

**T.C.  
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA ANABİLİM DALI**

**GELENEKSEL KEFİR DANELERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİ VE MAYALARIN TANIMLANMASI İLE BU  
MİKROORGANİZMALARIN BAZI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kübra PURUTOĞLU**

**Aralık-2018  
BAYBURT**



**GELENEKSEL KEFİR DANELERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİ VE MAYALARIN TANIMLANMASI İLE BU  
MİKROORGANİZMALARIN BAZI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Kübra PURUTOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ**

**T.C.  
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA ANABİLİM DALI**

**GELENEKSEL KEFİR DANELERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİ VE MAYALARIN TANIMLANMASI İLE BU  
MİKROORGANİZMALARIN BAZI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kübra PURUTOĞLU**

**2018**

**BAYBURT**

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAY SAYFASI

### Geleneksel Kefir Danelerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların Tanımlanması İle Bu Mikroorganizmaların Bazı Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Doç. Dr. Enes DERTLİ danışmanlığında, Kübra PURUTOĞLU tarafından hazırlanan bu tez çalışması 14/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL

İmza : M. Şengül

Üye : Doç. Dr. Engin ŞAHİN

İmza : Engin Şahin

Üye : Doç. Dr. Enes DERTLİ

İmza : Enes Dertli

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

  
Prof. Dr. Metin UÇURUM  
Enstitü Müdürü (V.)

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

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bu çalışmada şahsıma ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Kübra PURUTOĞLU

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### GELENEKSEL KEFİR DANELERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ VE MAYALARIN TANIMLANMASI İLE BU MİKROORGANİZMALARIN BAZI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kübra PURUTOĞLU

Bayburt Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ

Bu çalışmada Türkiyenin çeşitli illerinden (İstanbul, İzmir, Bursa, Erzurum, Erzincan) temin edilen altı adet geleneksel kefir daneleri aktifleştirildikten sonra Laktik Asit Bakterileri ve mayaların izolasyonu, tanımlanması ve LAB türlerinin fonksiyonel özelliklerinin açığa çıkarılması işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kefir danelerinden LAB ve maya türleri izole edilerek öncelikle farklı türlerin ortaya konması açısından RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA) PCR işlemi uygulanmıştır. Takiben kefir danelerinde yer alan bakteriyel türler *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranoformans subsp.*, *kefirgranum*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus kefiranoformans*, *Lactobacillus otakiensis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. hordniae*, *Acetobacter fabarum*, *Enterococcus durans*, *Acetobacter okinawensis*, *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans*, *Lactobacillus paracasei* ve *Acetobacter orientalis* olarak tanımlanmıştır. Kefir danelerinden izole edilen maya türleri ise *Pichia kudriavzevii*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces marxianus* olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca tanımlanan Laktik asit bakterilerinin antifungal, antimikrobiyal özellikleri, antibiyotik dirençleri ve ürettikleri ekzopolisakkarit (EPS) miktarı ve EPS karakteristikleri belirlenmiştir.

Kefir izolatlarının (*L. diolivorans*, *L. lactis*, *L. kefiranoformans*, *L. otakiensis*, *L. paracasei*, *L. kefir*) önemli düzeyde antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuş ve bu fonksiyonlarda tayin edilen suşa özgü özellikler gözlenmiştir. Test edilen tüm laktik asit bakterilerinin glukoz ve galaktoz içeren ekzopolisakkarit (EPS) ürettiği ve diğer taraftan bazı suşlarının homopolimerik fruktan tipi EPS ürettiği belirlenmiştir. Kefir izolatları arasında EPS üretim miktarının benzer olduğu ortaya konulmuştur ( $p>0.05$ ). Sonuç olarak; bu çalışma ile kefir danelerinin zengin mikroflorası ortaya konulmuş, kefire fonksiyonel özellik kazandıran türler ve bunların fonksiyonel etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

**2018, 80 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Kefir danesi, LAB, Fonksiyonel gıdalar, Probiyotik, Ekzopolisakkarit

## ABSTRACT

MS Thesis

### DETERMINATION OF SOME FUNCTIONAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA AND YEASTS ISOLATED FROM TRADITIONAL KEFIR GRAINS

Kubra PURUTOGLU

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

Department of Food Engineering  
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Enes DERTLI

In this study, Lactic Acid Bacteria (LAB) and yeast species were isolated and identified from Kefir grains following the activation of the kefir grains collected from different regions of Turkey (İstanbul, İzmir, Bursa, Erzurum, Erzincan) and the functional characteristics of kefir isolate LAB species were determined. For the discrimination of LAB and yeast isolates RAPD-PCR analysis was applied followed by the genotypic identification of the distinct isolates and in this study *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus otakiensis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Acetobacter fabarum*, *Enterococcus durans*, *Acetobacter okinawensis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus paracasei* and *Acetobacter orientalis* were isolated as bacterial species and *Pichia kudriavzevii*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces marxianus* were the yeast isolates. The functional characteristics of LAB species in terms of antifungal and antibacterial activity, antibiotic resistances and the level of exopolysaccharide (EPS) production and the EPS production characteristics were determined.

Important levels of antibacterial and antifungal activities were observed in kefir isolates (*L. diolivorans*, *L. lactis*, *L. kefiranofaciens*, *L. otakiensis*, *L. paracasei*, *L. kefir*) and these functions were altered depending on strain specific conditions. All LAB species tested produced a heteropolymeric EPS containing glucose and galactose and some strains produced a fructan type EPS. The level of EPS production among the kefir isolates were observed to be similar ( $p>0.05$ ). In conclusion, this study revealed the rich microflora of kefir grains and the functional characteristics of the isolates in which their presence results in the functional roles of kefir.

**2018, 80 pages**

**Keywords :** Kefir grains, LAB, Functional foods, Probiotics, Exopolisaccharides

## TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında fikirlerine başvurduğum, çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, bilimsel çalışma anlayışı ve bilgisiyle beni yönlendiren değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Enes DERTLİ'ye,

Laboratuar çalışmalarımda desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen ve her konuda yardımcı olan sevgili arkadaşım Hümeysra İSPİRLİ'ye,

HPLC çalışmalarımda yardımcı olan Öğretim Görevlisi Mustafa Onur YÜZER'e

Araştırma süresince birlikte çalıştığımız arkadaşlarım, Caner TOZLU'ya, Selda ÖKSÜZ'e

Kefir danesi temininde yardımcı olan Safa BEKMEZCİ'ye, Medine TÜYLÜ'ye ve Yerel Toplum Gönüllüleri Yöneticisi Ruhi ÖNKAL'a

Eğitimimde, öğrenimimde ve hayatım boyunca beni hep destekleyen ve bu günlere gelmemde çok büyük emek harcayan başta annem Ayşe PURUTOĞLU'na, ablam Müberra PURUTOĞLU'na, abim İsmet PURUTOĞLU'na ve tüm aileme çok teşekkür ederim.

Kübra PURUTOĞLU

Aralık /2018



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>5</b>
2.1. Kefir Danesi ve Danesinde Bulunan LAB.....	5
2.2. Kefir Danesinde Bulunan Mayaların Biyokimyasal Özellikleri.....	7
2.3. Kefir Danesinde Bulunan LAB ve Mayalar Arasındaki Simbiyotik ilişki.....	9
2.4. Kefirin Bileşimi.....	10
2.5. Kefir Üretimi.....	13
2.6. Kefirin Fonksiyonel Özelliği.....	13
2.6.1. Kefirin potansiyel antikanserojen etkisi.....	17
2.6.2. Kefirin potansiyel hipokolesterolemik etkisi.....	18
2.6.3. Kefirin potansiyel antialerjik etkisi.....	18
2.6.4. Kefirin potansiyel antioksidant etkisi.....	19
2.6.5. Kefirin potansiyel antiinflamasyon etkisi.....	19
2.6.6. Kefirin kan basıncı üzerine etkisi.....	19
2.6.7. Sindirim sistemi üzerine etkisi.....	20
2.6.8. Kefirin potansiyel antimikrobiyal etkisi.....	20
2.6.9. Kefirin potansiyel antifungal etkisi.....	21
2.7. Tezin Amacı.....	22

<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>23</b>
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kefir danesi örnekleri.....	23
3.1.2. Besiyerleri.....	23
3.1.3. Primerlerin seçimi.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Kefir danelerinin aktifleştirilmesi ve çoğaltılması.....	24
3.2.2. Kefir danelerinde yapılan analizler.....	24
3.2.2.1. <i>Lactobacillus</i> spp. sayısının belirlenmesi.....	25
3.2.2.2. <i>Lactococcus</i> spp. sayısının belirlenmesi.....	25
3.2.2.3. Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı.....	25
3.2.2.4. Maya sayısı.....	25
3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu.....	26
3.2.3.1. Kültür ortamı.....	26
3.2.3.2. Bakteriyel suşlar ve gelişme koşulları.....	26
3.2.3.3. Maya türlerinin izolasyonu.....	26
3.2.3.3.1. Kültür ortamı.....	26
3.2.3.3.2. Maya türlerinin izolasyonu ve gelişme koşulları.....	26
3.2.4. Kültür stoklarının oluşturulması ve izolatların depolanması.....	27
3.2.5. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması.....	27
3.2.5.1. Fenotipik tanımlama.....	27
3.2.5.1.1. Koloni morfolojisi.....	27
3.2.5.1.2. Gram boyama.....	27
3.2.5.1.3. Katalaz testi.....	28
3.2.5.2. Genotipik olarak Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanması.....	28
3.2.5.2.1. Genomik DNA izolasyonu.....	28

3.2.5.2.2. RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon.....	29
3.2.5.2.3. 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu.....	29
3.2.5.2.4. 26S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu.....	30
3.2.5.2.5. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü.....	31
3.2.5.2.6. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	32
3.2.5.2.7. Dizi analizi.....	32
3.2.6. İzole edilen bakterilerin filogenetik analizi.....	33
3.2.7. Kefir izolatlarının gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi.....	33
3.2.8. Kefir izolatlarının küf türlerine karşı antifungal aktivitelerinin belirlenmesi belirlenmesi.....	33
3.2.9. Kefir izolatlarının antibiyotik hassasiyetinin ölçülmesi.....	34
3.2.10. Farklı türün EPS üretimi.....	34
3.2.11. Fenol-sülfirik asit testi ile EPS üretim analizi.....	35
3.2.12. Ekzopolisakkaritlerin kompozisyonunun HPLC belirlenmesi.....	36
3.2.13. İstatistiksel analiz.....	36
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>37</b>
4.1. Kefir Danelerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	37
4.1.1. Kefir danelerinin <i>Lactobacillus</i> spp. sayısı.....	37
4.1.2. Kefir danelerinin <i>Lactococcus</i> spp. sayısı.....	38
4.1.3. Kefir danelerinin Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri sayısı.....	38
4.1.4. Kefir danelerinin maya sayısı.....	39
4.2. Kefir Danesinde Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların Tanımlanması.....	39
4.3. LAB Türlerinin Tanımlanması .....	40
4.3.1. RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon.....	40

4.3.2. Laktik asit bakterilerinin türlerinin tanımlanması için 16S rRNA gen dizisi analizi.....	43
4.3.3. Maya türlerinin tanımlanması için 26S rDNA gen dizisi analizi.....	44
4.4. İzole Edilen Bakterilerin Filogenetik İlişkisi.....	45
4.5. Kefir İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	47
4.6. Kefir İzolatlarının Küf Türlerine Karşı Antifungal Aktiviteleri.....	49
4.7. Kefir İzolatlarının Antibiyotik Direnci.....	51
4.8. LAB Türlerinin EPS Üretim Miktarı ve Temel EPS Yapısının Açığa Çıkartılması.....	53
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>58</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>77</b>
EK 1 Maltoz, glukoz, galaktoz, fruktoz'un standart HPLC kromatogramı.....	77
EK 2 <i>L. kefir</i> KF8 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	77
EK 3 <i>L. kefiranofaciens</i> KF16 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	78
EK 4 <i>Lactobacillus kefir</i> KF30 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	79
EK 5 <i>L. paracasei</i> KF39 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	79
EK 6 <i>L. lactis</i> KF42 tarafından Üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	80
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>81</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.2 16S geninin yapısı.....	30
Şekil 3.3 Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.....	32
Şekil 3.4 Fenol sülfirik asit testinde kullanılan standart eğri.....	35
Şekil 4.1 Kefir danesi bakteri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.2 Kefir danesi bakteri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.3 Kefir danesi maya izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.....	42
Şekil 4.4 Kefir danesi bakteri izolatlarının 16S geninin ampilifikasyonunu gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü .....	43
Şekil 4.5 Kefir danesi maya izolatlarının 26S geninin ampilifikasyonunu gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü.....	45
Şekil 4.6 Kefir izolatlarının 16S rRNA sekanslarına bağlı olarak filogenetik ilişkisini gösteren Neighbour-Joining metodu ile oluşturulmuş Dendogram.....	46
Şekil 4.7 <i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27729'a karşı <i>L.lactis</i> 'in antimikrobiyal etkisi ve <i>S. typhimurium</i> RSSK 95091'e karşı <i>L.lactis</i> 'in antimikrobiyal etkisi .....	47
Şekil 4.8 <i>L.kefiri</i> KF25'in <i>B. cinerea</i> 'ya karşı, <i>L.diolivorans</i> KF2'nin <i>Penicillium</i> 'a karşı antifungal etkisi.....	50
Şekil 4.9 Antibiyotik disklerin etrafındaki inhibisyon zon görüntüleri.....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1</b> Tez çalışmasında kullanılan primerler.....	23
<b>Çizelge 3.2</b> RAPD-PCR analizi için hazırlanan PCR karışımı ve PCR şartları.....	29
<b>Çizelge 3.3</b> 16S rRNA geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR karışımı ve PCR şartları.....	30
<b>Çizelge 3.4</b> RAPD-PCR analizi için hazırlanan PCR karışımı ve PCR şartları.....	31
<b>Çizelge 3.5</b> Antibiyotiklerin test konsantrasyonu.....	34
<b>Çizelge 4.1</b> Kefir danelerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	37
<b>Çizelge 4.2</b> Kefir danesi örneklerinden ve ilgili besiyerlerinden elde edilen izolat sayıları.....	39
<b>Çizelge 4.3</b> Antimikrobiyal zon inhibisyonları.....	48
<b>Çizelge 4.4</b> Antifungal zon inhibisyonları.....	51
<b>Çizelge 4.5</b> Kefir izolatlarının EPS üretim profili.....	54
<b>Çizelge 4.6</b> Kefir izolatları tarafından üretilen EPS miktarları ( $\mu\text{g}/10^7$ ).....	56

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

A	Alan
°C	Derece
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
K	Kelvin
mm	Milimetre
P	Basınç
pH	Asitlik Bazlık Birimi
s	Saniye
§	Döngü
V	Volt
µl	Mikrolitre

### Kısaltmalar

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bç/bp	Baz Çifti
C	Karbon
Caco-2	Colon Adeno Carcinoma Cell
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
FLA	3-Fenil Laktik Asit

FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
Gal	Galaktoz
Glc	Glukoz
GRAS	Generally Recognised As - Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kob	Koloni Oluşturan Birim
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe
NJ	Neighbour-Joining
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Potato Dextrose Agar
PG	Peptidoglikan Tabaka
RAPD	Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimerik DNA
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
TBE	Tris Borat EDTA
TCA	Trikloroasetik Asit
TE	Tris-EDTA
TM	Time Melting = Erime Sıcaklığı
UV	Ultraviole



## 1. GİRİŞ

Fonksiyonel gıda kavramı, temel besin fonksiyonlarına ek olarak, konakçı sağlığı üzerinde yararlı bir etki yaratacak veya kronik hastalık riskini azaltabilecek gıda veya gıda katkı maddeleri üretimi kavramını içermektedir (Huggett ve Schliter, 1996). Probiyotik mikroorganizmaları içeren fermente gıdalar genellikle fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilir (Fuller, 1989). Probiyotik, “hayat için” anlamında kullanılan Yunanca bir kelimedir (Koçak ve Kalkan, 2014) ve belirli bir sağlık etkisi olan canlı mikroorganizmaları ifade eder ve son dönemde probiyotik mikroorganizmalara olan ilgi ve probiyotik gıda üretme çabaları hızla artmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar gastrointestinal sistemde olası enfeksiyonların önlenmesi, laktoz metabolizmasının düzenlenmesi, immün sistemin uyarılarak hücrelerin aniden çoğalmasının engellenmesi, serum kolesterolünün azaltılması gibi daha birçok fonksiyonel özelliğe sahiptir (Gilliland vd, 1999). Prebiyotikler ise üst gastrointestinal kanalda insan konakçı tarafından sindirilemeyen, diğer taraftan ise selektif olarak bir veya daha fazla kolonik bakteri türünün gelişmesini uyarabilen mikrobiyal besin öğeleridir (Gibson vd, 1995). Asit ve safra toleransları, bir probiyotik mikroorganizmanın gastrointestinal yoldan geçerek hayatta kalmasını, ince bağırsağın başlangıcında mide ve safra asitlerinin asidik koşullarına direnmesini gösteren iki temel özelliktir (Michida vd, 2006). Mide yolu, gastrik bezlerden salgılanan pepsin ve hidroklorik asidin, yüksek hidroklorik asit konsantrasyonuna bağlı olarak düşük pH'lı mide suyu içerir (Holzapfel vd, 1998). Bağırsak yolu, safra suyu içeren safra tuzları ve pankreatin içerir ve pH değeri yaklaşık 8.0'dir (Keele vd, 1965; Floch vd, 1972). Bu yol aynı zamanda, gelişmiş sindirim ve enfeksiyonun önlenmesi gibi bir dizi fonksiyonla kompleks mikrobiyal sisteme de sahiptir. Sindirim sistemine dahil edilen probiyotik mikroorganizmalar, gastrointestinal mikrofloranın denge haline katkı sağlayabilir ve probiyotikler genellikle fermente süt ürünleri kaynaklı olabilmektedir (Michida vd, 2006). Bir probiyotik, tek bir suş veya farklı organizmaların karışımı olabilir ve patolojik süreçlere karşı immüno-modülatör özellikte metabolik ve bariyer aktiviteleriyle ise sağlık halinin devamlılığını geliştirdiği iddia edilmektedir. Kefir, probiyotik potansiyeldeki mikroorganizmaları ve yararlı etkilere sahip farklı maya

suşlarını içermesi yönüyle önemli probiyotik ürün olarak görülmektedir (Simova vd, 2002). Kefir mikroflorasında, yaklaşık 50'den fazla türün yer aldığı simbiyotik ilişki içerisinde yaşayan laktik asit ve asetik asit bakterileri ve maya türlerini içeren bir üründür. Hem bu türler hem de bu türlerin ürettikleri başta EPS ve peptitler olmak üzere metabolitler çeşitli olumlu sağlık etkilerine sahiplerdir (Guzel-Seydim vd, 2011). Özellikle, bakteri ve maya içeren bir gıda olarak kefir, bağırsak mikrobiyotasını modüle edebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bağırsak mikrobiyotasının sadece prokaryotları değil aynı zamanda ökaryotik organizmalarıda içerebileceğini göstermektedir (Underhill vd, 2014). Bağırsak mikrobiyotası bağışıklık sistemi ve enerji homeostazisi, sindirim ve bazı sistemik hastalıkların kontrolünde önemli roller oynaması nedeniyle, kefirin içerdiği olumlu türler nedeniyle potansiyel etkileri oldukça önemli bir husus olabilmektedir (De Filippo vd., 2010; Sekirov vd., 2010; Brown vd., 2015).

