

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KEFİRDEN İZOLE EDİLEN MAYA VE BAKTERİLERİN PROTEOLİTİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE PROTEOLİTİK AKTİVİTENİN
KONTROLÜ**

Esin ORHAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2014

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Esin ORHAN tarafından hazırlanan “**Kefirden İzole Edilen Maya ve Bakterilerin Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Proteolitik Aktivitenin Kontrolü**” adlı tez çalışması 15/07/14 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Kamuran AYHAN
Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Kamuran AYHAN
Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ertan ANLI
Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Eda KÖKSAL
Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik
Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

16/07/14

Esin ORHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEFİRDEN İZOLE EDİLEN MAYA VE BAKTERİLERİN PROTEOLİTİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE PROTEOLİTİK AKTİVİTENİN KONTROLÜ

Esin ORHAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Bu çalışma kapsamında, 8 adet piyasadan sağlanan ve 2 adet de ev yapımı olmak üzere toplam 10 adet kefir örneğinden 82 adet suş izole edilmiştir. İzolatların proteolitik aktivite (PA) değerleri Hull (1947) yöntemine göre belirlenmiştir. Sırasıyla maksimum ve minimum PA değerine sahip M24, M19; P23, P32; Y1, Y25 kodlu suşlar ile uygun kombinasyonlar oluşturulmuştur. 1. (M24+P23+Y1), 2. (M19+P23+Y1), 3. (P23+M19+Y25) ve 4. (P32+M24+Y1) kombinasyon, laktik asit bakterisi olduğu düşünülen suşlar arasındaki PA değerinin kıyaslanması amacı ile, 5. ve 6. kombinasyon (Y1+M19+P32; Y25+M24+P23) ise maya olduğu düşünülen suşların PA değerlerinin karşılaştırılması amacı ile seçilmiştir.

Kombinasyonlara ait PA değerleri belirlenmiş, 1. kombinasyonun PA değeri 67,4; 2. kombinasyonun PA değeri 65,6; 3. kombinasyonun PA değeri 84,3; 4. kombinasyonun PA değeri 56,1; 5. kombinasyonun PA değeri 81,7; 6. kombinasyonun PA değeri ise 62,2 µg tirozin/mL bulunmuştur. Starter kültür olarak kullanılan bu kombinasyonlar ile 6 adet kefir üretilmiş ve ürünlerin pH ve °SH değerleri saptanmıştır. Buna göre 10 adet eğitimli panelistin yaptığı duyu analizi değerlendirilmesi ile üretilen kefirlerin hepsinin tüketilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Kefirden izole edilen laktik asit bakterileri arasından PA değeri en yüksek ve en düşük olan 4 adet suşa biyokimyasal testler uygulanmış, sonuçlar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984)'e göre değerlendirilmiş ve suşlar tanımlanmıştır. Buna göre; M24 ve M19 kodlu suşun *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, P23 kodlu suşun *Lactococcus* subsp. *lactis* ve P32 kodlu suşun *Leuconostoc* olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, tez çalışmasında izole edilip PA değerine göre seçilen suşların pH ve °SH değerlerinin belirlenmesiyle yapılan duyu analizi, oluşturulan kombinasyonların starter kültür olarak kullanılacakları göstermektedir.

Temmuz 2014, 52 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kefir, Proteolitik aktivite, Laktik Asit Bakterisi, Maya

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF YEAST AND BACTERIA ISOLATED FROM KEFIR AND CONTROL OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY

Esin ORHAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Within this thesis, total 82 strains are isolated from 10 kefir samples that 8 of them are provided from markets and 2 of them are home made. Proteolytic activity (PA) values of isolates are computed according to Hull method (1947). Acceptable combinations are constituted with coded M24, M19; P23, P32; Y1, Y25 respectively have maximum and minimum PA values. 1. (M24+P23+Y1), 2. (M19+P23+Y1), 3. (P23+M19+Y25) and 4. (P32+M24+Y1) combinations are selected to compare PA values of strains which are possible lactic acid bacterias while 5. and 6. combinations (Y1+M19+P32; Y25+M24+P23) are selected to compare PA values of strains that are possible yeasts.

PA values of all combinations are determined thus: 1. combination is 67,4; 2. combination 65,6; 3. combination is 84,3; 4. combination is 56,1; 5. combination is 81,7; 6. combination is 62,2 µg tyrosine/mL. With these combinations, used as starter culture, 6 kefir are fermented and products' pH ve °SH values are obtained. Based on this, all produced kefir are edible for sensory analysis assessment that is applicated by 10 educated panelists.

Biochemical identification tests are applied to 4 strains, possible lactic acid bacterias, isolated from kefir and have maximum and minimum PA values. Results are estimated to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984). Therefore, M24 and M19 are *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, P23 is *Lactococcus* subsp. *lactis* and P32 is identified probably *Leuconostoc* spp.

As a conclusion, our results demonstrate that isolates, selected to PA and also pH, °SH value, sensory analysis assessment, can be used as starter culture.

July 2014, 52 pages

Key Words: Kefir, Proteolytic activity, Lactic Acid Bacterias, Yeasts

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim ve tezim boyunca bana her konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Kamuran AYHAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), fikir, yardım ve önerileri için sevgili hocam Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmamın önemli bir kısmında laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ertan ANLI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), duyu analizi bölümünde deneyimlerinden ve bilgisinden yararlandığım çok değerli hocam Prof. Dr. Kezban CANDOĞAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Kazakistan'dan edindiğim örneklerin temininde, geçmiş dönem Türkiye Cumhuriyeti Astana/Kazakistan Büyükelçiliği Ticaret Müşaviri Sayın Halil ÖZTÜRK ve eşi H. Tuğba ÖZTÜRK'e,

Maddi ve manevi yardımlarından dolayı çok sevgili arkadaşlarım Hilal SELAMOĞLU, Emine ÇARKCIOĞLU ve Naciye KUTLU'ya,

Bu tez çalışması hızlandırılmış proje kapsamında 13H4343004 numaralı proje ile desteklendiği için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bütün hayatım boyunca öncelikle eğitimim olmak üzere diğer her türlü konudaki maddi ve manevi desteğinden dolayı çok sevgili aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Esin ORHAN
Ankara, Temmuz 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1 Kefir.....	3
2.2 Kefirin Özellikleri.....	4
2.2.1 Kefirin duyuşal özellikleri.....	4
2.2.2 Kefirin Kimyasal Özellikleri.....	5
2.3 Fermente Süt Ürünlerinde Mikrobiyolojik Kriterler.....	6
2.4 Kefir Çeşitleri.....	7
2.5 Kefirin Probiyotik Özellikleri.....	8
2.6 Proteolitik Aktivite.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1 Materyal.....	15
3.1.1 İzolasyon Materyali.....	15
3.2 Metot.....	15
3.2.1 Örnek alma.....	15
3.2.2 Örneklerin hazırlanması.....	15
3.2.3 Saflaştırma.....	16
3.2.4 Kültürel sayım.....	16
3.2.5 İzolasyon.....	17
3.2.6 İzolatların Proteolitik aktivite değeriinin belirlenmesi.....	17
3.2.7 Proteolitik aktivite düzeyine göre seçilen izolatların kombinasyonlarının oluşturulması ve bunların proteolitik aktivitelerinin kontrolü.....	18
3.2.8 Üretilen Kefirlerin Duyusal Analizlerinin Yapılması.....	18
3.2.9 Seçilen izolatların tanımlanması.....	20
3.2.9.1 Gram boyama.....	20
3.2.9.2 Katalaz testi.....	20
3.2.9.3 Oksidaz testi.....	20
3.2.9.4 Hareket testi.....	21
3.2.9.5 Glikozdan CO ₂ üretimi.....	21
3.2.9.6 Arjinin hidroliz testi.....	21
3.2.9.7 Voges proskauer testi.....	22
3.2.9.8 Metil red testi.....	22
3.2.9.9 Karbonhidrat (Sakkaroz) fermantasyonu.....	22
3.2.9.10 Farklı sıcaklıklarda gelişme testleri.....	23
3.2.9.11 Farklı pH'larda gelişme testleri.....	23
3.2.9.12 Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testleri.....	23

4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	24
4.1 Bakterilerin İzolasyonu ve Kültürel Sayım.....	24
4.2 İzolatların Proteolitik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi.....	25
4.3 Proteolitik Aktivite Değerlerine göre Seçilen Suşların Uygun Kombinasyonlarının Oluşturulması.....	28
4.4 Kombinasyonların Proteolitik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi.....	30
4.5 Kombine Kültürler ile Kefir Yapılması ve Kefirlerin pH ve °SH Değerlerinin Ölçülmesi	30
4.6 Duyusal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	33
4.7 Seçilen Bazı Suşların Biyokimyasal Tanımlamalarının Yapılması.....	34
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	40
EKLER.....	45
EK 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri.....	46
EK 2 Araştırmada Kullanılan Kimyasallar.....	49
EK 3 Kefir Duyusal Analiz Değerlendirme formu.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	52

KISALTMALAR DİZİNİ

μ g	mikrogram
ABS	absorbans
dk	dakika
g	gram
kg	kilogram
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
mg	miligram
mL	mililitre
MR	Metil red
MRS	de Man Rogosa Sharpe Besiyeri
nm	nanometre
OD	Optik Yoğunluk
PA	Proteolitik aktivite
subsp.	Subspecies (alt tür, çoğul)
sp.	Species (tür, çoğul)
TAMB	Toplam aerobik mezofilik bakteri
TSB	Tryptic Soy Broth
VP	Voges Proskauer

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 650 nm dalga boyunda tirozin standart eğrisi.....	25
Şekil 4.2 Analizlerde kullanılan spektrofotometre (Shimatzu UV-1700 UV-VIS spectrophotometer,Japan).....	26
Şekil 4.3 Kombinasyonların pH değerlerinin belirlenmesi.....	31
Şekil 4.4 Kombinasyonların °SH değerlerinin belirlenmesi.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı sertliklerdeki kefirlerin özellikleri	4
Çizelge 2.2 Dokuz günlük muhafaza esnasında kefirdeki değişimler	5
Çizelge 2.3 Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2009/25) Fermente Süt Ürünlerine Ait Mikrobiyolojik Değerler	7
Çizelge 2.4 Tanımlanan bazı suşlara ait proteolitik aktivite değerleri.....	14
Çizelge 3.1 Duyusal analiz şeması ve puanlama.....	19
Çizelge 4.1 Örneklere ait kültürel sayım sonuçları.....	24
Çizelge 4.2 İzolatlara ait proteolitik aktivite değerleri.....	27
Çizelge 4.3 Suşlara ait PA özellikleri.....	29
Çizelge 4.4 Suşların kombinasyonlarının oluşturulması.....	20
Çizelge 4.5 Kombinasyonlara ait PA değerleri.....	30
Çizelge 4.6 Kombinasyonlardan mayalanan kefiirlere ait pH değerleri.....	31
Çizelge 4.7 Kombinasyonlardan mayalanan kefiirlere ait °SH değerleri.....	32
Çizelge 4.8 Duyusal analiz sonuç ortalamaları.....	34
Çizelge 4.9 Suşlara ait biyokimyasal tanımlama test sonuçları.....	35

1. GİRİŞ

Kefirin ilk olarak Kafkas Dağları'nda bulunduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. Kefirin Kafkasya'da Elburus Dağları eteklerinde yaşayan göçebe halkın serinlemek amacıyla, inek ve keçi sütünü kullanarak ürettikleri düşünülmekte ve yapımının gizli tutulduğu; Rusya'da yayınlanan "Kefyr" kitabının 1984 yılında Moritz Schulz tarafından Almanca'ya çevrilmesi ile Avrupa'da tanındığı açıklanmıştır (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003).

Kefirin gün içinde düzenli olarak tüketilmesinin metabolizmayı düzenleyici etkisi olduğu ve sağlığı olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir. Kefirin kansere karşı koruyucu özelliği dışında çeşitli iç organlar ve kan dolaşımı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu konu hakkındaki araştırmalar günümüzde de devam etmektedir. Kefir tanesinin yapısında *Kluyveromyces fragilis*, *Torulopsis kefir*, *Saccharomyces lactis*, *S. cremoris*, *S. fragilis*, *Lactobacillus casei*, *L. brevis*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* gibi mikroorganizmalar bulunmuştur (Karagözlü 2003).

