Etkileri			
Deney Yapacak Kişinin Adı: Nilgün ÖZDEMİR			
Tanımlar:			
1. Testimiz; sayılabilir derecelendirme duyusal analiz testidir. Testimizde ürün ile ilgili kesit-dış görünüş-yapı, koku, tat ve genel değerlendirme başlıkları altında Kefire özgü spesifik tanımlayıcı kelimeler yer almaktadır.			
2. Her başlığın altında ürün için istenilen özellikler belirtilmiştir. Lütfen, özellikleri okuduktan sonra dikkatli bir şekilde puanlama yapınız. Formda belirtildiği gibi karakteristik özelliği taşıyan örnek (ler) için açıklama kısmında yer alan puanları vermeniz uygundur. Karakteristik tanımlayıcı kelimeye uygun özellik taşımayan örneklerde puanlarını uygun şekilde azaltmanız gerekmektedir.			
3. Düşürülen Puanlama Nedenleri			
4. Örnekler arasında lütfen su---kraker---su şeklinde ağızımızı çalkalamaya özen gösteriniz.			
KEFİR; süt rengine, homojen, yoğun ayran kıvamında, ağızda dolgunluk hissi veren, fermente bir tada sahip, hafif ekşimsi, hoş giden ferahlık hissi uyandıran karakteristik duyusal özelliklere sahip fermente bir süt içeceğidir. Kefir’i değerlendirmek önemli bir ayrıcalıktır.			
Görünüş ve Tekstür			
Kefirin Karakteristik özelliğini ifade eden tanımlayıcı kelime	Puan	Kefir örnekleri	
		256	478
Hoşa giden güzel homojen görünümlü ¹	0-10		
Hafif köpüklü görünüm ²	0-5		
Kremsi-Beyaz renk ³	0-5		
Ağız kaplama (Dolgunluk hissi)	0-5		
Viskozite ⁴ (yoğun ayran kıvamı)	0-5		
Serum ayrılması olmayan	0-5		
Toplam Puan	35		
¹ Yağ partikülleri ve pıhtı parçaları vb. kötü görünüm kusurlarından puan düşürülmelidir.			
² Kefirde köpüklü görünüm istenilen bir özelliktir.			
³ Kefirin kendine özgü rengi			
⁴ Kefirde viskozite yoğun ayran kıvamında olması istenir.			

Çizelge 3.1. (devam)

Koku			
Kefirin Karakteristik özelliğini ifade eden tanımlayıcı kelime	Puan	Kefir örnekleri	
		256	478
Hissedilebilir yoğunlukta kendine özgü koku	0-10		
Hoşa giden Fermente koku	0-5		
Hoşa giden çok hafif sirkemsi koku	0-5		
Hafif ekşimsi Koku	0-5		
Hayvansal olmayan koku	0-5		
Toplam Puan	30		

Tat			
Kefirin Karakteristik özelliğini ifade eden tanımlayıcı kelime	Puan	Kefir örnekleri	
		256	478
Ağızda hissedilebilir yoğunlukta kendine özgü tat	0-5		
Ferahlatıcı tat	0-5		
Hoşa giden fermente tat	0-5		
Hoşa giden hafif Ekşimsi tat	0-5		
Hoşa giden hafif geniz yakıcı- keskin tat	0-5		
Hoşa giden hafif sirkemsi tat	0-5		
Yabancı kötü tat bulunmayan	0-5		
Toplam Puan	35		

Lütfen size sunduğumuz Kefir Örneğini beğenme düzeyine göre sıralayınız.

Çok fazla beğendim..... (5)

Çok beğendim.....(4)

Orta derece beğendim..... (3)

Çok beğenmedim.....(2)

Hiç beğenmedim.....(1)

3.12. İstatistiksel Analiz

Bu araştırmada üç tekerrür yapılmış ve tüm analizler her tekerrür için iki paralel olarak düzenlenmiştir. Araştırma sonuçları tekrarlı ölçümler ve tek yönlü varyans analizi kullanılarak incelenmiştir. $P < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Değişkenler grup içi ve grup değişkenler arasındaki ortalamaların farklı olup olmadığı belirlenmiştir (SPSS, 2006).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Araştırmada; mikroflorasında AAB bulunan Kefir danesinden (KDA) üretilmiş Kefir örneği (KA) ve AAB bulunmayan Kefir danesinden (KDC) üretilmiş Kefir örneği (KC) şeklinde iki farklı uygulama bulunmaktadır. Yapılan analizler sonucunda bu iki farklı uygulama ile üretilen ve 1 gün 4 °C’de depolanan Kefir örneklerinin mikrobiyolojik içerikleri, kimyasal, fiziksel ve duyuşsal özellikleri değerlendirilmiştir.

4.1. KDA ve KA Örneğinde Asetik Asit Bakterilerinin PZR Analizi sonuçları

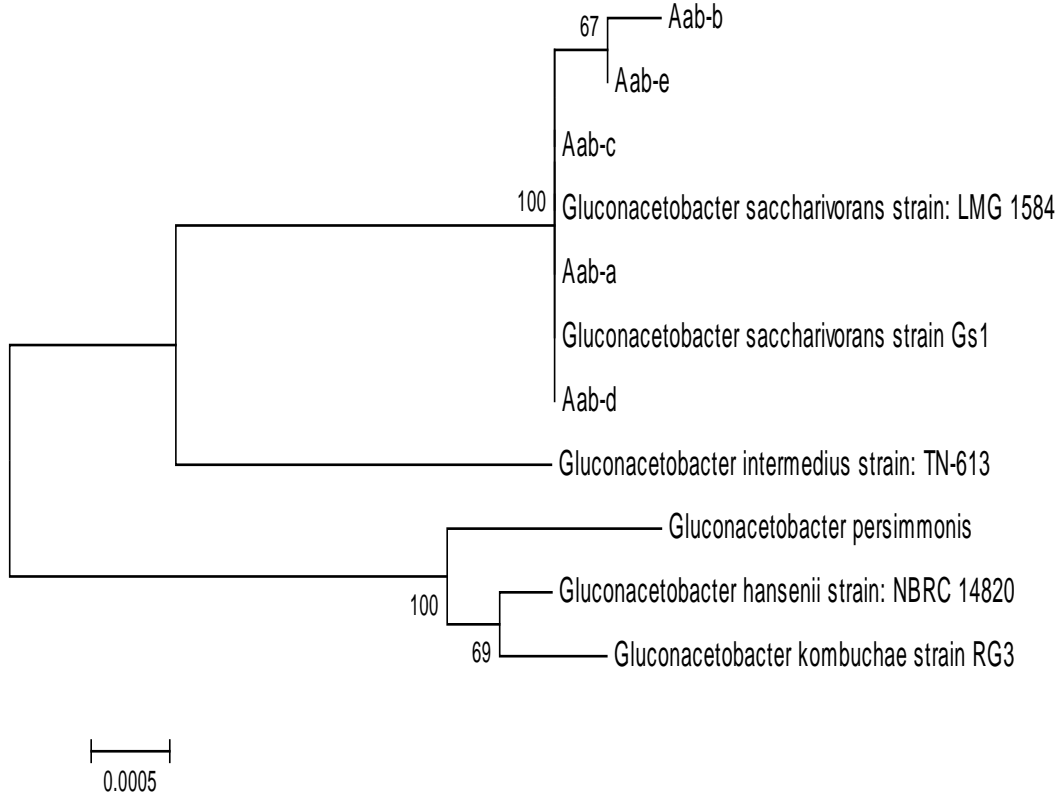
Sirke örneği uygun besiyerinde geliştirilerek koloni izolasyonları gerçekleştirilmiştir. besiyerlerinin hazırlanışı, inkübasyon sıcaklık ve süreleri Bölüm 3.5’ de belirtilmiştir. Primerler Bio Basic Inc, (Ontario, Kanada) firmasından temin edilmiştir (Bölüm 3.4).

Spesifik primer kullanılarak PZR analizi ve dizi analizi REFGEN (ODTÜ Teknokenti, Ankara)’de yaptırılmıştır. Dizi analizi sonrası sonuçlar, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> internet adresi kullanılarak BLAST programında değerlendirilmiştir. PZR ürünlerinin dizi analizi sonuçlarına ait AAB homolojisi Çizelge 4.1.’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Spesifik primerler kullanılarak elde edilen PZR ürünün dizi analizi sonrası bazı bakteri isimleri ve genetik benzerlikleri

BAKTERİ ADLARI	HOMOLOJİ/ BENZERLİK (%)	GENBANK NO	ÜRÜN
<i>Gluconacetobacter saccharivorans</i> strain Gs1	%100	JF346082	Üzüm
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	%99	AB099297	Sirke
<i>Gluconacetobacter intermedius</i> strain Gi8	%99	HQ400670	Sirke
<i>Gluconacetobacter persimmonis</i>	%99	AB095100	Sirke

Dizi analizi sonuçları BLAST değerlendirmelerine göre *Gluconacetobacter* spp. tespit edilmiştir. *Gluconacetobacter saccharivorans* ssp en yüksek derecede benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Değerlendirmelerin filogenetik ağaç gösterimleri Şekil 4.1. verilmiştir. Değerlendirme sonuçlarına göre izole edilen mikroorganizmaların *Gluconacetobacter* spp. olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. İzolantların filogenetik ağacı

(Aab-a KA Kefir örneği 1. tekerrür, Aab-b KA Kefir örneği 2. tekerrür, Aab-c KA KA Kefir örneği 2. Tekerrür, Aab-d KDA Kefir danesi, Aab-e AAB zenginleştirilmiş YG-broth)

Analiz sonuçları Kefir danesinde geliştirilen AAB'in *Gluconacetobacter* cinsine ait en yüksek homoloji gösterdiğini belirtmektedir. Pérez-Fernández vd. (2010) kırmızı üzüm sirkesi, beyaz üzüm sirkesi ve elma sirkesi üretiminden sorumlu asetik asit bakterilerinin belirlenmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada *Gluconacetobacter europaeus*, *Ga. xylinus*, *Ga. hansenii* ve *Acetobacter pasteurianus* türlerini izole etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada elma sirkesinden izole edilen izolantların

%35,3'ünü *Gluconacetobacter* cinsinin oluşturması elma sirke fermantasyonunda oldukça önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu çalışma elma sirkesinden izole edilen ve Kefir danesinde geliştirilen AAB dizi analizi sonuçlarını desteklemektedir. Dellaglio vd (2005) yaptıkları çalışmada elmalardan *Ga. Swingsii* sp. nov. ve *Ga. rhaeticus* sp. nov izole etmişlerdir.

Dane mikroflorasında olmayan AAB'nin bu cinsinin aside karşı yüksek toleranslı olması, Kefir üretim koşullarına dayanımı ve dane içine kolay adaptasyonu için uygun olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, *Gluconacetobacter europaeus* %10 asetik asit, *Gluconacetobacter intermedius* ve %6 asetik aside direnç göstermektedir (Trcek et al., 2006).

Gluconacetobacter spp. çeşitli fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Çin'de geleneksel bir içecek olan kambu (kambucha) çayı LAB, AAB ve mayaların fermantasyonu sonucunda üretilmektedir. Kambu çayının fonksiyonel özellik gösterdiği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Yang vd. (2010) kambu çayı ve kefir mikroorganizmaları arasındaki interaksyonu araştırmışlardır. Kambu çayından izole edilen *Gluconobacter* sp A4 ile Kefirden izole edilen 10 farklı suş kullanılarak fermantasyon yapılmıştır. *Gluconobacter* sp. A4 d-sakkarit 1,4 laktan (DSL) üreten bir mikroorganizmadır. DSL kanserojen maddelerin etkisini azalttığı için fonksiyonel bir bileşendir. Yapılan uygulamada Kefirden izole edilen LAB ile *Gluconobacter* sp A4 simbiyotik bir ilişki oluşturduğu belirlenmiş ve DSL üretimi birlikte yapılan fermantasyon sonucunda artış göstermiştir.