Geleneksel kefir danesinin ortaya çıkışı, Kafkasya'da hayvan derilerinden yapılan deri tulumlarda ya da meşeden yapılmış fiçiler içinde sütün fermente edilmesiyle başlamıştır. Fermente olan sütün bir bölümü alınarak yeniden taze süte eklenerek fermentasyona bırakılmış ve bu şekilde işlem haftalarca devam edilmiştir. Bu süre sonunda tabaka halinde protein yapısında pıhtılar oluşmuş ve bu pıhtıların birikmesi sonucu karnabahara benzer bir yapı meydana gelmiştir. Tulum ya da tulum adı verilen derinin iç kısmındaki karnabahara benzeyen yapının alınarak bölünmesi, kurutulması gibi işlemlerden geçirilmiş ve kurutma işleminin sonunda oluşan daneler kefir danesi olarak adlandırılmıştır (Karatepe vd, 2012).

Türk Gıda Kodeksi 2009/25 No'lu Fermente Sütler Tebliği'ne göre kefir; "fermentasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve edemeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da kefir danelerinin kullanıldığı fermente bir süt ürünüdür" şeklinde tanımlanmaktadır (Anonim, 2009).

Literatürde ise kefir, süte kefir daneleri eklenerek laktik asit ve alkol fermentasyonunun gerçekleşmesi ile oluşan ve 21.yy'ın yoğurdu olarak adlandırılan süt içeceği olarak tanımlanmıştır. Kefirin diğer fermente süt ürünlerinden farkı laktik

asetik asit bakterilerinin aktivitelerine ilaveten mikroflorada yer alan asetik asit bakterileri ve mayaların fermentasyonu ile açığa çıkan CO<sub>2</sub> nedeniyle gaz oluşturan bir yapıya ve ferahlatıcı bir tada sahip olmasıdır (Artık ve Konar, 2013). Adiloğlu vd. (2013)'e göre kefir, EPS ve proteinlerden meydana gelen polisakkarit kümelerinin içinde mevcut olan LAB' nin, asetik asit bakterilerinin ve mayaların sütü fermente etmesiyle oluşan içecektir.

Kefir daneleri, beyazdan açık sarıya kadar değişen renkte, elastik, sıkı ve genellikle 1 ile 3 cm arasında değişen, farklı boyutlarda düzensiz ve loblu şekilli (katlanmış veya düzgün olmayan bir yüzeyin oluşturulmasıyla) akıl taşı benzeri bir yapıya sahiptir (Farnworth, 2005; Kabak ve Dobson, 2011; Leite vd., 2013a). Kefir daneleri içeriği bakımından incelendiğinde, bakteri-maya hücreleri ve bunlara ait metabolik ürünler, karbonhidratlar, fermentasyon sonucu oluşan pıhtılaşmış süt proteinlerini yapısında barındırmaktadır (Libudzisz ve Piatkiewicz, 1990; Garrote vd., 1997; Beshkova vd., 2002). Kefir, sütte laktik/alkol fermentasyonu sonucunda laktik asit ve asetik asit, etanol, CO<sub>2</sub>, asetaldehit, asetoin, diasetil, EPS ve mikrobiyal fermentasyonla üretilen diğer biyoaktif bileşenlerin (peptitler, amino asitler, bakteriyosinler, folik asit, kalsiyum, B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub> ve K vitaminleri gibi) bir karışımından oluşan belirgin bir viskozitede ayırdedici lezzeti ile karakterize edilmektedir (Kabak ve Dobson, 2011; Güzel-Seydim vd., 2011; Leite vd., 2013a). Bu mikrobiyal topluluğun çeşitliliği, kefirin egzotik ekşi ve yoğurt benzeri tat özellikleri ile kendiliğinden gazlı bir içecek olarak benzersiz rollere sahiptir (Beshkova vd, 2003). Aynı zamanda kefir danelerinin, *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces* ve *Pichia* gibi farklı türlere ait maya türlerinin baskın olduğu çeşitli maya mikroflorası vardır (Marsh vd, 2013; Zhou vd, 2009). *Lactobacillus* türlerinin baskın olduğu gösterilmiş olan kefir danelerinde, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* gibi diğer LAB türlerinin ve başta *Acetobacter* spp. olmak üzere asetik asit bakterilerinin zengin bakteri topluluğunda bulunduğu gösterilmiştir (Dertli ve on, 2017; Kesmen ve Kaçmaz, 2011; Leite vd., 2012; Nalbantoğlu vd., 2014; Walsh vd., 2016).

Kefir danelerinin mikrobiyal florası, kefir danelerinin kaynağına, kefir danelerinin oluştuğu coğrafi bölgelere ve bu kefir danelerinin gelişmesi için kullanılan sütün çeşitine bağlı olarak değişebilir (Dertli ve on, 2017). Bu nedenle kefir danelerinin mikrobiyal topluluğunun belirlenmesi, kefirin fermentasyon kinetiğinin ve bu

topluluğun kefir oluşumu sırasındaki rolünün anlaşılması açısından önemlidir. Kefirin fermentasyonu sırasındaki rollerine ek olarak, bu mikroorganizmalar özellikle LAB türlerinin, kefirin fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunabilecek antibakteriyel, antifungal ve EPS üretim özellikleri gibi özel rolleri olabilir. Örneğin, kefirin ve metabolitlerinin yanı sıra kefir izolatu LAB suşlarının önemli düzeyde antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Santos vd, 2003).

Kefir danelerindeki LAB türlerinin EPS üretimi hemen hemen eşit miktarda glikoz ve galaktoz tarafından oluşturulan kefiranın oluşumu için potansiyel rolleri nedeniyle özel ilgi görmektedir (Kooiman, 1968). Kefir danelerinden LAB türlerinin EPS üretim özelliklerinin belirlenmesi, kefir oluşumuna ve kefirin diğer potansiyel sağlık faydalarına katkılarını anlamak için önemlidir.

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden altı adet geleneksel kefir danesi temin edilmiş ve bu danelerin bakteri ve maya çeşitliliği kültüre bağlı bir yaklaşımla belirlenmiştir. RAPD-PCR analizi ile genotipik ayrımının yapılmasını takiben farklı bakteriyel ve maya türleri genotipik yollarla tanımlanmıştır. Kefir mikroflorasını oluşturan bu suşlar sonrasında önemli gıda kaynaklı patojenlere ve zararlı küflere karşı sırasıyla antibakteriyel ve antifungal etkileri açısından test edilmiştir. Benzer olarak kefir danesinden izole edilen LAB türlerinde üretilen EPS miktarları ve EPS'lerin kimyasal yapıları belirlenmiştir. Son olarak tüm izolatların antibiyotik dirençliliği açısından güvenilirliğini test etmek için antibiyotik duyarlılıkları test edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile geleneksel kefir danelerinin mikrobiyal florası ortaya konulmuş ve kefir izolatlarının fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Kefir Danesi ve Kefir Danesinde Bulunan LAB

LAB, Gram pozitif olup temel özellikleri karbonhidratları fermente edip Laktik asit üretmeleridir. LAB türleri fermentasyon sonucunda sadece laktik asit üreten homofermentatif ve laktik asitin yanısıra etanol, CO<sub>2</sub> gibi farklı metabolitleri üreten heterofermentatif türlerden oluşurlar ve temel cinsler *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Lactococcus*'tur (Mathur ve Singh, 2005; Liu vd, 2011). LAB türleri fermente ürünlerin üretiminde en yaygın kullanılan mikroorganizma grubudur.

Kefir danesinden izole edilen homofermentatif LAB türleri arasında; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* ve *L. acidophilus*; *Lactococcus* spp. *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *Streptococcus thermophilus*, heterofermentatif LAB türleri olarak ise; *L. kefiri*, *L. parakefiri*, *L. fermentum* ve *L. brevis* (Ratray ve O'Connel, 2011; Leite vd, 2012) aynı şekilde sitrat pozitif suşlar *L. lactis* (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Lopitz-Otsoa vd., 2006; Ratray ve O'Connel, 2011; Leite vd., 2012) yer almaktadır. Bu türler kefir üretiminde rol almakta ve bu suşların sitratı kullanmasıyla tipik kefir aromasına katkıda bulunan temel bileşikler üretilmektedir (Ratray ve O'Connel, 2011).

Kefir danelerinin mikrobiyal bileşimi; danelerin coğrafi kökeni, iklim koşulları, kullanılan yöntem (sıcaklık, inkübasyon süresi, süte ilave edilen dane oranı) ve periyodik alt kültürlemede kullanılan süt çeşidi tarafından etkilenmektedir (Witthuhn vd., 2005; Filipcev vd., 2007; Dobson vd., 2011; Leite vd., 2013b; Marsh vd., 2013; Altay vd., 2013; Dertli ve Çon., 2017). Kefirdeki mikrobiyotanın dinamik dengesinin olası modifikasyonu, fizikokimyasal, reolojik, duyuşal ve beslenme özelliklerinde önemli değişikliklerden sorumlu olabilir.

Kefir çok yüksek seviyelerde 8 ila 10 log kob/ml arasında değişen LAB sayısına sahiptir ve bu husus LAB türlerinin gastrointestinal sistemde canlılığını ve kolonizasyon özelliklerini geliştirerek, bağırsaktaki LAB miktarını arttırabilmektedir (Sarkar 2007; Guzel-Seydim vd., 2011; Kim vd., 2015d).

Kefir danelerinin mikrobiyolojisi, asitlik, viskozite, aroma ve organoleptik özelliklerini büyük ölçüde etkiler (Ratray ve O'Connell 2011). Kefirde laktik asit ve alkol fermentasyonunu gerçekleştiren mikroflora dane içerisinde simbiyotik halde bulunur. Kefir daneleri kazein ve kazein partiküllerine gömülü ortak yaşayan mikroorganizmalar, bunların oluşturduğu metabolik ürünler ve karbonhidratlardan meydana gelmektedir. Mikroorganizmalar daneden süte geçerek fermentasyon işlemini gerçekleştirirler. Danenin en önemli özelliği sütü fermente ettikten sonra süzülerek geri kazanılmasıdır (Liu vd., 2000; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003; Alpkent ve Demir, 2004). Ayrıca, kefir danelerinin mikroflorası, uygun kültürel ve fizyolojik koşullar altında korunup inkübe edilirse yıllarca aktivitesini stabil bir şekilde koruyabilir (Guldager ve Tamime, 2006).

Son yıllarda kefir danelerinin mikrobiyolojik bileşiminin belirlenebilmesi için kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yöntemler kullanılmıştır (Latorre-Garcia vd., 2007; Wang vd., 2008; Gao vd., 2012; Marsh vd., 2013; Nalbantoglu vd., 2014). Daha önceleri kültürden bağımsız teknikler, denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE) analizi ile yapılmaktaydı (Wang ve Guo, 2006; Zhou vd., 2009; Kesmen ve Kacmaz, 2011). Ancak yakın zamandaki yapılan çalışmalar kefir danelerinin mikrobiyal florasının açığa çıkarılması için yeni nesil dizileme tekniğinin kullanımının gerekli olduğunu göstermiştir (Gao vd., 2013; Marsh, O'Sullivan, Hill, Ross ve Cotter, 2013; Nalbantoglu vd., 2014; Walsh vd., 2016; Dertli ve Çon, 2017). Bu tür analizler, özellikle farklı bölgelerden gelen kefir danelerinin farklı bakteri ve maya topluluklarına sahip olduklarını detaylı bir şekilde gösterebilmek adına önem arz etmektedir (Lago vd, 2010).

Kültüre bağlı yöntemlerle yapılan kefir danelerindeki baskın LAB türlerinin *Lactobacillus* spp. ve *Lactococcus lactis* olduğunu, ancak *Leuconostoc* türlerinin daha düşük sayılarda bulunduğu araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (Nakase vd, 1998; Kesmen ve Kacmaz, 2011).

Kültürden-bağımsız ve kültüre-bağımlı yöntemlerin kombinasyonu, kefir danelerinde bulunan bakterilerin yeterli karakterizasyonu için gereklidir. Kültürden bağımsız yöntemler, kefir danelerinde bulunan mikroorganizmaların çeşitliliğinin güvenilir bir şekilde değerlendirilmesini kolaylaştırırken, tek başına veya diğer bakteriler ve

mayalar ile etkileşimleri sırasında izole edilmiş mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerini belirlemek için kültüre bağlı yaklaşımlar gereklidir. Ek olarak belirli bir bakteri türünün izolasyondan bağımsız olarak kültürden bağımsız teknikler kullanılarak belirlenmesi başarılı bir izolasyon elde etmek için kullanılan ekim tekniklerine yönelik ayarlamalar yapılması gerektiğini göstermektedir (Zanirati vd, 2015).

Kefir danesinin yapısı taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelendiğinde, kefir danesinin iç kısmında, çeşitli Laktobasil grubunun üyeleri (uzun ve kavisli), mayalar ve ipliksi materyal gözlemlenmiştir. Dış kısımda kısa Laktobasil ve maya gözlenmiştir. Araştırmacılar, iç kısımdaki mikrobiyal hücre yoğunluğunun dış kısımdaki yoğunluktan daha az olduğunu bildirmişlerdir (Dong vd, 2009). Araştırmacılar, danede gözlenen ipliksi materyalinin aslında, dane boyunca mevcut olan kefiran polisakariti olabileceğini öne sürmüşlerdir (Guzel-Seydim vd, 2005; Magalhães vd, 2010 a, b) (Magalhães vd, 2011).

## 2.2. Kefir Danesinde Bulunan Mayaların Biyokimyasal Özellikleri

Gıda üretim süreçlerinde mayaların temel görevlerinin başında alkol fermentasyonunu gerçekleştirmek olup bu fermentasyon neticesinde farklı gıda maddelerinin üretimi meydana gelmektedir. Mayalar sadece CO<sub>2</sub> ve etanol üretimi için değil aynı zamanda pH'nın modülasyonu, aroma gelişimi, amino asitler ve vitaminlerin üretiminden de sorumludur (Simova vd, 2002; Özdestan ve Üren 2010). Mayalar, hücelere temel karbon ve enerji sağlayacak olan çok çeşitli organik substratları metabolize edebilirler (Walker, 1998). Ürün içinde istenilen duyuşsal özelliklerin elde edilmesi için minimum maya sayısı  $1,0 \times 10^5$  kob/g olmalıdır (Stam vd, 1998; Simova vd, 2002). Kefir daneleri, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Kazachstania*, *Issatchenkia* ve *Dekkera* gibi farklı cinslere ait baskın maya türlerini içermektedir (Simova vd., 2002; Gao vd., 2012; Marsh vd., 2013; Diosma vd., 2014; Lu vd., 2014).

Kefir ve kefir danelerinde yer alan laktozu fermente edebilen maya türleri *K. marxianus*, *C. kefir*, *K. lactis* var. *lactis*, *D. hansenii*, *D. anomala*, laktozu fermente edemeyen mayalar ise *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *P. fermentans*, *K. unispora*, *S. turicensis*, *I. orientalis* ve *D. occidentalis* olarak ortaya konulmuştur (Simova vd,

2002; Rattray ve O'Connel, 2011). *K. marxianus* hem laktozu hem de galaktozu kullanır ve bu nedenle süt ortamında hızlıca gelişim gösterebilir. Öte yandan, *S. cerevisiae* laktozu kullanamadığı için kefir danelerinde laktoz hidroliziyle diğer maya veya bakteri türleri tarafından üretilen glikoz ve galaktozun fermentasyonu ile sütte gelişebilir. Bulgaristan, Arjantin ve Brezilya kökenli kefir danelerindeki *S. cerevisiae*'nin miktarı diğer bölgelere göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Simova vd., 2002; Leite vd., 2012; Diosma vd., 2014). Metagenomik bir çalışmada İrlanda, ABD, Almanya ve diğer bazı ülkelerdeki kefir danelerindeki *S. cerevisiae*'nin bulunma sıklığının düşük olduğu bildirilmiştir (Marsh vd, 2013). Bu nedenle kefir danelerinin coğrafi kökeni, *S. cerevisiae* miktarı açısından önemli bir rol oynamaktadır. *S. cerevisiae* suşlarının bağırsak pro-inflamatuvar etkinin azaltılması yoluyla bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiş ve düşük yapışma yeteneğine sahip suşlarının bile patojenik bakterilerin adhezyonunun azaltılmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Van der Aa Kühle vd, 2005). Bazı *S. boulardi* ve *S. cerevisiae* suşları bağırsak epitelinde spesifik reseptörlere *Salmonella* ve *E. coli*'nin yapışmasını engelleyerek bağırsak yüzeyinde bu patojenlerin yer almasını engelleyebilmektedirler. Böylece konakçı üzerindeki patojen istilalarını önlemiş olurlar (Tiago vd, 2012).

Laktozu fermente eden *K. marxianus* ve laktozu fermente edemeyen *S. cerevisiae*, *P. fermentans* mayalarının kefir danesinin içerisinde birarada bulunması ve gelişmesi kefirin karakteristik tadı ve asitliği açısından çok önemlidir (Simova vd, 2002).

*Y. lipolytica* kefirle birlikte birçok farklı gıda çeşidinde bulunur ve proteolitik ve lipolitik enzim içeren fizyolojik olarak birçok aktif madde üretebilir (Mansour vd, 2008). *Yarrowia* sp. bakterilerle simbiyotik ilişkilerde diğer maya türleri arasında lider rol oynamaktadır ve laktozu kullanamasa da danelerde *Y. lipolytica* yağ kullanarak gelişebilir. *S. cerevisiae*, oksijenle birlikte veya oksijensiz çoğalabilirken, *Y. lipolytica* ve *Kluyveromyces* büyüme için oksijene bağımlıdır, *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces* ile rekabet edebilir. Ancak danelerde *S. cerevisiae* ile rekabet edemez. Ayrıca, *Y. lipolytica* tarafından üretilen yağ asitleri *Kluyveromyces*'in gelişmesini engelleyebilir (Lu vd, 2014).



*Pichia* türleri diğer fungal türlerin toksinlerinin çoğalmasını sınırlayabilir (Lim ve Tay, 2011). *G.geotrichum* yaygın olarak yüzey olgunlaştırılmış peynirlerden izole edilmiş, laktozu fermente edemeyen, ancak kefirin karakteristik tat ve aromasına katkıda bulunabilecek çeşitli proteolitik ve lipolitik enzimler üretme yeteneğine sahiptir. Laktatın *G. geotrichum* tarafından kullanılmasının depolama sırasında kefirin pH'sında artışa yol açabileceği öne sürülmüştür (Boutrou ve Gueguen, 2005). *S. boulardii*'nin patojenik enterik bakterileri (*C. difficile*, *E. coli*, *V. cholera*, *Salmonella*, ve *Shigella* spp.) bağladığı ve bakteriyel toksinlerini nötralize ettiği bildirilmektedir (Brandão vd., 1998; Gedek 1999; Czerucka vd., 2007; Mummy vd., 2008; Martins vd., 2010; Tiago vd., 2012; Martins vd., 2013). *S. boulardii* ayrıca hem *in vitro* hem de murin modellerinin kolonunda gösterildiği gibi tümör nekrozis faktör-alfa (Tnf- $\alpha$ ) interlökin ve IL-12 sekresyonunu indükleyen immün faktörlerini de etkilemektedir. T hücreleri dendritik hücre fonksiyonlarını düzenleyerek iltihaplara karşı koruma sağlayabileceği, benzer olarak *K. marxianus* CBS1553 T hücrelerinin oluşumunu sağlayarak epitel hücrelerin patojenlere karşı bariyer oluşturmada önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Smith vd, 2015).

Smith vd. (2015) tarafından yapılan bir araştırmada, *Salmonella* patojeninin epitel hücrelerine verdiği tahribatın tamamına yakınının *K. marxianus* tarafından düzeltildiği rapor edilmiştir. Ayrıca iltihaplara karşı savunma görevi olan T hücrelerinin oluşumunda patojenlere karşı bariyer oluşturma özellikleri açısından önemli olduğu rapor edilmiştir.