Kefir yapımında kullanılan mikrobiyel kültür ve bu kültürdeki mikroorganizmaların proteolitik aktivite (PA) değerleri kefirin duyusal özellikleri üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Kefirdeki mikroorganizmaların proteolitik aktivitelerinin yüksek olması çeşitli acılaşımların ve lezzet kusurlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu durum kefir yapımında starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmaların seçimi ve kombine edilmesi gibi kriterlerin ürün kalitesi üzerinde büyük önem taşıdığı gerçeğini ortaya çıkarmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, kefirde bulunan maya ve bakterilerin izolasyon sonrasında proteolitik aktivite düzeylerinin belirlenmesi, PA değerine göre seçilen suşlardan uygun kombinasyonların oluşturulması ve bu suşların biyokimyasal testlerle tanımlamasıdır.

İzole edilen bazı laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların proteolitik aktivitelerinin kontrolü ve tanımlanması ile kefir üretiminde starter kültür oluşturma kriterlerinin araştırılması, bu çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Kefirdeki floranın tanımlanması

ve karakterizasyonuna yönelik ulusal ve uluslararası alanda birçok araştırma yapılmıştır. Fakat literatürde kefirde izole edilen mikroorganizmaların proteolitik aktivite seviyesinin belirlenmesi, bu seviye doğrultusunda seçilen izolatın tanımlanıp starter kültür olarak kullanımı hakkında yapılan bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Kefir

Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği'ne göre kefir; fermantasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente edebilen (*Kluyveromyces marxianus*) ve edemeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler veya kefir tanelerinin kullanıldığı fermente süt ürünü olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2009). Kefirin ismi Türkçe'de hoş giden 'kef' kelimesinden türetilmiştir (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003). Kefirin, sütün kefir tanesi ile mayalanmasından sonra oda sıcaklığında yaklaşık 8- 12 saat inkübe edilmesi ile yapıldığı belirtilmiştir (Gökçe ve Üstün 2011).

Kefir tanesinin bazı özellikleri şu şekilde sıralanmaktadır: sarımsak renkte, çapı 1-2 mm'den 3-6 mm'ye değişmekte ve minyatür karnabahar görünümündedir. Ortadoğu'da bu taneye 'Peygamber darısı' denildiği de bilinmektedir. Tanenin temel olarak polisakkaritten meydana geldiği ve polisakkarit yapı içinde bir miktar yağ ve kazein mevcut olduğu bildirilmiştir. Laktozu fermente edebilen mayalar kefir tanesinin yüzeyinde bulunurken edemeyenlerin ise orta kısımlarında bulunduğu saptanmıştır (Yaygın 1994).

Kefir tanesinin protein ve polisakkarit yapıya sahip kompleks bir mikrofloradan meydana geldiği belirtilmiştir (Garrote vd. 1997). Karakteristik mikroflorası laktik asit bakterileri, mayalar ve bazı asetik asit bakterilerinden oluşan kefir, laktik asit ve maya fermantasyonuyla ayırt edilmektedir. Sonuç olarak elde edilen ürünün ekşi, hafif alkollü, köpüklü bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur (Hafliger vd. 1991, Kurmann vd. 1992). Mayalar kefirdeki alkol fermantasyonundan öncelikle sorumlu mikroorganizmalar olarak ortaya çıkmaktadır. Kefir tanelerinin yapısında çoğunlukla laktozu fermente edebilen mayalar (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torula kefir*) başta olmak üzere, laktozu fermente edemeyen mayaların (*Saccharomyces cerevisiae*) da bulunduğu belirtilmiştir (Irigoyen vd. 2005).

2.2 Kefirin Özellikleri

2.2.1 Kefirin duyuusal özellikleri

Reolojik bakımdan kaliteli bir kefirin akıcı, homojen ve parlak bir görünümde olması beklenmektedir. Topaklanmalar kusur sayılmaktadır. Kefir içildiği esnada hafif maya tadı hissedilmeli, ekşimsi olmalı ve serinletici bir etki bırakmalıdır. Muhafazası boyunca kefirde asitlik, CO₂ ve alkol oranlarının yükseldiği belirtilmektedir. Bundan dolayı kefir tatlı, orta sert ve çok sert kefir olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.1, Anonim 2007).

Çizelge 2.1 Farklı sertliklerdeki kefirlerin özellikleri (Beshkova vd. 2003).

	Tatlı kefir %	Orta sert kefir %	Sert kefir %	Çok sert kefir %
Su	88,2	88,9	89,4	89,0
Süt asiti	0,8	0,6	0,7	0,9
Etil alkol	0,6	0,7	0,8	1,1
Laktoz	2,7	2,9	2,3	1,7
Kazein	2,9	2,7	2,9	2,5
Laktalbumin	0,3	0,2	0,1	0,1
Yağ	3,3	3,1	2,8	3,3
Kül	0,8	0,6	0,7	0,6

Muir vd. (1999)'nin kefir, tereyağı ve yoğurdun duyuusal özelliklerinin karşılaştırılması üzerine yapmış olduğu bir çalışmada, kefirin laktik asit içeriği yoğurda göre daha düşük çıkarken, asetik asit içeriği yüksek çıkmıştır. Orotik asit, sitrik asit ve ürik/formik asit içeriği tüm bu ürünlerde (kefir, tereyağı, yoğurt) birbirine yakın bulunmuş, propiyonik asit ise belirlenememiştir.

2.2.2 Kefirin kimyasal özellikleri

Kefirin yapımında kullanılan sütün nitelikleri, inkübasyon süresi ve depolamaya bağlı olarak kefirin bileşimi ve kimyasal özelliklerinin değiştiği belirtilmektedir. Kefirin soğuk ortamda muhafazası esnasında asitlik, etil alkol, serbest yağ asitleri, asetaldehit miktarı ve viskozite miktarında artış olurken, laktoz, protein, aseton miktarı ve maya sayısında ise azalma gözlenmiştir (Çizelge 2.2, Anonim 2007).

Çizelge 2.2 Dokuz günlük muhafaza esnasında kefirdeki değişimler (Anonim 2007)

	1. Gün	2. Gün	3. Gün
Kuru madde (%)	11,63	11,57	11,18
Laktoz (%)	3,35	3,30	3,20
Yağ (%)	2,8	2,8	2,0
Protein (%)	3,57	3,37	3,25
Asitlik (SH)	39,2	40,32	43,38
pH	4,20	4,17	4,15
Serbest yağ asitleri (ml Eq/100 g yağ)	41,96	45,08	47,48
Etil alkol (ppm)	1365,0	2205,0	2280,0
Asetaldehit (ppm)	29,5	65,0	75,0
Aseton (ppm)	-	6,95	4,55
Viskozite (san.)	2,65	5,45	8,30
Canlı maya (ad/ml)	$2,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
Kül (%)	0,69	0,69	0,69

Kefir fermantasyonu esnasında oluşan olaylar aşağıda sıralandığı gibi özetlenebilir (Konar ve Şahan 1989).

1. Laktozdan laktik asit oluşumu (Laktik asit fermantasyonu)
2. Laktozdan etil alkol ve karbondioksit oluşumu (Alkol fermantasyonu)

3. Kefire özgü tipik mayayı andırır kefir aroması oluşumu
4. Sınırlı ölçüde proteinin pepton ve aminoasitlere parçalanması

Endüstriyel kefir üretim teknolojisinin aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır (Gökçe ve Üstün 2011):

1. %8 KM (İnek sütü)
2. Yağlı süt, yarım yağlı süt veya yağsız süt
3. Homojenizasyon
4. Isıl işlem (90-95°C’de 5-10 dk)
5. Soğutma (18-24°C’ye)
6. Mayalama (%2-8 kefir kültürü)
7. İnkübasyon (20-25°C’de 18-24 saat)
8. Pıhtı parçalama, olgunlaşma (12-14°C 24 saat)
9. Paketleme

2.3 Fermente Süt Ürünlerinde Mikrobiyolojik Kriterler

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği’ne (Çizelge 2.3, Anonim 2009) göre kefire ait bazı mikrobiyolojik limitler çizelge 2.4’te belirtilmiştir. Buna göre 3 adet kefir örneğinde bulunmasına izin verilen koliform bakteri sayısının en fazla 9 EMS/g-mL olması gerektiği ve 2 adet kefir örneğinde koliform bakteri sayısı 95 EMS/g-mL’yi aşması durumunda örneklerin kabul edilemez olduğu sonucuna varılmaktadır. Küf miktarı ise 3 adet kefir örneği için en fazla 10² EMS/g-mL ve 2 adet örnekte 10³ EMS/g-mL’nin üstüne çıkması durumunda örneklerin kabul edilemeyeceği yorumu yapılmaktadır. Son kriter olarak 5 adet kefir örneğinde *Escherichia coli*’nin 3 EMS/g-mL’den küçük sayıda olması ve 3 EMS/g-mL’den büyük hiçbir örneğin kabul edilemeyeceği şeklinde belirtilmiştir.

Çizelge 2.3 Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2009/25) Fermente Süt Ürünlerine Ait Mikrobiyolojik Değerler (Anonim 2009)

Ürün	Mikroorganizmalar	Numune alma planı		Limitler ⁽¹⁾	
		n	c	m	M
Kefir	Koliform bakteriler ⁽²⁾	5	2	9	95
	Küf	5	2	10 ²	10 ³
	<i>E. coli</i> ⁽²⁾	5	0	<3	
Yoğurt, meyveli vb. yoğurtlar, ayran ve diğer fermente süt ürünleri	Koliform bakteriler ⁽²⁾	5	2	9	95
	Maya (probiyotik kullanılanlar hariç)	5	2	10 ²	10 ³
	Küf	5	2	10 ²	10 ³
	<i>E. coli</i> ⁽²⁾	5	0	<3	

⁽¹⁾ : Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-mL olarak değerlendirilir.

⁽²⁾ : EMS (En Muhtemel Sayı) yöntemi

n : Partiden, bağımsız ve rastgele seçilen numune sayısı

c : m ve M arasında olmasına izin verilen maksimum numune sayısı (M değeri taşıyabilecek en fazla numune sayısını)

m : (n-c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla mikrobiyolojik değer

M : c sayıdaki numunenin bu değeri aşması halinde uygunsuz olup kabul edilemez olduğunu gösteren mikroorganizma sayısı

2.4 Kefir Çeşitleri

Sade Kefir: Yapımında hiçbir katkı maddesi kullanılmayan kefir olarak tanımlanmaktadır. Genellikle bu çeşit kefirin üretiminde yağ oranı en az %3 ve kuru madde oranı en az %8 olan süt kullanılmaktadır (Anonim 2007).

Meyveli kefir: Bu ürünün üretiminde çeşitli meyve soslarından faydalanılmaktadır. İlave edilen aroma maddelerinin Türk Gıda Kodeksi'ne uygun özellikte olması gerektiği belirtilmiştir. Eklenen meyve sosunun türüne göre kefir çilekli, muzlu vb. şekillerde isimlendirilmektedir. Meyveli kefirde tat ve aroma, ilave edilen meyve türüne göre değişiklik göstermektedir. Homojenizasyon işlemi için 120–140 kg/cm² basınç 65°C'de

uygulanmaktadır. Meyve sosunun kefire ilavesi ise pıhtı kırma işleminden sonra gerçekleştirilmektedir (Anonim 2007).

Light kefir: Sade kefirin yapımından farklı olarak kullanılan sütün yağ oranı %1 olacak şekilde standardize edildikten sonra üretilen kefir olarak tanımlanmaktadır. Yağ standardizasyonu öncesinde ise %2 diyet lifi eklendiği ve homojenizasyon işleminin 120–140 kg/cm² basınç altında ve 65°C sıcaklıkta uygulandığı belirtilmiştir (Anonim 2007).

Kefir tüketimini arttırmak ve farklı lezzetlerde kefir üretmek amacıyla yapılan bir çalışmada fenolik bileşenler bakımından yüksek olan erik ve pekmez kullanılmış, duyu analizi sonuçlarına göre panelistler tarafından en çok beğenilen erik kullanılarak üretilen kefir olduğu bildirilmiştir (Kök-Taş 2013).

Ankara piyasasında satılan kefirlerin mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal ve duyu özellikleri üzerine yapılan bir araştırmadaki duyu analizi sonucu panelistlerin karışık meyveli ve muzlu kefirleri sade kefire göre daha çok beğendikleri, çilek tadını ise beğenmedikleri sonucuna ulaşılmıştır (Uslu 2010).