4.2. Mikrobiyolojik Analiz Bulguları

Asetik asit bakterisi içeren Kefir danesi (KDA) ve kontrol Kefir danesi (KDC) kullanılarak üretilen Kefir örneklerinin (KA, KC) laktobasil içerikleri sırasıyla 9,02 ve 8,53 log kob/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Yapılan diğer araştırmalarda laktobasil içeriği 8-10 log kob/mL değişim aralığında bulunmakta ve sonuçlar yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (Garrote et al., 2001; Witthuhn et al., 2004; Irigoyen et al. 2005; Guzel-Seydim et al. 2005; Papavasiliou et al., 2008; Ertekin and Güzel-Seydim 2010; Kök-Taş, 2010; Magalhães et al., 2010). Yapılan çalışmada iki farklı uygulama ile üretilen Kefir örneklerinin laktobasil

içerikleri arasında istatistik olarak önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Daneye ilave edilen AAB'nin dane mikroflorasındaki laktobasil içeriğine simbiyotik etki yaparak pozitif yönde etkilediği düşünülmektedir.

Kefir örneklerinin laktokok içerikleri ise sırasıyla 9,28 ve 9,27 log kob/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Çeşitli araştırmalarda Kefir örneklerinin laktokok içerikleri 8,3-10 log kob/mL değişim aralığında olduğu belirtilmekte ve bulguların literatüre uyumlu olduğu anlaşılmaktadır (Kroger, 1993; Rea et al., 1996; Garrote et al., 1997; Irigoyen et al., 2005; Guzel-Seydim et al., 2005; Ertekin and Guzel-Seydim, 2010; Bozkurt, 2010; Kök-Taş, 2010). KC örneği ile KA arasında laktokok içerikleri bakımından önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0,05$), (Şekil 4.2). KA Kefir örneğinin normal kefirde bulunan laktokok değerinin değişmediği ve daneye AAB uygulamasının laktokok türleri üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermediği belirtilmektedir.

KA ve KC Kefir örneklerinin maya içerikleri sırasıyla 2,08 ve 2,0 log kob/mL olarak belirlenmiş (Çizelge 4.2) ve sonuçlar arasında istatistik olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Çeşitli çalışmalarda Kefir maya içerikleri 4,0-6,6 log kob/mL aralığında olarak değişim göstermektedir (Kroger, 1993; Rea et al., 1996; Marquina et al., 2002; Witthuhn et al. 2004; Irigoyen et al., 2005; Guzel-Seydim et al., 2005; Ertekin and Güzel-Seydim, 2010; Bozkurt, 2010; Kök-Taş, 2010). Sonuçlara göre tespit edilen maya içeriğinin her iki Kefir örneğinde de literatürde belirtilen değer aralığının altında olması, AAB ilavesinin Kefirin maya içeriğine olumsuz bir etkisi olmadığını göstermektedir. Maya içeriğinin düşük olması Kefir dane mikroflorasının çeşitli parametrelerden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir.

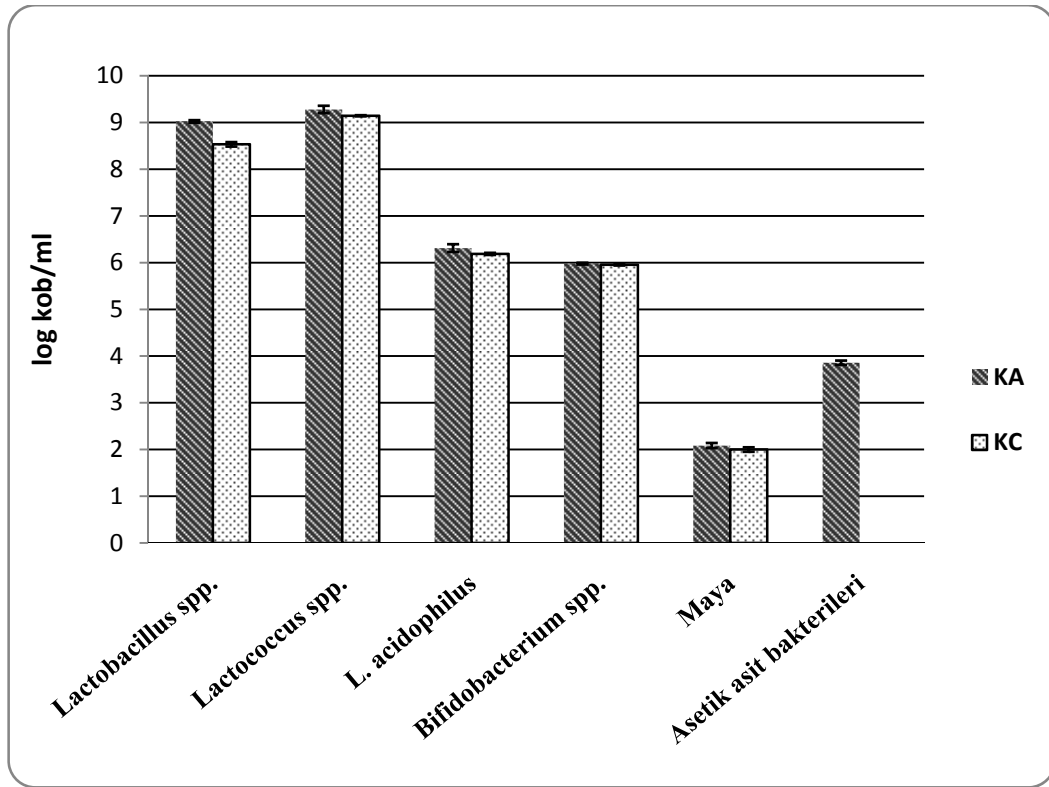
Çizelge 4.2. Kefir örneklerinin *Lactobacilli* spp., *Lactococcus* spp., *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. ve maya içerikleri

ÖRNEKLER (log kob/mL)	KA	KC
<i>Lactobacillus</i> spp.	9,02±0,03	8,53±0,05
<i>Lactococcus</i> spp.	9,28±0,08	9,14±0,01
<i>L. acidophilus</i>	6,31±0,08	6,19±0,02
<i>Bifidobacterium</i> spp.	5,98±0,02	5,95±0,02
Mayalar	2,08±0,06	2,00±0,05
Asetik asit bakterileri	3,86±0,05	—

Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda, KA ve KC Kefir örneklerinde sırasıyla 6,31 ve 6,19 log kob/mL olarak *L. acidophilus* içeriği ve 5,98 ve 5,95 log kob/mL olarak *Bifidobacterium* spp. içerikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Sonuçlar Kök-Taş (2010) tarafından Kefir örneklerinde belirlenen 5,78-6,43 log kob/mL değişim aralığındaki *L. acidophilus* içeriği ve 5,23-6,14 log kob/mL değişim aralığındaki *Bifidobacterium* spp. içerikleri ile paralellik göstermektedir. Benzer sonuçlar Bozkurt vd. (2010) tarafından 6,10 ve 6,16 log kob/mL olarak belirtilmiştir. Ayrıca KA ve KC Kefir örnekleri arasında *L. acidophilus* içeriği ve *Bifidobacterium* spp. içerikleri bakımından istatistik olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0,05$; Şekil 4.2).

Kefir dane mikroflorasında probiyotik özellikli olan *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. kefiranofaciens*, *L. casei*, *L. brevis*, *Str. thermophilus*, *B. longum* ve *B. bifidum* gibi bakteri türleri bulunmaktadır (Shah, 2000; Tuomola et al., 2001; Heller, 2001; Soomro et al., 2002; Wang et al., 2009; Kök-Taş et al., 2011). Yapılan çalışmalar *L. acidophilus*'un tümör hücrelerini inhibe ettiği, prokarsinojen maddelerin karsinojen maddelere dönüşmesine neden olan mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösterdiğini belirtmektedir (Nayir, 2008). Bifidobakterlerin ise böbrek rahatsızlıklarını iyileşmesi, kandaki amonyak düzeyinin azalması ve sindirim sistemi üzerine olumlu etkileri olduğu, anti-mutajenik ve anti-kanserojenik etkilere

sahip olduğu belirtilmektedir (Lankaputhra and Shah, 1998; Rowland et al., 1998). Ayrıca Wang vd. (2009) tarafından probiyotik özelliğe sahip olduğu belirlenen *L. plantarum* MA2 suğu ve Kök-Taş vd. (2011) tarafından *Bifidobacterium bifidum* S17 PRL2010 suğu Kefir danesinden izole edilmiştir. Probiyotik özelliği olan mikroorganizmaların Kefir içeriğinde doğal olarak bulunması Kefire terapötik özellik kazandırmaktadır. Bu alışmada, KA ve KC Kefir  rnekleri arasında probiyotik özelligi bilinen *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp. içeriklerinin istatistik açıdan farklı olmaması dane mikroflorasına AAB ilavesi Kefirin probiyotik özellikli mikroflorasını olumsuz yönde etkilemediğinin göstergesidir.



şekil 4.2. KA ve KC kefir örneklerinin mikrobiyal içerikleri

Kefir dane mikroflorası AAB gelişiminde Kefir fermantasyonuna 15 gün boyunca % 4 oranında ilave edilen YG- brothun AAB içeriğinin ortalama değeri $7,36 \pm 0,51$ log kob/mL olarak belirlenmiştir. Kefir danesine ilave edilen YG-brothlarının AAB içeriği uygulama süresince düzenli bir dağılım göstermektedir.

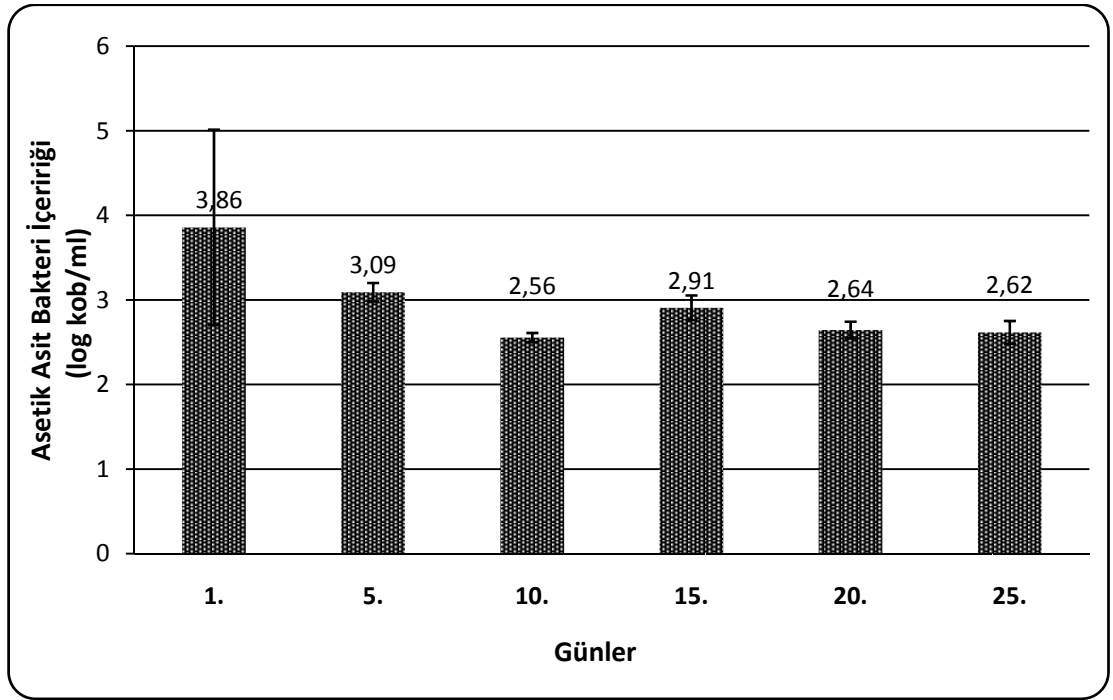
Dane içerisinde AAB gelişiminin göstergesi olarak belirlenen AAB içeriği, KA Kefir örneğinde 3,86 log kob/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.2). Tez çalışmasında kontrol örneği olarak kullanılan Kefir dane mikroflorasında AAB bulunmamaktadır. Kefir dane mikroflorasındaki çeşitlilik dane orijinine göre değişim göstermekte ve oldukça sınırlı sayıdaki çalışmada Kefir mikroflorasında doğal olarak AAB bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda bazı Kefir ve Kefir danesinden izole edilen AAB'ne *Acetobacter* spp. *Acetobacter pasteurianus*, *A. aceti*, *A. syzygii*, *A. lovaniensis* örnek gösterilebilir (Ottogalli et al., 1973; Rosi 1978; Koreleva 1991; Bottazzi et al., 1994; Garrote et al., 2001; Marquina et al., 2002; Magalhães et al., 2010a; Miguel et al., 2010). Yapılan araştırmalarda belirlenen Kefir mikroflorasındaki AAB içeriği 4-6 log kob/mL aralığında değişim göstermektedir (Garrote et al., 2001; Irigoyen et al., 2005). Kefir dane mikroflorası AAB geliştirilmesiyle AAB değeri 3,86 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Uygulamadaki sonuçlar, Marquina vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada Kefir dane mikroflorasında doğal olarak bulunan 4,10 log kob/mL AAB içeriği ile uyum göstermektedir. Ayrıca asetik asit bakterisi inokülasyonunun, dane mikroflorasını özellikle probiyotik özellikteki bakteri içeriği bakımından olumsuz etkilememesi Kefir'e fonksiyonel özelliği bakımından önem kazandırmaktadır.