### **2.3 Kefir Danesinde Bulunan LAB ve Mayalar Arasındaki Simbiyotik İlişki**

LAB türleri laktozu metabolize etme kapasitesinde olduğundan (Rea vd, 1996), sütte mayadan daha hızlı çoğalma eğilimindedirler (Rea vd, 1996; Tamime, 2006). LAB türleri laktozu hidrolize ederek laktik asit üretir ve maya gelişimi için gerekli koşulları oluşturmaktadır (Tamime, 2006). Mayalar, kompleks B vitaminlerini sentezler ve süt proteinlerini hidrolize ederek CO<sub>2</sub> ve etanol üretmek için oksijeni kullanırlar (Lopitz-Otsoa vd, 2006; Tamime, 2006). *Acetobacter* spp. tarafından B vitamini üretimi gerçekleştirilerek danede bulunan diğer türlerin gelişmesini teşvik ederler (Lopitz-Otsoa vd, 2006; Rea vd, 1996). Farklı mikroorganizmalar arasındaki simbiyotik ilişkiyi değerlendiren ana belirteç, fermentasyon sırasında artan biyokütledir (Garrote

vd, 2010). Maya ve bakterilerin aralarındaki gösterdikleri karşılıklı etkiler, mevcut ortamdaki besinlere ve ürettikleri metabolitlere bağlı olarak değişebilir. Ortak kültürlerde besin ihtiyaçlarına ve ürettikleri metabolitlerin türüne göre biri diğerini geliştirebilir veya inhibe edebilir ya da birbirleriyle dayanışma içerisinde gelişme gösterirler (Lopitz-Otsoa vd, 2006). Bazı maya türleri, amino asitler ile yağ asitleri üretme yeteneğinde yani proteolitik ve lipolitik (Ratray ve O'Connel, 2011). *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* gibi türler LAB tarafından oluşturulan laktik asidi asimile ederek pH'ı yükseltir ve bakteri çoğalmasını stimüle edebilir ve aynı zamanda lipolitik özelliğe sahiptirler (Rea vd, 1996; Lopitz-Otsoa vd, 2006). Cheirsilp vd. (2003) *L. kefiranofaciens*, *S. cerevisiae* ile birlikte çoğaldığında kefiran polisakkaritinin üretimini arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Son zamanlarda Mendes vd. (2013) *S. cerevisiae* ve *L. delbrueckii*'nin transkriptom analizine dayanarak doğrudan etkileşimini bildirmişlerdir. Bu durum, iki partnerin karbon ve nitrojen kaynaklarından faydalanmak için birbirleri ile iyi işbirliği yaptığını ve zorlu koşullarla başa çıkmak için metabolizma stratejilerini geliştirdiklerini ve düşük pH ve etanol koşullarını değiştirdiklerini göstermektedir (Mendes vd, 2013).

*K. marxianus* spp. ve *C. kefir*, inokülasyonla sütte gelişme eğilimindedirler ve kefir danelerinde bulunurlarsa danede baskın hale gelmektedirler (%80-100) ( Wyder vd, 1997). Ancak bu maya türleri danede bulunmazsa laktöz negatif türler (*S. unisporus*) baskın hale geleceği ve toplam maya sayısının azalmış olacağı ifade edilmektedir.

## 2.4 Kefirin Bileşimi

Kefir danelerinin kompleks bir mikrobiyolojik bileşimi vardır ve LAB türleri genelde kefir danesinin %83-90'ını, mayalar ise %10-17'sini geri kalan kısım ise asetik asit bakterilerini ve diğer türleri içermektedir. Danelerin mikroskopik gözlemi danelerin % 80 laktobasil, % 12 maya ve % 8 laktokok içerdiğini göstermektedir (Anonymous, 2002).

Kefirden izole edilen *Lactococcus* spp. (özellikle *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), *Lactobacillus* türleri, *S. thermophilus* ve *Leuconostoc* spp. LAB grubunun ana türlerini oluşturur. Bununla birlikte kefir danelerinde, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L.*

*helveticus*, *L. casei* subsp. *kefir* ve *L. pseudopantarum* ve *L. brevis* içerdiği bildirilmektedir (Rea vd, 1996).

Kefir, organların işlevlerini yerine getirebilmesi için ve vücuttaki metabolik, kimyasal olayların normal olarak devamı için vazgeçilmez yararlı bakterileri, mayaları, vitamin, mineral ve esansiyel aminoasitleri ihtiva etmektedir (Esmek ve Güzeler, 2015). Kefir, sütteki tüm besin maddelerini içerir. Ayrıca organik asitlerin de kefirin yapısında var olduğu saptanmıştır (Köroğlu vd, 2015). Kefir valin, izolösin, metionin, lizin, fenilalanin ve triptofan gibi diğer amino asitleri içermektedir (Otlas ve Çağındı, 2003; Sarkar, 2007). Kefir'deki esansiyel amino asit içerikleri 220 mg/100 g valin, 262 mg/100 g izolösin, 137 mg/100 g metionin, 376 mg/100 g lizin, 183 mg/100 g treonin, 231 mg/100 g fenilalanin ve 70 mg/100 g triptofan olarak saptanmıştır (Liutkevicius ve Sarkinas, 2004).

Kefir, vitamin ve mineral kaynağıdır. Bu vitaminler; A, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C vitamini, folik asit, K vitamini ve biyotin (vit H) olarak sıralanabilir. Makro mineral maddeler; fosfor, potasyum, magnezyum, mikro minerallerden de çinko, bakır, selenyum, manganez, demir ve kobalt içerir (Ahmed vd, 2013; Esmek ve Güzeler, 2015; Otlas ve Çağındı, 2003). Liutkevicius ve Sarkinas (2004), kefirin makro mineral değerlerini % 1,65 potasyum, % 0,86 kalsiyum, % 1,45 fosfor ve % 0,30 magnezyum olarak, mikro mineral değerlerini ise: 7,32 mg/kg bakır, 92,7 mg/kg çinko, 20,3 mg/kg demir, 13,0 mg/kg manganez, 0,16 mg/kg kobalt ve 0,33 mg/kg molibden olarak belirlemişlerdir (Liutkevicius ve Sarkinas, 2004).

Kök-Taş vd. (2014), kefir örneklerinin kül içeriğinin % 0,55 ile % 0,66 arasında değiştiğini bildirmiştir. Günde sadece 175 ml kefir tüketimi ile insan vücudunun ihtiyacı olan kalsiyum ve fosfor miktarının % 20'si, B<sub>12</sub> vitamininin %14'ü, B<sub>2</sub> vitamininin %19'u ve magnezyum miktarının ise % 5'i karşılanabilmektedir (Felix, 2016). Kefirdeki laktoz oranı sütte karşılaştırıldığında çok düşüktür. Bu yüzden kefir laktoz intoleransı olan kişiler için alternatif, yararlanılabilir bir kaynaktır (Esmek ve Güzeler, 2015).

Ozer ve Ozer (1999), kefir tipik olarak % 89-90 nem, % 0,2 yağ, % 3,0 protein, % 0,7 kül ve % 1,0 laktik asit ve alkol içerir (Sarkar, 2007). Kefirin 1,98 g / L CO<sub>2</sub> ve % 0,48 alkol içerdiği bildirilmiştir (Beshkova vd, 2002). Başka bir çalışmada, Liutkevicius ve

Sarkinas (2004), kefir danelerinin % 86,3 nem, % 4,5 protein, % 1,2 kül ve % 0,03 yağ ihtiva ettiğini bildirmişlerdir. Magalhaes vd. (2011a), 24 saatlik fermentasyondan sonra Brezilya kefirinin % 3,91 protein, % 2,34 yağ ve % 9,62 kuru madde içerdiğini belirlemişlerdir.

Wszolek vd. (2001), İskoçya ve Polonya'da farklı starter kültürler kullanılarak sığır, keçi, koyun sütünden yapılan kefirlerin özelliklerini inceleyerek kefirin toplam kuru maddesi % 10,6 ila % 14,9, ham protein oranının % 2,9-6,4, karbohidrat oranının % 3,8-4,7 ve kül oranının % 0,7-1,1 olduğunu belirtmişlerdir.

Kefirin pH değeri laktik asit, karbonik asit ve asetik asit olmak üzere yüksek konsantrasyonlarda organik asitlerin bulunduğu konsantrasyona bağlı olarak belirlenir. Fermentasyon sırasında kefirin pH değerinin 3,0 ile 5,0 arasında değişmesiyle birlikte optimum pH değerinin 4,6 olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Farnworth vd, 2003).

Fermentasyon işlemi sırasında laktik asit, asetik asit, pirüvik asit, hippurik asit, propiyonik asit, bütirik asit, diasetil ve asetaldehit oluşabilir. Bu bileşikler kefire tat ve aroma verir (Ahmed vd, 2013). Kesenkas vd. (2011), laktik asit, sitrik asit, pirüvik asit ve asetik asidin içeriğinin 28 gün depolamadan sonra sırasıyla 107,80-282,40 mg/kg, 1,79-5,08 mg/kg, 0,17-0,45 mg/kg ve 0,38-0,66 mg/kg olduğunu bildirmişlerdir.

Fermentasyonun başlamasıyla oluşan başlıca bileşenler laktik asit, CO<sub>2</sub> ve alkoldür (Ogles ve Cagindi, 2003). L (+) laktik asit, fermentasyondan sonra en fazla bulunan organik asittir ve başlangıç sütündeki orijinal laktozun yaklaşık % 25'i fermentasyona uğratarak elde edilir. Kefirin fermentasyonu sırasında üretilen etanol ve CO<sub>2</sub> miktarları üretim koşullarına bağlıdır (Farnworth, 2005).

Kefir içerisindeki mevcut aroma bileşenleri asetoin, asetaldehid ve diasetildir. Diasetil, *L. lactis* subsp. *diasetilactis* ve *Leuconostoc* sp. tarafından üretilmektedir (Ogles ve Cagindi, 2003). Depolama sırasında asetaldehit konsantrasyonu artarken, asetoin konsantrasyonu azalmaktadır (Güzel-Seydim ve Greene, 2000). Aslim vd. (2004b)'nin yaptığı çalışmada çeşitli Türk kefir kaynaklarından elde edilen 21 LAB izolatının asetaldehit ürettiğini (0,88 – 4,40 µg / mL) belirlemişlerdir.

Çakmakcı vd. (2010), farklı süt çeşitleri (sığır, koyun ve keçi) ve kültür türleri (kefir danesi ve ticari starter kültür) kullanılarak üretilen kefirlerin özelliklerini araştırmışlardır. Başlangıç kültürü tipinin, depolama süresi pH değerindeki değişiklikleri etkilediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Magalhaes vd. (2011), laktik asit içeriğinin 1,4 ile 17,4 mg / mL arasında değiştiğini, asetik asit miktarının ise 2,10'dan 2,73 mg / mL'ye yükseldiğini bildirmişlerdir (Magalhaes vd, 2011). Kefir üretiminde asitleşme değerini inokülasyon miktarı ve inkübasyon sıcaklığının etkilediğini bildirmişlerdir (Irigoyen vd, 2003).

## 2.5 Kefir Üretimi

Kefir daneleri, bireysel mikrobiyal türlerin ortak kültürlerinden kendiliğinden oluşamazlar (Wang vd, 2012). Kefir danelerinin biyokütle artışı sağlamak için kefir daneleri, 20-25 °C'de 24 saat süre ile sütte çoğaltılır. 24 saat sonra yaklaşık %5-7 biyokütle elde edilir (Libudzisz ve Piatkiewicz, 1990). Kefirin besin değerini arttırmak ve maliyetini düşürmek için süt yerine peyniraltı suyu tozu ve yayıkaltının kullanımı mevcuttur (Ersoy ve Uysal, 2003).

Kefir üretimi için geleneksel ya da endüstriyel yöntemler kullanılmaktadır. Endüstriyel kefir, sadece tek kullanımlık starter kültür ile yapılmaktadır. Starter kültür kefir danelerinden izole edilen LAB türlerinin belli oranlarla biraraya getirilerek hazırlandığı liyofilize mikroorganizma topluluğudur. Başlatıcı (starter) kültür içerisinde hiç maya bulunmayabilir ve mikrofloradaki çeşitliliği daha azdır (Kadıoğlu, 2017).

Günümüzde geleneksel olarak kefir, evlerde kefir danelerinin pastörize edilmiş ve oda sıcaklığına soğutulmuş süte (inek sütü, keçi sütü, koyun sütü, hindistan cevizi sütü, pirinç sütü ya da soya sütü) ilave edilmesiyle üretilmektedir (John ve Deeseenthum, 2015). Süte doğrudan kefir daneleri eklenerek 18-24 saat aralığında 20-25° C'de inkübasyon ile kefir üretimi gerçekleştirilmektedir. Kefir daneleri süzülerek tekrar tekrar kullanılabilir.

## 2.6 Kefirin Fonksiyonel Özelliği

Kefirde mevcut birçok Laktobasil türünün S katmanı proteinlerine sahip olduğu ortaya konmuş ve S tabakalı proteinin varlığı Laktobasillerin gastrik ve pankreatik suya karşı duyarlılığını azalttığı kanıtlanmıştır (Frece, 2005). Yüzey katmanları (S katmanı) birçok prokaryotik mikroorganizmanın en dış yüzeyindeki birimlerde sıralanabilir (Mobili vd, 2009). S-tabakası, farklı bakteri ve Archaea türlerinin yüzeylerini kaplayan ve gelişmenin tüm aşamalarında organizmayı tamamen kaplayan, iki boyutlu bir kafes oluşturmak için kendi kendine bir araya getirilen monomoleküler protein veya glikoprotein alt birimleri dizisidir (Sa'ra ve Sleytr, 2000). Bu kafesler, yüzey tanıma, hücre yapışması, hücre tanıma, patojenlerin inhibisyonu veya virülans faktörleri gibi yapılar olarak koruyucu katlar, moleküler elekler veya iyon tuzakları olarak işlev görebilir (Sleytr vd., 2014; Gerbino vd., 2015b; Prado Acosta vd., 2016). Bu S katmanlı proteinlerin Caco-2 hücrelerinde *S. enterica* serovar *Enteritidis*'in gelişmesini inhibe eden koruyucu bir etki gösterebildikleri ve ayrıca *in vitro* ökaryotik hücreler üzerinde *C. difficile* toksinlerinin etkilerini antagonize etme kabiliyetine sahip oldukları bildirilmiştir (Gao vd, 2013b). Aynı zamanda *L. kefir* S tabakaya sahiptir ve bu tabaka *L. kefir*'in mayalar ile etkileşimini sağlamaktadır (Golowczyc vd, 2009). *L. kefir*'in gastrointestinal mukusun (Carasi vd, 2014a) yapışmalarına katılarak ve bakteriyel hücreleri  $Pb^{+2}$  iyonunun zararlı etkisine karşı korumaktadır (Gerbino vd, 2015a).

Kefirden izole edilen *Lactobacillus* izolatları, *Salmonella*'ya karşı hücre yapışması, topaklaşma ve antagonistik aktiviteye ve gıda endüstrisindeki uygulamalara izin veren teknolojik özelliklere sahiptir (Foligné vd, 2013). Bu suşların probiyotik etkisi, antimikrobiyal maddelerin üretimi, rekabetçi, uzaklaştırma bağışıklık cevabının modülasyonu, bağırsak bakteriyel metabolik aktivitesinin değiştirilmesi, insan bağırsağında mikroekolojinin yararlı bir şekilde değiştirilmesi ve bakteriyel translokasyonun inhibe edilmesi gibi çeşitli mekanizmalarla ilişkili olabilir (Servin, 2004).

EPS'ler; bakteriler, mantarlar ve mavi-yeşil algler gibi mikroorganizmaların metabolik süreçleri sırasında üretilen hücre dışı biyopolimerlerdir (Amjres vd, 2014). Bakteriyel EPS'ler genellikle doğal koruyucu olup olumsuz çevre faktörlerine karşı (yüksek asitlik ve safra tuzları) yararlı bakterilerin direncini artırabilmektedirler. EPS üretimi

ile EPS verimi ve monosakkarit kompozisyonu yararlı bakterilerin hayatta kalmaları için önemlidir (De los Reyes-Gavilán vd, 2011).

Hamet vd. (2015), tarafından *L. paracasei* CIDCA 8339'un fermente sütün viskozitesini etkileyen yüksek moleküler ağırlıklı EPS ürettiği ortaya konulmuştur. EPS üreten LAB türleri süt endüstrisinde yoğurt, peynir ve kefir gibi fermente süt ürünlerinin kıvamına ve reolojisine katkısı nedeniyle önemli bir rol oynamaktadır (Duboc ve Mollet, 2001; Leroy ve De Vuyst, 2004; Ruas-Madiedo, Hugenholtz ve Zoon, 2002; Welman ve Maddox, 2003; Zajšek ve Goršek, 2010a).

EPS'ler, GRAS sınıflandırması olan LAB suşları tarafından in situ olarak üretiltiklerinden dolayı doğal biyo-kalınlaştırıcı olarak göz önüne alınabilirler. Bazı LAB EPS'leri, immün stimülasyon, anti-ülser ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi potansiyel sağlığa yararlı özelliklere sahiptirler (Vliegenthart vd., 2001; Lin ve Chang Chien, 2007; Zajsek ve Gorsek, 2010b). Biyoaktif rolleri, biyoteknoloji, gıda ve biyofarmasotik endüstrilerindeki uygulanabilirlikleri nedeniyle bu biyo-moleküllere daha fazla ilgi gösterilmektedir. Endüstriyel olarak önemli olan LAB'nin ürettiği EPS'in bir örneği kefirandır. Kefiran karmaşık bir LAB ve mayaların yerleşik bir popülasyonuna bağlı olan kefir danelerinde üretilen suda çözünebilir bir polisakkarittir (Tanaka vd, 2001; Shioya vd, 2003). *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, kefiranın ana üretiminden sorumludur (Hamet vd, 2013). Kefir danesindeki mikrobiyal konsorsiyumda gömülü olan suda çözünebilir bu polisakkarit antibakteriyel, antidiyabetik ve antitümöral özelliklere sahiptir. Kefiran asit süt jellerinin viskoelastik özelliklerini geliştirmesi, antimikrobiyal, yara iyileştirmesi, serumdaki kan basıncını ve kolesterolü düşürme kabiliyeti, tümör büyümesini geciktirme kapasitesi, bağırsakların bağışıklık sistemini güçlendirmesi gibi önemli hayati özelliklere sahiptir (Sanlibaba ve Çakmakçı 2016).

Ayrıca kalınlaştırıcı, jelleştirici ajan ve emülsifier gibi çeşitli teknolojik özelliklere sahip olmasından dolayı gıda endüstrisinde çok önemlidir (Farnworth, 2005; Ahmed vd., 2013; Hamet vd., 2013). Ancak *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* ve *L.kefiri* her iki tür de laktozu asimile edememektedir (Vaughan-Martini vd, 2011). Kefiranın, yaklaşık olarak eşit miktarda D-glikoz ve D-galaktoz kalıntısı içeren tekrarlama ünitesinden oluştuğu bildirilmiştir (Mitsuoka vd, 2004; Song vd, 2008). Bu

polimerin, antibakteriyel ve anti-tümör etkinlikleri bulunmaktadır. Bağırsak bağışıklık sistemini modüle ederek ve *B. cereus* ekzoselüler faktörlerine (Shioya vd, 2001) karşı epitel hücrelerini koruyabilir (Shioya vd, 2007; Wang vd, 2008).