2.5 Kefirin Probiyotik Özellikleri

Kefir sütteki tüm besin maddelerini içerdiği için beslenme değeri yüksek, sindirimi ise kolay bir içecek olarak bilinmektedir. Mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri ile laktoz ve proteinlerdeki değişimler sonucu oluşan karbondioksitin, kefirin sindirimini kolaylaştırdığı gözlenmiştir. Ayrıca kefirdeki laktozun yaklaşık %90'ından fazlası L (+) laktoz halinde bulunduğu için kefirin fizyolojik olarak da önemli olduğu açıklanmıştır (Anonim 2007). Fermantasyon sırasında homofermentatif laktik asit bakterilerinin salgıladıkları β -galaktozidaz enzimi ile laktoz önce glikoz ve galaktoza parçalanmakta daha sonra ise heterofermentatif laktik asit bakterilerinin (*Leuconostoc*) açığa çıkardığı enzimle glikoz ve galaktoz, laktik asit, CO₂ ve aroma maddeleri olan asetoin, diasetil,

asetaldehit ve asetona parçalandığı belirtilmiştir. Mayaların ise kefirde bulunan laktozu, glikoz ve galaktoza, bu şekerleri de etil alkol ve CO₂'e parçaladığı gözlenmiştir (Yaygın 1994).

Kefir, bileşiminde bazı B grubu vitaminleri içerdiği belirtilmiştir. Biotin açısından iyi bir kaynak olması, folik asit, B₁₂ gibi diğer B vitaminlerinin de vücutta sentezine ve emilimine yardımcı olduğu bulunmuştur. Kefir içinde bulunan B vitaminleri ile böbrek-karaciğer ve sinir sisteminin işleyişinde; kalsiyum ve magnezyum ile sağlıklı kemik gelişiminde; fosfor ile vücudun karbonhidrat, yağ, protein ve enerji metabolizmalarında; esansiyel bir aminoasit olan triptofan ile sinir sisteminin rahatlatmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir. K vitamini, pantotenik asit, niasin bakımından da kefir iyi bir kaynak olarak gösterilmektedir. Kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir (Anonim 2007).

Gıdalarda kullanılan bazı probiyotik mikroorganizmalar şu şekilde sıralanmaktadır: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Propionibacterium freundenreichii*, *Saccharomyces boulardii* (Şener 2009). Kefirin mikroflorasının ise laktik streptokok, leukonostok, termofilik laktobasil, mezofilik laktobasil, mayalar (laktozu fermente edebilen ve edemeyen) ve asetik asit bakterilerinden oluştuğu bilinmektedir. Kefir tanelerinin mikrobiyel bileşiminin tanelerin orijinine ve fermantasyon yöntemine bağlı olarak değişebildiği belirtilmiştir (Kurmman vd. 1992, Beshkova vd. 2002, Güzel-Seydim vd. 2005).

Kefirin düzenli olarak günlük tüketimi ile organizmayı stabilize edici etkisi olduğu, sağlık üzerine olumlu etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca kefirin; karaciğer, safra, böbrek fonksiyonları ve kan dolaşımı üzerinde pozitif etkileri olduğu, antikarsinojenik özellik gösterdiği de literatürde gösterilmiştir. Ancak bu konudaki bilimsel araştırmaların günümüzde de devam ettiği açıklanmıştır (Anonim 2001).

Kefirde fermantasyon sonucu meydana gelen maddeler kefirin serinletici, iştah açıcı bir özellik kazanmasını ve beğenilen tat ile aromanın oluşmasını sağlamaktadır. Kefirdeki laktozun tamamına yakınının maya ve bakterilerin yapısında bulunan laktaz enzimi tarafından parçalandığı belirtilmiştir. Bu nedenle laktoz oranı süte göre azaldığı için kefirin laktoz intoleransı olan kişilerce de rahatlıkla tüketilebileceği bildirilmektedir. Laktoz intoleransı; insan vücudunda laktozu parçalayan enzimin yetersizliğinde görülmekte ve laktoz içeren ürünleri tüketen bu kişilerde çeşitli bağırsak rahatsızlıklarının meydana geldiği bir durum olarak tanımlanmıştır. Kefirin yapısında, esansiyel yağasitleri ve aminoasitlerin de yer aldığı ortaya konmuştur. Kefirde oluşan asetik asit, H₂O₂ (hidrojen peroksit) gibi maddeler ve antibiyotiklerin; *E.coli*, *Salmonella* gibi patojen bakteriler üzerine antibakteriyel etki yaptığı gözlenmiştir (Anonim 2007).

Bakteriyosin üreten *Pediococcus* sp. 13 suşunun 16S rRNA ile tanımlanması ve karakterizasyonu ile ilgili bir çalışmada bu suşun antimikrobiyel özellikte olduğu ve *Listeria monocytogenes* patojenine karşı etkin olduğu saptanmıştır (Güneş-Altuntaş 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise *Lactobacillus* türlerinin *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* üzerinde kuvvetli bir inhibitör etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Golowczyc vd. 2008). Carasi (2014) *Lactobacillus kefiri* CIDCA 8348 suşunun antimikrobiyel özellikte olduğu ve süt ürünlerinde probiyotik olarak kullanılabilceğini deneysel olarak göstermiştir. Kefirde fermantasyon süresince üretilen metabolik ürünlerin nutrasötik (fonsiyonel) özelliğe sahip olduğu ileri sürülmektedir (Güzel-Seydim vd. 2011). Bununla birlikte araştırmacılar, LAB'nin gıdalarda hem starter kültür hem de koruyucu olarak kullanılabilmesi, yeni suşların izolasyonu ve tanısı amacıyla çalışmaların devam etmesi gerektiğini de vurgulamaktadır (Okcu 2010).

Kefir tüketiminin içerdiği CO₂ ve kalsiyum tuzlarından dolayı ürünü seyrelttiği bazı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Koliform, *Mycoderma* ve *Geotrichum candidum* gibi mikroorganizmaların kefire sonradan bulaştığı, doğal kefir mikroflorasında koliform grubu mikroorganizmaların inhibe olduğu birçok bilimsel çalışmada yer almaktadır. Kefirin depolama süresinin uzaması durumunda *Mycoderma* ve *Geotrichum candidum* gelişebildiği gözlenmiştir. *Shigella* ve *Salmonella* gibi patojen bakterilerin ise

kefir taneleri ile birlikte sütte bulduklarında aktivite gösteremedikleri belirtilmiştir (Koroleva 1988). Çünkü kefir tanesinde bulunan mikroorganizmaların laktik asit ve antibiyotik gibi ürünler ürettiği ve bu bileşenlerin sütte bulunan patojen ve üründe bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların gelişimini engellediği saptanmıştır (Chen vd. 2008).

Geleneksel kefirin üniform aromasının kefir tanesinden gelen birçok bakteri ve maya türlerinin simbiyotik aktiviteleri sonucu oluştuğu bildirilmiştir. Kefir üretiminde starter kültür kullanımı, kontrol edilebilir standardize ürünlerin oluşumunu sağladığı açıklanmıştır (Beshkova vd. 2003).

Rusya’da yapılan bir çalışmada bifidokefir olarak isimlendirilen yeni bir süt ürünü geliştirilmiştir ve bu üründe $2,0 \times 10^7$ adet *Bifidobacterium* bulunduğu belirtilmiştir. Bu ürünün yüksek oranda B kompleks vitaminleri, askorbik asit, glutamat ve treonin içerdiği gözlenmiştir. Yapılan klinik deneyler bifidokefirin patojen bakteri sayısını azalttığını, aynı zamanda toksinleri de elemine ettiğini göstermektedir (Molokeev vd. 1998a). *Bifidobacterium* temeline dayalı starter kültür kullanımı ile üretilen kefirin bir amacı da insan bağırsak florasının gelişimini desteklemek olduğu açıklanmıştır (Molokeev vd. 1998b). Benzer şekilde standardize edilmiş süte kefir taneleri, *Acidophilus* bakterisi ve mezofilik grubu streptokok kullanarak *Acidophilus*’lu kefir üretimi gerçekleştirmiştir (Fal’Berg 1987).

Geniş bir çeşitliliği olan fermente ürünlerin üretiminde LAB en önemli endüstriyel mikroorganizmalar olarak bilinmektedir (Axelsson 1993, Batish vd. 1997, Mete 2011). Gıdalarda yalnızca gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek ve/veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan antagonistik kültürlerle “koruyucu kültürler” denilmektedir. LAB’nin, patojenleri ve özellikle bozulma yapan mikroorganizmaları kontrol eden antagonistik bileşikler de ürettiği açıklanmıştır. Uzun yıllardır gıda üretiminde LAB starter kültür veya koruyucu kültür olarak kullanılan güvenilir bakteriler olarak tercih edilmektedir (Ayhan ve Coşansu 1998, Altuntaş vd. 2009, Samantır 2012).

Gourama ve Bullerman (1995), makalelerinde LAB'nin doğru seçiminin küf gelişimini kontrol edebileceğini, fermente ürünlerin raf ömrünü uzatabileceğini ve böylece mikotoksinlere maruz kalınmasıyla oluşabilecek sağlık risklerinin azaltılabileceğini belirtmiştir (Dalie vd. 2010, Samantır 2012). Bazı laktik asit bakterileri, kontrol edilmediklerinde gıdaların renk, tat, koku gibi duyuşsal özelliklerine zarar verdikleri için bu bakterilerin koruyucu kültür olarak kullanıldığı gıdalara kontrollü bir proses uygulanması gerektiği ifade edilmektedir (Coşansu ve Ayhan 2002, Seçkin vd. 2010, Samantır 2012). Buna göre fermente bir süt ürünü olan kefirde biyojen amin olarak tiramin, putresin, kadaverin ve spermidin bulunmuş, toplam biyojen aminin ise 2,4-35,2 mg/L arasında olduğu bazı araştırmalar ile gösterilmiştir (Özdestan ve Üren 2010, Mete 2011). Boza fermantasyonu sırasında doğal laktik asit bakterilerinin yüksek sayıda olması ya da uygun olmayan starter kültür kullanılması sonucu biyojen amin içeriğinin geniş bir varyasyon gösterdiği belirlenmiştir (Coşansu 2009, Mete 2011).

Bağırsakta tutunabilen bazı probiyotik özellikteki LAB'nin öncelikle yoğurt olmak üzere süt ürünlerinin starter kültürlerine ikincil mikroflora olarak ilave edilmektedir (Tunail 2009). LAB oluşturdukları ekzopolisakkarit (EPS) ile insan bağırsağındaki epitelyum dokuyla bakteriler arasında gerçek bir bağ meydana getirdiği ve böylece EPS üretimine sahip suşların yüksek bir tutunma kapasitesinde olduğu ileri sürülmektedir (Mıdık 2011).

Kefirde fermantasyon süresince üretilen metabolik ürünlerin nutrasötik özellikte olduğu belirtilmektedir. Hatta kefir fonksiyonel ve probiyotik bir gıda olarak tanımlamaktadır (Güzel-Seydim vd. 2011).

Bilici vd. (2012) tarafından yapılan bir anket çalışmasında; 19-65 yaş grubu aralığında 400 gönüllü içinde kefir tüketenlerin %20,2'sinin kadın, %9,5'inin erkek olduğu, tüketim bakımından yaş, eğitim ve cinsiyet farklılığının önemli olduğu, ankete katılan 400 kişi içinde kefir tüketenlerin %95,2'sinin kefirin sağlık üzerine olumlu katkısı olduğunu için tükettiklerini belirtirken, tüketmeyenlerin %71,0'nin kefirle ilgili yeterli bilgi sahibi olmadıkları için kefir tüketmedikleri, kefir tüketenlerin %96,8'nin evde kefir ürettikleri, sonucuna ulaşılmıştır.

2.6 Proteolitik Aktivite

Proteolitik aktivite, mikroorganizmalar tarafından salgılanan proteolitik özellikteki enzimlerin proteinleri hidrolize etmesi olarak tanımlanmaktadır. Proteolitik aktivite, gıdanın duyuşal özellikleri bakımından önemli bulunmaktadır. Proteolitik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin başında Hull (1947) metodu gelmektedir. Kazeinin parçalanması ile serbest kalan tirozin ve triptofan miktarı belirlendikten sonra sonuçlar tirozin eşdeğeri ile hesaplanmaktadır (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003).

Laktik asit bakterileri, gelişebilmek için ortamda bazı serbest aminoasitlerin varlığına gereksinim duymaktadırlar. *Streptococcus* türlerinin, hücre dışı proteinaz enzim aktivitesi ile özellikle hücre zarına bitişik yapıda olan kazeini peptitlere parçaladığı belirtilmektedir. Meydana gelen peptitlerin, LAB hücresi tarafından alındığı ve hücre içinde hidrolize edildiği açıklanmıştır (Law ve Kolstad 1983).