Son yıllarda AAB üzerine yapılan çalışmalar artmakta ve AAB'nin sağlık üzerine olumlu etkilerinin olduğu belirtilmektedir. AAB'nin anti-mikrobiyal etkisi, dermatolojide kullanımı, sinirsel iletim üzerine ve deri bariyer fonksiyonu üzerine olumlu etkisi, bazı AAB türleri tarafından üretilen selülozun yara tedavisinde kullanılması vb. yapılan çalışmalardan bazılarıdır (Fesq et al., 2001; Green et al., 2004; Stasiak and Blażejok, 2009; Fukami et al., 2010a; Oda et al., 2010; Zhao et al., 2010a;b). Bu nedenle AAB'nin Kefir dane mikroflorasında bulunmasının ülkemizde üretilen kefirlerin sağlık üzerine gösterdikleri terapötik etkiyi arttıracakı düşünülmektedir.

Kefir dane mikroflorasında AAB içeriği Pintado vd. (1996), Witthunn vd. (2004); Yuksekdağ vd. (2004); Guzel-Seydim vd. (2005) ve Kök-Taş (2010) tarafından yapılan çalışmalarda tespit edilmemiştir. Ancak farklı orijinli Kefir dane

mikroflorasında Garrote vd. (2001) 5,4-5,56 log kob/mL, Marquina vd. (2002) log 4,1 kob/mL ve Irigoyen vd. (2005) 6 log kob/mL olarak yaptıkları çalışmalarla AAB içeriğini belirlemişlerdir.

Çalışmada elde edilen AAB içerikli kefir danesinin (KDA) mikroflorasındaki AAB içeriğinin sürekliliğini belirlemek için 25 gün süresince (1., 5., 10., 15., 20., 25. gün) mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Mikrobiyolojik analiz sonuçlarına göre 10. gün sonunda yaklaşık 1 logaritmik bir azalma gözlemlenirken ($P < 0,05$), sonraki 15 gün süresince gözlemlenen logaritmik değişim önemsiz olarak belirlenmiştir ($P > 0,05$). Yapılan çalışmada mükemmel bir dengesi olan Kefir dane mikroflorasında AAB geliştirilmiş ve AAB içeriğinin 2,91-2,56 log kob/mL değişim aralığında devamlılık göstereceği tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. KDA danesinin 25 gün süresince mikroflorasındaki AAB içeriği

4.3. Kimyasal Analiz Bulguları

Yapılan çalışmada, KA ve KC Kefir örneklerinin başlıca kimyasal analiz bulguları Çizelge 4.3' de belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Kefir örneklerinin kimyasal analiz bulguları

Örnekler	pH	Laktik asit (%)	Kurumadde (% w/w)	Kül miktarı (% w/w)
KA	4,70±0,02	1,18±0,02	12,56±0,06	1,18±0,12
KC	4,68±0,01	1,53±0,04	12,18±0,05	1,26±0,06

KA ve KC Kefir örneklerinin pH değerleri sırasıyla 4,70 ve 4,68 değişim aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). KA Kefir örneği ve KC Kefir örneği pH bulguları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Bu değer Kefir, yoğurt gibi fermente süt ürünlerin pH değerleriyle uyumluluk göstermektedir. Yapılan çalışmalarda Kefirin pH değeri 4,19-4,7 aralığında değişim göstermektedir (Simova et al., 2002; Irigoyen et al., 2005; Wróblewska et al., 2009; Ertekin and Guzel-Seydim, 2010; Sirirat and Jelena, 2010). Kefir gibi fermente ürünlerin pH değerlerinde fermantasyonda rol oynayan mikroorganizmalar oldukça etkili olduğu belirtilmektedir (Collar, 1996). Asetik asit bakterilerinin ürünün pH'sında olumsuz bir değişiklik yapmaması ürün özelliklerinin korunması bakımından önemlidir.

Kefir örneklerinin (KA, KC) laktik asit cinsinden titrasyon asitliği değerleri %1,18 ve %1,53 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Kefir örnekleri üzerine yapılan çalışmalarda laktik asit cinsinden titrasyon asitliğinin genelde %0,70- %0,83 değer aralığında bulunduğu belirtilmektedir (Simova et al., 2002; Beshkova et al., 2002; Dinç, 2008; Ertekin and Güzel-Seydim, 2010; Sirirat and Jelena, 2010). Çalışmamızda belirlenen değerlere uyumlu olarak, Papavasiliou vd. (2008) %9,7 ve Kök-Taş (2010) %0,81-0,95 değişim aralığında laktik asit değerleri belirlemişlerdir. Assadi vd. (2000) tarafından Kefir örneğinde %1,5 olarak belirlenen laktik asit cinsinden titrasyon asitliği değerleri KC Kefir örneği ile benzerlik göstermektedir. KA ve KC Kefir örneklerinin % laktik asit değerleri arasındaki farklılığın AAB uygulamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ortamdaki organik moleküllerin bir kısmının AAB tarafından kullanılmasının ve asetik asit gibi farklı organik asitlere hatta karbondioksit ve suya kadar parçalanmasının sentezlenen laktik asit miktarında azalmaya neden olduğu düşünülmektedir (Guillomón and Mas, 2011).

Kefir örneklerinin kurumadde içerikleri %12,53 ve %12,18 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Yapılan bazı çalışmalarda Kefir örneklerinin kurumadde %7,8-12 olarak belirtilmiştir (Güven et al., 2004; Irigoyen et al., 2005; Kök-Taş, 2010; Ertekin and Guzel-Seydim 2010; Özdestan and Üren, 2010). Kefir kurumadde değerindeki bu geniş skala üretimde kullanılan süt bileşen miktarlarının özellikle yağ miktarının farklılığından kaynaklanmaktadır. KA ve KC örneklerin her ikisinin de kurumadde değerleri yapılan çalışmalarla uyum göstermiştir.

KA ve KC Kefir örneklerinin kül içeriği sırasıyla %1,18 ve %1,26 olarak belirlenmiş (Çizelge 4.3) ve değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0,05$). Yapılan bazı çalışmalar ile belirlenen Kefirin % kül miktarı %0,6-0,9 değer aralığında değişmektedir (Garrotte et al., 1997; Assadi et al., 2002; Güven et al., 2004; Nayir, 2008). Literatürdeki bu değerler elde edilen bulgularla uyumluluk göstermektedir.

4.4. Organik Asit Bileşen İçerikleri

Kefir örneklerinde laktik asit, asetik asit, formik asit ve sitrik asit miktarları belirlenmiş ve standartlara ve Kefir örneğine ait kromatogram Bölüm 3.7.'de verilmiştir. KA ve KC Kefir örneklerine ait analiz edilen organik asit bileşen içerikleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kefir örneklerinin organik asit bileşen içerikleri

Örnekler ($\mu\text{g/mL}$)	Formik asit	Laktik asit	Asetik asit	Sitrik asit	Pirüvik asit
KA	908,1 \pm 73,7	21595,6 \pm 957	1976,4 \pm 84,3	8052,2 \pm 192,2	—
KC	1049,3 \pm 80,1	21858,8 \pm 367	1689,1 \pm 81,7	6594,8 \pm 448,2	—

KA Kefir örneğinde 908,1 $\mu\text{g/mL}$ formik asit, 21595,5 $\mu\text{g/g}$ laktik asit, 1976,4 $\mu\text{g/g}$ asetik asit, 8052,2 $\mu\text{g/g}$ sitrik asit tespit edilmiştir. KC Kefir örneğinde ise 1049,3 $\mu\text{g/mL}$ formik asit, 21858,8 $\mu\text{g/g}$ laktik asit, 1689,1 $\mu\text{g/g}$ asetik asit, 6594,8 $\mu\text{g/g}$ sitrik asit tespit edilmiştir. Her iki örnekte de pirüvik asit tespit edilememiştir.

KA ve KC Kefir örneklerinde her bir organik asit bileşeni arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir ($P>0,05$). KA Kefir örneğinin asetik asit ve sitrik asit değerleri KC Kefir örneğinden yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bu Kefir danesine farklı bir mikroorganizma grubunun ilave edildiğini ayrıca, ilave edilen mikroorganizma grubunun krebs döngüsü (sitrik asit döngü) ürünleri üretebildiğini göstermektedir. Laktik asit ve formik asit değerlerinin kontrol grubunda daha yüksek olması ise kullanılan substratın KA Kefir örneğine göre daha fazla kısmının laktik ve formik asite dönüştüğünü göstermektedir.

Kefir’de bulunan organik asitler fermente bir süt ürünü olduğu için biyokimyasal ve bakteriyel metabolik proses sonucu meydana gelmektedir. Fermantasyonda rol alan mikroorganizmaların metabolik yollarına göre sentezlenen son ürün (organik asit vb.) farklılık göstermektedir. Çalışmamızda KA Kefir örneğindeki asetik asit miktarının fazla olması AAB tarafından asetik asit sentezlenmesinden kaynaklanmaktadır. Kefirdeki asetik asit miktarında, Kefir dane mikroflorası heterofermantatif LAB ve AAB içeriği etkili olmaktadır.

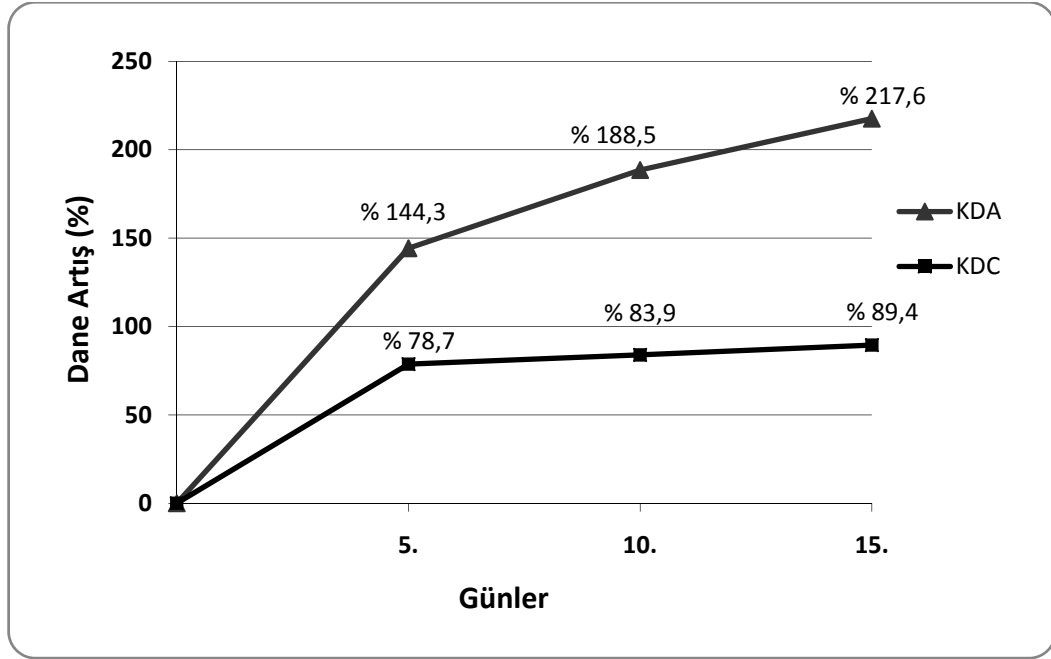
Magalhães vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada Kefir örneklerinde laktik asit değeri 5 g/L, asetik asit değeri 0,7 g/L olarak belirlenmiştir. Papavasiliou vd. (2008) Kefir örneğinde laktik asit değerini 9,7 g/L olarak belirlemişlerdir. Grønnevik vd. (2011) Kefir örneğinde asetik asit değerini 0,8 g/L olarak belirlemişlerdir.