Kefiran ayrıca, fermente ürünler için gıdada kullanılan bir katkı maddesi olarak da kullanılabilir. Ek olarak kefiran, Caco-2 hücrelerini *Bacillus cereus* infeksiyonunun yol açtığı sitopatik etkilerden koruyabilir (Medrano vd, 2009). Kefiran bağırsak lümeninin yüzeyinde mucin üreten goblet hücrelerinin sayısını artırma özelliğine sahiptir (Medrano vd, 2011). Mucin, *Bifidobacterium* için iyi bilinen bir besin kaynağıdır ve bağırsakta kefiran tarafından sağlanan mucin artışı ile birlikte bifidojenik etki sağlanmaktadır (Pokusaeva vd, 2011).

Maeda vd. (2004), kefiranın spontan inme eğilimli sıçanlarda serum kolesterol düzeyini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Kefiran, yiyeceklerdeki kolesterol emilimini engelleyemediği, bununla birlikte bağırsakta enterohepatetik dolaşan kolesterolü tuttuğu bildirilmektedir. Kolesterol ve orotik asitin neden olduğu karaciğer bozukluklarının önlenmesine katkıda bulunduğu, karaciğer bozukluğunun önlenmesi ve bağırsak histamin konsantrasyonunun azalması gibi çeşitli işlevlere de sahip olduğu belirtilmektedir (Maeda vd, 2005).

EPS, bazı LAB türleri tarafından üretilen bir polimerdir ve hücre yüzeyinde veya çevreleyen ortamda bir muko-madde olarak üretilir (Ramchandran vd, 2009). Yokoi ve Watanabe (1992), tarafından laktozun *Lactobacillus* sp. kefiran üretimi için en iyi kimyasal olarak tanımlanmış karbon kaynağı olduğu belirtilmektedir. Laktozun geleneksel olarak kefiranın yüksek miktarda üretimi için iyi bir kaynak olduğu belirtilmektedir. Cheirsilp vd. (2003)'e göre, C/N oranı ne kadar yüksekse, toplam kefiran üretiminin de o kadar düşük olduğu ifade edilmektedir. EPS, fermentasyon ürünleri üzerinde yumuşatıcı ve stabilize edici etkileri nedeniyle doğal bir biyodiferansiyatör olarak kabul edilmesinin yanında immünostimülant, antitümör ve kolesterol düşürücü etkileri gibi biyoaktif fonksiyonları nedeniyle de oldukça önemli biyoaktif bileşiklerdir (Shiomi vd., 1982; Vinderola vd., 2006; Kim vd., 2015a).

Jeong vd. (2017), tarafından yapılan bir çalışmada kefiran izole edilen *L. kefiranofaciens* DN1 suşu tarafından üretilen EPS DN1, yeni bir biyoaktif bileşik olarak kabul edilmiştir. Bu suş MRS besiyerinde 2.2 g/L üzerinde glukoz



konsantrasyonunda modifiye edilerek özellikle kültür besiyerine % 1'lik bir konsantrasyonda EPS DN1, eklendiğinde, iki patojenik bakteri *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis* üzerinde bir bakterisidal etki gösterdiğinden dolayı EPS DN1 doğal antibiyotik alternatifleri geliştirmek için önerilmiştir (Jeong vd, 2017).

Kefir danelerinde bulunan LAB türlerinin sahip oldukları bir diğer önemli fonksiyonel etki bu mikroorganizmaların antimikrobiyal etkileridir. Örneğin *L. lactis*, kefir danelerinde yaygın olarak bulunan homofermantatif bir LAB türüdür (Witthuhn vd., 2004; Ninane vd., 2007; Chen vd., 2008; Jianzhong vd., 2009; Gao vd., 2012; Leite vd., 2012) ve bu türün Lacticin 3147 adı verilen iki peptidli geniş spektrumlu lantibiyotik (sınıf I bakteriyosin veya antimikrobiyal peptit) ürettiği bilinmektedir (Ryan vd., 1996; Martin vd., 2004; Lawton vd., 2007). Lacticin 3147'nin, toksijenik *C. difficile*'i, hastane kaynaklı metisiline ve birçok ilaca dirençli olan *S. aureus*'u ve vankomisine dirençli enterokoklar gibi klinik olarak ilgili patojenleri inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Rea vd, 2007; Piper vd, 2009). Carasi vd. (2014), kefir danelerinden izole edilen belirli *E. durans* suşlarının, çeşitli Gram-pozitif ve negatif patojenlere karşı bir inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

### 2.6.1 Kefirin potansiyel antikanserojen etkisi

Kefir, mutasyonu ve DNA üzerinde hasar oluşturan faktörleri ortadan kaldırarak, kanser oluşumuna temel oluşturan  $\beta$ -glukuronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz vb. enzimlerin aktivitelerini düşürerek genlerde değişikliğe neden olabilecek maddeleri (mutajenite) etkisizleştirerek hücrelerdeki hızlı çoğalmayı engellemektedir. Ayrıca kısa zincirli yağ asitlerinin (propiyonat, asetat ve bütirat) üretiminin artmasıyla birlikte asiditenin artmasını sağlayarak, kanser hücrelerinde veya DNA hasarı olan hücrelerde programlı hücre ölümünü (apoptoz) gerçekleştirerek antikanserojen etki gösterebilmektedir (Karatepe ve Yalçın, 2015). *L.kefiri*'in suşu olan P-IF, bir antikanser ajan olarak etkinliğine katkıda bulunabilecek birçok farklı özelliğe sahiptir. Diğer *L. kefiri* suşlarının aksine, P-IF bir karbon kaynağı olarak galaktozu kullanmakta ve büyüme ortamında karbonik asit üretmektedir. *L. kefiri* suşlarının çoğu, uzunlamasına boyutlu bir modelde gelişmektedir. Ancak P-IF, yüzeyinde benzersiz karbonhidrat zincirlerine atfedilen üç boyutlu olarak gelişmektedir (Suzuki vd, 2011) ve önemli fonksiyonel bir kefir suşu olarak görülmektedir. *L. kefiri* P-IF, HL60/AR

hücreleri üzerinde, kanser hücrelerinin hücrel membranında delik oluşturan bir mekanizma ile apoptotik etki gösteren yeni bir simbiyotik mikroorganizma kültürünü temsil etmektedir. Bu tür DC'lerin, interlökinler (IL-6, IL-10 ve IL-1p) ve TNF-a gibi artan sitokin seviyelerini salgılamaya teşvik edici özelliğe sahiptir. *L. kefir* P-IF, MDR lösemi tedavisini iyileştirmek için kullanılabilir yeni bir adjuvant sınıfını temsil edebileceği ifade edilmektedir (Ghoneum vd, 2011).

Kahouli vd. (2015) *L. fermentum*'un, anti-kanser etkileri önceki çalışmalarla karakterize edilen diğer bazı probiyotik bakteriyel türlere (*L. acidophilus* ve *L. rhamnosus*) kıyasla kolon kanseri hücrelerine karşı daha yüksek bir anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda kanser hücrelerinin *L. fermentum* tarafından inhibe edildiğini, ancak normal hücrelerin *L. fermentum* tarafından inhibe edilmediğini de ortaya koymuşlardır. *L. reuteri*'nin, SCFA'ların üretimi ile bağlantılı olarak kolon kanseri hücre büyümesini inhibe etmede önemli bir etki olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle *L. reuteri*'nin antikanserojenik bileşikler üretme yeteneğine sahip olduğu ve kolon kanserinde potansiyel biyoterapötik etkiye sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (Kahouli vd, 2015).

### 2.6.2 Kefirin potansiyel hipokolesterolemik etkisi

Kefir kaynaklı *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* ve *L. reuteri* gibi mikroorganizmalar safra tuzlarını dekonjugasyona uğratarak serum kolesterol seviyelerinde düşüşü sağlayabilmektedir (Pereira vd., 2003; Taranto vd., 2003; Begley vd., 2006, Tsai vd., 2013; Song vd., 2015). *L. plantarum*'un kolesterol, ağrı, bağırsak enfeksiyonu, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve kabızlığın hafifletilmesi gibi geniş bir yelpazede sağlık yararları ile probiyotik özelliklere sahip olduğu ifade edilmektedir (Sirilum vd, 2010). Ahmed vd. (2013), tarafından yapılan bir araştırmada kefirin hipokolesterolemik etkisi açısından orjini farklı olan sütler araştırılmıştır. Koyun, keçi ve inek sütü kullanılarak kefir üretilmiş ve hipokolesterolemik açıdan inceleme sonucunda en yararlı koyun sütü olduğunu ortaya koymuşlardır.

### 2.6.3 Kefirin potansiyel antialerjik etkisi

Eozinofiller, sindirim sisteminde, parazitlere karşı koruma sağlamaktadır. Ancak bazı alerjik hastalıklarda (Bronş astımı, atopik dermatit gibi) kanda ve dokuda hızlı bir artış

göstererek hastalığın şiddetini arttırabilirler (Yalçın, 2005). Lee vd. (2007), tarafından kefirin akciğer dokusunda ovalbumini kullanarak eozinofil artışını önlemesi ve aşırı mukus salgısını azaltması ile alerjik semptomları azalttığını bildirmişlerdir.

#### **2.6.4 Kefirin potansiyel antioksidant etkisi**

Kefirde yer alan LAB suşlarının antioksidant etkisi bağlanmış NADH oksidaz/peroksidaz sistemi, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi birtakım enzimatik mekanizmalar aracılığıyla reaktif oksijen türlerini inaktive ettiği *in vitro* çalışmalarla belirlenmiştir (Johnston ve Delwiche, 1965; Chang ve Hassan, 1997; Hertel vd., 1998; De Angelis ve Gobbetti, 1999; Lin ve Yen, 1999; Amanatidou vd., 2001; Kullisaar vd., 2002, 2003; Barcena vd., 2004).

#### **2.6.5 Kefirin potansiyel antiinflamasyon etkisi**

Zabala vd. (2001b), kefir tüketimi ile bağırsakta *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* 'un arttığını gram negatif bakterilerin (*Gammaproteobacteria* ve *Enterobacteriaceae*) azaldığını ve bağırsaktan bakteri ve bakteriyel toksinlerin mezenterik lenf noduna ve kan dolaşımına translokasyonunu önlediğini ifade etmektedirler. Aynı araştırmacılar LAB 'nin prokarsinojen/karsinojenlere bağlanarak bunları baskıladığını ve insanda üriner mutajenite riskini azalttığını da ortaya koymuşlardır.

#### **2.6.6 Kefirin kan basıncı üzerine etkileri**

Maeda vd. (2004), tarafından kefirin farelerde kan basıncı üzerine etkileri araştırılmış ve kefirin kan basıncı düzeyini önemli oranda düşürdüğünü ortaya koymuşlardır. Kan basıncındaki düşüşün, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)' in kefir tarafından baskılanmış olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Quirosve vd, 2005). Günümüzde hipertansiyon tedavisinde anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) baskılayıcı ilaçlar kullanılmaktadır. Erkaya vd. (2015) tarafından, yapılan bir çalışmada kefirin suda çözünür ekstraktlarının (WSE), insan plazmasından saflaştırılan ACE üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Kefirin ACE inhibisyonu üzerinde olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, farklı bir çalışmada 4 haftalık hipertansif sıçanlarda düşük doz aspirin ve kefirin arteriyel kan basıncı ölçümleri ve renal apoptozis üzerine etkisi araştırılmış (Kanbak vd, 2014) ve sonuçlar

kefirin ACE inhibitörü rolüyle böbrek fonksiyonu hasarını azalttığını ortaya koymuştur (Erkaya vd, 2015).

### 2.6.7 Kefirin sindirim sistemi üzerine etkileri

Kefirin sahip olduğu mikroflora patojenlere karşı antagonistik etki göstererek bağırsakta patojen kolonizasyonuna engel olduğundan dolayı kefir, Rusya'da mide ülserinde ve on iki parmak bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Köroğlu vd, 2015). İnsanlarda ve hayvanlarda yüksek kırmızı et tüketimi ile fekal enzimlerin ( $\beta$  glukuronidaz, azo-redüktaz ve nitroredüktaz) aktiviteleri artmaktadır (Naidu vd, 1999; Zabala vd, 2001b). Naidu vd. (1999), *L.acidophilus*'un tahıl diyetine eklenmesi ile fekal enzim aktivitelerini azalttığını göstermişlerdir.

Taze kefir mide kaslarını çalıştırarak midedeki ağrı, sindirim rahatsızlıklarını azalttığı ve midenin daha hızlı boşalmasını sağladığı araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır. (Zubillaga vd, 2001). Midedeki ülserlerin, gastritin ve mide kanserlerinin temel nedeni olarak görülen *H.pylori*'nin üremesini engellemek için alkali kefir kullanılmış ve *H.pylori*'nin üremesinin engellendiği belirlenmiştir (Karatepe ve Yalçın, 2015). Sepsis, pnömoni ve menenjit gibi hastalıklarda enfeksiyon kaynağı olabilecek bir bakteri *Beta streptokok* olup bu bakterinin aşırı çoğalmasını önleyebilecek bileşenin kefir olduğu bildirilmektedir (John ve Deeseenthum, 2015).

### 2.6.8 Kefirin potansiyel antimikrobiyal etkisi

LAB bakteriyosinler, reuterin, diasetil, hidrojen peroksit, karbondioksit, asetaldehit, aminoasitlerin D-izomerleri ve organik asitler (örnek; laktik ve asetik asit), diasetil ve bakterisidal polisakkaritler veya peptitler gibi çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretmektedir (Lengke ve Adriani, 2009). LAB'nin antimikrobiyal aktivitesi, antibakteriyel maddelerin yanı sıra kültür süpernatantın pH'sını düşüren organik asit üretme yeteneklerine bağlanabilmektedir (Simark-Mattsson vd, 2009).

*Streptococcus* cinsinin üyeleri özellikle *S. mutans* ve *S.sobrinus*, (Wen ve Burne, 2002; Shemesh vd, 2007) çözünmez gluklan ve fruktan üretme ve dış yüzeyine tutunma yetenekleri nedeniyle erken diş çürüklerinin sebebidir. Eritromisin, metal tuzu ve flüorür gibi antibiyotikler geleneksel olarak ağız boşluğunda karyojenik bakterileri hedef almak için kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar diş renginin bozulması ve tahriş

gibi olumsuz yan etkilerle ilişkilidir. Bu nedenle, karyojenik bakteri popülasyonlarının boyutunu azaltmak ve biyofilm oluşumunu bastırmak, ağız hastalıklarının önlenmesi için *L. kefiranofaciens* tüketiminin gerekli olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Kefirden izole edilen *L. kefiranofaciens* antimikrobiyal EPS üreterek antimikrobiyal aktiviteye katılmakta aynı zamanda ağız içinde yüzeye tutunma ağız patojenlerine karşı inhibitör etki sağlama ve ana karyojenik patojenlere karşı (*S. mutans* ve *S. sobrinus*), antimikrobiyal ve anti-biyofilm oluşturma aktivitelerine sahiptir ( Jeong vd, 2018). Çeşitli klinik çalışmalar *L. rhamnosus* ve *L. paracasei* tüketiminin oral kavitedeki *S. mutans* biyofilm oluşumunu azaltabildiğini göstermiştir (Chuang vd, 2011; Guzel-Seydim vd, 2011). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *L. acidophilus*'un *S. mutans*'ın gtf genini (sükrozdan yapışkan ekstraselüler glukozların sentezini sağlayan gen) düşürdüğü gösterilmiştir (Lee ve Kim, 2014).

#### **2.6.9 Kefirin potansiyel antifungal etkisi**

Küf bulaşması veya küflerin kontrol altına alınamaması gıda bozulmalarına ve çeşitli sağlık problemlerine sebep olmaktadır. *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Botrytis* türleri başlıca fungal bozulmaya neden olan türlerdir. Bu türler insan sağlığı için büyük tehdit oluşturan karsinojenik, toksijenik, immünotoksik, nörotoksik, teratoksijenik, hepatoksik, nefrotoksik alerjik etkilere sahip metabolitler olan mikotoksinleri üretebilir (Berikten ve Kivanc, 2012; Bryden, 2007). Küflerin gelişimini durdurmak veya kontrol altına almak için biyokoruyucu olarak fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin kullanımı günümüzde hız kazanmıştır (Magnusson vd, 2003). Daha önceki yapılan çalışmalarda ise *L. lactis* ssp. *lactis* CHD 28.3 suşunun antifungal aktiviteye sahip olduğu ve bu suşun proteine benzer yapıda maddeler üreterek *A. parasiticus*, *A. flavus* ve *Fusarium* sp. funguslarına karşı antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir (Roy vd, 1996). Gerez vd. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada LAB kültürlerinin laktik asit, asetik asit ve FLA (3-fenil laktik asit) üretmeleri nedeniyle bu küflere karşı antifungal etki gösterdikleri ortaya konulmuştur.

## 2.7 Tezin Amacı

Kefir LAB türleri, mayalar ve asetik asit bakterileri tarafından üretilen fermente bir süt ürünüdür. LAB, laktozu laktik aside dönüştürerek süt pH'sını düşürür ve mayalar fermentasyon ile etanol ve CO<sub>2</sub> üretirler. Bu temel bileşenlere ilave olarak kefir danelerinde yer alan mikroorganizmalar EPS, antimikrobiyal bileşenler gibi temel metabolitleri ve süttten diğer biyoaktif bileşenleri üreterek kefirin fonksiyonel niteliklerine katkı sağlarlar. Sonuç olarak kefir danelerinde yer alan türler kefirin fonksiyonel etkilerinin oluşmasında temel rol oynayan unsurdur. Bu açıdan kefir danesinde yer alan türlerin tanımlanması ve ortaya konması onların fonksiyonel niteliklerinin açığa çıkarılması açısından son derece önemlidir. Bu bağlamda bu tezin amaçları:

- 1-Geleneksel kefir danelerinin Türkiye'nin farklı illerinden temin edilerek, kefir üretimi ve danelerde yer alan LAB türlerinin ve mayaların izolasyonu,
- 2-Kefir mikroflorasında yer alan LAB ve maya izolatlarının RAPD-PCR ile ayırt edilmesi ve sonrasında LAB türlerinin ve mayaların genotipik olarak tanımlanması
- 3-Tanımlanan LAB türlerinde EPS üretimi ve antimikrobiyal etki gibi fonksiyonel niteliklerin ortaya konmasıdır.

Sonuç olarak kefire fonksiyonel özellik kazandıran türler ve bu potansiyel türlerin fonksiyonel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Kefir danesi örnekleri

Türkiye'nin beş farklı ili'nden (İstanbul, İzmir, Bursa, Erzurum ve Erzincan) altı adet kefir danesi steril su içinde steril şişelerde temin edilmiş ve soğuk zincirinde Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.2 Besiyerleri

LAB'ın geliştirilmesi amacıyla de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth ve agar, M17 broth ve agar, patojen bakterilerin geliştirilmesi için Brain Heart Infusion (BHI) broth ve agar, Mayaların geliştirilmesi için Potato Dextrose Agar (PDA), Toplam aerobik mezofilik bakterilerin geliştirilmesi için Plate Count Agar (PCA) besiyerleri kullanılmıştır. Kullanılan besiyerleri Merck Türkiye'den temin edilmiştir.