Laktik asit bakterilerinin yapısında bulunan proteolitik enzimlerin peynir aromasına ve belli ürünlerin kokusunun oluşumunda etkili olduğu belirtilirken proteolitik aktivite özelliğinde ise pH ve sıcaklığın önemli olduğu ortaya konulmuştur (Giori vd. 1985). Süt ve süt ürünlerinde bakteriyosinlerin kullanımı üzerine yapılan bir çalışmada peynirin olgunlaşması sırasında gerçekleşen proteolizin aromadan sorumlu olan küçük peptitlerin ve serbest aminoasitlerin oluştuğu ve bu durumun kalite belirleyici bir unsur olduğu açıklanmıştır (Ayhan ve Güneş-Altuntaş 2010).

Rasic ve Kurmann (1978) tarafından yapılmış bir araştırmada, proteolitik aktivitenin bakterilerin logaritmik gelişme fazı esnasında meydana geldiği, *Streptococcus thermophilus*'un sadece hücre içi enzim ürettiği, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un ise hücre içi ve az miktarda da hücre dışı enzim oluşturduğu saptanmıştır. Hücre dışı enzimlerle proteinlerin, küçük parçalara ayrılarak hücre içine daha fazla girmesinin sağlandığı düşünülmektedir.

Laktik asit bakterileri üzerinde yapılan başka bir çalışmada, laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitenin cins, tür ve hatta suşlar arasında çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003).

Kefir tanesinden izole edilen *Lactobacillus* cinslerinin tanımlanması ve proteolitik aktivitesinin belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada (Kabadjova-Hristova vd. 2006) API 50 CHL hızlı test kiti ile tanımlanan bazı suşlar ve bu suşlara ait proteolitik aktivite değerleri çizelge 2.4'te verilmiştir. Bu çalışmada proteolitik aktivite değerleri belirlenirken Kunitz (1946) yönteminden yararlanılmıştır.

Çizelge 2.4 Tanımlanan bazı suşlara ait proteolitik aktivite değerleri

Suş Kodu	API 50 CHL ile tanımlanan türler	Tanımlama derecelendirmesi	Proteolitik aktivite (absorbans değeri/mL)
DR22x	<i>Lactobacillus kefir</i>	Mükemmel (%98,4)	530
DR22r	<i>Lactobacillus kefir</i>	Çok iyi (%92,7)	290
GK44eps	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Çok iyi (%94,4)	340
GK62N	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Çok iyi (%92,1)	180
GK30	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Mükemmel (%98,5)	360
GK22r	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Çok iyi (%90,2)	189
GK6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	İyi (%85,7)	380

Farklı proteolitik sistemlere sahip olan laktik asit bakterilerinin, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un birlikte kullanıldığı gibi, simbiyotik ilişki içerisinde farklı proteolitik sistemleriyle hem kendilerinin ve ortağının gelişmesine katkıda bulunduğu hem de olgunlaştırılan peynirlerin lezzetini geliştirdiği açıklanmıştır (Tunail 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 İzolasyon materyali

Bu çalışmada Eker, İçim, Altıncılıç, Karamaya, Atatürk Orman Çiftliği Kefiri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi tarafından üretilen kefir, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi tarafından satışı sunulan sıvı kefir mayası ile yapılmış kefir, Kazakistan'dan temin edilen iki adet ticari kefir örneği (%1 ve %2,5 yağlı) ve Endanem Toz Kefir Mayası ile yapılmış kefir olmak üzere 10 adet kefir örneği kullanılmıştır. Analizleri yapılan kefir örneklerinin evde mayalananları dışındakiler marketlerden hazır olarak temin edilmiştir. Endanem marka toz kefir mayası marketten, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi yaş kefir mayası ise Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi satış noktasından sağlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Örnek alma

Çalışmada 8 adet ticari firmaların ürettiği ve 2 adet ev yapımı olmak üzere 10 adet örnek kullanılmıştır.

3.2.2 Örneklerin hazırlanması

1 N HCl kullanılarak porselen kroze içindeki 90 g kum asitlendirilmiştir. Böylece kum, içindeki organik bileşenlerden uzaklaştırılmıştır. Ardından %1'lik fenolftalein (Merck) belirteci ilave edilip 1 N NaOH ile renk değişimi gözlenene kadar titre edilmiştir. Kumun inorganik bileşenlerden uzaklaştırılıp sterilize edilebilmesi amacıyla 165°C'de 3 saat süre ile etüvde bırakılmıştır. Etüv sonrası krozenin içine analiz edilecek kefir örneğinden 100 mL eklenmiş ve yaklaşık 10 dk süreyle ezilmiştir.

3.2.3 Saflaştırma

Ezme işlemi sonrasında krozedeki kefirde öze yardımcı ile steril koşullar altında MRS Agar (de Man Rogosa Sharpe, Merck), PCA Agar (Merck) ve YGC Agar (Merck) bulunan Petrilere inokülasyon yapılmıştır. MRS Agar'lı Petrilere anaerob jar (Merck) içinde olmak üzere diğer tüm Petrilere beraber 28°C'de 24-48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

Gelişim gözlemlenen PCA Agar ve YGC Agar bulunan besiyerlerindeki kolonilerden TSB'ye, MRS Agar'lı besiyerindeki kolonilerden ise MRS Broth'a inokülasyon yapıldıktan sonra örnekler 28°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme görülen sıvı besi ortamından katı besiyeri içeren Petrilere ekim yapılarak aynı sıcaklık ve sürelerde inkübe edilmişlerdir. İşlem 2 kez tekrarlanarak saflaştırma basamağı da tamamlanmıştır.

3.2.4 Kültürel sayım

İnkübasyon süresinin sonunda Petri kutusundaki koloniler sayılıp toplam koloni sayısı dilüsyon faktörü ile çarpılarak örnekteki canlı hücre sayısı bulunmuştur. Ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması alınarak örnekteki sayı hesaplanmıştır. Bu hesaplamada kullanılan formül;

$$N = C / (d * V * (n_1 + 0.1n_2))$$
 şeklindedir.

Bu formülde;

N = Gıda örneğinin 1 g ya da 1 mL'sinde mikroorganizma sayısı

C = Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V = Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (mL)

n₁ = İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

n₂ = İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

d = Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır.

İncelenen örnek sıvı olduğu için sonuçlar kob/mL olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5 İzolasyon

Saflaştırılan izolatlardan 3.2.3'te açıklandığı şekilde laktik asit bakterisi olduğu tahmin edilen TSB ve MRS Broth besiyerinde geliştirilen aktif kültürlerden 1'er mL alınarak steril koşullarda içinde 1 mL toz CaCO₃ bulunan skim milk besiyerine inoküle edilmiş ve 28°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişme gözlenen tüpler 4°C'de muhafaza edilmiştir. TSB sıvı besiyerine inoküle edilen ve maya olduğu tahmin edilen izolatlar ise 0,5 mL steril gliserol içeren Eppendorf tüplerine 1 mL olacak şekilde aktarılarak kültür stokları oluşturulmuş ve -18°C tekrar kullanılincaya kadar saklanmışlardır.

3.2.6 İzolatların proteolitik aktivitelerinin (PA) Belirlenmesi

İzolatların proteolitik aktiviteleri belirlenirken Hull (1947) yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla aktifleştirilmiş sıvı kültürlerden %1 oranında (0,1 mL) alınarak 10 mL'lik skim milk besiyerine inoküle edildikten sonra örnekler 28°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda aktif kültürden 5 mL alınıp üzerine 1 mL saf su ve 10 mL 0,72 N Triklorasetik asit (TCA) eklenerek karıştırılmış ve 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin bitiminde karışım, Whatman 42 nolu filtre kağıdı ile süzölmüştür. Elde edilen filtrattan 5 mL alınıp 50 mL'lik erlene konulmuş ve üzerine 10 mL Na₂CO₃-Na₄P₂O₇ (Sodyum karbonat-tetrasodyum pirofosfat) çözeltilisinden ilave edilip karıştırılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine 3 mL fenol ayırıcı eklenip maksimum mavi rengin gelişmesi için 5 dk beklenmiştir. Örnekler 5000 devir/dk hızda 15 dk süreyle santrifüjlenmiş (Hettich Zentrifügen, Mikro 22R, Deutschland) ve bu işlem sonunda süpernatantların, spektrofotometrede (Shimatzu UV-1700 UV-VIS spectrophotometer, Japan) 650 nm dalga boyundaki absorbanları (OD) ölçölmüştür. Yapılan ölçömlerde şahit olarak, steril 5 mL skim milk besiyerine yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak elde edilen sıvı kullanılmıştır. Analizde kullanılan çözeltilerin hazırlanışları EK 2'de açıklanmıştır.

Proteolitik aktivite analizi için bahsedilen yöntem laktik asit bakterileri ve mayalar olmak üzere her iki grup için de aynı şekilde uygulanmıştır. Fakat mayaların proteolitik aktivite değerleri belirlenirken besiyeri olarak skim milk yerine TSB besiyeri kullanılmıştır. TSB besiyerinin tercih edilme sebebi, mayaların daha iyi gelişeceği besiyeri bileşenlerine, özellikle de skim milk'e göre fazla miktarda glikoz oranına sahip olmasına dayanmaktadır. Yapılan bir çalışmada yüksek ve düşük gravitedeki malt fermantasyonu süresince mayaların proteolitik aktivitesinin fermantasyon süresi boyunca arttığı gözlenmiştir. Maltın starter kültür tarafından kullanılması ve zamanla glikoza kadar parçalanması ile mayaların gelişimi olumlu yönde etkilenmiş, PA değerlerinin de fermantasyon boyunca arttığı belirtilmiştir (Cooper vd. 2000).

3.2.7 Proteolitik aktivite düzeyine göre seçilen izolatların kombinasyonlarının oluşturulması ve bunların proteolitik aktivitelerinin kontrolü

İzole edilen her iki mikroorganizma grubu içinden proteolitik aktivitesi en yüksek ve en düşük olan iki adet olmak üzere toplam 6 adet izolat seçimi yapılmıştır. Seçilen bu izolatlar arasında PA değeri en düşük ve en yüksek olan iki izolat, PA seviyelerini karşılaştırmak amacı ile uygun üçlü kombinasyonlarda kullanılmıştır. Oluşturulan bu kombinasyonlar, steril cam şişe içindeki pastörize inek sütüne 0,5 mL olmak üzere steril koşullar altında inoküle edilmiş ve 28°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.8 Üretilen Kefirlerin Duyusal Analizlerinin Yapılması

Oluşturulan kombinasyonlar ile üretilen kefirler fermantasyonlarının ilk gününde duyusal analiz için çizelge 3.1'de belirtilen şekilde ve 10 panelistten oluşan bir grup tarafından değerlendirilmiştir (Lawless ve Heymann 1999).

Çizelge 3.1 Duyusal analiz şeması ve puanlama

Görünüş	Renk	Koku	Homojen yapı	Ekşilik	Mayamsı tat	Alkol tadı	Ferahlatıcı tat	Yabancı aroma	Genel beğeni
1 Aşırı kötü	1 Aşırı kötü	1 Aşırı kötü	1 Aşırı kötü	1 Çok az	1 Çok az	1 Çok az	1 Çok az	1 Çok az	1 Aşırı kötü
2 Çok kötü	2 Çok kötü	2 Çok kötü	2 Çok kötü	2 Az	2 Az	2 Az	2 Az	2 Az	2 Çok kötü
3 Kötü	3 Kötü	3 Kötü	3 Kötü	3 Orta	3 Orta	3 Orta	3 Orta	3 Orta	3 Kötü
4 Ortanın altı kötünün üstü	4 Ortanın altı kötünün üstü	4 Ortanın altı kötünün üstü	4 Ortanın altı kötünün üstü	4 Fazla	4 Fazla	4 Fazla	4 Fazla	4 Fazla	4 Ortanın altı kötünün üstü
5 Kötü	5 Kötü	5 Kötü	5 Kötü	5 Çok fazla	5 Çok fazla	5 Çok fazla	5 Çok fazla	5 Çok fazla	5 Kötü
6 İyinin altı ortanın üstü	6 İyinin altı ortanın üstü	6 İyinin altı ortanın üstü	6 İyinin altı ortanın üstü						6 İyinin altı ortanın üstü
7 İyi	7 İyi	7 İyi	7 İyi						7 İyi
8 Çok iyi	8 Çok iyi	8 Çok iyi	8 Çok iyi						8 Çok iyi
9 Mükemmel	9 Mükemmel	9 Mükemmel	9 Mükemmel						9 Mükemmel

3.2.9 Seçilen izolatların tanımlanması

PA değerine göre seçilen toplam 6 adet izolatın biyokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla Gram boyama, oksidaz ve katalaz testi yapılmıştır. Ek olarak, izolatlar hareket, glikozdan CO₂ gazı üretimi, arjinin hidrolizi, Voges Proskauer, Metil Red, karbonhidrat (sakkaroz) fermantasyonu, farklı sıcaklık (10 ve 45°C), pH (4,4 ve 9,6) ve tuz konsantrasyonu (%4, %6,5 ve %18) gibi fenotipik gelişme özelliklerine göre incelenmiştir (Harrigan ve McCance 1990, Temiz 2000, Carr vd. 2002, Çakmakçı vd. 2002, Halkman 2005).