Güzel-Seydim vd. (2000a) tarafından yapılan çalışmada kefirin 4°C’deki depolama süresince organik asit değerlerindeki değişimi (orotik, sitrik, pirüvik, laktik, ürik, asetik, propionik, bütirik ve hippürik) 275 nm’de UV detektör kullanılarak HPLC ile belirlenmiştir. Depolama süresince sitrat miktarı 1438-1863 µg/g, ürik asit miktarı 27-33 µg değişim aralığında olduğu belirtilmiştir. Pirüvik asit miktarı 0. günde 18 µg/g, orotik asit miktarı 21. günde 131 µg/g aralığında tespit edilmiştir. Kefirde asetik, propionik, bütirik ve hippurik asit depolama süresince tespit edilememiştir.

4.5. Asetik Asit Bakterilerinin Dane Biyokütle Artışına Etkisi

KDA ve KDC Kefir danelerine AAB ilavesinin 15 günlük aktifleşme sürecindeki biyokütle artışına etkisi incelenmiş ve biyokütle artış miktarının tespiti için 15 gün

süresince (1., 5., 10., 15. gün) yapılan gravimetrik analiz sonucunda KD danesine göre KDA danesinde biyokütle artışın önemli derecede farklı olduğu belirtilmiştir ($P<0,01$). Elde edilen veriler doğrultusunda yapılan istatistik analiz sonuçlarına göre; KDC ve KDA danelerinin 5. gün tartım sonuçları arasındaki fark istatistik olarak önemli ($P>0,05$) olmadığı, 10. gün tartım sonuçları arasındaki fark önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Devam eden AAB ilavesinde 15. gün tartım sonuçlarına göre KDC %89,4 oranında ve KDA %217,6 oranında artış göstermiştir. İki dane arasındaki yüzde biyokütle artış oranının oldukça önemli olduğu bulunmuştur ($P<0,01$). Bu sonuçlar daneye AAB ilavesinin biyokütle artışını pozitif yönde etkilediği ve bu etkinin 15 günlük aktifleşme süresince artarak devam ettiğini göstermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. KDA ve KDC Kefir danelerinin biyokütle artış miktarı

Çok sayıda mikroorganizmayı florasında bulunduran doğal Kefir danesi özgün olarak fermantasyon sırasında substratı fermente ederken kendi biyokütlelerini de artırmaktadırlar. Dane mikroflorasındaki mikroorganizmaların yaşam ortamı olan dane sisteminin biyokütle artışı üzerine bazı araştırmalar yapılmıştır. Rimada ve Abraham (2001) dane inokülasyon oranının ve fermantasyon sıcaklığının biyokütle artışına etkisini incelemiştir. Biyokütle artışının fermantasyon sıcaklığının 20 °C ile

30⁰C aralığındaki artan sıcaklık değerleriyle pozitif korelasyon gösterdiği, uygulanan %1 ve %10 inokülasyon oranları ile negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. 30⁰C üzerindeki sıcaklıklarda ise her iki inokülasyon oranı biyokütle artışını olumsuz etkilemiştir. En fazla artış 30⁰C %1 inokülasyon oranındaki bir fermantasyonda 0,05 g/g dane olarak belirlenmiştir.

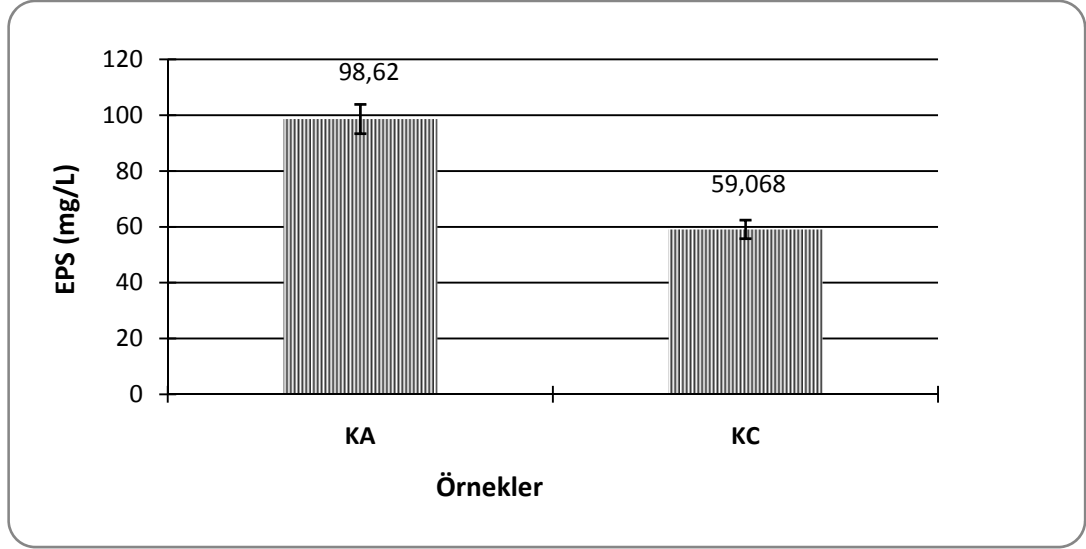
Guzel-Seydim vd. (2011) belli oranlarda modifiye peynir altı suyu proteini ve inulin ilave edilerek hazırlanan süt örnekleri, farklı atmosferik koşullar altında (normal ve CO₂ atmosfer), üç hafta süresince geliştirilerek, Kefir danesindeki biyokütle artışını tespit etmişlerdir. Peyniraltı suyu proteini ile zenginleştirilmiş süt ortamında Kefir danelerinde en yüksek biyokütle artışı %392 olarak belirlenmiştir. CO₂ atmosfer uygulaması dane gelişimini, biyokütle artışı dane mikroflorasını önemli düzeyde etkilememiştir.

Uygulamada mikroflorasında AAB geliştirilen Kefir danesinin (KDA) biyokütle artış oranının önemli düzeyde fazla olmasında, AAB tarafından üretilen EPS etkili olduğu düşünülmektedir.

4.6. Kefir Örneklerinin Ekzopolisakkarit (EPS) İçeriği

EPS yapı Kefirin fizikokimyasal, reolojik ve organoleptik özelliklerinin oluşumunda etkilidir ve Kefir danesinde var olan mikroorganizmalar tarafından üretildiği yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Wang et al., 2010). Kefirdeki bu yapı 'Kefiran' olarak isimlendirilmiştir. Birçok araştırmada EPS içeriğinin ve özelliğinin mikroorganizmaların çeşitliliğine, fermantasyon koşullarına ve fermantasyon ortamının kompozisyonuna bağlı olduğu belirtilmektedir.

Çalışmamızda yapılan EPS analiz sonuçlarına göre KA ve KC Kefir örneklerinin EPS içeriği sırasıyla 98,62 ve 59,07 mg/L olarak belirlenmiş (Şekil 4.5) ve aralarındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,05). KA örneğinin EPS içeriğinin önemli derecede yüksek olması Kefir danesine AAB ilavesinden kaynaklanmaktadır. Özellikle, PZR sonuçlarına göre belirlenen *Gluconacetobacter* cinsine, EPS üretme yeteneği ile biyokütle artışına katkı sağladığı düşünülmektedir (Park et al., 2003).



Şekil 4.5. KA ve KC Kefir örneklerinin EPS içeriği

Kök-Taş (2010) Kefir örneklerinde EPS içeriklerinin 79-130,15 mg/L aralığında değişim gösterdiğini belirlemiştir. Rimada ve Abraham (2001) yaptıkları çalışmada 28,9-78,7 mg/L değer aralığında belirlemiştir. Ayrıca, EPS miktarının fermantasyon sıcaklığı ve dane inokülasyon oranının artışı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir.

Cheirsilp vd. (2003b) *L. kefiranofaciens* ile *Sacch. cerevisiae* tarafından birlikte üretilen kefiran miktarının *L. kefiranofaciens* tarafından üretilen kefiran miktarından yaklaşık iki kat fazla olarak belirlenmiş ve bu sonuç maya ve LAB'ın kefiran üretiminde de sinerjik etki oluşturduklarının göstergesidir.

Ayrıca Kefir danelerinin süt içinde fermantasyonu sonrası EPS miktarı 218 mg/L, deproteinize peynir altı suyu içinde fermantasyonu sonrası EPS miktarı 247 mg/L olarak bulmuştur (Rimada and Abraham, 2003).

Başlıca Kefir danesine özgü bakteriler *L. kefiranofaciens*, *L. kefir*, *L. kefirgranum* ve *L. parakefir*, *L. plantarum* bakteri türleri tarafından üretilmektedir (Kooiman, 1968; Kandler, 1983; Fujisawa, 1988; Yokoi, 1991; Takizawa et al., 1994; Cheirsilp et al., 2003; Wang et al., 2008; Wang et al., 2010). Ekzopolisakkarit üretme yeteneğine sahip starter kültürlerin kullanımı ile fermente süt ürünleri tekstüründe iyileşme ve

serum ayrılmasında azalma sağlamak, su tutma kabiliyetini artırarak reolojik özelliklerini geliştirdiği bilinmektedir (Özer, 2006).

Tibet Kefirden izole edilen *L. plantarum* K15 suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritin özellikleri incelenmiş ve K15-EPS'in hidroksil (-OH) grubu ile su molekülleri arasında var olan güçlü interaksiyondan dolayı pseudoplastik (yalancı Newtoniyani olmayan akışkan) özelliği göstermektedir (Wang et al., 2010).

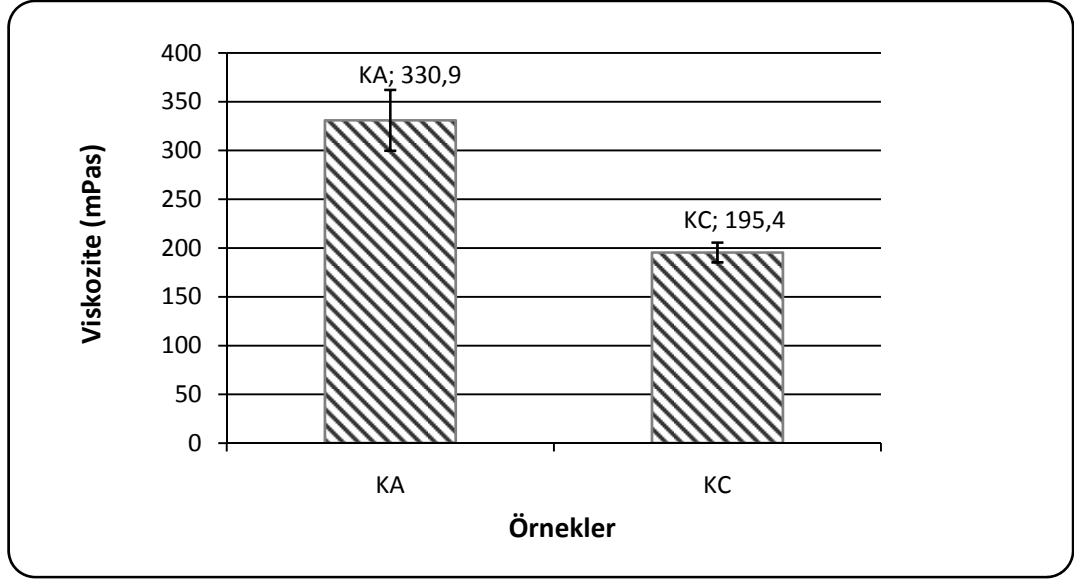
Çalışmamızda da izole edilen bazı *Gluconacetobacter* türlerinin EPS ve selüloz ürettiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Lisdiyanti et al., 2006; Dutta and Gachhui, 2007).