##### 3.1.3 Primerlerin seçimi

LAB suşlarında, 16S rRNA gen dizilemesi ile bakteriyel tanımlama için AMP\_F ve AMP\_R primerleri seçilmiştir. Maya türlerinin 26S rDNA genlerinin amplifikasyonu için NL1 ve NL4 primerleri kullanılmıştır. Bu primerlerin hedef gen, hedef gen boyutu, PCR şartları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1** Tez çalışmasında kullanılan primerler

Primer Referans	Sekans((5'- 3')	Hedef gen	Hedef gen boyutu(bp)	PCR Şartları	Referans
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	-	-	94 °C 2dk 94 °C 1 dk 42 °C 20 s 72 °C 2 dk 40 defa  72 °C 10 dk	(Dertli vd, 2016)

**Çizelge 3.1** Tez çalışmasında kullanılan primerler (devam)

2003)					(Baker vd,
AMP_F	GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG	16S	1.500	95 °C 2 dk 95 °C 30 s 55 °C 20 s 72 °C 30 s 25 defa	
AMP_R	AAGGAGGTGATCCARCCGCA	16S	1.500	72 °C 5 dk	
NL1:	GCATATCAATAAGGGGAGGAAAAG		615		
NL4:	GGTCCGTGTTTCAAGACGG				

### 3.2 Yöntem

#### 3.2.1 Kefir danelerinin aktiveştirilmesi ve çoğaltılması

Beş farklı bölgeden temin edilen kefir danelerinde, 30 °C’de 18-24 saat süre ile pastörize süt kullanılarak ön aktiveştirme işlemi yapılmıştır. Aktiveştirilen kefir daneleri yaklaşık olarak 1 mm gözenek çapına sahip süzgeç ile süzülerek kefir daneleri biraraya toplanmıştır ve takiben saf su ile yıkanıp üzerine pastörize inek sütü ilave edilerek 30 °C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kefir danelerinin çoğalması için bu işleme 10 gün süre ile devam edilmiştir. 10 gün sonra kefir danelerinde çoğalma ve hacim artışı olduğu gözlenmiştir.

#### 3.2.2 Kefir danelerinde yapılan analizler

Kefir danelerinin on gramı, 15 dakika boyunca maksimum hızda Stomacher cihazı 400 Circulator (BagMixer) kullanılarak 90 mL soğuk steril fizyolojik tuzlu su (% 0,85 NaCl) içerisinde homojenize edilmiş ve 1/10’luk dilüsyonlar hazırlanmıştır. Homojenize edilen örnekler’den 1 ml alınarak içinde 9 ml FTS bulunan tüpe aktarılmış ve bu şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.



### 3.2.2.1 *Lactobacillus* spp. sayısının belirlenmesi

*Lactobacillus* spp. sayısını tespit etmek için de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar) (Merck 1.10660) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan 0.1 ml yayma plak yöntemi ile ekim yapılarak Anaerocult A (Merck 1.13829) ile birlikte anaerobik jarlara konularak oluşturulan anaerobik şartlarda  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra sayım yapılmıştır (Speck, 1984).

### 3.2.2.2 *Lactococcus* spp. sayısının belirlenmesi

*Lactococcus* spp. sayısını tespit etmek için M17 agar kullanılmıştır. Petrilere uygun dilüsyonlardan 0.1 ml yayma plak yöntemi ile ekim yapılarak Anaerocult A (Merck 1.13829) ile birlikte Anaerobik jarlara konularak oluşturulan anaerobik şartlarda  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra sayım yapılmıştır (Speck, 1984).

### 3.2.2.3 Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı

Uygun miktarlarda hazırlanmış olan dilüsyonlardan 1 ml alınarak petri plakalarına konulmuştur. Daha sonra  $45^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulmuş Plate Count Agar (PCA) Merck (1.05463) besiyerinden petri plakalarına ilave edilerek (13-15 ml) ekim yapılmıştır. Petri plakaları  $30^{\circ}\text{C}$  'de  $48\pm 2$  saat inkübe edilerek uygun sayım aralığında ki (10-300) koloniler ilgili dilüsyon faktörü ile çarpılarak TAMB sayısı log kob/ml olarak belirlenmiştir (Harrigan, 1998).

### 3.2.2.4 Maya sayısı

Maya türlerinin izolasyonu için, uygun miktarlarda hazırlanmış olan dilüsyonlardan 1 ml alınarak petri plakalarına konulmuştur.  $45^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulmuş Potato Dextrose Agar (PDA) Merck (1.10130) besiyerine besiyerinin pH' sını 3,5'a ayarlamak için % 10'luk tartarik asitten ilave edilerek homojen olarak karışması sağlanmıştır. Tartarik asitle karıştırılan besiyeri petri plakalarına eklenecek ekim yapılmıştır. Petri plakaları  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 5-7 gün inkübe edilerek uygun sayım aralığında ki (10-300) koloniler sayılıp seyreltme faktörü ile çarpılarak sonuç log kob/g bulunmuştur (Witthunn vd, 2004).

### **3.2.3 Laktik asit bakterilerinin izolasyonu**

#### **3.2.3.1 Kültür ortamı**

Laktobasillerin izolasyonu için MRS agar, geliştirilmesi için MRS broth, Laktokokların izolasyonu için M17 agar, geliştirilmesi için M17 broth kullanılmıştır. Asetik asit bakterilerinin izolasyonu için AAM (Asetik Asit Medium) ve GEA (Glikoz yeast extract agar) geliştirilmesi için MRS broth kullanılmıştır (AAM içeriğinde %1 Glukoz, %0,5 Etanol, %0,3 Asetik Asit, %1,5 Pepton From Casein kullanılmıştır). (GEA içeriğinde %5 Glukoz, %0,5 Yeast Extract, %1 Agar-agar kullanılmıştır).

#### **3.2.3.2 Bakteriyel suşlar ve gelişme koşulları**

Kefir örneklerinden laktik asit bakterisi izole etmek amacı ile örneklerden 10 gram steril stomacher poşetlerine tartılıp 90 ml steril fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Daha sonra örneklerden dilüsyonlar hazırlanmış  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  dilüsyonlarından MRS agar, M17 agar ve BHI agar besiyerlerine yayma yöntemiyle ekim yapıp petri plakaları  $37^{\circ}\text{C}$  de 24 saat anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında katı besiyeri ortamında gelişen morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilip ilgili sıvı besiyeri ortamına steril kürdanlar yardımı ile alınıp  $37^{\circ}\text{C}$ ' de 24 saat inkübe edilmiştir.

### **3.2.3.3 Maya türlerinin izolasyonu**

#### **3.2.3.3.1 Kültür ortamı**

Maya türlerinin izolasyonu için Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) geliştirilmesi için Potato Dextrose Broth (PDB) (PDB içeriğinde %2 Glukoz, %1 Pepton From Casein, %1 Yeast Extract) kullanılmıştır.

#### **3.2.3.3.2 Maya türlerinin izolasyonu ve gelişme koşulları**

Kefir örneklerinden maya türlerini izole etmek amacı ile örneklerden 10 gram steril stomacher poşetlerine tartılıp 90 ml steril fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Daha sonra örneklerden dilüsyonlar hazırlanmış  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  dilüsyonlardan PDA agar besiyerine yayma yöntemiyle ekim yapıp petri plakaları  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 5-7 gün anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonunda katı besiyeri ortamında gelişen morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilip ilgili sıvı besiyeri ortamına steril kürdanlar yardımı ile alınıp 21°C'de 2 gün inkübe edilmiştir.

### **3.2.4 Kültür stoklarının oluşturulması ve izolatların depolanması**

İzole edilen bakterilerin stok solüsyonları sonraki analizlerde kullanılmak üzere % 40'lık gliserol kullanılarak hazırlanıp -80 °C de depolanmıştır.

### **3.2.5 Laktik asit bakterilerinin tanımlanması**

#### **3.2.5.1 Fenotipik tanımlama**

##### **3.2.5.1.1 Koloni morfolojisi**

Katı besiyeri ortamında gelişen koloniler birbirleri ile kıyaslanarak morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilmiştir. Petrilerden alınan kolonilerin saflaştırılma işlemlerinin takiben bu izolatlardan LAB suşlarına ait olanların ortaya konabilmesi için Gram boyama ve katalaz testi yapılmış ve Gram pozitif ve katalaz negatif suşlar sonraki genotipik ayırım ve tanımlama işlemleri için seçilmiştir. Benzer olarak Gram negatif olarak değerlendirilen suşlardan da Asetik asit bakterisi olabileceği münasebetiyle bazı izolatlar sonraki işlemler için seçilmiş ve genotipik moleküler işlemler bu izolatlar içinde uygulanmıştır.

##### **3.2.5.1.2 Gram boyama**

Gram boyama yapılan kültürler 18-24 saat sıvı kültür ortamında geliştirilmiş daha sonra kültürler santrifüjlenerek sıvı kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet temiz bir lam üzerine öze yardımıyla aktarılmış ve ince bir film tabakası halinde yayılmıştır. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra preparat usulüne uygun şekilde 3 kez alevden geçirilerek, bakterilerin lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır. Preparat kristal viyole ile 1 dk boyanmış, boya lam üzerinden akıtılmış ve yerine lügol çözeltisi konularak 1 dakika beklenmiştir. Lügol lam üzerinden akıtılarak preparat rengi giderilinceye kadar önce etil alkol ile sonra su ile yıkanmıştır. Preparat ikinci zıt boya olan sulu karbol füksin ile 20-30 sn. boyanmıştır ve boyanın uzaklaştırılmasını takiben preparat su ile iyice yıkanmış ve sonra kurutma kağıdı ile kurulanmış ve havada kuruması için beklenmiştir. Preparata immersiyon yağı damlatılarak ışık

mikroskopunun x100'lük objektifinde incelenmiştir. Gram pozitif bakteriler kristal viyolenin koyu mavi-mor renginde, Gram negatifler ise füksinin kırmızı renginde görünmüşlerdir (Sert, 2002).

### **3.2.5.1.3 Katalaz testi**

Katı besiyerindeki koloninin (1 günlük) üzerine 1 damla %3'lük Bactident Catalase (Merck 1.11351) çözeltisi damlatılmıştır. İşlem ardından gaz kabarcıklarının oluşumunun gözlenmesi katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Pichhardt, 2004).

### **3.2.5.2 Genotipik olarak Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanması**

#### **3.2.5.2.1 Genomik DNA izolasyonu**

Laktik asit bakterilerinin ve maya türlerinin genomik DNA izolasyonu için Fenol kloroform metodu kullanılmıştır. Sıvı kültür ortamında bir gece geliştirilmiş kültürden ependorf tüpü içerisine 1 ml alınarak 10 dakika 7000xg'de santrifüj işlemi ile bakteri hücreleri bir araya toplanmıştır. Tüpteki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bir araya toplanan hücrelerin üzerine 450 µl TE (Tris EDTA) tamponundan ilave edilip hafif bir karıştırma ile hücrelerin tampon içerisinde süspansen olması sağlanmıştır. Süspansen edilen hücrelere 50 µl %10' luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µl Proteinaz K ilave edilip vortekslenildikten sonra 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ise 0.5 ml fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip tüpler baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C'de 10 dakika 7000xg'de santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. İşlem fenol-kloroform-isoamil alkol karışımı ile birkez daha tekrarlanıp oluşan süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel yeni bir tüpte toplanmıştır. 5M'lık sodyum asetatın 50 µl içeriğe ilave edilip hafifçe karıştırılmıştır. İçeriğe 1 ml izopropanol ilave edilerek çöken DNA'nın beyaz iplikçikleri oluşana kadar ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 3000xg'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pellet üzerine 0,5 ml %70'lik etanol ilave edilip hafif karıştırıldıktan sonra içerik 3000xg'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolü uzaklaştırmak

için içerik 37°C’de 5-10 dakika bekletilmiş ardından elde edilen DNA 100 µl distile su ilave edilerek süspanse edilmiştir (İspirli, 2016).

### 3.2.5.2.2 RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon

Geleneksel kefir danelerinden izole edilen farklı LAB ve maya izolatlarını ayırt etmek için, M13 (5’- GAGGGTGGCGTTCT) primeri kullanılarak çizelge 3.2’de verilen RAPD-PCR protokolü uygulanmıştır (Dertli vd, 2016). Bu amaçla 100 µl’lik PCR tüplerine toplamda son hacimleri 50 µl olacak şekilde, sırasıyla; steril su, 5x Phusion Buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP miks, Primer (M13),Taq polimeraz ve templet DNA ilave edilip, tüm bileşenler pipetle iyice karıştırılmıştır. PCR tüpleri cihaza yerleştirilerek 1 döngü 94°C’de 120 saniye başlangıç denatürasyonu basamağının (ön denatürasyon) ardından bir çevrimi 94°C’de 30 saniye denatürasyon (çift zincirin açılması), 42°C’de 20 saniye primer bağlanması, 72°C’de 120 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 40 döngü ve son olarak 1 döngü 72°C’de 10 dk son uzama ve 20°C’de bekleme aşamalarından oluşan Çizelge 3.2’de verilen PCR protokolü kullanılmıştır. PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrılmasından sonra bant desenleri görselleştirilmiştir ve tanımlama için ayrı ayrı izolatlar seçilmiştir.

**Çizelge 3.2** RAPD-PCR analizi için hazırlanan PCR karışımı ve PCR şartları

<b>PCR Karışımı</b>		<b>PCR Şartları</b>		
H <sub>2</sub> O	<u>50 ul için</u>			
Şablon (DNA)	1ul	94°C	2 dk	1 <sup>§</sup>
5x Phusion Buffer	10ul	94°C	1 dk}	Denatürasyon
MgCl <sub>2</sub>	4ul	42°C	20 s} x40 <sup>§</sup>	
dNTP miks	1ul	72°C	2 dk}	Bağlanma
Primer (M13)	0.75ul	72°C	10 dk	Uzama
Taq polimeraz	0.25ul	20°C		Son uzama
				Bekleme

### 3.2.5.2.3 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

RAPD-PCR analizi ile bant desenleri görselleştirilen PCR ürünlerinden farklı olan izolatlar seçilmiştir. Bakterileri tanımlamak amacıyla 16S rRNA gen bölgesi PCR işlemi ile çoğaltılmıştır. Farklı türlerin 16S rRNA bölgeleri; AMP F (5'-GAGAGT TTGATYCTGGCTCAG - 3') ve AMP R (3'- AAGGAGGTGATCCARCCGCA - 5')

primerleri kullanılarak çizelge 3.3'te verilen PCR protokolü uygulanmıştır (Dertli vd, 2016).

Bu gen Şekil 3.2'de görüldüğü gibi 9 farklı bölgeden oluşmakta ve bu bölgeler türler arası değişken bölgeler ve her türde aynı olan bölgeleri içermektedir ve primer geliştirilme işlemlerinde her tür için aynı olan bölgeler kullanılmaktadır. Bu genin kullanılması son zamanlarda oldukça gelişen topluluk mikrobiyota analizlerinin de gelişimine katkı sağlamıştır.



Şekil 3.2 16S geninin yapısı. V1-V9 farklı bölgeleri göstermektedir.

Çizelge 3.3 16S rRNA geninin amplifikasyonu için oluşturulan PCR karışımı ve PCR şartları

<b>PCR Karışımı</b>		<b>PCR Şartları</b>		
H <sub>2</sub> O	50 ul için			
Şablon (DNA)	1ul	95°C	2 dk	1 <sup>§</sup>
5x tampon	10ul	95°C	30 s	} Denatürasyon
dNTP	0.4ul	55°C	60 s	
Primer F (20 µM)	1ul	72°C	30 s	} Uzama
Primer R (20 µM)	1ul	72°C	5 dk	
GoTaq	0.25ul			

### 3.2.5.2.4 26S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Genomik DNA izolasyonu işleminden sonra mayaların tanımlanması için 26S rDNA geninin D1/D2 bölgesinin amplifikasyonu yapılmıştır. Bu amplifikasyonu gerçekleştirmek için NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG-3') ve NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri kullanılarak Şekil 3.4'te verilen PCR

protokolü uygulanmıştır (Yılmaz vd, 2016). 26S rDNA geninin 600 bp bölgesi NL1 ve NL4 primer çifti ile ampilifiye edilmiştir.

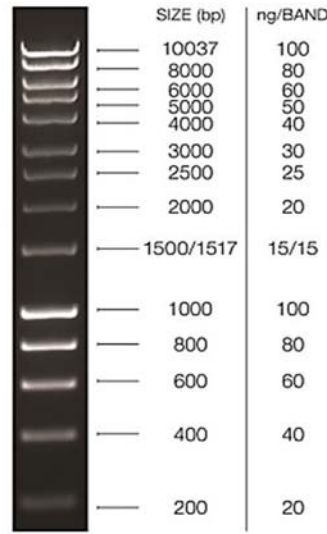
**Çizelge 3.4 RAPD-PCR analizi için hazırlanan PCR karışımı ve PCR şartları**

<b>PCR Karışımı</b>		<b>PCR Şartları</b>		
H <sub>2</sub> O	<u>50 ul için</u>	95°C	10 dk	
Şablon (DNA)	1ul	94°C	1 dk}	Denatürasyon
5x tampon	10ul	54°C	2 dk} x40 <sup>s</sup>	Bağlanma
dNTP	0.4ul	70°C	3 dk}	Uzama
Primer F (20 µM)	1ul	72°C	7 dk	
Primer R (20 µM)	1ul			
GoTaq	0.25ul			

PCR ürünleri saflaştırma işlemi uygulanmadan sekans analizini yapan firmaya gönderilmiştir.

### 3.2.5.2.5 PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü

PCR ürünlerinin elektroforezi için, %1 agaroz (Sigma A9539) içeren jeller kullanılmıştır. Konsantrasyonu %1 olan agaroz jeli 0,5X Tris borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. PCR ürününden 10 µl alınarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve TBE tamponu kullanılarak elektroforez işlemi yapılmıştır. Örnekleri agaroz jele yüklemeye önce örnekler loading buffer (% 0,015 bromethyl blue (Sigma), % 10 glycerol (Sigma) 0,5 x TBE buffer) ile renklendirilmiştir. Renklendirme işlemi için parafilm üzerine 1 µl loading buffer konulup üzerine 10 µl örnek ilave edilerek mikropipet yardımıyla birbirine karıştırılmıştır ve renklendirilen örnekler agaroz jele yüklenmiştir. Jel tarağı yerleştirilmiş elektroforez tankına jelin üzerini kapatacak biçimde tampon çözelti (0.5XTBE) ilave edilmiştir. Elektroforez, 100 voltta yaklaşık bir saat süreyle yapılmıştır. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiş ve ortamdan alınan jel, 1 mg.L<sup>-1</sup> 'lik etidyum bromid çözeltisinde bekletilmiştir. Jel etidyum bromid çözeltisinden dikkatlice alınıp, deiyonize su içerisinde kısa süre tutularak durulandıktan sonra UV ışık altında görüntülenmiştir. Hyperladder I (Bioline, UK) her elektroforetik jelde DNA boyutlayıcısı olarak kullanılmıştır. Jele yüklenen 5 µl ladder'ın fragmentlerinin boyutları ve miktarları Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.3** Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.

#### 3.2.5.2.6 PCR ürünlerinin saflaştırılması

Amplifikasyon bitiminde ürün ortamdaki maddelerden (dNTP, kısa DNA parçaları, tamponlar ve enzimler gibi) arındırılmıştır. Temizleme işlemine Sure-Clean (Bioline) kullanılmıştır. PCR ürününe eşit miktarda Sure-Clean tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra santrifüjlenmiştir (30 dk, 14.000×g, 24°C). Daha sonra 150 µl %70'lik etanol ilave edilip tekrar santrifüjlenmiştir (30 dk, 14000×g, 24°C). Bu adımda etanol uzaklaştırıldıktan sonra pellet havada kurutulmuş ve 20 µl TE tamponu ilave edilerek yeniden süspansiyon edilmiştir. PCR ürünleri dizi analizi için hazır hale getirilmiştir.