3.2.9.1 Gram boyama

Çalışmada uygulanan Gram boyama Çakmakçı vd.(2002)'e göre yapılmıştır. İşlem için 18-24 saatlik aktif kültürler kullanılmıştır.

3.2.9.2 Katalaz testi

MRS Agar (Merck) içeren Petri kutusunda 28°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası gelişen koloni üzerine mikro pipetle %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılır ve en geç 1 dakika içinde gözle görülür gaz çıkışı olursa sonuç katalaz (+), görülmezse katalaz (-) olarak değerlendirilir (Halkman 2005).

3.2.9.3 Oksidaz testi

Yöntemin uygulanması direkt olarak Bactident Oxidase (Merck) ile yapılmıştır. Bu amaçla MRS Agardan öze ile tek bir koloni alınmış ve 1 mL saf suda çözüldükten sonra test şeridinin reaksiyon bölmesine öze ile aktarılmıştır. 60 sn içinde mavi-menekşe renk dönüşümü oksidaz testinin pozitif sonuç verdiğini göstermektedir (Halkman 2005).

3.2.9.4 Hareket testi

İzolatların hareket özelliklerini belirlemek için direkt olarak SIM Medium (Sulfate, Indole, Motility Medium, Merck) kullanılmıştır. MRS'de geliştirilen izolat iğne özeyle batırma kültür olarak inoküle edilmiş ve tüpler 28°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişme tüm besiyerinde gerçekleşmişse hareket pozitif, sadece aşılama hattı boyunca olursa hareket negatif olarak değerlendirilmiştir (Halkman 2005).

3.2.9.5 Glikozdan CO₂ üretimi

MRS Broth besiyerinde geliştirilen izolat, içinde Durham tüpü olan ve 10 g/L glikoz içeren Fenol Red Broth (Merck) besiyerine inokülasyon yapılmıştır. İnoküle edilen tüpler 10 gün boyunca 28°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüplerde oluşan sararma ve gaz oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Harrian ve McCance 1990).

3.2.9.6 Arjinin hidrolizi testi

Bileşimden hazırlanan modifiye MRS Broth (Merck) besiyerine %0,5 arjinin aminoasiti eklenmiştir. MRS Broth'ta geliştirilen aktif kültürden modifiye MRS dekarboksilaz besiyeri içeren tüplere inokülasyon yapılmıştır. Hemen sonra tüplerin hava ile temasını engellemek amacıyla anaerobik şartların oluşturulabilmesi için üzerlerine 1'er mL steril sıvı parafin eklenmiş ve tüpler 28°C'de 2-7 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca tüplerdeki renk değişimi düzenli bir şekilde kontrol edilmiş besiyerinin kendi rengi olan mor renk, glikozun kullanılmasıyla inkübasyonun ilk günü sarıya dönüşmüştür. İnkübasyonun ilerleyen günlerinde ise arjinin aminoasitinin kullanılmasına bağlı olarak sarı rengin tekrar mor renge döndüğü tüplerdeki izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.9.7 Voges Proskauer testi

MRS Broth besiyerinde 18 saatlik süre ile geliştirilen aktif kültürden MR-VP Broth (Merck) besiyerine öze ile inokulüm yapılmış ve 28°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinden 48. saatte alınan 1 mL kültüre VP testi uygulanmıştır. Tüplerin üzerine önce 0,6 mL α -naftol daha sonra ise 0,2 mL %40'luk KOH çözeltisi ilave edilmiş ve 4 saat sonra kiraz kırmızısı renk oluşumu gözlenen tüpler için sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.

VP testi için kullanılan 5 mL'lik kültürlerden 1'er mL alınması ile kalan 4 mL'lik kültürler MR testinin uygulanması için tekrar aynı sıcaklıkta 96 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır (Halkman 2005).

3.2.9.8 Metil Red testi

VP testi sonrasında MR-VP Broth (Merck) besiyerindeki kültürler 28°C'de 48 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüplere pastör pipeti ile 3-4 damla metil red indikatörü damlatılmış ve sarıdan kırmızıya dönen tüplerdeki izolatların test sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.9.9 Karbonhidrat (sakkaroz) fermantasyonu

Testin amacı izolatların sakkarozu fermente etme yeteneklerinin belirlenmesi olduğu için bileşimden hazırlanan modifiye MRS Broth besiyerine (Yeast extract içermeyen) %1 oranında sakkaroz eklenmiştir. 20 saatlik süre ile aktifleşmiş kültürden besiyerine inokülasyon yapılmış ve anaerobik koşulun sağlanması için tüplere 1'er mL sıvı parafin ilave edilmiştir. Tüpler 28°C'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası rengin mordan sarıya döndüğü tüpler için test pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000).

3.2.8.10 Farklı sıcaklıklarda gelişme testleri

İzolatlar 10 ve 45°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta geliştirilmiş ve gelişme durumları Carr vd. (2002)'e göre belirlenmiştir.

3.2.8.11 Farklı pH'larda gelişme testleri

Tanımlama testlerinin uygulandığı izole edilmiş bakterilerin pH 4,4 ve 9,6'da gelişme durumları Harrigan ve McCance (1990) ve Carr vd. (2002)'e göre incelenmiştir.

3.3.8.12 Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testleri

Analizde kullanılan bakterilerin %4, %6,5 ve %18 olmak üzere farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişme testleri Temiz (2000)'e göre gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Bakterilerin İzolasyonu ve Kültürel Sayım

İzolasyon materyali olarak Eker, İçim, Altıncılıç, Karamaya, Atatürk Orman Çiftliği Kefiri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi tarafından üretilen kefir, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi tarafından satışa sunulan yaş kefir mayası ile yapılmış kefir, Kazakistan'dan temin edilen iki adet ticari kefir örneği (%1 ve %2,5 yağlı) ve Endanem Toz Kefir Mayası ile yapılmış kefir olmak üzere 10 adet kefir örneği kullanılmıştır. Örnekler 3.3.2.'de açıklandığı gibi izolasyona hazırlanıp uygun dilüsyonlardan MRS Agar, PCA ve YGC Agar olmak üzere 3 farklı besiyerine ekimi yapılmış, uygun sıcaklık ve süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim gözlenen Petrilerde 3.3.5'de açıklandığı gibi kültürel sayım yapılmış ve hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.1'de verilmiştir.

Tez çalışmasında 10 adet kefir örneğinden laktik asit bakterisi olduğu tahmin edilen 58 adet, maya olduğu tahmin edilen 24 adet toplamda 82 adet koloni izole edilmiştir.

Çizelge 4.1 Örneklere ait kültürel sayım sonuçları

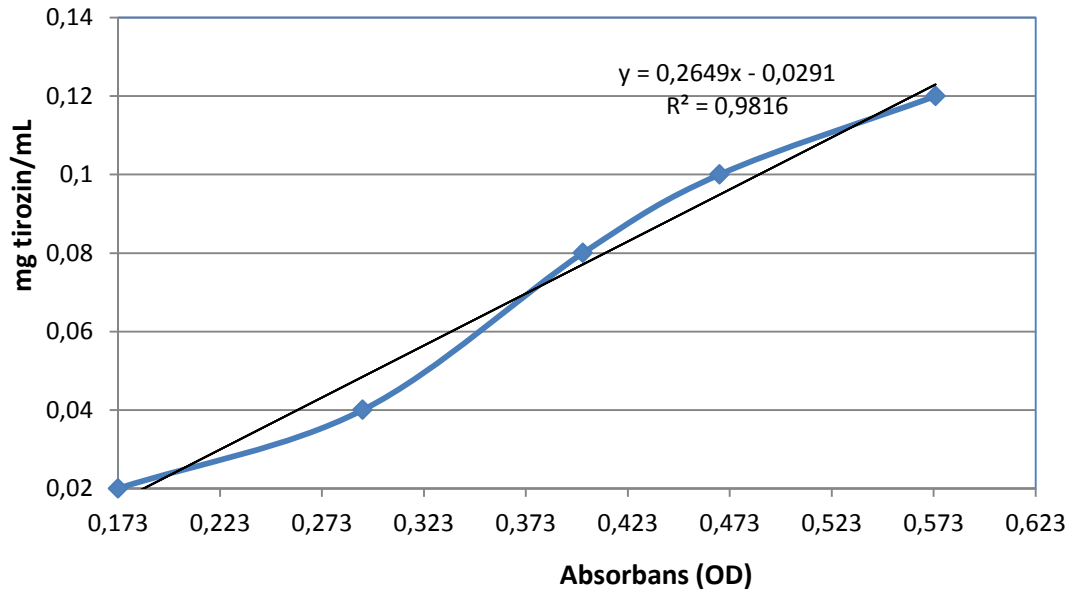
Besiyerleri			
Firma	MRS (log kob/mL)	PCA (log kob/mL)	YGC (log kob/mL)
F1	7,15	7,43	2,60
F2	9,44	8,58	5,43
F3	7,18	7,46	7,42
F4	8,42	8,43	5,42
F5	6,95	7,26	4,11
F6	7,28	8,97	6,34
F7	6,90	7,40	3,48
F8	6,85	7,30	7,53
F9	7,54	7,81	-
F10	7,43	8,11	-

(-) : Gelişme görülmemiştir.

Çalışmada MRS besiyerinde F2 örneğindeki LAB sayısı en yüksek 9,44 log kob/mL; en düşük ise F8 örneğinde 6,85 log kob/mL, PCA besiyerinde F6 örneğinde 8,97log kob/mL; en düşük ise F5 örneğinde 7,26 log kob/mL, YGC besiyerinde ise maya sayısı en yüksek F8 örneğinde 7,53 log kob/mL, en düşük ise F1 örneğinde 2,60 log kob/mL olarak bulunmuştur. Benzer bir çalışmada üç farklı yöntemle (geleneksel, birinci fermantasyonda starter kültür ve ikinci fermantasyonda starter kültür kullanılarak) üretilen şalgam suyu örneklerindeki LAB'ne ait kültürel sayım sonuçları sırasıyla 10,06; 9,70 ve 8,76 log kob/mL olarak belirlenmiştir (Sebat 2011). Elde ettiğimiz veriler daha önce yapılan bu çalışmayla uyumludur.

4.2 İzolatların Proteolitik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi

İzolatların proteolitik aktivite değerleri 3.2.6.'da açıklandığı gibi belirlenmiş olup, şekil 4.2'deki tirozin standart eğrisine göre mg tirozin/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1 650 nm dalga boyunda tirozin standart eğrisi



Şekil 4.2 Analizlerde kullanılan spektrofotometre (Shimadzu UV-1700 UV-VIS spectrophotometer, Japan)

Çalışma kapsamında izole edilen suşların proteolitik aktivite düzeyleri tirozin standardına göre hesaplanmış olup elde edilen veriler çizelge 4.2’de görülmektedir. Analizler 2 paralelli olarak yürütülmüştür.

Araştırmada 10 adet kefir örneği kullanılmış olmakla birlikte Kazakistan’dan gelen ve Kazakistan’dan gelen diğer örneklerde olduğu gibi F4 kodlu örnekte de inokülasyon sonrasında maya gelişimi gözlenmediği için PA miktarı da belirlenememiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 İzolatlara ait proteolitik aktivite değerleri

Firma	İzolot Numarası (PCA)	Proteolitik aktivite miktarı μg tirozin/mL	İzolot Numarası (MRS)	Proteolitik aktivite miktarı μg tirozin/mL	İzolot Numarası (YGC)	Proteolitik aktivite miktarı μg tirozin/mL
F1	P1	59,2	M1	64,4	Y1	150,2
	P2	50,8	M2	77,6	Y2	82,2
	P3	57,8	M3	60,2	Y3	145,3
F2	P4	47,1	M4	49,3	Y4	143,6
	P5	54,0	M5	51,9	Y5	122,1
	P6	36,4	M6	66,5	Y6	80,7
F3	P7	65,4	M7	100,0	Y7	(x)
	P8	46,4	M8	88,2	Y8	88,1
	P9	61,2	M9	88,2	Y9	135,3
F4	P10	60,4	M10	62,3	Y10	*
	P11	48,1	M11	49,3	Y11	
	P12	45,5	M12	47,4	Y12	
F5	P13	(x)	M13	31,1	Y13	64,7
	P14	36,7	M14	30,1	Y14	84,4
	P15	27,1	M15	30,5	Y15	93,9
F6	P16	25,4	M16	32,8	Y16	124,0
	P17	29,1	M17	37,9	Y17	124,0
	P18	(x)	M18	37,2	Y18	94,7
F7	P19	50,4	M19	19,7	Y19	98,6
	P20	51,2	M20	30,1	Y20	98,9
	P21	56,5	M21	29,8	Y21	106,6
F8	P22	85,4	M22	127,9	Y22	136,8
	P23	85,6	M23	45,4	Y23	103,7
	P24	65,5	M24	191,1	Y24	128,9
F9	P25	58,3	M25	62,8	Y25	56,5
	P26	70,1	M26	106,7	Y26	144,9
	P27	58,7	M27	97,3	Y27	91,1
F10	P28	37,6	M28	111,2	Y28	*
	P29	46,1	M29	30,5	Y29	
	P30	35,2	M30	23,6	Y30	
F11	P31	21,8	M31	133,7	Y31	*
	P32	21,2	M32	111,4	Y32	
	P33	26,3	M33	111,6	Y33	

(x) : Stokta kaybedilen izolat.