Bu nedenle *Gluconacetobacter* cinsi bakterilerin selüloz üretimi ve EPS üretimi Kefir'in EPS miktarına katkı sağlamıştır.

4.7. Kefir Örneklerinin Reolojik Analiz Bulguları

KA ve KC kefir örneklerinin 100 RPM'de ölçümü yapılan viskozite değerleri sırasıyla 330,9 ve 195,4 mPas belirlenmiştir. Farklı uygulamalarla üretilen kefir örneklerinin viskozite değerleri arasında istatistik olarak önemli düzeyde farklılık olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$, Şekil 4.6).

Irigoyen vd. (2005) farklı oranda Kefir daneleri (%1 ve %5) kullanılarak üretilen Kefirlerin, 100 RPM'de viskozite değerleri sırasıyla; 293 ve 372 mPas olarak belirlenmiştir. Kefirin viskozitenin dane inokülasyon miktarıyla artış gösterdiğini belirtirken fazla dane inokülasyonunun viskoziteyi azalttığını belirtilmiştir.



Şekil 4.6. KA ve KC Kefir örneklerinin viskozite değerleri

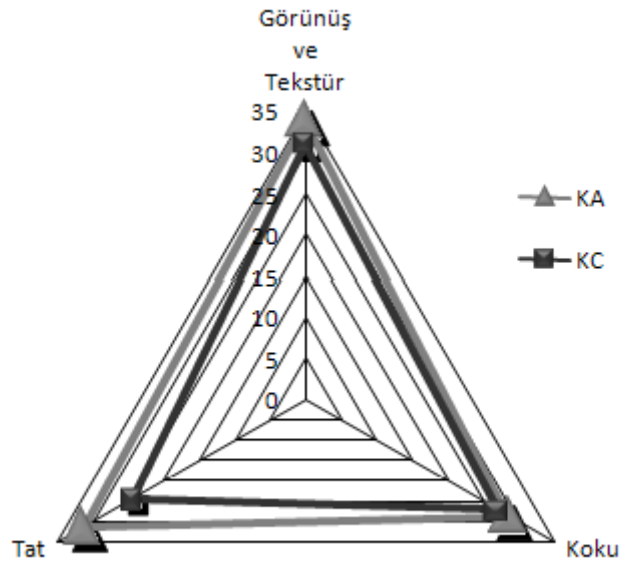
Kök-Taş (2010) tarafından Kefir örneklerinin 10 RPM'deki viskozite değerlerini 225-315 mPas aralığında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Ertekin and Güzel-Seydim (2010) tarafından yağsız süt kullanarak üretilen Kefir örneğinin 10 RPM' de viskozite değerleri ölçülmüş viskozite değeri 180 mPas olarak tespit etmiştir. Benzer şekilde, Wróblewska vd. (2009) danenin 60 RPM'de viskozite değeri 492 cP, danenin transglutaminaz ilavelisiz süt içerisinde fermantasyonu sonrasında oluşan Kefirin viskozite değeri 340 cP, farklılık göstermiştir. Tratnik vd. (2006) inek ve keçi sütüne inülin, peynir altı suyu protein konsantresi ve süt tozu ilave ederek hazırlanan kefir örneklerinde viskozite değerleri 42,2-166,6 mPas değişim aralığındadır. Sirirat ve Jelena (2010) kefir viskozite değerini 24 saat fermantasyon süresi sonunda 53-54 mm²/sn olarak belirlemiştir.

Yapılan çalışmada, Kefir danesine asetik asit bakterilerinin geliştirilmesi Kefir örneklerinin viskozite değerleri arasındaki farklılığa neden olduğu düşünülmektedir. Babina ve Rozhokova (1973) Kefir danesindeki LAB ve AAB'nin viskoziteyi artırıcı yönde etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca bazı çalışmalarda *A. aceti*, *A. rancens* Kefirin viskozitesinde ve kıvamında artırıcı yönde etki gösterdiği belirtilmiştir (Libudzisz and Piatkiewicz, 1990; Liu et al., 2005).

EPS içeriğinin viskoziteyi artırıcı yönde etki göstermesi KA örneğinin yüksek viskozite değerinin nedenini göstermektedir.

4.8. Kefir Örneklerinin Duyusal Analiz Bulguları

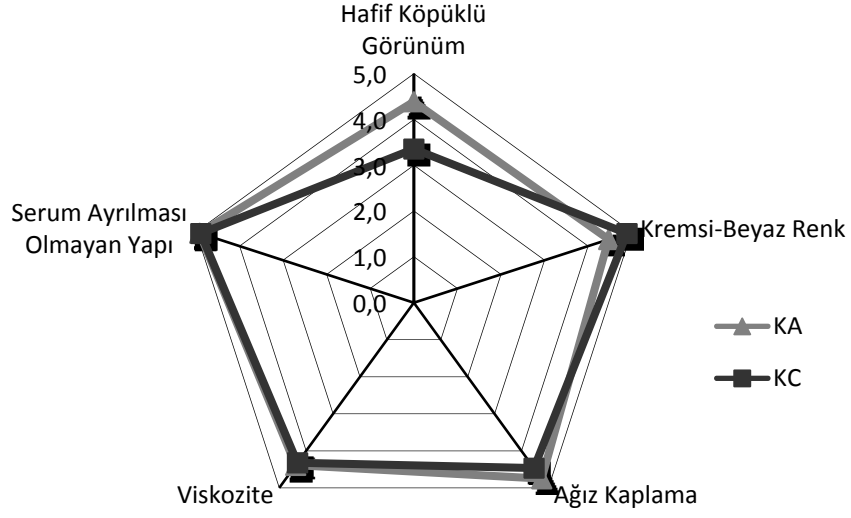
İki farklı uygulama ile üretilen Kefir örneklerinin duyusal değerlendirme bulguları Şekil 4.7. ve 4.8. a., b., c.'de verilmiştir. KA ve KC örnekleri tekstür, koku ve tat özellikleri değerlendirilmiştir. KA ve KC örneklerinin sırasıyla görünüş-tekstür özelliği 30,9 ve 25,1; koku özelliği 33,8 ve 23,6; tat özelliği 31,1 ve 24,3 olarak tespit edilmiştir. Örnekler arasında tat özelliği bakımından istatistik olarak farklılık önemlidir ($P < 0,05$). Asetik asit bakterilerini içeren KA örneği tat özelliği bakımından KC örneğinden daha yüksek puan alması yapılan uygulamanın tüketici tercihi bakımından olumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir.



Şekil 4.7. KA ve KC örneklerinin genel duyusal (tat, koku, tekstür) değerlendirme sonuçları

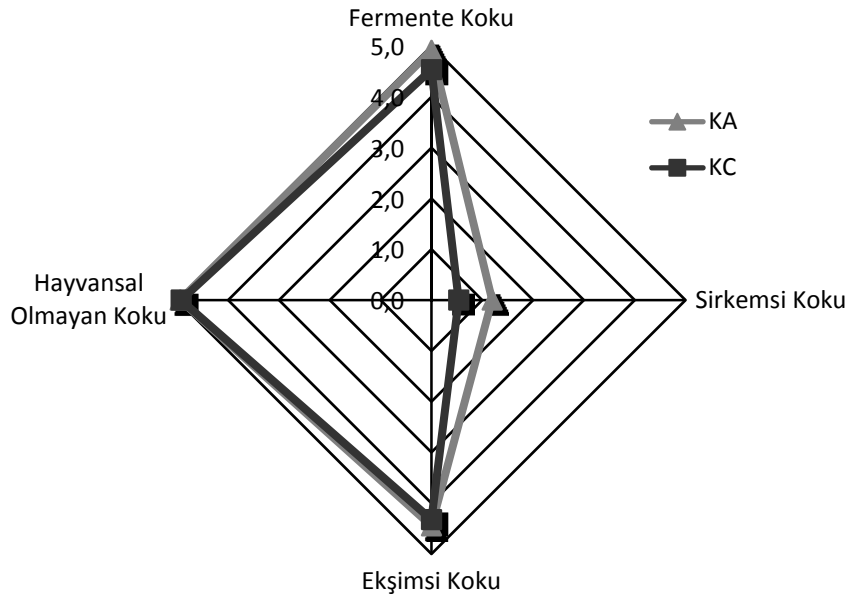
KA ve KC Kefir örneklerinde Görünüm ve Tekstür özellikleriyle ilgili kriterlerin değerlendirilmesi Şekil 4.8a.'da verilmiştir. Köpüklü görünüm ve kremi-beyaz renk puanları arasındaki fark önemli ($P < 0,01$) ancak ağız kaplama, viskozite, serum ayrılması olmayan yapı puanları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($P > 0,05$).

Özellikle, kefirde arzu edilen köpüklü görünüm değeri KA örneğinde kontrol örneğine göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (Şekil 4.8a).



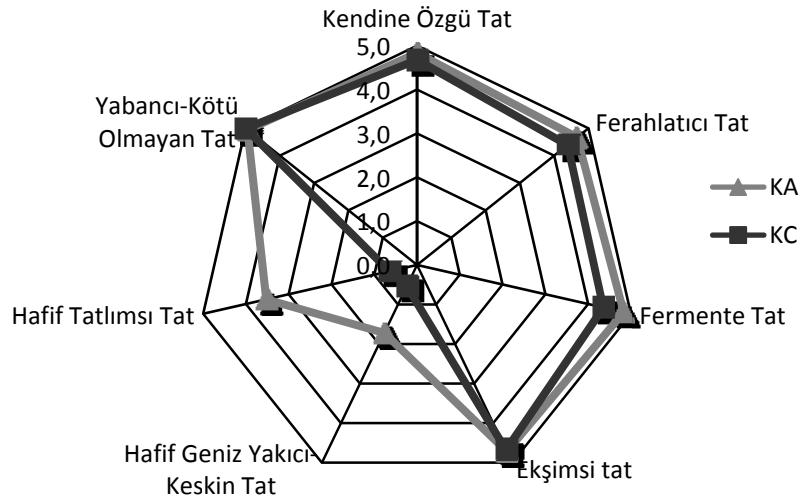
Şekil 4.8a. KA ve KC örneklerinin görünüm ve tekstür özellikleri ile ilgili duyuşal değerlendirme sonuçları

KA ve KC Kefir örneklerinde koku özellikleriyle ilgili kriterlerin değerlendirilmesi Şekil 4.8b.'de verilmiştir. Hoş a giden çok hafif sirkemsi koku puanları arasındaki fark önemli ($P < 0,05$) ancak hoş a giden fermente koku, hafif ekşimsi koku ve hayvansal olmayan koku puanları arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur ($P > 0,05$). İki örnek arasında sirkemsi koku kriter puanları bakımından fark olsa da uygulamanın koku değerleri arasında önemli bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.8b).