#### 3.2.5.2.7 Dizi analizi

DNA dizi analizi bir DNA molekülünün nükleotid baz diziliminin belirlenmesidir. Saflaştırdığımız PCR ürünlerinin 16S rRNA geninin sekans analizi GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi Sanayi ve Ticaret Limited Şirketine yaptırılmıştır. İzolatların 16S rRNA dizileri, % 97-100'lük bir benzerlik kriteri ile BLAST algoritması kullanılarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanı ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda tür tanımlaması yapılmıştır.



### 3.2.6 İzole edilen bakterilerin filogenetik analizi

Farklı suşların 16S rRNA genlerinin filogenetik mesafeleri MEGA7 programı ile test edilmiştir. Filogenetik ağaçlar 1000 tekrarlı özyükleme ile neighbour-joining (NJ) metodu kullanılarak oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, 1987).

### 3.2.7 Kefir izolatlarının gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Tüm LAB izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri *S. typhimurium* RSSK95091, *E. coli* BC1402, *B. cereus* BC6830, *Y. enterocolitica* ATCC27729 ve *S. aureus* ATCC25923'e karşı belirlenmiştir. Antimikrobiyal testi İspirli vd. (2017) belirlediği metoda göre yapılmıştır. Kültürler 10 ml MRS broth içinde %1 inokülasyon ile bir gece boyunca 37 °C'de geliştirilmiştir. Tüm patojen bakteriler TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) besiyerinde aerobik koşullarda 37°C'de geliştirilmiştir. Hücreler 14 000 g'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant steril bir 0,22 µm şırınga filtreden geçirilmiştir. Filtre edilen süpernatantın pH'sı NaOH ile pH 6,0'ya ayarlanmıştır. Muhtemel engellerin ortadan kaldırılması için 30 dk. boyunca 25°C'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalaz (Merck) ile uygulama inhibisyonu takip eden organik asitler ilave edilmiştir.

Son filtrasyon adımını takiben test edilen suşların süpernatantları hedef patojen suşlarının daha önce yayıldığı TSA (Tryptic Soy Agar, Merck) agar plakalarına uygulanmış daha sonra her birinde oluşan inhibisyon bölgelerinin ölçümü 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra yapılmıştır ve antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir. İnhibisyon bölgeleri için belirli bir skala oluşturularak belirlenmiştir.

### 3.2.8 Kefir izolatlarının küf türlerine karşı antifungal aktivitelerinin belirlenmesi

Kefir LAB izolatlarının antifungal aktiviteleri *B. cinerea*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *F. oxysporum* ve *P. chrysogenum*'a karşı test edilmiştir. Kefir izolatları MRS broth içerisinde 37 °C'de %1 inokülasyonla bir gece geliştirilmiştir. MRS agar plakalara dökülerek 37 °C'de 3 saat bekletilmiştir. Bu plakalara geliştirilen izolatlardan spot yöntemi ile ekim yapılarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 10 ml yumuşak PDA (%0,8 agar) içine küf ilave edilerek plakalarda gelişen laktik asit bakterilerinin üzeri yumuşak PDA ile kaplanmış ve 25°C'de 3 gün inkübe edilmiştir. LAB etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür ve mm olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.9 Kefir izolatlarının antibiyotik hassasiyetinin ölçülmesi

Antibiogram testi, antibiyotik difüzyon diskleri kullanılarak İspirli vd. (2017) belirlediği metoda göre yapılmıştır. Kefir izolatları arasında antibiyotik direncinin belirlenmesi için her bir suş MRS broth içerisinde geliştirilmiştir ve % 1 inokulum ile yayma plak yöntemi uygulanmıştır. Plakalara antibiyotik diskler yerleştirilmiştir ve plakalar 24-48 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Antibiyotiklerin test konsantrasyonları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

**Çizelge 3.5** Antibiyotiklerin test konsantrasyonu

Ampicillin (Amp, 10 µg),
Streptomycin (S, 10 µg),
Chloramphenicol (C, 30 µg),
Erythromycin (E, 15 µg)
Kanamycin (K, 30 µg)
Tetracycline (TE, 30 µg)
Oxytetracycline (T,30 µg),
Penicillin G (10 units)

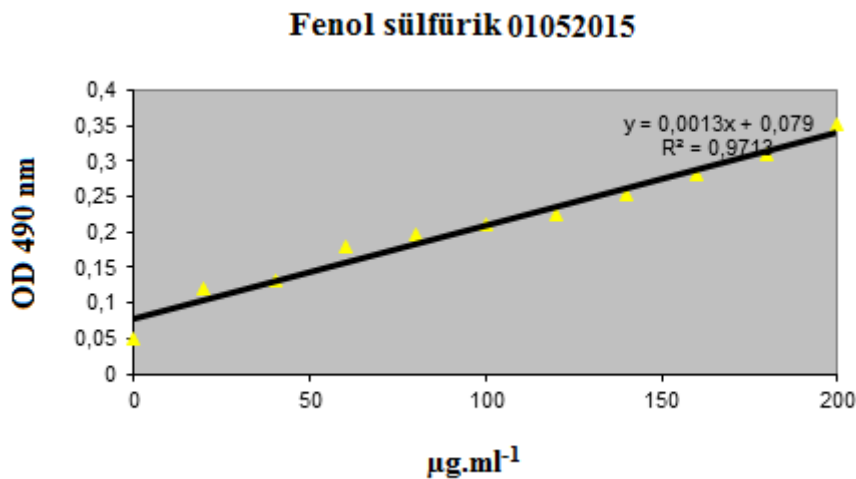
### 3.2.10 Farklı türün EPS üretimi

EPS üreten türlerin belirlenmesi için koloni formunda yapışkan bir görünümde olan şlaym karakterdeki koloniler seçilmiştir. EPS üretiminin belirlenmesi amacıyla LAB türleri %1 oranında 500 ml modifiye BHI besiyerine inoküle edilerek ve uygun ortamda 30°C'de 48 saat geliştirilerek (Dertli vd, 2013) tanımladığı metoda göre EPS izolasyonu işlemine tabi tutulmuştur. İlk olarak hücreler 6000 × g (4°C 30 dk.)' de elde edilerek bakteriyel çökelti ve süpernatant ayrılmıştır. Süpernatantla eşit miktarda soğuk alkol ilave edilerek EPS çöktürülmüştür. Bir gece bekletilen örnekler 10000 × g 'de 30 dk. 4°C'de santrifüj edilerek ve çökelen EPS toparlanmıştır. EPS çökeltisi daha

sonra suda hafif bir ısıtma işlemi ile (50°C’de) çözülecek ve 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilerek bir gece daha 4°C’de bekletilmiştir. Sonraki aşamada santrifüj işlemi tekrar edilerek EPS elde edilmiştir ve H<sub>2</sub>O’da çözülmüştür. Elde ettiğimiz çökeltide EPS dışında bulunabilecek şeker bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için çökelti 3 gün boyunca diyaliz işlemine (12000-14000 Da) tabi tutulmuştur. EPS’e karışmış olabilecek protein bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için diyaliz işlemine tabi tutulmuş EPS çözeltileri %10 TCA ile muamele edilerek 4 °C’de bir gece bekletilmiştir. Çökelen proteinler 10000 × g’de 15 dk. boyunca santrifüj edilerek EPS’den ayrılmıştır. Bu işlemin ardından supernatanta 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilerek 4°C’de bir gece çökeltme işlemi uygulanarak çökelen EPS elde edilip H<sub>2</sub>O’da çözülmüştür.

### 3.2.11 Fenol-sülfirik asit testi ile EPS üretim analizi

EPS miktarını belirlemek için Fenol-sülfirik asit testi yapılmıştır (Dubois vd, 1956). Bu analiz için glikoz kullanılarak standart seyreltik çözeltiler (0’dan 0,2 mg.ml<sup>-1</sup>’ye kadar) hazırlanmıştır. Standart seyreltiler ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Spektro küvetlerinin her birine 200 µl örnek konularak üzerine 600 µl % 98’lik sülfirik asit ve 120 µl % 5’lik fenol ilave edilmiştir. Renk gelişimi için 5 dk. beklenmiştir. Spektrometrenin OD değeri 490 nm’ye ayarlanmıştır. Süre bitimini takiben küvetler spektrometreye konularak OD<sub>490 nm</sub>’de ölçüm yapılmıştır. Glikoz eğrisi kullanılarak örneklerin EPS miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.4 Fenol sülfirik asit testinde kullanılan standart eğri

### 3.2.12 EPS kompozisyonunun HPLC ile belirlenmesi

Kefirden izole edilen LAB'leri tarafından üretilen EPS'te yer alan şeker gruplarının tespiti amacıyla HPLC analizi yapılmıştır. Ağzı kapaklı tüplere yaklaşık 1 g EPS örneği tartılmış ve örnekler 0,5 M 25 ml sülfürik asit ilavesiyle 95 °C sıcaklıkta tam 12 saat süreyle hidrolizasyona uğratılmıştır. İşlem sonunda örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ve daha sonra 4 M NaOH ile nötralize edildikten sonra hacimleri 30 ml'ye tamamlanmıştır. İşlem sonunda tüpler 1600×g hızında 10 dk. süre ile santrifüj edilmiş ve süpernatantlar 0,45 µm şırınga filtrelerden geçirilerek safsızlıklardan arındırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnekler refraktif indeks dedektörüne sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu) sistemine enjekte edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlenmiş ve kolon olarak CARBOsep CHO-682 Pb Column kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C'de sabit tutulmuş ve hareketli faz olarak su kullanılmıştır. Örneklerin glukoz, galaktoz, maltoz ve fruktoz içerikleri aynı sistem ve çözücü kullanılarak her bir şeker için daha önceden oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. (İspirli, 2016). Bu kapsamda glukoz, galaktoz, maltoz ve fruktoz için aynı konsantrasyonlar hazırlanmış ve her bir konsantrasyona karşılık HPLC kromatogramından elde edilen alan belirlenmiştir.

### 3.2.13. İstatistiksel analiz

Kefir danelerinde yer alan mikroorganizma grupları ve kefir izolatları tarafından üretilen EPS miktarları arasındaki farklılıkların ortaya konması için SPSS istatistik paketi (17.0; SPSS Statistics/IBM, Armonk, NY) ile tukey testi ve ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1 Kefir Danelerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

#### 4.1.1 Kefir danelerinin *Lactobacillus* spp. sayısı

Farklı şehirlerden toplanan 6 kefir danesinde belirlenen *Lactobacillus* spp. sayıları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’den görüleceği üzere kefir danelerinde en düşük Laktobasil sayısı 7,37 log kob/g olarak belirlenirken en yüksek değer ise 9,07 log kob/g olarak sayılmıştır. Kefir danelerinde yer alan Laktobasil sayıları karşılaştırıldığında iki adet kefir danesinin Laktobasil sayısı diğerlerine göre yüksek bulunmuş olup bu fark istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

**Çizelge 4.1** Kefir danelerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları.

Örnek Numarası	<i>Lactobacillus</i> spp. Sayısı (log kob/g)	<i>Lactococcus</i> spp. Sayısı (log kob/g)	TAMB Sayısı (log kob/g)	Maya Sayısı (log kob/g)
1	7,82 <sup>c*</sup>	7,69 <sup>a</sup>	7,27 <sup>d</sup>	7,35 <sup>b</sup>
2	8,31 <sup>b</sup>	7,65 <sup>a</sup>	7,75 <sup>bc</sup>	7,97 <sup>a</sup>
3	7,65 <sup>cd</sup>	7,64 <sup>a</sup>	7,98 <sup>b</sup>	7,45 <sup>b</sup>
4	9,07 <sup>a</sup>	7,50 <sup>a</sup>	7,55 <sup>c</sup>	7,49 <sup>b</sup>
5	7,37 <sup>d</sup>	6,82 <sup>b</sup>	8,76 <sup>a</sup>	6,77 <sup>c</sup>
6	7,64 <sup>cd</sup>	5,84 <sup>c</sup>	6,83 <sup>e</sup>	7,85 <sup>a</sup>

\* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $p<0.05$ ).

Daha önce yapılan çalışmalarda kefirin Laktobasil içeriği 8,0-9,1 log kob/ml değişim aralığında tespit edilmiştir (Witthuhn vd., 2004; Irigoyen vd., 2005; Guzel-Seydim vd., 2005; Ertekin ve Guzel-Seydim 2010). Bu sonuçlara göre çalışmamızdaki kefir danesi

örneklerinde saptanan Laktobasil sayısı literatür verileri ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

#### **4.1.2 Kefir danelerinin *Lactococcus* spp. sayısı**

Kefir danesi örneklerinde belirlenen *Lactococcus* spp. sayısı en düşük 5,84 log kob/g ve en yüksek 7,69 log kob/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Örnekler arasındaki farklılıklar incelendiğinde son iki örneğin ilk dört örneğe göre daha düşük *Lactococcus* spp. sayısına sahip olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Daha önce kefir üzerinden yapılan bir çalışmada Guzel-Seydim vd. (2005), kefirin fermentasyonu sonunda 8,87 log kob/g Laktokok içerdiğini belirtmişlerdir. Öner vd. (2010), tarafından farklı süt çeşitleri ve kültür çeşitlerinin kefirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisini araştırdığı bir çalışmada ise kefirin Laktokok içeriğinin 7,255-8,230 log kob/g olarak değiştiğini belirlemişlerdir. Benzer diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlar kefirin Laktokok içeriğinin 7,255-10,0 log kob/g arasında değiştiğini ortaya koymuşlardır (Kroger, 1993; Rea vd., 1996; Garrote vd., 1997; Irigoyen vd., 2005; Guzel-Seydim vd., 2005; Ertekin ve Guzel-Seydim, 2010). Bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar *Lactococcus* spp. sayısının literatür verileri ile kıyaslandığında daha düşük olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak kefir danelerinin mikrobiyal içeriği, kefir danelerinin kaynağına, kefir danelerinin oluştuğu coğrafi bölgelere ve bu kefir danelerinin gelişmesi için kullanılan sütün çeşidine, inkübasyon zamanına bağlı olarak değişebileceği açıklanmaktadır (Dertli ve Çon, 2017). Benzer olarak yapılan çoğu çalışma kefir üzerinden yürütülmüş olup bu çalışmada dane üzerinden *Lactococcus* spp. sayısının belirlendiği düşünüldüğünde bu farklılığın normal olduğu sonucuna ulaşılabilir.

#### **4.1.3 Kefir danelerinin Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri sayısı**

Kefir danelerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı en düşük 6,83 log kob/g en yüksek ise 8,76 log kob/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Önemli olarak bu sayı kefir danelerinde dikkate değer bir şekilde değişkenlik göstermektedir. Bu durum kefir danelerinin geliştirildiği ortamların, süt kaynağının vs., gibi faktörlere bağlı olarak TAMB sayısının daneler açısından farklılık arz ettiği şeklinde yorumlanabilir.

#### 4.1.4 Kefir danelerinin maya sayısı

Kefir danelerinde belirlenen maya sayısı en düşük 6,77 log kob/g en yüksek ise 7,97 log kob/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Guzel-Seydim vd. (2005), tarafından kefirin bir günlük depolama sonrası maya miktarı 6,55 log kob/ml olarak kaydedilmiştir. Mainville vd. (2001), tarafından yapılan araştırmada kefirin 5,09 log kob/ml maya içeriğine sahip olduğunu, Ninane vd. (2005), tarafından yapılan başka bir çalışmada kefirdeki maya sayısının 7,70 log kob/ml olduğunu, Irigoyen vd. (2005), tarafından yapılan çalışmada kefirin maya içeriğinin 5,00 log kob/ml olduğunu, Guzel-Seydim vd. (2005), tarafından yapılan çalışmada ise kefirin maya içeriğinin 6,16 log kob/ml olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda kefirin maya içeriği 5-6 log kob/ml değişim aralığında olduğu ifade edilmektedir. Bu çalışmada kefir danelerinde belirlenen maya sayısı ise literatür verilerine göre biraz daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun daha önce de ifade edildiği gibi kefir danesinin orjinine, kullanılan sütün yağ miktarına ve fermentasyon süresine bağlı olduğu düşünülmektedir. Benzer olarak bu tip farklılıkların ortaya çıkabilmesi üretilecek kefirin karakteristiklerinin farklı olması ve sonuç olarak farklı nitelikte kefir üretilebilmesine imkân verebilmesi açısından önem arz etmektedir.

#### 4.2 Kefir Danesinde Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların Tanımlanması

Kefir danesinde yer alan farklı LAB ve maya suşlarının tanımlanması amacıyla öncelikle kefir danelerinden MRS, M17, BHI ve PDA, besiyerlerine ekim yapılmış ve toplamda 200 maya ve bakteri izolatu petri kutularında gösterdikleri morfolojik farklılıklara istinaden bir sonraki işlemler için izole edilmiştir.

**Çizelge 4.2** Kefir danesi örneklerinden ve ilgili besiyerlerinden elde edilen izolat sayıları

Örnek No	İzolat Sayısı			
	MRS agar	M17 agar	BHI agar	PDA agar
1	9	9	6	10

**Çizelge 4.2** Kefir danesi örneklerinden ve ilgili besiyerlerinden elde edilen izolat sayıları (devam)

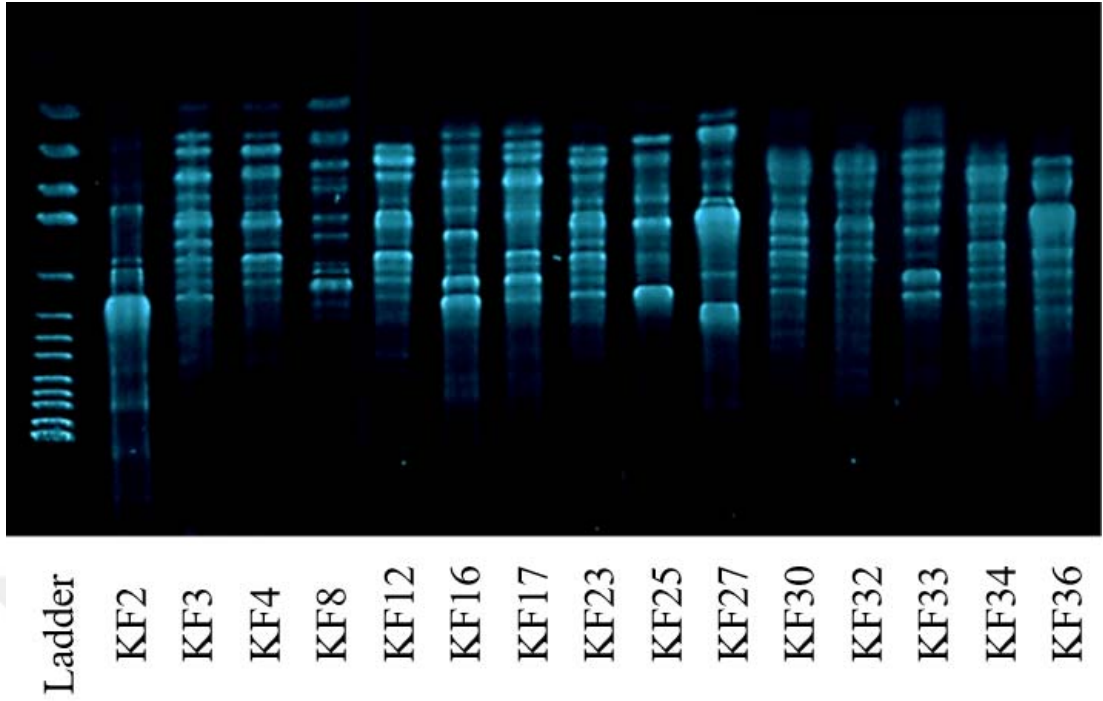
<b>2</b>	8	10	5	9
<b>3</b>	7	8	8	9
<b>4</b>	9	9	5	9
<b>5</b>	9	8	7	10
<b>6</b>	10	9	7	10