(*) : 4. 10. ve 11. firmaya ait örneklerin YGC Agar besiyerine ekimi sonucu herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.

Üç farklı besiyeri kullanılarak yapılan 3.2.3'te verildiği gibi izolasyon sonucu elde edilen izolatlara ait proteolitik aktivite değerleri incelendiğinde PCA besiyerinde en düşük PA özelliği gösteren iki kefir örneğinden (F6 ve F11) elde edilen izolatlarda PA

miktarı 21,2 ile 29,1 µg tirozin/mL aralığında belirlenmiştir. Buna göre F11 örneğinden izole edilen P32 izolatının 21,2 µg tirozin/mL ile en düşük olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.2). En yüksek PA miktarı F8 örneğinden izole edilen P22 izolatı 85,4 µg tirozin/mL ve P23 izolatı ise 85,6 µg tirozin/mL olarak belirlenmiştir. MRS besiyerinde en düşük PA özelliği gösteren kefir F7 örneğinden elde edilen 19,7 µg tirozin/mL ile M19 izolatı iken, en yüksek PA miktarı F8 örneğinden elde edilen 191,1 µg tirozin/mL ile M24 izolatı olduğu görülmektedir. Son olarak, YGC besiyerinde en düşük PA özelliği gösteren izolat, F9 örneğinden elde edilen 56,5 µg tirozin/mL ile Y25 izolatı iken, en yüksek PA miktarı F1 örneğinden izole edilen 150,2µg tirozin/mL ile Y1 suşu olarak belirlenmiştir.

Kazakistan'dan temin edilen F11, F10 ve F4 örnekleri dışında tüm kefirlerde maya gelişimi gözlemlendiği için PA miktarları araştırılmıştır. Fakat bu üç örnekte herhangi bir şekilde maya gelişimi olmamıştır.

Yoğurt ve peynir için starter kültür üretimi üzerine yapılan bir çalışmada *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izolatlarına ait proteolitik aktivite değerlerinin ise 0-0,984 mg tirozin/5 mL arasında değiştiği gözlenmiştir (Korkmaz 2011). Salamura beyaz peynir ile ilgili yapılan bir çalışmada ise *Lactococcus* suşlarının PA değerleri 25,4 ile 77,2 µg tirozin/mL *Enterococcus* suşlarınınki 29,3 ile 121,1 µg tirozin/mL aralığında bulunmuştur (Durlu- Özkaya 2001).

4.3 Proteolitik Aktivite Değerlerine göre Seçilen Suşların Uygun Kombinasyonlarının Oluşturulması

Proteolitik aktivite analizi sonucunda her üç besiyerinde gelişen, maksimum ve minimum PA değerlerine sahip 6 adet suş seçilmiş ve PA özellikleri çizelge 4.3'teki gibi bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Suşlara ait PA özellikleri

Suşlar	PA değerleri (µg/mL)
M24	191,1 (Maksimum)
M19	19,7 (Minimum)
P23	85,6 (Maksimum)
P32	21,2 (Minimum)
Y1	150,2 (Maksimum)
Y25	56,5 (Minimum)

Seçilen suşlar arasında uygun kombinasyonlar ise çizelge 4.4'te gösterildiği şekilde oluşturulmuştur.1., 2., 3. ve 4. kombinasyonlar laktik asit bakterisi olduğu düşünülen suşlar arasındaki PA değerinin kıyaslanması amacı ile, 3. ve 4. kombinasyonlar ise maya olduğu düşünülen suşların PA değerlerinin karşılaştırılması amacı ile seçilerek oluşturulmuştur.

Çizelge 4.4 Suşların kombinasyonlarının oluşturulması

Kombinasyonlar	Suşlar
1. Kombinasyon	M24 + P23 + Y1
2. Kombinasyon	M19 + P23 + Y1
3. Kombinasyon	P23 + M19 + Y25
4. Kombinasyon	P32 + M24 + Y1
5. Kombinasyon	Y1 + M19 + P32
6. Kombinasyon	Y25 + M24 + P23

Kombinasyonları oluşturulan ve karşılaştırılmak istenilen gruptaki suşların dışındaki diğer iki suş ise PA değerleri en yüksek olan suşlar olarak seçilmiştir. Böylece kombinasyon grupları arasındaki tek fark aynı mikroorganizma grubu içinde olduğu düşünülen suşlar arasında olacak şekilde bir araya getirilmiştir. Kombinasyonlar için seçilen üç suşun her birinden %1 (0,05 mL) oranında alınıp 5 mL'lik steril skim milk besiyerine inoküle edilmiş ve 28 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

4.4 Kombinasyonların Proteolitik Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi

İnkübasyon sonrasında gelişme gözlenen bütün tüplere PA analizi 3.2.6'da açıklandığı gibi uygulanmış ve sonuçlar çizelge 4.5'te verilmiştir. Buna göre; aynı grupta olduğu düşünülen suşlar M24, M19, P23, P32; Y1, Y25 arasındaki PA değeri farkının simbiyotik süreçte de değişmediğini yani PA değeri maksimum olan suşun kombinasyon oluşturulduktan sonra da PA düzeyi bakımından düşük olan suştan yüksek değerde olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca suşların tek başına sahip olduğu PA miktarının simbiyotik süreç (kombinasyonların oluşturulması) sonrasında belirlenen PA, her üç suşun PA değerlerinin ortalamasına yaklaştığı görülmektedir.

Çizelge 4.5 Kombinasyonlara ait PA değerleri

Kombinasyonlar	Proteolitik aktivite miktarı (µg/mL)
1. Kombinasyon	67,4
2. Kombinasyon	65,6
3. Kombinasyon	84,3
4. Kombinasyon	56,1
5. Kombinasyon	81,7
6. Kombinasyon	62,2

4.5 Kombine kültürler ile Kefir Yapılması ve Kefirlerin pH ve °SH değerlerinin Ölçülmesi

İzolatlar arasından seçilen 6 adet suş ile çizelge 4.3'te verildiği gibi üçlü kombinasyonlar oluşturulmuş ve bu kombine kültürlerden 0,5 mL alınıp steril cam şişeler içindeki 500 mL'lik ticari pastörize inek sütüne steril koşullar altında inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyon sonrası cam şişeler kapakları kapalı olarak 28°C'de 18 saat olmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi ve inokülüm miktarı, yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. Mayalanan kefir örneklerinin pH değerleri pH metre (620 Lab Ph Meter) ile ölçülmüş ve pH değerlerine ilişkin sonuçların birbirine yakın çıktığı gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Kombinasyonlardan mayalanan kefirlerle ait pH değerleri

Mayalanan Kefirler	pH
1. Kefir	4,04
2. Kefir	4,30
3. Kefir	3,99
4. Kefir	4,08
5. Kefir	3,98
6. Kefir	4,05

PA değeri yüksek olan suşların pH değerlerinin, PA değeri düşük olan suşlardan daha düşük olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada fermantasyon sonrası kefir örneklerinin pH ölçüm sonuçları 4,15-4,2 arasında değiştiğini göstermektedir (Anonim 2007). Bizim çalışmamızda da kombinasyon kültürlerle üretilen kefir örneklerinin pH değerlerinin 3,98-4,3 aralığında değiştiği ve daha önce yapılmış bu çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3 Kombinasyonların pH değerlerinin belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kefir üretimi için kullanılan ticari pastörize süt örneğine yapılan titrasyon asitliği tayini sonucu asitlik %5,5 bulunmuştur. Titrasyon asitliği °SH cinsine çevrilirken kullanılan formül; % asitlik = (°SH*0,022) şeklindedir ve bu formüle göre ticari süte ait °SH değeri 2,5 olarak hesaplanmıştır. Yüzde asitlikten °SH cinsine çevrilirken kefirler için de aynı formülden yararlanılmıştır ve her biri için aynı ticari süt örneği kullanılmak üzere mayalanan kefiirlere ait °SH değerleri çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Buna göre fermantasyon sonucu sütün °SH değerinde meydana gelen artış açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.7 Kombinasyonlardan mayalanan kefiirlere ait °SH değerleri

Mayalanan Kefirler	°SH
1. Kefir	43,53
2. Kefir	35,80
3. Kefir	40,50
4. Kefir	41,93
5. Kefir	45,00
6. Kefir	45,00

Laktik asit bakterisi olduğu tahmin edilen ilk dört suş arasında PA ve °SH değerleri arasında herhangi bir korelasyon olmadığı gözlenmiştir. Çünkü PA değeri yüksek olan suşun kullanıldığı 1. kefir örneğinde °SH değeri, karşılaştırılma yapılan 2. kefir örneğine göre yüksek çıkarken; PA değeri yüksek olan başka bir suşun kullanıldığı 3. kefir örneğinde, °SH değeri, karşılaştırılma yapılan 4. kefir örneğine göre düşük çıkmıştır. 5. ve 6. kefir örneklerinde ise PA değeri sırasıyla maksimum ve minimum olan iki farklı suş kullanılmış olmasına rağmen °SH değerleri aynı bulunmuştur.



Şekil 4.4 Kombinasyonların °SH değerlerinin belirlenmesi

4.6 Duyusal analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

On kişilik panel grubunun çizelge 3.1’de verilen kriterlere göre yapmış oldukları duyusal analiz sonuçlarının ortalamaları çizelge 4.9’da verilmiştir. Toplam puanlar göz önüne alınarak yapılan bu değerlendirmede en yüksek puanı 4. kombinasyon ile mayalanan kefirin aldığı gözlenirken, en düşük puanı ise 6. kombinasyon ile mayalanan kefirin aldığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.8 Duyusal analiz sonuç ortalamaları

	1. kefir	2. kefir	3. kefir	4. kefir	5. kefir	6. kefir
Görünüş	82	82	80	84	78	75
Renk	83	82	81	83	82	75
Koku	73	68	74	71	70	66
Homojen yapı	72	71	64	73	69	64
Ekşilik	27	28	28	29	26	28
Mayamsı tat	24	26	25	28	30	20
Alkol tadı	15	19	16	19	16	14
Ferahlatıcı tat	28	30	32	31	31	26
Yabancı aroma	10	12	16	12	13	10
Genel beğeni	74	69	72	75	72	65

4.7 Seçilen Bazı Suşların Biyokimyasal Tanımlamalarının Yapılması

Bu tez çalışması hızlandırılmış proje kapsamında Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir fakat ayrılan bütçenin kısıtlı olması sebebi ile mayaların tanımlanmasında kullanılması planlanan API ID 32 test kiti temin edilememiş tanımlama testleri muhtemel laktik asit bakterileri için gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakterisi olduğu düşünülen 4 adet izolat için biyokimyasal tanımlama testleri 3.2.8’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Testlere ait sonuçlar ise çizelge 4.8’de verildiği gibi izolatların hepsinin kok şeklinde, Gr (+),

hareketsiz, VP negatif, katalaz negatif olduğunu göstermektedir. Biyokimyasal testlerin sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984)'e göre değerlendirilip bu sınıflandırma dahilindeki gruplar esas alınarak adlandırılmıştır.