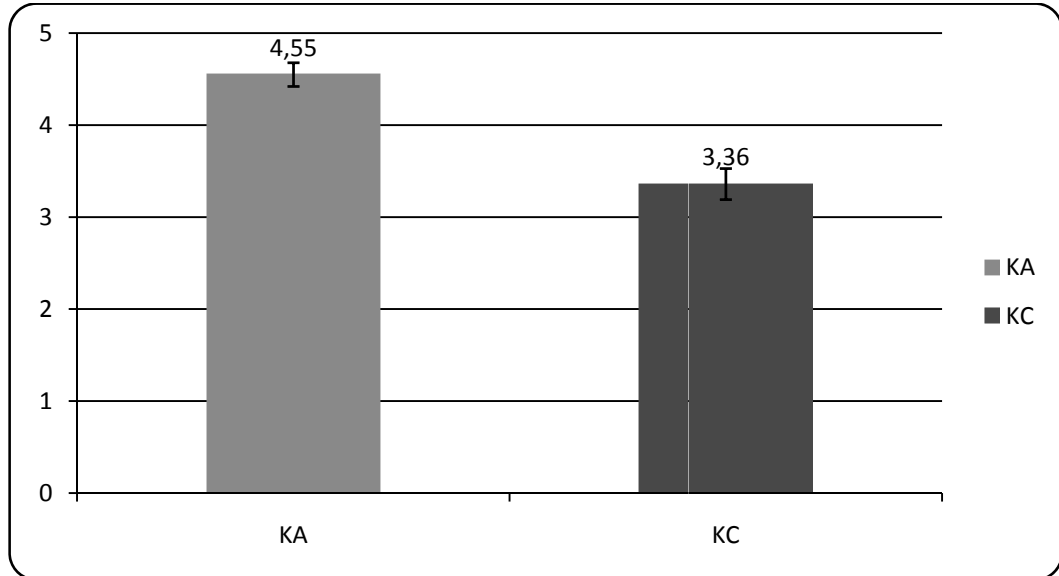
Şekil 4.8b. KA ve KC örneklerinin koku özellikleriyle ilgili duyuusal değerlendirme sonuçları

KA ve KC Kefir örneklerinde tat özellikleriyle ilgili kriterlerin değerlendirilmesi Şekil 4.8c.'de sunulmuştur. Ferahlatıcı tat, hoş giden fermente tat, hoş giden hafif geniz yakıcı-keskin tat, hoş giden çok hafif tatlımsı tat puanları arasındaki farklılıklar önemli ($P < 0,05$) ancak hissedilebilir yoğunlukta kendine özgü tat, hoş giden hafif ekşimsi tat, yabancı-kötü olmayan tat puanları arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur ($P > 0,05$). Sonuçlar uygulamanın ferahlatıcı tat üzerinde pozitif etkisi olduğunu göstermekte ayrıca, hoş giden çok hafif tatlımsı tat ve hafif geniz yakıcı-keskin tadın olumlu yönde bir farklılık gösterdiği belirtilmiştir. KA Kefir örneğindeki bu olumlu etki asetik asit bakterilerinin metabolik ürünlerinden özellikle asetik asitten kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.8c. KA ve KC örneklerinin tat özellikleriyle ilgili duysal değerlendirme sonuçları

Duyusal analiz sonuçları, AAB uygulamasının Kefir örneğinin duysal özelliği bakımından olumsuz etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.9. KA ve KC örneklerinin hedonik test değerlendirme sonuçları

Hedonik test sonuçlarına göre KA ve KC örnekleri arasında KA örneği bakımından olumlu bir fark vardır ($P<0,05$). Tüketicilerin beğenisinin olumlu olduğu tespit edilmiştir. Uygulamanın Kefir tüketim yelpazesini genişleteceği düşünölmektedir.

5. SONUÇ

Bilim dünyasında geleneksel fermente bir süt ürünü olan Kefire ilgi her geçen gün artmaktadır. Bilimsel araştırmaların eğilimi ve yapılan çalışmaların sonuçları günümüzde sağlık konusunda bilinçlenen tüketicilerin tercihlerini olumlu yönde etkilemektedir. Kefir'e olan ilginin başlıca sebebi Kefir'in doğal ve etkin terapötik özelliklere sahip bir ürün olması ve bunun son zamanlarda daha iyi anlatılmasından kaynaklanmaktadır.

Beslenmede düzenli olarak tüketilen Kefirin sağlık üzerine olumlu etki gösterdiği birçok bilimsel çalışma ile desteklenmektedir. Yapılan çalışmalar, Kefir'in sindirim sistemi, bağışıklık sistemi, laktoz intolerans ve kolesterol üzerine olumlu etkileri olduğunu; anti-mutajen, anti-kanserojen, anti-tümör özellik gösterdiğini belirtmektedir. Kefir'in bu terapötik etkisi üretiminde kullanılan süt, dane mikroflorasında bulunan probiyotik mikroorganizma içeriği ve bunların ürettikleri metabolik ürünlerle ilişkilendirilmektedir.

Kefir üretimi, üretiminde kullanılan dane mikroflorasının sinerjik interaksiyonuna dayanmaktadır. Kefir danesinde bulunan mikroflora içeriğinin ve/veya oranlarının farklı olması ürünün tat, aroma, tekstür gibi özelliklerinde bazı farklılıklar göstermektedir. Ayrıca probiyotik mikroorganizmaları mikroflorasında bulundurması Kefirinin fonksiyonel özelliği açısından önemli olmaktadır.

Uluslararası çalışmalarda Kefir danelerinde asetik asit bakterilerinin doğal olarak bulunduğu nadiren tespit edilmiştir. Ülkemizde ise bugüne kadar Kefirin dane mikroflorası ile ilgili yapılan çalışmalarda, asetik asit bakterilerinin Kefir danesinde bulunmadığı belirtilmiştir. Bu tez, farklı bir mikroorganizma grubunun dane içerisinde geliştirilmesi amacıyla uluslararası yapılan ilk çalışmadır. Dane yapısının farklı mikroorganizmalar için taşıyıcı olabileceği düşünölmektedir.

Çalışmada ölkemize ait kefir danelerinde bulunmayan ve son yıllarda önemi artan asetik asit bakterilerinin dane mikroflorasına adaptasyonu amaçlanmıştır. AAB'in fermantasyondaki etkinliği ve sağlık üzerine etkileri çeşitli araştırmalarla desteklenmektedir. Bu çalışma ile *Gluconacetobacter* türlerinin dane

mikroflorasındaki laktik asit bakterileri ve maya içeriğini olumsuz etkilemeksizin dane mikroflorasına yerleştirilmesi başarılıdır.

Yapılan analizler sonucunda asetik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimine katkısı, biyokütle artışını pozitif yönde etkilemesi ve danenin doğal mikroflorasında olumsuz bir değişikliğe neden olmaması önemli sonuçlar olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca asetik asit bakterileri içerikli Kefir danelerinden üretilen Kefir örneklerinin duyuşal özelliklerinin kontrol Kefir örneklerinden görünüş-tekstür, koku ve tat bakımından daha çok beğenilmesi Kefirin tüketim yelpazesini pozitif yönde etkileyecektir.

6. KAYNAKLAR

- Amatayakul, T., Sherkat, F., Shah, P.N., 2006. Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. *International Journal of Dairy Technology*, 59 (3), 216 – 221.
- Anonymous, 1998. Kefir's History, Kefir's Production, Kefir's Health Benefits. *Functional Foods Magazine's article about Lifeway Foods* (www.kefir.com).
- Assadi, M.M., Pourahmad, R., Moazami, N., 2000. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 541-543.
- Babina, N. A. and Rozhokova, I. V., 1973. Quantitative composition of kefir grains and kefir microflora at different of the year. *Molochnaya promyshlennost*, 2, 15-17.
- Bekar, O., Yılmaz, Y., Gulten, M., 2011. Kefir Improves the Efficacy and Tolerability of Triple Therapy in Eradicating *Helicobacter pylori*. *journal of medicinal food* 14 (4), 344-347.
- Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I., Simov, Z.I., Dimitrov, Z.P., 2003. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, 13, 529-535.
- Beshkova, D.M., Simova, E.D., Simov, Z.I., Frengova, G.I., Spasov, Z.N., 2002. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, 19, 537-544.
- Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P.G., Dallavalle, P. and Parisi, M.G. 1994. Kefir microbiologia, chimica, e tecnologia. *L'industria Latte* 30, 41-62.
- Bozkurt, P., Taş, T.K., Seydim, Z.G., 2010. Geleneksel Ve Ticari Olarak Üretilen Kefirlerin Mikrobiyal İçeriklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta.
- Brown, A.J. 1886. An acetic ferment which forms cellulose. *J.Chem. Soc.*, 49,432-439.
- Budak, H. N., 2010a. Elma ve Üzümünden Üretilen Sirkelerin fonksiyonel Özellikleri Üzerine Araştırma. Süleyman Demirel Üniversitesi, Doktora Tezi, 165s, Isparta.
- Budak, H.N., Guzel-Seydim, Z.B., 2010b. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2021-2026.
- Budak,N.H., Doguc, D.K., Savas, C.M., Seydim, A.C., Kok Tas, T., Ciris, M.I., Guzel-Seydim, Z.B., 2011. Effects of apple cider vinegars produced with

- different techniques on blood lipids in high-cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6638-6644.
- Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S., 2003. Enhanced kefir production of *Lactobacillus kefiranofaciens* by mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Biotechnology*, 100, 43-53.
- Chen, H.C., Wang, S.Y., Chen, M.J., 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25, 492-501.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J. 2002. Reexamination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1551-1558.
- Collar, C., 1996. Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking application's. *Food Science and Technology International*, 2, 349–367.
- Costa, A.O., Thomaz-Soccol, V., Paulino, R.C., de Castro, A.E., 2009. Effect of vinegar on the viability of *Giardia duodenalis* cysts. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 510-512.
- Czaja, W. K., Young, D.J., Kawecki M., Brown R.M. Jr., 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8, 1–12.
- Çevikbaş, A., Yemni, E., Ezzedenn, F. W., Yardımcı, T., Çevikbaş, U., Stohs, S. J., 2006. Antitumoral antibacterial and antifungal activities of Kefir and Kefir garin. *Physiother. Res.*, 8, 78-82.
- Çevikbaş, A., Yemni, E., Ezzedenn, F.W. ve Yardimici, T., 1994. Antitumoural Antibacterial and Antifungal Activities of Kefir and Kefir Grain. *Phytotherapy Research*, 8, 78-82.
- De Ory, I., Romeo, L. E., Cantero, D., 2002. Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52, 31-37.
- De Vero, L., and Giudici, P. 2008. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16SrDNA PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 96-101.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., Cleenwerck, I., 2008. Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int J Food Microbiol* 125, 79–90.

- Delfederico, L., Hollmann, A., Martinez, M., Iglesias, N.G., Antoni, G.D., Semorile, L., 2006. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 73, 20-27.
- Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G. E., Engelben, K., Janssens, D., Marzotto, M., 2005. Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *International Journal Systematic and Evolutionary microbiology*. 55, 2365-2370.
- Dinç, A., 2008. Kefirin Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara üniversitesi, Ankara.
- Draelos M.D., Zoe D., Self-Tanning Lotions: Are they a healthy way to achieve a tan. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2002. 3, 317–318.
- Duboc, P., Mollet, B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759-768.
- Dutta, D., Gachhui, R., 2007. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 353-357.
- Ershidat, O.T.M., Mazahreh, A.S., 2009. Probiotics Bacteria in Fermented Dairy Products. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(7), 1107-1113.
- Ertekin, B., Guzel Seydim, Z.B., 2010. Effect of fat replacers on kefir quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 543-548.
- Farnworth, E.R., 2005. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1-17.
- Farnworth, E.R., 2006. Kefir – A Complex Probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1).
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., Ruiz-Larrea, F., 2010. Rapid molecular methods for enumeration and taxonomical identification of acetic acid bacteria responsible for submerged vinegar production. *European Food Research and technology*, 231, 813-819.
- Fesq H., Brockow K., Storm, Mempel M., Ring J., Abeck D., 2001. Dihydroxyacetone in a new formulation – a powerful therapeutic option in vitiligo. *Dermatol.*, 203, 241–243.
- Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M., Simov, Z.I., 2002. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. *Z. Naturforsch*, 57, 805-810.

- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Crystales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E., et al. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1305-1314.
- Fujisawa, T., Adachi, S., Toba, T., Arihara, K., Mitsuoka, T., 1988. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 12- 14.
- Fukami, H., Kobayashi, S., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T., Waki, H., Iwamoto, M., Tanaka, Y., 2010a. Effect Continuous Ingestion of Acetic Acid Bacteria on Memory Retention and the Synaptic Function in Aged Rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74 (7), 1498-1500.
- Fukami, H., Kobayashi, S., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T., Waki, H., Iwamoto, M., Tanaka, Y., 2010. Effect of continuous ingestion of acetic acid bacteria on memory retention and the synaptic function in aged rats. *Biosci biotechnol. Biochem*, 74 (7), 1498-1500.
- Fukami, H., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T., Tanaka, Y., 2010b. Acetic Acid Bacterial Lipids Improve Cognitive Function in Dementia Model Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4084–4089
- Furukawa, N., Matsuoka, A., Takahashi, T., Yamanaka, Y., 1991. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival day in mice bearing Meth-A. *Animal Science Technology (Japan)*, 62, 579-585.
- Furukawa, N., Matsuoka, A., Yamanaka, Y. 1990. Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 43, 450–453.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G. ve De Antoni, G.L., 1997. Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 30, 77-84.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni G.L., 2001. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68, 639-652.
- German, J.B., C.J. Dillard and R.L. Walzem. 2001. U.S. Whey Products and Dairy Ingredients for Health: A Review. U.S. Dairy Export Council.
- Gorsek, A., Tramsek, M., 2007. Quantitative examination of process parameters during kefir grain biomass production. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 5, 8.
- Gorski, D. 1994. Kefir: 21st century yogurt? *Dairy Foods* 95:49.

- Gönülateş, N., 2008. Kefirin insanlar üzerindeki immünomodülatör etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 55s.
- Green S.R., Whalen E.A., Molokie E., 2004. Dihydroxyacetone: Production and uses. *J. Biochem. Microbiol. Technol.*, 3, 351-355.
- Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., 2006. *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2609-2616.
- Grishina, A., Kulikova, I., Alieva, L., Dodsonb, A., Rowlandb, I., Jin, J., 2010. Antigenotoxic Effect of Kefir and Ayran Supernatants on Fecal Water-Induced DNA Damage in Human Colon Cells. *Nutrition and Cancer*, 63:1, 73-79.
- Gronnevik, H., Falstad, M., Narvhus, J.A., 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, doi:10.1016/j.idairyj.001, 1-6.
- Guillamon, M. J., Mas, A., 2011. *Molecular Wine Microbiology*. In: *Acetic acid bacteria* (Carrascosa, V. A., Munoz, R., Gonzalez-Garcia, R., -eds) Academic pres in an imprint of Elsevier london.
- Gullo, M., Giudici, P., 2008. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.11, 076.
- Güven, A., Güven, A., Kamiloğlu, N.N., 2004. Kefirin Lipid Peroksidasyonuna Etkilerinin Araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 10(2), 165-169.
- Güzel Seydim, Z.B., 2001. Studies on fermentative, microbiological and biochemical properties of kefir and kefir grains. Ph. D. Dissertation, Clemson University, Clemson, SC.
- Güzel Seydim, Z.B., Seydim, A.C., Greene, A.K., Bodine, A.B., 2000b. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 13, 35-43.
- Güzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T. Greene, A.K. 2010a. Review: Functional properties of kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Güzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T. Greene A.K. 2010b. Kefir and koumiss: Microbiology and Technology. In: "Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products". 143-164. ISBN 978-1-4200-8207-4.
- Güzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T., Ertekin-Filiz, B., Seydim, A. C., 2011. effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *J. Dairy Sci.* 94, 1239–1242.

- Güzel-Seydim, Z., Seydim, A.C., Greene, A.K., 2000a. Organic Acids and Volatile Flavor Components Evolved During Refrigerated Storage of Kefir. *Journal of Dairy Science*, 83, 275-277.
- Güzel-Seydim, Z., Wyffels, J.T., Seydim, A.C., Greene, A.K., 2005. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 25-29.
- Güzel-Seydim, Z.B., Seydim, A.C., Greene, A.K., 2003. Amino acid profile of kefir. *Milchwissenschaft*, 58 (3), 158-160.
- Güzel-Seydim, Z.B., Seydim, A.C., Grenee, A.K., Tas, T., 2006. Determination of antimutagenic properties of some fermented milks including changes in the total fatty acid profiles including CLA. *Internatinal Journal of Dairy Technology*, 59 (3), 209-215.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., et al. 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 79-87.
- Heler, H.J., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr*, 73, 374-379.
- Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* 103, 582-587.
- Hong, W.S., Chen, H.C., Chen, Y.P., Chen, M.J., 2009. Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. *International Dairy Journal*, 19, 244-251.
- Hong, W.S., Chen, Y.P., Chen, M.J., 2010. The Antiallergic Effect of Kefir Lactobacilli. *Journal of Food Science*, 75(8), H244-253.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas, A. 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 245-249.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 490-495.
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., Ibanez, F.C., 2005. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90, 613-620.

- Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D., 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26, 770-775.
- Johnston, C. S., 2006. Medicinal uses of vinegar. *Med Gen Med*. May 30, 8:2,61.
- Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S., Fudou, R. 2004. *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2263-2267.
- Kandler, O. and Kunath, P. 1983. *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *Systematic and Applied Microbiology* 4: 286-294.
- Kappeng, K., Pathom-aree, W., 2009. Isolation of acetic acid bacteria from honey. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 3 (1), 71-76.
- Karademir, G., Ünal, Y., 2009. Broilerde Kefirin Probiyotik Amaçla Kullanılması. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 49(1), 47-54.
- Karagözlü, C., Bayarer, M., 2004. Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri Ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(2), 197-207.
- Kaya, A., 2007. *Acetobacter xylinum*'un suşlarında selüloz üretimi ile yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 34s, Ankara.
- Kenne L., and Lindberg B., in Aspinall G.O., ed., 1983 pp. *The Polysaccharides*, vol. 2, Academic Press, New York, 287-363.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J., 2006. The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. *The Prokaryotes*, Vol. 4, 3rd edn (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E, eds), pp. 163–200. Springer-Verlag, New York, NY.
- Kınık, Ö., Akalın, A.S., Gönç, S., 1998. Kefirin üretimi ve depolanması sırasında organik asitlerin değişimi üzerine bir araştırma. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. 21-22 Mayıs, Tekirdağ.
- Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., 2010. *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α - Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 81-87.
- Kooiman, P. 1968. The chemical structure of kefiran, the watersoluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research* 7, 200-211.

- Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I. and Stockar, U. 2003. Influence of Nutritional Factors on the Nature, Yield and Composition of Exopoly sacchradides Produced by *Gluconacteobacter xylinus* I-2281. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 2003, p. 6091-6098.
- Koroleva, N.S. 1982. Special products (kefir, koumyss, etc.). *Proceedings XXI International Dairy Congress, Moscow 2*, 146-151.
- Koroleva, N.S. 1988a. Technology of kefir and kumys. *Bulletin of the International Dairy Federation* 227, 96-100.
- Koroleva, N.S. 1988b. Starters for fermented milks, section 4: kefir and kumys starters. *Bulletin of the International Dairy Federation* 227, 3540.
- Koroleva, N.S. 1991. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K., editor. *Therapeutic properties of fermented milks: 159-179*. Elsevier Applied Sciences Publishers, London, UK.
- Kosikowski, F.V., Mistry, V.V., 1997. *Cheese and fermented milk foods*. F.V. Kosikowski LLC, Wesport, Connecticut, USA.
- Koutinas, A.A., Kopsahelis, N., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Katechaki, E., Kallis, M., Sideris, K., Bekatorou, A., 2009. Scale-up of Dried Kefir Production from Liquid Dairy Waste, Whey, for Use as Starter in Cheese Manufacturing. *Proceedings of the 11th International Conference on Enviromental Science and Technology, Chania, Crete, Greece, 3-5 September*, 506-513.
- Kök-Taş, T., 2010. *Kontrollü Atmosfer Uygulamasının Kefir Danesi ve Kefir Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi*. Doktora Tezi, Isparta. 122s.
- Kök-Taş, T., Ekinci, F.Y., Güzel-Seydim, Z.B., 2011. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 1-6.
- Kroger M. 1993. Kefir. *Cult Dairy Prod J* 28, 26– 29.
- Kuo, C.Y., Lin, C.W., 1999. Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54, 19-23.
- Kwon, O.K., Ahn, K.S., Lee, M.Y., Kim, S.Y., Park, B.Y., Kim, M.K., Lee, I.Y., Oh, S.R., Lee, H.K., 2008. Inhibitory Effect of Kefiran on Ovalbumin-induced Lung Inflammation in a Murine Model of Asthma. *Arch Pharm Res*, 31(12), 1590-1596.
- La Rivie´re, J.W.M., Kooiman, P., Schmidt, K., 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archiv fur Mikrobiologie*, 59, 269-278.

- Lankaputhra, W.E.V, Shah, N.P., 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutation Research*, 397, 169-182.
- Latorre-Garcia, L., Del Castillo-Agudo, L., Polaina, J., 2007. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes, *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23, 785.
- Lawless, H.T., Heymann, H., 1999. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. Chapman & Hall, New York.
- Libudzisz, Z., Piatkiewicz, A., 1990. Kefir Production in Poland. *Dairy Industries International*, 55(7), 31-34.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2002. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov. and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *Journal of Genetics Applicative and Microbiology*, 47, 119–131.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R. R., Uchimura, T., Komagata, K., 2006. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* 56:2101–2111.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2003. Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiol Cult Coll* 19, 91–98.
- Liu, j. R., Chen, M. J., Lin, C. W., 2005. Antimutagenic and antioksidant properties of milk- kefir. *J. Agric Food Chem.* 53, 2467-74.
- Liut Kevicius A, Sarkinas A., 2004. Studies on the growth conditions and composition of Kefir grains-as a food and forage biomass. *Dairy Sci Abstr* 66, 903.
- Loganathan, P. and Nair, S. 2004. *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1185-1190.
- Loretan, T., Mostert, J. F., Viljeon B. C., 2003. Microbial flora associated with South African household kefir. *S Afr J Sci* 99, 92–94.
- Madhaiyana, M., Saravananb, V. S., Jovic, D. B. S. S., Leea, H., Thenmozhid, R., Harie, K., 2004. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats. *India Microbiological Research*, 159, 233-243.

- Maeda H, Zhu X, Suzuki S., 2004. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). *J Agric Food Chem.*, 52, 5533-8.
- Magalhães, K.T., Dragone, G., de Melo Pereira, G.V., Oliveira, J.M., Domingues, L., Teixeira, J.A., Almeida e Silva, J.B., Schwan, R.F., 2011. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*, 126, 249-253.
- Magalhães, K.T., Pereira, G.V.D.M., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2010a. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1241-1250.
- Magalhaes, K.T., Pereira, M.A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J.A., Silva, J.B.D.A., Schwan, R.F., 2010b. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, 101, 8843-8850.
- Marquina, D., Santos, A., Corpas, I., Munoz, J., Zazo, J., Peinado, J.M., 2002. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 136-140.
- Mason, L. M., and Claus, W. 1989. Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 174-184.
- Medrano, M., Hamet, M.F., Abraham, A.G., Perez, P.F., 2009. Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 505-513.
- Micheli, L., Ucelletti, D., Palleschi, C., Ceresenzi, V., 1999. Isolation and characterisation of a ropy lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied microbiology and Biotechnology*, 53, 69-74.
- Miguel, M.G.D.C.P, Cardoso, P.G., Lago, L.D.A., Schwan, R.F., 2010. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, 43, 1523-1528.
- Mitsue, T., Tachibana, K., Fujio, J., 1999. Efficient kefiran production by a mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 and yeast strains. *Seibutsu-Kogaku Kaishi*. 76, 93-103.
- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T. and Adachi, S. 1988. Structural microheterogeneity of kefiran from kefir grains. *Japanese Journal of Zootechnology* 59, 167-176.