### **4.3 LAB Türlerinin Tanımlanması**

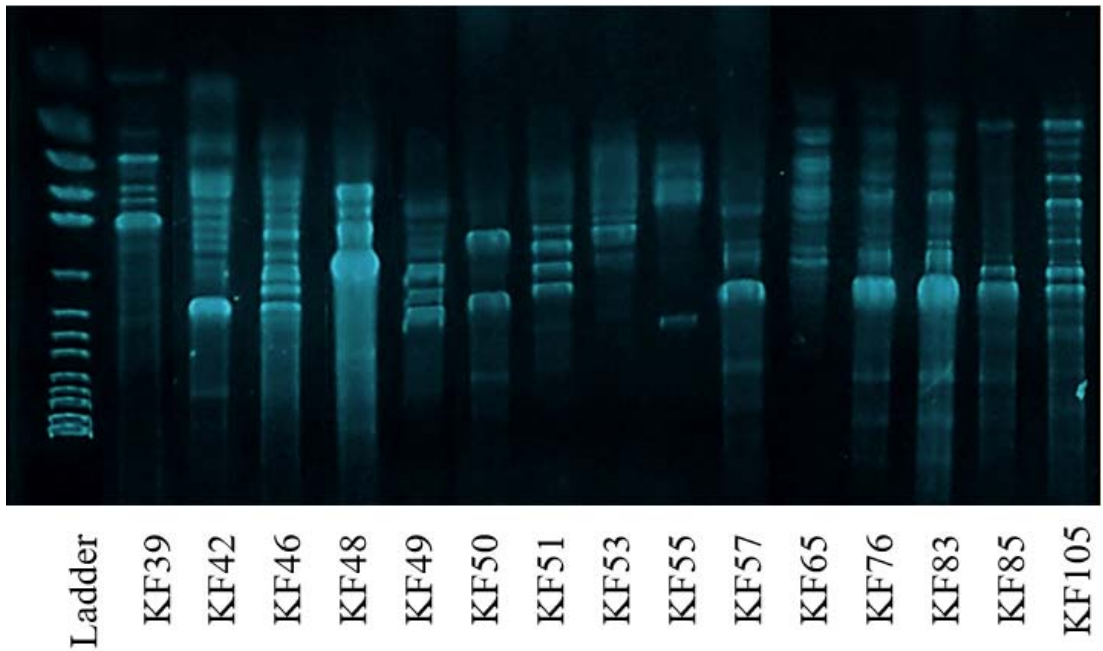
#### **4.3.1 RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon**

RAPD-PCR işlemi belirli bir primerin rastgele genomda yapacağı ampilifikasyona dayalı ve suş bazında ayırım gerçekleştirebilen bir genotipik ayırım uygulamasıdır. Bu tez kapsamında da geleneksel kefir danelerinde yer alan farklı LAB ve maya izolatlarını ayırt etmek için, M13 primeri ile RAPD-PCR analizi yapılmış ve herbir izolatın genomunda gerçekleştirilen PCR işleminin ardından elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Şekil 4.1 ve 4.2, LAB suşu olabilecek kefir danesi izolatlarının RAPD-PCR profillerini göstermekte iken Şekil 4.3 ise maya örneklerine ait RAPD-PCR profilini ortaya koymaktadır.

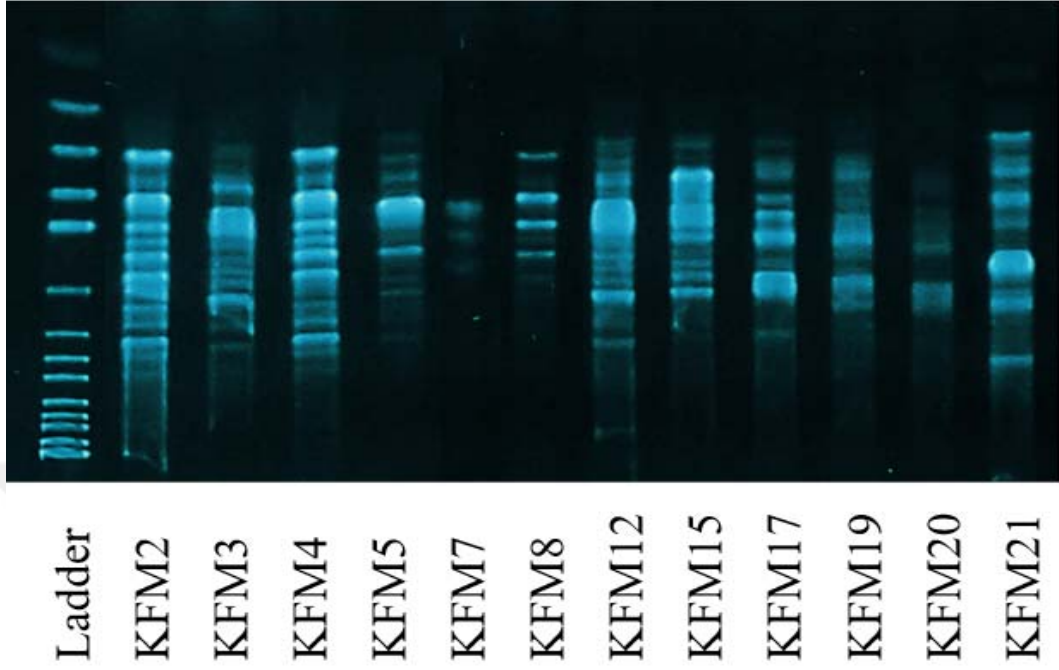




**Şekil 4.1** Kefir danesi bakteri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü



**Şekil 4.2** Kefir danesi bakteri izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü

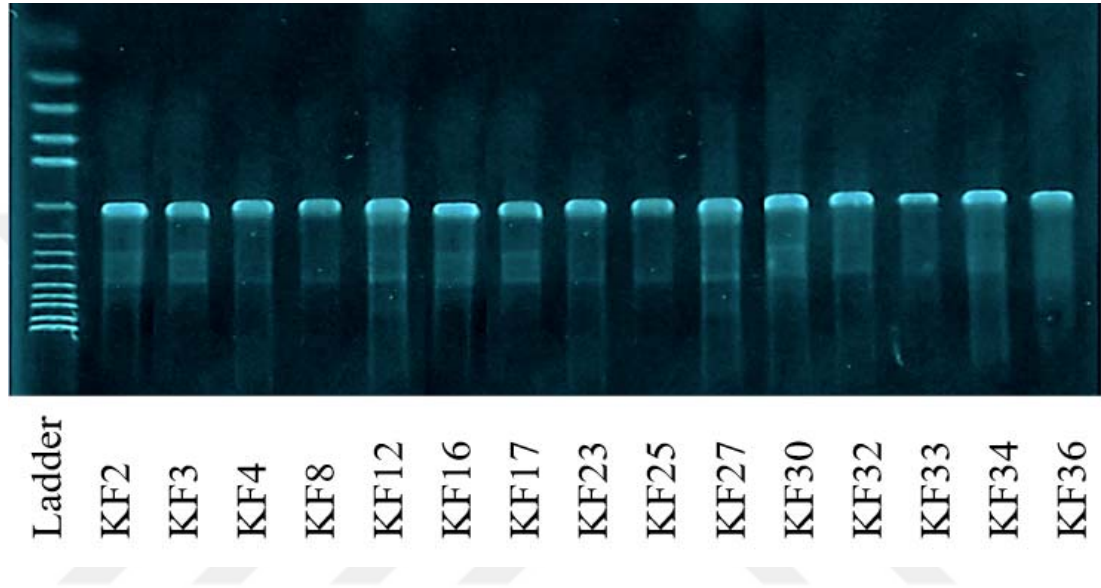


**Şekil 4.3** Kefir danesi maya izolatlarının M13 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü

Hem LAB izolatlarına hem de maya izolatlarına ait RAPD-PCR görüntüleri incelendiğinde test edilen izolatların RAPD-PCR profillerinin hemen hemen hepsinin birbirinden farklı olduğu görülebilir. Dolayısıyla RAPD-PCR ile test ettiğimiz bütün izolatlar bir sonraki aşama olan 16S rRNA genine bağlı olarak bakteri türlerinin tanımlanması ve mayalar için ITS bölgesine bağlı olarak tanımlama işlemleri için seçilmiştir. Test ettiğimiz bütün izolatların RAPD-PCR profillerinin farklı çıkması özellikle ilk izolasyon aşamasında daneden gelen türlerin morfolojik olarak farklı karakterde gelişebilmelerine bağlı olmuştur. Normal koşullarda bakterilerin morfolojik olarak petri kutularında bu seviyede ayrımı her zaman mümkün olmamakla birlikte özellikle test ettiğimiz ortamın farklı ve karmaşık mikroflorasının varlığının bu sonucu ortaya koyabildiği sonucuna varılabilir. Sonuç olarak RAPD-PCR işlemi ile danelerde yer alan ve farklı tür-suş olabilecek izolatlar bir sonraki işlem olan tanımlama işlemi için seçilmiştir.

### 4.3.2 Laktik asit bakterilerinin türlerinin tanımlanması için 16S rRNA gen dizisi analizi

RAPD-PCR bant görüntülerine göre farklı olduğu değerlendirilen bakteriyel izolatlarla 16S rRNA geninin amplifikasyonu için PCR işlemi uygulanmıştır. Şekil 4.4'te 16S geninin PCR ampilifikasyonunun ardından jelde yürütülmesi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 4.4 Kefir danesi bakteri izolatlarının 16S geninin ampilifikasyonunu gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü

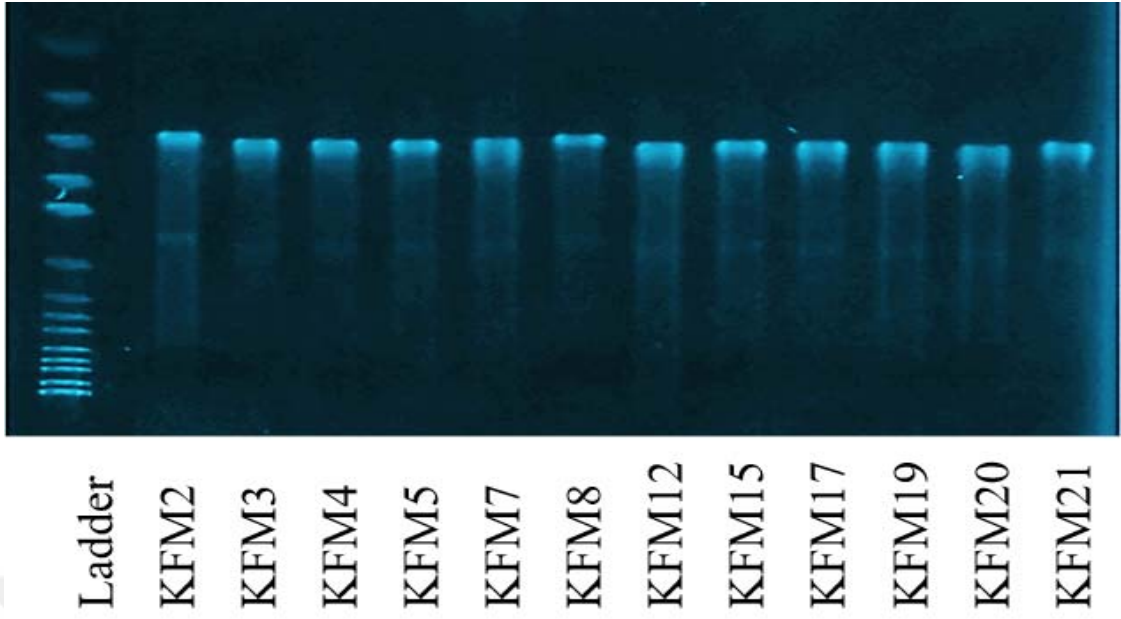
PCR ürünlerinin saflaştırılması işleminden sonra dizi analizi için MEDSANTEK'e (İstanbul) gönderilmiştir. Sonuçlar BLAST (<http://goo.gl/lohXcq>) veritabanına yüklenip veritabanındaki mevcut türler ile karşılaştırılarak benzerlik oranının %97 ve üzerinde olması durumunda test edilen izolatların o türe ait olduğu şeklinde değerlendirme yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kefir örneklerinden LAB türleri olarak *L. kefir*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *L. diolivorans*, *L. kefiranofaciens*, *L. otakiensis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. paracasei* ve *E. durans*'ın farklı suşları izole edilirken Asetik asit bakterilerinden ise *A. fabarum*, *A. okinawensis* ve *A. orientalis* suşları izole edilmiştir (Kesmen ve Kaçmaz, 2011; Leite vd., 2012; Nalbantoğlu vd., 2014; Walsh vd., 2016; Dertli ve Çon, 2017). Toplamda 30 LAB suşu 6 farklı kefir danesinden bu çalışma ile izole edilebilmiştir. KF2: *L. diolivorans*, KF3: *L. kefir*, KF4: *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, KF8: *L. kefir*, KF12: *L. kefir*, KF16: *L.*

*kefiranofaciens*, KF17: *L. lactis*, KF23: *L. otakiensis*, KF25: *L. kefir*, KF27: *A. fabarum*, KF30: *L. kefir*, KF32: *L. kefiranofaciens*, KF33: *L. kefir*, KF34: *L. kefir*, KF36: *L. lactis* subsp. *cremoris* KF39: *L. paracasei* subsp. *tolerans*, KF42: *L. lactis*, KF46: *L. lactis* subsp. *hordniae*, KF48: *L. lactis*, KF49: *L. lactis*, KF50: *L. lactis* subsp. *cremoris* KF51: *L. lactis*, KF53: *L. lactis*, KF55: *L. lactis* subsp. *cremoris* KF57: *L. lactis*, KF65: *E. durans*, KF76: *A. okinawensis*, KF83: *L. paracasei*, KF85: *L. lactis*, KF105: *A. orientalis* olarak tanımlanmıştır.

Bu suşlar daha önce kefir örneklerinde yer aldığı gösterilen suşlar olup özellikle kültüre bağlı metotlar ile bu seviyede yüksek suş sayısına ulaşılabilmesi kefir danelerinin zengin LAB florası ve iyi bir şekilde üretildikleri fikri ile açıklanabilir.

#### **4.3.3 Maya türlerinin tanımlanması için 26S rDNA gen dizisi analizi**

Benzer olarak maya izolatlarının hangi türe ait olduklarının açığa çıkarılması için RAPD-PCR işlemi ile seçilen 12 koloni için 26S rRNA bölgesindeki ITS kısmının ampilifiye edilmesi amacıyla PCR işlemi uygulanmıştır. PCR ürünlerinin saflaştırılması işleminden sonra dizi analizi yukarıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar BLAST (<http://goo.gl/lohXcq>) veritabanındaki mevcut türler ile karşılaştırılarak maya türleri tanımlanmıştır. Şekil 4.5'te 26S geninin PCR ampilifikasyonunun ardından jelde yürütülmesi sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsünü göstermektedir. Beklendiği gibi 600 bp uzunluğundaki bölge ampilifiye edilmiştir.

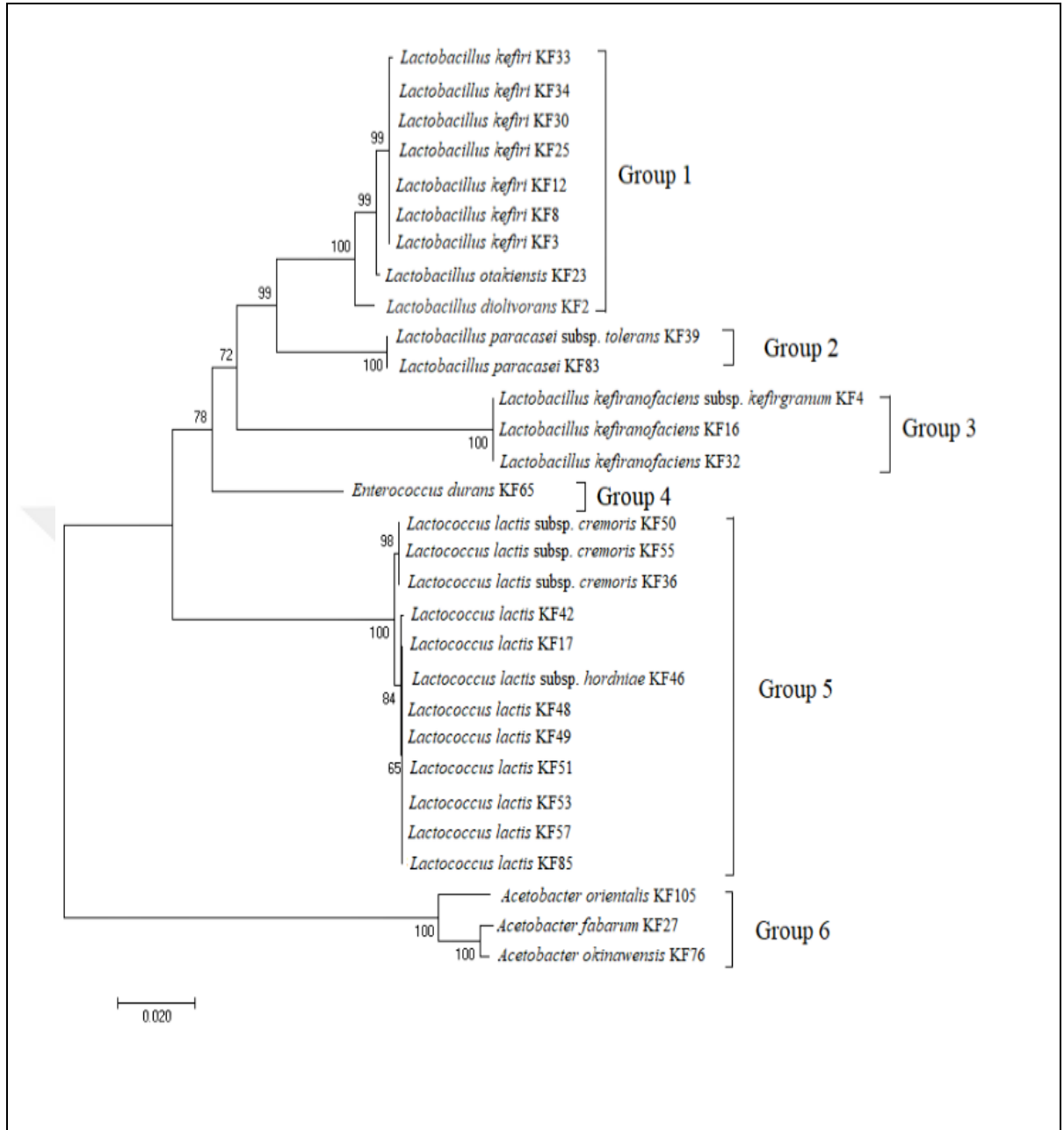


**Şekil 4.5** Kefir danesi maya izolatlarının 26S geninin ampilifikasyonunu gösteren Agaroz jel (%1) görüntüsü. KFM2: *P. kudriavzevii*, KFM3: *K. unispora*, KFM4: *K. unispora*, KFM5: *K. unispora*, KFM7: *S. cerevisiae*, KFM8: *S. cerevisiae*, KFM12: *K. marxianus*, KFM15: *K. marxianus*, KFM17: *S. cerevisiae*, KFM19: *K. unispora*, KFM20: *S. cerevisiae*, KFM21: *K. marxianus* olarak tanımlanmıştır.