Çizelge 4.9 Suşlara ait biyokimyasal tanımlama test sonuçları

Testler	Suşlar			
	M24	M19	P23	P32
Gram reaksiyonu	+	+	+	+
Hücre Morfolojisi	Kok	Kok	Kok	Kok
Katalaz reaksiyonu	-	-	-	-
Oksidaz reaksiyonu	-	-	-	+
Hareketlilik	-	-	-	-
Glikozdan CO₂ üretimi	-	-	-	-
Arjinin hidrolizi	-	-	-	-
VP reaksiyonu	-	-	-	-
MR reaksiyonu	-	-	-	+
Karbonhidrat (Sakkaroz)fermantasyonu	+	+	+	+
10°C'de gelişme	-	-	-	-
45°C'de gelişme	+	+	-	+
pH 4,4'de gelişme	-	-	+	+
pH 9,6'da gelişme	+	+	+	+
%4 NaCl'de gelişme	+	+	+	+
%6,5 NaCl'de gelişme	+	+	-	-
%18 NaCl'de gelişme	-	-	-	-

+ : pozitif reaksiyon, - : negatif reaksiyon

Şalgam suyundan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve fenolik asit dekarboksilaz enzim üreten suşların seçimi üzerine yapılan bir çalışmada muhtemel laktik asit bakteri izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçlarına göre hücre morfolojisi kok olarak belirlenen suşların da hareketsiz, MR pozitif, katalaz negatif olduğu gözlenmiştir (Ayhan ve Güneş-Altuntaş 2014). Şalgamdan izole edilen laktik

asit bakterilerinin dekarboksilasyon aktivitelerinin ve biyojen amin üretme yeteneklerinin belirlenmesi ile ilgili bir çalışmada ise *Lactococcus* olarak tanımlanan izolatların 15°C ve 45°C’de üreyemedikleri 10°C’de ise gelişebildikleri gözlenmiştir (Mete 2011). Sonuçlarımızın daha önce yapılan bu çalışma ile uyumludur.

Günay (2012) tarafından yapılan Türkiye kökenli *Lactococcus* subsp. *lactis* suşlarının kromozal farklılıklarının tanımlanması ile ilgili bir çalışmada bu suşa ait bazı tanımlayıcı özelliklerin incelendiği üç farklı suşun incelendiği bu çalışmada izolatların hepsi katalaz (-) özellikte, 2 adedi arjinin (+), %4 NaCl ve 40°C’de gelişebilirken, 1 adedi de katalaz (-), %4 NaCl ve 40°C’de gelişme göstermediği açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda da 1 adet *Lactococcus* subsp. *lactis*, 2 adet *Streptococcus thermophilus* ve 1 adet *Leuconostoc* sp. olduğu düşünülen izolatlar biyokimyasal testlerle belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada hem geleneksel yöntemle mayalanan 2 adet kefir hem de ticari kefir olarak üretilen ve 8 ayrı firmadan temin edilen örnekler kullanılarak laktik asit bakterisi ve maya izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolatların Hull (1947) yöntemine göre PA değerleri belirlenmiştir. PA değerine göre seçilen 6 adet suş ile her biri 3 adet suştan oluşmak üzere 6 adet kombinasyon oluşturulmuştur ve bu kombinasyonların starter kültür olarak kullanılmasıyla da kefir üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen kefirlerin PA değerlerinin kontrolü sağlanıp izolatların simbiyotik süreçteki PA değerleri de izlenmiştir. Her ne kadar proje önerisinde bu basamak önerilmemişse de kefirlerin duyuşsal analiz değerlendirmesi yapılmış (Güzel-Seydim vd 2007) ve duyuşsal analiz sonuçlarının olumlu olması üzerine biyokimyasal testlerle izolatların identifikasyonları yapılmıştır.

Bu proje kapsamında yapılan araştırma sonuçlarına göre;

Birbirinden farklı 10 adet kefirde, laktik asit bakterisi olduğu tahmin edilen 58 ve maya olduğu düşünölen 24 adet olmak üzere toplam 82 adet izolat elde edilmiştir. Her bir izolat, ait olduğu öngörölen mikroorganizma grubunun özelliklerine göre muhafaza edilmiştir. Sonrasında PA değerlerinin belirlenmesi için uygun koşullarda aktifleştirilmiş ve Hull (1947) yöntemine göre 3.2.6'da anlatıldığı gibi PA değerleri belirlenmiştir. PA sonuçları incelendiğinde, PCA ve MRS besiyerlerinden izole edilen bakterilerin PA değerlerinin birbirine yakın olduğu, YGC besiyerinden izole edilen ve maya olduğu düşünölen izolatların PA değerlerinin ise diğere iki besiyerine göre farklı seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Yalnızca bu değerlere bakılarak PCA ve MRS besiyerinden izole edilen bakterilerin laktik asit bakterisi, YGC'den izole edilenlerin ise maya olduğu sonucuna varılamamaktadır. Fakat PA değerlerine ilişkin sonuçlar başlangıç aşamasında izolatlar hakkında bir ön fikir oluşturmuş ve izolatların PA düzeylerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Her üç besiyerinden elde edilen izolatların PA değerleri dikkate alınarak en yüksek ve en düşük PA değerine sahip 6 adet suş seçimi gerçekleştirilmiştir. Seçilen suşlar M24, M19, P23, P32, Y1 ve Y25 kodlu suşlardır. Bu suşların kombinasyonları çizelge 4.4'te verildiği gibi oluşturulmuştur. Buna göre en yüksek PA değerine sahip kefir 3. kombinasyondan mayalanan, en düşük değer ise 4. kombinasyondan mayalanan kefir olarak belirlenmiştir. Tek başına PA değeri en yüksek olan suş M24 iken simbiyotik süreçte en yüksek değer P23 suşunun kullanıldığı kombinasyon olarak bulunmuştur.

Üretilen kefiirlere ait pH ve °SH değerlerinin karşılaştırılan suşlar arasında her iki özellik bakımından da önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir. En yüksek PA değerine sahip P23 kodlu suşun pH değerinin en düşük olduğu gözlenmiştir.

Görünüş, renk, koku, homojen yapı, ekşilik, mayamsı tat, alkol tadı, ferahlatıcı tat, yabancı aroma ve genel beğeni özelliklerinin değerlendirildiği duyuşal analiz değerlendirme sonuçlarına göre bu 10 adet özellik bakımından en yüksek beğeniye 4. kombinasyondan (P32+M24+Y1) mayalanan kefir alırken en düşük beğeniye ise 6. kombinasyondan (Y25+M24+P23) mayalanan kefir almıştır. En yüksek beğeniye alan 4. kefirin PA değeri diğer altı kefir içinde en düşük olarak bulunmuştur

Kefirden izole edilen laktik asit bakterileri arasından PA değeri en yüksek ve en düşük olan 4 adet suşa biyokimyasal testler uygulanmış, sonuçlar 1984 yılında yayınlanan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'e göre değerlendirilmiş ve suşlar tanımlanmıştır. Buna göre; M24 ve M19 kodlu suşların *Streptococcus thermophilus*, P23 kodlu suşun ise *Lactococcus subsp lactis*. ve P32 kodlu suşun *Leuconostoc* sp. olduğu düşünülmektedir. Şalgam suyundan izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA ile tanımlanması ve bazı gelişme parametrelerinin belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile tanımlanan izolatin API 50 CHL testi sonucundan farklı çıktığı gözlenmiştir (Samantır ve Ayhan 2014). Sucuktan izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel özelliklerinin belirlenmesi ve bakteriyosin üreten türlerin seçimi hakkında yapılan bir çalışmada da izolatların tanımlaması için API 50 CHL testi tercih edilmiştir (Ayhan vd. 2008). Buna göre

gelecek çalışmalarda, biyokimyasal tanımlama testlerinin yanında moleküler ve hızlı test kitleleri ile de doğrulama yapılması sonuçların kesinliği açısından önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, kefir yapımında kullanılan starter kùltürün PA değeri bakımından değerlendirilmesi hakkında şimdiye kadar sınırlı araştırma olduğunu ve bu çalışmanın sonuçlarının gelecekte yapılacak bu konu hakkındaki pek çok araştırma için kaynak olacağını söyleyebiliriz. Ek olarak, proje süresinin ve bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle izole edilen başta mayalar olmak üzere tüm izolatların identifikasyonunun yapılması bu proje ile mümkün olamamıştır. Özellikle seçilen suşların starter olma özelliklerinin belirlenmesi, kefir üretimindeki davranışlarının incelenmesi ve suşların optimum gelişme parametrelerinin de irdelenmesi gerekmektedir. Suş kombinasyonlarının sayısının arttırılması, kombinasyonlar ile mayalanan kefirlerin duyusal analizlerinin ve doğru starter kùltür seçiminin yapılabilmesi ancak yeni bir proje çalışmasıyla yapılabileceği gör÷lmektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2001. Ege Üni. Zir. Fak. Süt Teknolojisi Bölümü ‘Kefir Tanıtım Broşürü’, İzmir.
- Anonim. 2007. MEGEP, MEB, (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi) Gıda Teknolojisi, Milli Eğitim Bakanlığı, 2007.
- Anonim. 2009. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığında: Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünler Tebliği (Tebliğ No: 2009/25).
- Altuntaş, E. G., Ayhan, K., Okcu, G., Erkanlı, K., Balcı, M. H. ve Sonakın, S.S. 2009. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri. Gıda-Journal of Food, Cilt 35(3); 197-203.
- Altuntaş, E. G. 2011. Bakteriyosin Üreten *Pediococcus* sp. 13 Suşunun 16S r RNA ile Tanımlanması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Böl. Ankara.
- Axelsson, L. T. 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, (S. Salminen and An von Wright, editörler), Lactic Acid Bacteria, Markel Dekker, Inc., New York, 442 p.
- Ayhan, K. ve Coşansu, S. 1998. Fermente et ürünlerinde starter kültür kullanımı ile patojenlerin inhibisyonu. Gıda dergisi, Cilt 23(2); 95-100.
- Ayhan, K., Coşansu, S., Mol, S. ve Altuntaş, E. G. 2008. Sucuktan izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel özelliklerinin belirlenmesi ve bakteriyosin üreten türlerin seçimi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No:20070745001HPD, 31, Ankara.
- Ayhan, K. ve Altuntaş, E. G. 2010. Süt ve Süt Ürünlerinde Bakteriyosinlerin Kullanımı, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt:16, Sayı:1, 113-120.
- Ayhan, K. ve Altuntaş, E. G. 2014. Şalgam Suyundan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve Fenolik Asit Dekarboksilaz Enzim Üreten Suşların Seçimi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No:12B4343005.
- Aysun, M. 2011. Şalgamdan izole edilen laktik asit bakterilerinin dekarboksilasyon aktivitelerinin ve biyojen amin üretme yeteneklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 51, Sakarya.
- Beshkova, D.M., Simova, E.D., Simov, Z.I., Frengova, G.I. and Spasov, Z.N. 2002. Pure Cultures for Making Kefir. Food Microbiology, 19, 537-544 p.

- Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I., Simov, Z.I. and Dimitrov, Zh.P. 2003. Production of volatile aroma compounds by Kefir starter cultures. *International Dairy Journal* 13 (2003) 529-535 p.
- Bilici, S., Köksal, E., Küçükerdönmez, Ö. ve Şanlıer, Nevin. 2012. Consumers' Kefir consumption: A pilot study in Turkey. *Health Med*;2012, Vol. 6 Issue 7, 997 p.
- Carasi, P., Díaz, M., Racedo, SM., De Antoni, G., Urdaci, MC. and Serradell, Mde. L. 2014. Safety Characterization and Antimicrobial Properties of Kefir-Isolated *Lactobacillus kefir*. *Biomed Res Int.* 2014;2014:208974.
- Carr, F. J., Chill, D. and Maida, N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 28(4), 281-370 p.
- Chen, H.C., Wang, S.Y. and 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 p.
- Cooper, J. D., Stewart, G. G. and Bryce, H. J. 2000. Yeast proteolytic activity during high and low gravity wort fermentations and its effect on head retention. *International Centre for Brewing and Distilling, Heriot-Watt University, Edinburgh, Scotland.*
- Coşansu, S. 2009. Determination of Biogenic Amines in Fermented Beverage, Boza, *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol. 7(2): 54-58 p.
- Coşansu, S. and Ayhan, K. 2012. Effects of lactic and acetic acid on survival of *Salmonella enteritidis* during refrigerated and frozen storage of chicken meats. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1); 372-377 p.
- Çakmakçı M. L., Karahan G. A. ve Arıdoğan-Cicioğlu B. 2002. Genel mikrobiyoloji uygulama kılavuzu, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No:24, 171, Isparta.
- Dalie, D. K. D., Deschamps, A. M. and Richard-Forget, F. 2010. Lactic acid bacteria potential for control of mould growth and mycotoxins. *Food Control*, 21 (2010); 370-380.
- Fal'berg, L.V. 1987. New milk products. *Molochnaya Promyshlennost. Dairy Science Abstract* (731), pp.18-19.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G. and Antoni, G.D. 1997. Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology*, 30, pp.77-84.
- Giori, G.S., de Valdez, G.F., de Holgado, A.P.R. and Oliver, G. 1985. Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria, *J. Dairy Scienc.*, 68,2160-2164.