- Munoz-Rojas, J. and Caballero-Mellado, J., 2003. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microb Ecol*, 46:454–464 DOI: 10.1007/s00248-003-0110-3
- Nayir, S.M., 2008. Sütün Yoğurda Dönüşümü Sırasında İçerdiği Fenolik Antioksidan Maddelere Probiyotik Bakteri Etkisinin İncelenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 67s.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L. B., Owusu, M., Andersson, M., Holzapfel, W. H., 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 168–186.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M., 2005. Antioksidant capacity of vegetables spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal Nutrition*, 93 (2), 257-266.
- Nishikawa, Y., Takata, Y., Nagai, Y., Mori, T., Kawada, T., Ishihara, N., 2001. Antihypertensive effects of korusu extract, a traditional vinegar produced from unpolished rice, in the SHR rats. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* (in Japanese), 48, 73-75.
- Oda, T., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T., Ichihashi, M., 2010. Effect of Oral Intake of Ceramide-Containing Acetic Acid Bacteria on Skin Barrier Function. *Anti-Aging Medicine*, 7 (5), 50-54.
- Otles, S., Cagindi, O., 2003. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54-59.
- Ottogalli, G., Galli, A., Resmini, P., Volonterio, G., 1973. Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei ganuli di kefir. *Annali di Microbiologia*, 23, 109-121.
- Öresin, Z.A., 2008. Sepsis Oluşturulmuş Ratlarda Kefirin Etkinliği. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 44 s, Edirne.
- Özdestan, Ö., Üren, A., 2010. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. *European Food Research and Technology*, 231, 101-107.
- Özer, B.H., Uzun, Y.S., Kırmacı, H.A., 2008. Effect of cell immobilization on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 in Kasar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 61 (3), 237-244.
- Papalexandratou, Z., Cleenwerck, I., De Vos, P., De Vuyst, L., 2009. (GTG)5-PCR reference framework for acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 301, 44-49.

- Papavasiliou, G., Kourkoutas, Y., Rapti, A., Sipsas, V., Soupioni, M., Koutinas, A.A., 2008. Production of freeze-dried kefir culture using whey. *International Dairy Journal*, 18, 247-254.
- Park, J.K., Jung, J.Y., Park, Y.H., 2003. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters*, 25, 2055–2059.
- Piermaria, J. A., De La Canal, M. L., Abraham, A. G., 2008. Gelling properties of Kefiran, a food grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloid* 22, 1520–1527
- Piermaria, J.A., Pinotti, A., Garcia, M.A., Abraham, A.G., 2009. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23, 684-690.
- Pintado, M.E., Lopes Da Silva, J.A., Fernandes, P.B., Malcata, F.X., Hogg, T.A., 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 15-26.
- Poyrazoğlu Çoban, E., 2007. Yüzey kültür fermantasyon yöntemi ile bazı asetik asit bakterilerinden ekstraselular polisakkarit üretimi. Adnan Menderes Üniversitesi, Doktora Tezi, 207s, Aydın.
- Poyrazoğlu Çoban, E., Bıyık, H.H., 2008. Asetik asit bakterilerinden elde edilen alternatif selüloz. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6 (2), 19-26.
- Quiros, A., Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I., 2005. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *Journal Dairy Science*, 88, 3480-3487.
- Raja, A., Gajalakshmi, P., Mohamed Mahroop Raja, M., Muhamed İmran, M., 2009. Effect of *Lactobacillus lactis cremoris* Isolated from Kefir against Food Spoilage Bacteria. *American Journal of Food Technology*, ISSN 1557-4571.
- Ramchandran, L., Shah, N.P., 2009. Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 92, 895–906.
- Ramesh H. P. and Tharanathan R. N., 2003. Carbohydrates the Renewable Raw Materials of HighBiotechnological Value, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23, 149-173,10.
- Rea, M.C., Lennartsson, T., Dillon, P., Drinan, F.D., Reville, W.J., Heapes, M., Cogan, T.M., 1996. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 83-94.

- Reddy, R.N., Armstrong, D.J., Rhodehamel, E.J., Kautter, D.A., 1992. Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: A review. *Journal of Food Safety*, 12 (2), 87-118.
- Ricelli A., Baruzzi F., Solfrizzo M., Morea M., Fanizzi F.P., Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007. 73, 785–792.
- Rimada, P.S., Abraham, A.G., 2003. Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Lait*, 83, 79–87.
- Rimada, P.S.R., Abraham, A.G., 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68, 653-661.
- Rosi, J., Rossi, J., 1978. I Microrganismi del kefir: I fermenti lattici. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 29, 291-305.
- Rowland, I.R., Rumney, C.J., Countts, J.T. ve Lievens, L.C. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin a gut bacterial metabolism and carcinogeninduced aberrant crypt foci in rats. *Human Colonic Bacteria* CRC Pres, Boca Raton, 281-285
- Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, T.H., Wiedemann, G., Oehlbauer, M., 2009. The antimicrobial effect of acetic acid—An alternative to common local antiseptics? *Burns*, 35, 695-700.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J.M., Marquina, D., 2003. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 434-437.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*, 83, 894–907.
- Shiomi, M., Sasaki K., Murofushi, M., Aibara, K., 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Japan Journal Medicine Science Biology*, 35 (2), 75-80.
- Sievers, M. and Swings, J., 2005. Family Acetobacteraceae. *Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 2nd edn (Garrity GM, ed), pp. 41–95. Springer, New York, NY.
- Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M. 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 386-392.

- Silva, K.R., Rodrigues, S.A., Filho, L.X., Lima, A.S., 2009. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 152, 316-325.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z., 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 1-6.
- Sirirat, D., Jelena, P., 2010. Bacterial Inhibition and Antioxidant Activity of Kefir Produced from Thai Jasmine Rice Milk. *Biotechnology*, 9(3), 332-337.
- Soomro, A.H., Masud, J. ve Anwaar, K. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1), 20–24.
- SPSS, 2006. *Statistics Student Version 15.0*. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Stasiak, L., Błażej, S., 2009. Acetic acid bacteria-perspectives of application in biotechnology. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59 (1), 17-23.
- Stepaniak, L., Fetlinski, A., 2002. Fermented Milks/Kefir. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier Science Ltd., 1049.
- Sugiyama, K., Sakakibara, R., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T., Tabata, I., 2010. Effects of Acetic acid Bacteria Supplementation on Muscle Damage After Moderate-Intensity Exercise. *Anti-Aging Medicine*, 7(1), 1-6
- Sutherland I. W., 1998. Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides, *Tibtech.*, 38, 41-47.
- Şatır, G., 2011. Kefir fermantasyonunun keçi sütünün bazı fonksiyonel özelliklerine etkisinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Isparta. 182s.
- Şengün, İ.Y., Karabıyıklı, Ş., 2011. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22, 647-657.
- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y., Nakase, T., 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains E Simova et al 5 sp. nov., two new species from kefir grains. *Int J Syst Bacteriol* 44, 435– 439.
- Tamai, Y., Yoshimitsu, N., Watanabe, Y., Kuwabara, Y., Nagai, S. 1996. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 181–182.
- Taşkın, N., 2007. Ankara İlinde Tüketime Sunulan Sokak Sütlerinde ve Beyaz Peynirlerde *Brucella* Varlığının Elisa Yöntemiyle Araştırılması ve *Brucella* Bakterisinin Kefirde Yaşam Süresinin Tayini. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 74 s, Ankara.

- Terzi, G., 2007. Kefir Bileşimi ve Beslenme Açısından Önemi. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 78(1), 23-30.
- Toba, T., Arihara, K. and Adachi, S. 1990. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. International Journal of Food Microbiology, 10, 219-224.
- Tratnik, L., Rajka, B., Herceg, Z., Draglic, I., 2006. The quality of plain ve supplemented kefir from goat's ve cow's milk. International Journal of Dairy Technology, 59.
- Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. Systematic and Applied Microbiology, 28, 735-745.
- Trcek, J., Raspor, P., 1999. Molecular identification of Acetobacter isolated from spirit vinegar. Food Technol. and Biotechnology 37:2, 113-116.
- Trcek, J., Toyama, H., Czuba, J., Misiewicz, A., Matsushita, K., 2006. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol, 70, 366-373.
- Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., Komagata, K. 1989. Acidomonas gen.nov., incorporating Acetobacter methanolicus as Acidomonas methanolicacomb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 39, 50-55.
- Van Geel-Schutten, G.H., Faber, E.J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M.R., Ten Brink, B., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F., Dijkhuizen, L., 1999. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. Applied Environmental Microbiology, 65, 3008-3014.
- Vegas, C., Mateo, E., González, A., Jara, C., Guillamón, J.M., Poblet, M., Torija, M.J., Mas, A., 2010. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production, International Journal of Food Microbiology, 138, 130-136.
- Vinderola G, Perdigo'n G, Duarte J, Farnworth E, Matar C., 2006. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. Cytokine 36, 254–260.
- Wang, Y., Ahmeda, Z., Fenga, W., Lia, C., Songa, S., 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. International Journal of Biological Macromolecules, 43, 283.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., Bai, X., 2010. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. Carbohydrate Polymers, 82, 895-903.

- Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B., Bai, X., 2009. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 341-347.
- Witthuhn, R.C., Schoeman, T., Britz, T.J., 2004. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 33-37.
- Witthuhn, R.C., Schoeman, T., Britz, T.J., 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15, 383-389.
- Wojtowski J., Dankow R., Skrzyper R., Fahr R.D., 2003. The fatty acid profile in from sheep, goat and cow milk. *Milchwissenschaft* 58(11/12), 633–636.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 12, 91-109.
- Wroblewska, B., Kolakowski, P., Pawlikowska, K., Troszynska, A., Kaliszewska, A., 2009. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. *Food Hydrocolloids*, 23, 2434-2445.
- Yakushi, T., Matsushita, K., 2010. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 1257-1265.
- Yamada Y., Hoshino K. and Ishikawa T. 1997 . The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA, *Shizuoka Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, 47, 37-44.
- Yamada, Y., 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2225– 2227.
- Yamada, Y., and Akita, M. 1984. An electrophoretic comparison of enzymes in strains of *Gluconobacter* species. *Journal of General and Applied Microbiology*, 30, 115e126.
- Yamada, Y., and Yukphan, P. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 15-24.
- Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T., 2010. Symbiosis between Microorganisms from Kombucha and Kefir: Potential Significance to the Enhancement of Kombucha Function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 446-455.

- Yaygın, H., 1996. Kefir ve Özellikleri, III. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. İstanbul, MPM, Yayın No: 548, 246-252.
- Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T., Adachi, S., 1991. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 257-264.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., 2009. *Ameyamaea* *chiangmaiensis* gen. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 73, 2156-2162.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., 2008. *Tanticharoenia* *sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 72, 672-676.
- Yukphan, P., Malimas, T., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., 2010. *Gluconobacter* *wancherniae* sp. nov., an acetic acid bacterium from Thai isolates in the α -Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 67-73.
- Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., Yamada, Y. 2005. *Neoasaia* *chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 301-311.
- Yücel, O., 2000. *Helicobacter pylori* infeksiyonlarının tedavisinde antibiyoterapi. *Ankem derg.* 14 (no:4) 448-453.
- Yüksekdağ, Z.N., Beyatli, Y., Aslim, B., 2004. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 663-667.
- Zacconi, C., Parisi, M. G., Sarra, P. G., Dalvalle, P., Botazzi, V. 1995. Competitive exclusion of *Salmonella* kedougou in kefir fed chicks. *Microbiology Aliment-Nutrition*, 12, 387-390.
- Zajsek, K., Gorsek, A., 2010. Mathematical modelling of ethanol production by mixed kefir grains yeast population as a function of temperature variations. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 7-12.
- Zhoua, J., Liua, X., Jiangb, H., Don, M., 2009. Analysis of the microflora in tibetan Kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26 (8), 770-775.
- Zisu, B., Shah, N.P., 2003. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of

exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. Journal Dairy Science, 86, 3405–3415.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R., Boccio, J., 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. Nutr. Res., 21:569-579.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nilgün ÖZDEMİR

Doğum Yeri ve Yılı: ANTALYA,1985

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: (1999-2002) Antalya Lisesi, Antalya

Lisans: (2004-2009) Süleyman Demirel Üniversitesi, Müh. Mimarlık Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

1. Özdemir, N., Kök-Taş, T., Güzel-Seydim, Z., 2009. Güllü Yoğurt Üretimini Geliştirilmesi ve Bazı Niteliklerinin Belirlenmesi. Gıda Teknolojisi.13(8):60-62.
2. Özdemir, N., Kök-Taş, T., Güzel-Seydim, Z. B., 2011. Süt Kaynaklı Gıda Zehirlenmeleri ve Zehirlenmelerin Takibinin Önemi. 7. Gıda Mühendisliği Kongresi, 23-25 Kasım 2011, Ankara. Bildiri Kitabı, s:204