- Golowczyc, M., Gugliada MJ, Hollmann A, Delfederico L, Garrote GL, Abraham AG, Semorile L and De Antoni G. 2008. Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. J Dairy Res. 2008 May;75(2): 211-7 p.
- Gökçe, R. ve Üstün G. 2011. Yurtdışında üretilen fermente süt içecekleri. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Günay, Ö. 2012. Türkiye kökenli *Lactococcus lactis* suşlarının kromozal farklılıklarının tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, 85, Ankara.
- Güzel-Seydim, Z. B., Wyffels, J.T., Seydim, A.C. and Greene, A.K. 2005. Turkish kefir ve kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. International Journal of Dairy Technology. 58 (1), 25-29.
- Güzel-Seydim, Z. B., Soyyiğit, H. ve Okur, Ö. D. 2007. Fonksiyonel özellikleri geliştirilmiş yoğurt üretimi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Müh. Böl., Gıda, 33 (2): 57-67, Isparta.
- Güzel-Seydim, Z. B., Kök-Taş, T., Greene, A. K and Seydim, A. C. 2011. Review: Functional Properties of Kefir, Critical Reviews in Food Science and Nutrition Volume 51, Issue 3, 51 (3): 261-268.
- Hafliger, M., Spillmann, H., and Puhon, Z. 1991. Kefir-a fascinating cultured milk product. Lebensmittel industrie und Milchwirtschaft 112 (13) p. 370-375. Dairy Science Abstract (5575), 1993.
- Halkman A. K. 2005. Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., 358, Ankara.
- Harrigan, W. F and McCance, M. E. 1990. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, 8th edn., Academic Press, London, 452 p. Irigoyen, A., Akana, I., Castiella, M., Torre, P. and Ibanez, F.C. 2005. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. Food Chemistry 90, 613-620.
- Kabadjova-Hristova, P., Bakalova, S., Gocheva, B. and Moncheva, P. 2006. Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains. Sofia University, Biological Faculty, Department of Microbiology, Sofia, 89-94 Bulgaria.
- Karagözlü, C. 2003. Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi, Çiftçi Broşürü:44, E.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, 141-148, İzmir.
- Koroleva, N.S. 1988. Starters for fermented milks. Science and Technology of Fermented Milks. Bulletin of IDF 227, 35-40, Brussels.

- Konar, A. ve Şahan, N. 1989, İnek, keçi ve koyun sütlerinden üretilen kefirlerin özellikleri ve bu özelliklere olgunlaştırma süresinin etkisi üzerine bir araştırma, Bursa I. Uluslararası Gıda Sempozyumu, 184-187, Bursa.
- Korkmaz, A. G. 2011. Yoğurt ve peynir için starter kültür üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 73, Ankara.
- Kök-Taş T., Öker A. ve İlkey E. 2013. Pekmez ve erik kullanılarak üretilen kefirlerin bazı kalite kriterlerinin belirlenmesi, 8. Gıda Mühendisliği Kongre Kitabı, 180, Ankara.
- Kunitz M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. Gen. Physiol., 30, 291-310, New Jersey.
- Kurmann, J.A., Rasic, J.L. and Kroger, M. 1992. Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products. Published by Van Nostrand Reinhold, NewYork, 156-161 p.
- Law, R.A. and Kolstad, J. 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria, Ant. van Leeuwen., 49,225- 245 p.
- Lawless, HT. and Heymann H, 1999. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices. A Chapman and Hall Food Science Book. An Aspen Publicatio, 848 p.
- Mıdık, F. 2011. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi Yönünden İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 60, Ankara.
- Molokeev, A.V., Baybakov, V.I., Nikulin, L.G., Karih, T.L., Yatsentyuk, R.M. and Molokeeva, N.V. 1998a. A technique for manufacturing bifidokefir and study of it useful properties. Bioteckhnologiya 14 (4) 86-91 p.
- Molokeev, A.V., Baybakov V.I., Karih, T.L., Nikulin, L.G., Yatsentyuk, R.M. and Molokeeva, N.V. 1998b. Bifidokefir-therapeutic and prophylactic product. Pishchevaya Promyshlennost 3, 61-62 p.
- Muir, D.D., Tamime, A.Y. and Wszolek, M . 1999. Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yogurt. International Journal of Dairy Technology, 52 (4), 129-134 p.
- Okcu, G. 2010. Laktik asit bakterileri ve gıdalardaki fenolik bileşikler.Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 30, Ankara.
- Özdestan, Ö. ve Üren, A. 2010. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product, Eur Food Res Technology 231:101-107.

- Özkaya-Durlu F. 2001. Salamura Beyaz Peynirden İzole Edilen Bazı Laktokok, Enterekok ve Laktobasil Suşlarının Proteolitik Aktivite, Bakteriyosin Etkenliği ve Biyogen Amin Oluşumu Açısından Karşılaştırılması. Doktora tezi Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Böl. Ankara.
- Rasic, J.L. and Kurman, J.A. 1978. Yogurt technology, manufacture and preparation, D.K. 27, 20, Vanlose Copenhagen, 466 p.
- Samantır, N. 2012. Laktik asit bakterilerinin gıdalarda küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun engellenmesindeki rolü, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 37, Ankara.
- Samantır, N. 2014. Şalgam Suyundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması ve Bazı Gelişme Parametrelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Böl., 85, Ankara.
- Sebat, C. 2011. Starter kültür kullanılarak üretilen şalgam suyunda biyojen amin miktarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 40, Sakarya.
- Seçkin, A. K., Tosun, H. ve Aritürk, R. 2010. Biyokorumanın Süt Endüstrisinde Kullanım Olanakları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5(3); 36-46 p.
- Şener, A. 2009. Serbest ve Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Ticari Dondurma Üretiminde Kullanılabilirliği Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 29, Ankara.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu yayınları:96, Yükseköğretim dizisi: 29, ISBN 975-7527-76-9, 274, Ankara.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji, Bölüm 13 Enerjinin fermantasyon ile kazanılması (322-323). Pelin Ofset, ISBN: 978-605-603-62-0-0, 448, Ankara.
- Uslu G. 2010. Ankara piyasasında satılan mikrobiyolojik, fiziksel, kimyasal ve duyuşal özellikleri üzerine bir araştırma, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Böl. Ankara.
- Üstün, R. ve Üstün, Ö. 2001. Yurtdışında üretilen fermente süt içecekleri, Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Müh. Derg. (10): 24-29.
- Yüksekdağ, Z. N. ve Beyatlı, Y. 2003. Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Yıl: 2003 Cilt: 01 Sayı: 02, 49-69.
- Yaygın H., 1994. 'Kefir, Kıymız ve Özellikleri' III. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu' Ankara-1995.

EKLER

EK 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

EK 2 Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

EK 3 Kefir Duyusal Analiz Değerlendirme Formu

EK 1 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

1.1 Plate Count Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 25,5 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, cam şişelere 500 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 7,0±0,2).

1.2 MRS Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 68,2 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, cam şişelere 500 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 5,7±0,2).

1.3 MRS Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 52,2 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş ve tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 5,7±0,2).

1.4 YGC Agar (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 40 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, cam şişelere 500 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petri kutularına dağıtılmıştır (pH 7,3±0,2).

1.5 Tryptic Soy Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 30 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7,3±0,2).

1.6 Fenol Red Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 15 g alınıp 800 mililitre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 4'er mL olacak şekilde dağıtılmış ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonra tüplerin içerisine daha önceden 0,5 g/10 mL olarak hazırlanıp fitre ile sterilize edilmiş glikozdan tüplerdeki besiyerine 1 ml eklenmiştir (pH 7,4±0,2).

1.7 Metil Red – Voges Proskauer Broth (Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 17 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve sonra 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 6,9±0,2).

1.8 SIM Medium (Sulfate, Indole, Motility Medium, Merck)

Ticari olarak bulunan bu besiyerinden 30 g alınıp 1 litre destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 7 mL olacak şekilde dağıtılmış ve ve sonra 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7,3±0,2).

1.9 Skim Milk(Sigma-Aldrich) Besiyeri

Ticari olarak bulunan skim milk powder (Sigma-Aldrich)' dan 10 g alınıp destile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Tüplere önce 1 g CaCO₃ eklenip, sonra hazırlanmış olan skim milk çözeltilisinden 10 mL eklenmiştir. Hazırlanan tüpler, 110°C sıcaklıkta 15

dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon süresi boyunca canlı mikroorganizma kalmış olma ihtimaline karşı 37°C’de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

1.10 Gliserol (Merck) Saklama Sıvısı

Ticari olarak bulunan gliserolden (Merck) Eppendorf tüplerine 0,5 ml olmak üzere dağıtılıp ve ardından 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir.

EK 2 ARAŞTIRMADA KULLANILAN KİMYASALLAR

1. Hull Metodunda Kullanılan Çözeltiler

Triklorasetik asit: 0,72 N TCA (Sigma-Aldrich) hazırlamak için 1,18 g TCA tartılmış ve 10 ml saf su ilave edilmiştir.

Na₂CO₃-Na₄P₂O₇ çözeltisi (Sodyum karbonat-tetrasodyum pirofosfat) :75 g Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich) ve 10 g Na₄P₂O₇ (Merck) 500 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

Fenol ayracı: Bir birim Folin ciocalteus (Sigma-Aldrich) çözeltisi, iki birim saf suyla karıştırılarak ve kullanmadan önce taze olarak hazırlanmıştır.

Tirozin standart kurvesinin hazırlanışı: 100 mL tirozin (Merck) 250 mL saf suyun içinde çözülmüştür. Hazırlanan çözeltilerden 5, 10, 15, 20, 25 ve 30'ar mL alınıp her biri 100 mL'ye tamamlanmıştır ve konsantrasyonları 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 ve 0,12 mg tirozin/mL saf su olacak şekilde standart çözeltiler oluşturulmuştur. Hull (1947) metodunda anlatılan işlemler sırası ile bu çözeltilere uygulanıp standart kurve çizilmiştir (Özkaya-Durlu 2001).

2. NaOH (1 N) Çözeltisi

1 g NaOH (Sigma-Aldrich) tartılıp 25 mL saf su içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

3. HCl (1 N) Çözeltisi

0,9 g HCl (Merck) 25 mL saf su içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

4. Fenolftalein Çözeltisi

%1'lik fenolftalein (Merck) çözeltisi için 1 g fenolftalein 50 mL %95'lik etil alkolde çözüldürülmüş ve 100 mL'lik balonjojeye aktarılmıştır. Hacim çizgisine kadar %95'lik etil alkol ile tamamlanmıştır.

5. Barzit (α - naftol)

0,5 g α - naftolün 10 mL mutlak etil alkol içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.

6. O'meara (% 40'lık Potasyum Hidroksit) Çözeltilisi

4 g KOH'ın 10 mL destile su içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

7. Metil Red İndikatörü

0,1 g metil kırmızısının 300 mL % 95'lik alkol içinde çözülmesi sonrasında bu çözeltinin destile su ile 500 mL'ye tamamlanması şeklinde hazırlanmıştır.

EK 3 KEFİR DUYUSAL ANALİZ DEĞERLENDİRME FORMU

KEFİR DUYUSAL ANALİZ DEĞERLENDİRME FORMU

PANELİSTİN ADI SOYADI:

TARİH:

Tadıma başlamadan önce ve tadım esnasında örnekler arasında bir önceki örnekten ağzınızda kalan tadı su ve ekmek ile giderin.

Her bir örnek ve duyuşsal karakteristik için belirtilen skaladan bir numara kodlamayı unutmayın.

Örnek kodu	Görünüş	Renk	Koku	Homojen yapı	Ekşilik	Mayamsı tat	Alkol tadı	Ferahlatıcı tat	Yabancı aroma	Genel beğeni
248										
316										
205										
931										
416										
845										

1	Aşırı kötü	1	Çok az
2	Çok kötü	2	Az
3	Kötü	3	Orta
4	Ortanın altı kötünün üstü	4	Fazla
5	Orta	5	Çok fazla
6	İyinin altı ortanın üstü		
7	İyi		
8	Çok iyi		
9	Mükemmel		

*: 1,2,3,4 ve 10. özellik için 1-9 arasındaki puanlama kullanılmıştır.

EK NOTLAR:

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esin ORHAN

Doğum Yeri : Tunceli

Doğum Tarihi : 16.06.1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Tunceli Anadolu Lisesi (2005)

Lisans : Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
(2010)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı (Şubat 2013- Temmuz 2014)

Çalıştığı Kurum ve Yılı :

Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi 2012-