Kefir örneklerinden *P. kudriavzevii*, *K. unispora*, *S. cerevisiae* ve *K. marxianus*'a ait olan toplam 12 farklı suş maya izole edilebilmiştir. Bu suşlar kefirin tanımında yer alan laktozu fermente edebilen ve fermente edemeyen maya tarifine uymakta olup bu maya türlerinin ülkemizden toplanan kefir daneleri ve örneklerinde yer alabildiği daha önce gösterilmiştir (Dertli ve Çon, 2017). Bu tez kapsamında kefir izolatu maya suşlarının teknolojik ve fonksiyonel etkileri üzerinde durulmamış olup bununla birlikte bu suşların hem kefir açısından hem de biyoteknolojik olarak önemli fonksiyonel etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.4 İzole Edilen Bakterilerin Filogenetik İlişkisi

Kefir danelerinden izole ettiğimiz bakteriler arasındaki genetik yakınlığın ortaya çıkarılması amacıyla dendogram oluşturulmuştur. Bu amaçla oluşturulan dendogram Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere kefir izolatları 6 grup şeklinde dendogramda yer almışlardır.



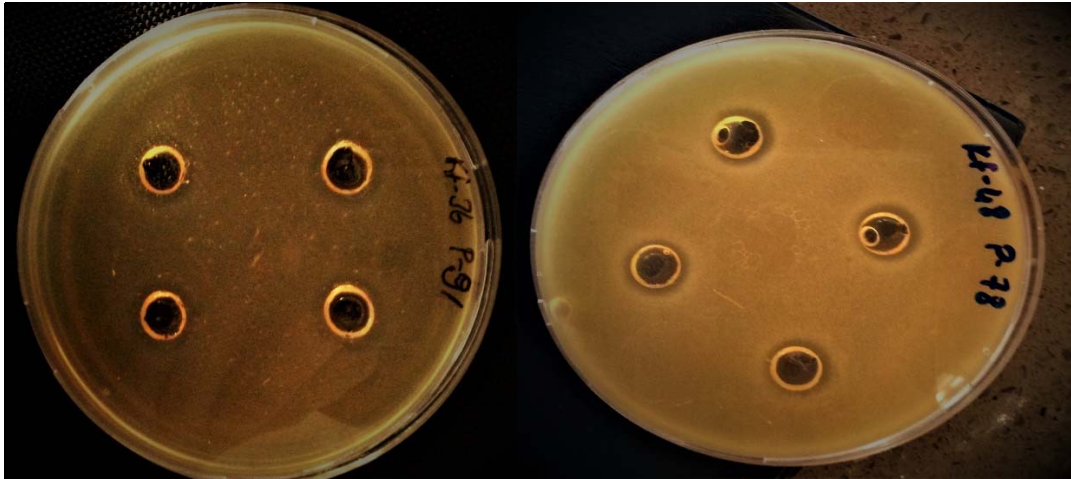
**Şekil 4.6** Kefir izolatlarının 16S rRNA sekanslarına bağlı olarak filogenetik ilişkisini gösteren Neighbour-Joining metodu ile oluşturulmuş Dendogram. (Filogenetik analiz Mega7 ile gerçekleştirilmiştir).

İlk grup *L. kefirii*, *L. diolivorans* ve *L. otakiensis* suşlarının bir arada bulunması ile oluşmuş olup sonraki iki türün *L. kefirii* ile bu seviyede benzerlik göstermesi bu türlerin akrabalık ilişkilerinin ortaya konması bakımından önem arz etmektedir. Dendogram analizinde elde ettiğimiz sonuçlar, *L. paracasei*, *L. kefiranofaciens*, *L. lactis* ve *Acetobacter* spp. suşlarının birlikte kümelendiklerini ve sırasıyla 2., 3., 5. ve 6. grupları oluşturduklarını ortaya koymuştur. Son olarak *E. durans* suşu diğer kefir izolatlarından

ayrılmıştır ve farklı bir grup oluşturmuştur. Bulgularımız, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan geleneksel kefir örneklerinin çeşitli mikrofloraya sahip olduğunu ve önemli ölçüde farklı suşların sayısının oldukça yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

#### 4.5 Kefir İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, 27 LAB ve 3 asetik asit bakterisinin *S. typhimurium* RSSK95091, *E. coli* BC1402, *B. cereus* BC6830, *Y. enterocolitica* ATCC27729 ve *S. aureus* ATCC25923'a karşı antibakteriyel aktiviteleri test edilmiştir. Şekil 4.7'de *Y. enterocolitica* ATCC 27729'a karşı *L. lactis*'in ve *S. typhimurium* RSSK 95091'e karşı *L. lactis*'in antimikrobiyal etkisini göstermektedir. Tüm patojenlere karşı en yüksek inhibe edici etkiyi *L. kefiranofaciens* (KF16) ve *L. lactis* (KF48) göstermiştir. *L. lactis* (KF85) test edilen patojenlere karşı hiçbir inhibitör etki göstermemiştir. Kefir izolatları genel olarak değerlendirildiğinde *E. coli*, *B. cereus*, *Y. Enterocolitica*'ya karşı daha fazla etkili iken, *S. typhimurium* ve *S. aureus*'a karşı daha az inhibitör etki göstermiştir. *L. kefiranofaciens* KF4 ve KF16, *L. lactis* KF17, KF46, KF48 ve KF49 ve *L. otakiensis* KF23 farklı seviyelerde test edilen tüm patojenler için etkili olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3).



**Şekil 4.7** *Y. enterocolitica* ATCC 27729'a karşı *L. lactis*'in antimikrobiyal etkisi ve *Salmonella typhimurium* RSSK 95091'e karşı *L. lactis*'in antimikrobiyal etkisi

Çizelge 4.3'te gösterildiği gibi *L. diolivorans*'in (KF2), *E. coli*, *Y. enterocolitica* ve *S. aureus*'a karşı inhibisyon etkisi oldukça yüksektir. *L. lactis*, *S. typhimurium* ve *S. aureus*'a karşı yüksek inhibitör etki göstermiştir. Bunun nedeni olarak *L. Lactis*, lacticin adı verilen antimikrobiyal peptid üreterek patojenlere karşı inhibitör etki göstermekte ve bu patojenlere karşı antimikrobiyal etkinin bu peptid tarafından sağlandığı düşünülmektedir (Ryan vd., 1996; Martin vd., 2004; Lawton vd., 2007). *L. kefiranofaciens* tarafından üretilen kefiran bağırsak mikrobiyotasında önemli bir matris üreticisi ve patojen modülatörüdür. Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere *L.kefiranofaciens* KF16, bütün patojenlere karşı yüksek değerde inhibisyon etkisi gösterirken *L.kefiranofaciens* KF32 *S. typhimurium* ve *S. aureus*'a karşı inhibisyon etki gösterememiştir. Suş spesifik özellikleri *L. kefiranofaciens*'in patojenlere karşı inhibisyon etkisinde belirleyici olmuştur. Buradan hareketle aynı türe ait farklı suşların patojenlere karşı inhibitör profilinin değişken olduğunu görmekteyiz.

**Çizelge 4.3** Antimikrobiyal zon inhibisyonları

Kefir izolatları	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Staph. aureus</i>
<i>L. diolivorans</i> KF2	+++	+	-	+++	+++
<i>L. kefir</i> KF3	-	-	+++	+++	+++
<i>L. kefiranofaciens</i> KF4	+++	+++	+	+++	+++
<i>L. kefir</i> KF8	+	++	++	+++	-
<i>L. kefir</i> KF12	+++	+	-	+	+++
<i>L. kefiranofaciens</i> KF16	+++	+++	+++	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF17	+	+	+++	+++	++
<i>L. otakiensis</i> KF23	+++	+++	++	+++	++
<i>L. kefir</i> KF25	+	++	-	+++	++
<i>A. fabarum</i> KF27	-	-	-	+++	-
<i>L. kefir</i> KF30	+++	+++	-	+++	-
<i>L. kefiranofaciens</i> KF32	+++	+++	-	+++	-
<i>L. kefir</i> KF33	++	++	+	+++	-
<i>L. kefir</i> KF34	++	+++	-	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF36	+++	+++	-	+++	+++
<i>L. paracasei</i> KF39	++	++	-	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF42	+	++	+++	+++	-
<i>L. lactis</i> KF46	+++	+	+++	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF48	+++	+++	+++	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF49	+	+++	+++	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF50	-	+	++	+++	-
<i>L. lactis</i> KF51	-	-	++	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF53	+	++	+++	+++	-
<i>L. lactis</i> KF55	-	++	+++	+++	++
<i>L. lactis</i> KF57	+	++	++	+++	-



Çizelge 4.3 Antimikrobiyal zon inhibisyonları devam

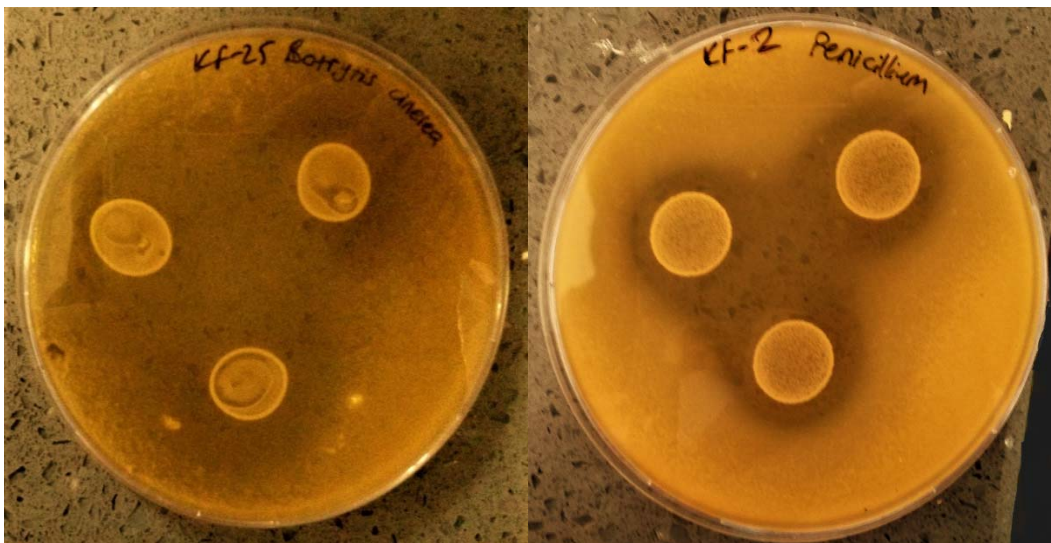
<i>E. durans</i> KF65	++	-	+++	+++	-
<i>A. okinawensis</i> KF76	-	+	++	++	++
<i>L. paracasei</i> KF83	+	+++	+++	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF85	-	-	-	-	-
<i>A. orientalis</i> KF105	-	-	-	-	-

(-) inhibisyon yok, (+) inhibisyon zonu < 2mm, (++) inhibisyon zonu 2-5 mm ve (++++) inhibisyon zonu >5 mm

Genel olarak LAB'nin inhibe edici aktiviteleri, laktik asit ve asetik asit benzeri organik asitler (Rojo-Bezares vd, 2007), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yüksekdağ vd, 2004), bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler (Aslim vd, 2005), diasetil ve CO<sub>2</sub> (Çon ve Gökalp, 2000) kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

#### 4.6 Kefir İzolatlarının Küf Türlerine Karşı Antifungal Aktiviteleri

Bu çalışmada, *Botrytis cinerea*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *F. oxysporum* ve *P. chrysogenum*'a karşı otuz kefir izolatının antifungal rolleri test edilmiştir (Çizelge 4.4). Şekil 4.8'de *L. kefir* KF25'in *Botrytis cinerea*'ya ve *L. diolivorans* KF2'nin *Penicillium*'a karşı antifungal etkisini göstermektedir. *L. lactis*, *A. niger* ve *P. chrysogenum*'a karşı antifungal etki gösterememiştir. *Acetobacter* spp. kefir danelerinden izole edilen suşlar, test edilen küf türlerine karşı etkili olmuş ve bu tür suşların *A. niger*'e karşı inhibe edici etkilerinin olmadığı bulunmuştur.



**Şekil 4.8** *L. kefir* KF25'in *Botrytis cinerea*'ya karşı, *L. diolivorans* KF2'nin *Penicillium*'a karşı antifungal etkisi

Kefirden izole edilen LAB suşlarının ve üç asetik asit bakterisinin etkileri için, suş spesifik özellikleri antifungal rolleri için belirleyici olmuştur. *L. diolivorans* KF2, *L. kefir* KF3, KF12, KF25, KF33, *L. otakiensis* KF23 ve *L. paracasei* KF83 test edilen tüm küf türlerine karşı antifungal aktiviteler göstermiştir (Çizelge 4.4).

*E. durans* KF65'in herhangi bir antifungal rolü görülmemiş olmasına rağmen, daha önce *E. durans* A5-11'in mantar büyümesinin önlenmesi için etkili olduğu bildirilmiştir (Belguesmia vd, 2013), suş spesifik özelliklerinin antifungal fonksiyonlar için rol oynayabileceğini göstermektedir.

*B.cinerea*'ya karşı *L. kefiranofaciens* KF16, *L. lactis* KF17, KF36, KF42, KF49, KF50, KF53, KF55, KF85 türleri, *E. durans* KF65 antifungal etki göstermemiştir. *A. niger*'e karşı *L. diolivorans* KF2, *L. kefir* KF3, *L. kefir* KF12, *L. otakiensis* KF23, *L. kefir* KF25, KF30, *L. kefir* KF33, KF85 antifungal etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu suşlarda misel büyümesi iyi anlaşılır şekilde ve bakteri kolonisi etrafında spor oluşumu gözlenmemiştir. *A. Alternata*'ya karşı bütün suşlar yüksek antifungal etki göstermiştir. *E.durans* KF 65 *A. Alternata*'ya karşı antifungal etki göstermemiştir. *E. durans* dışındaki bütün suşlar misel büyümesini çok iyi engellemiştir ve bakteri kolonilerinin etrafında geniş açık bölgeleri ile spor oluşumunu yok etmiştir. *A. paraciticus*'a karşı *L. lactis* KF57, KF85 ve *E. durans* dışındaki bütün suşlar yüksek antifungal etki göstererek misel gelişimini çok etkili bir şekilde engellemişlerdir. *F. oxysporum*'a karşı *L. lactis* türleri dışındaki bütün kefir bakterileri yüksek antifungal etki göstermiştir. *P. chrysogenum*'a karşı *L. diolivorans* KF2, *L. kefir* KF3, *L. kefir* KF8, *L. kefir* KF12, *L. otakiensis* KF23, *L. kefir* KF25, *A. fabarum* KF27, *L. kefir* KF30, *L. kefir* KF33, *L. kefir* KF34, *L. paracasei* KF39, *A. okinawensis* KF76, *L. paracasei* KF83 yüksek antifungal etki göstermiştir.

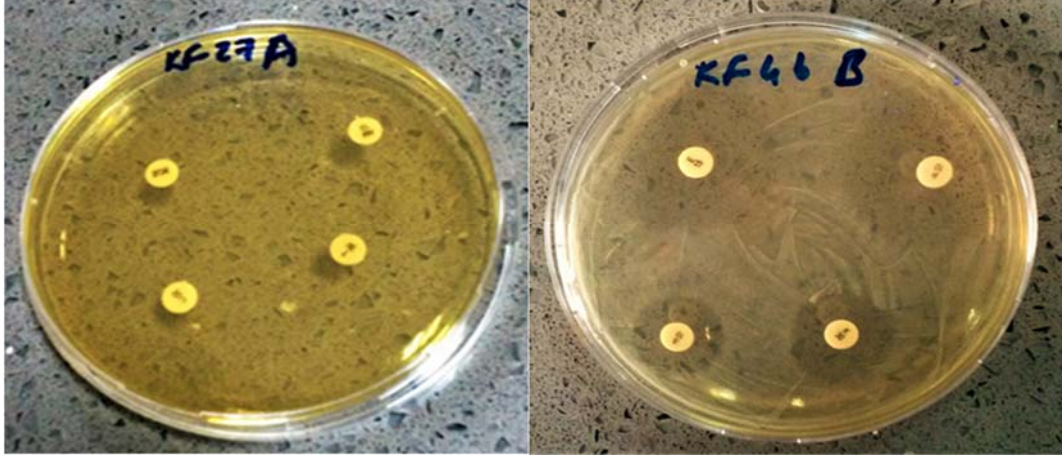
Çizelge 4.4 Antifungal zon inhibisyonları.

Kefir izolatları	<i>B. cinerea</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. paraciticus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. chrysogenum</i>
<i>L. diolivorans</i> KF2	++	++	+++	+++	+++	++
<i>L. kefir</i> KF3	++	+	+++	+++	+++	++
<i>L. kefiranofaciens</i> KF4	++	-	+++	+++	+++	-
<i>L. kefir</i> KF8	++	-	++	+++	+++	++
<i>L. kefir</i> KF12	++	+	+++	+++	+++	+++
<i>L. kefiranofaciens</i> KF16	-	-	+++	+++	+++	-
<i>L. kefir</i> KF17	-	-	++	+	++	-
<i>L. otakiensis</i> KF23	+++	++	+++	+++	+++	+++
<i>L. kefir</i> KF25	+++	++	+++	+++	+++	++
<i>A. fabarum</i> KF27	+++	-	++	+++	++	+
<i>L. kefir</i> KF30	+++	+	+++	+++	+++	+++
<i>L. kefiranofaciens</i> KF32	++	-	+++	+++	+++	-
<i>L. kefir</i> KF33	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>L. kefir</i> KF34	++	-	+++	+++	+++	+
<i>L. lactis</i> KF36	-	-	++	+	-	-
<i>L. paracasei</i> KF39	++	-	+++	+++	+++	++
<i>L. lactis</i> KF42	-	-	++	+	+	-
<i>L. lactis</i> KF46	-	-	++	+	-	-
<i>L. lactis</i> KF48	+	-	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> KF49	-	-	+	-	+	-
<i>L. lactis</i> KF50	-	-	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> KF51	+	-	++	+	-	-
<i>L. lactis</i> KF53	-	-	++	+	-	-
<i>L. lactis</i> KF55	-	-	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> KF57	++	-	++	-	+	-
<i>E. durans</i> KF65	-	-	-	-	-	-
<i>A. okinawensis</i> KF76	++	-	++	+++	++	++
<i>L. paracasei</i> KF83	++	+	+++	+++	+++	+++
<i>L. lactis</i> KF85	-	-	++	-	++	-
<i>A. orientalis</i> KF105	+	-	+++	+++	+++	-

(-) inhibisyon yok, (+) Bakteri kolonisi etrafındaki inhibisyon küçük şeffaf bölge ile spor oluşumu, (++) Bakteri kolonisi etrafındaki inhibisyon iyi anlaşılır bölgesi ile spor oluşumu yok, (+++) Misel büyümesinin çok iyi engellenmesi ve bakteri kolonilerinin etrafında geniş açık bölgeleri ile spor oluşumu yok.

#### 4.7 Kefir İzolatlarının Antibiyotik Direnci

Bu çalışmada, tüm izolatların chloramphenicol (C, 30 µg), erythromycin (E, 15 µg), kanamycin (K, 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), oxytetracycline (30 µg), ampicillin (Amp, 10 µg), penicillin (G (10 units) ve streptomycin (S, 10 µg), antibiyotiklerine karşı antibiyotik direnci test edilmiştir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9** Antibiyotik disklerin etrafındaki inhibisyon zon görüntüleri

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak bazı laktik asit bakterilerinin streptomycin ve kanamycin antibiyotiklerine karşı yüksek değerlerde direnç gösterdiği belirlenmiştir. Önceki gözlemlere göre LAB suşlarının bu antibiyotiklere direnç göstermesi bakterilerin içsel direncinden kaynaklanabileceğini ortaya koymuştur (Arici vd, 2004; Dertli vd, 2017).

Bu çalışmada kefir danesi örneklerinden izole edilen LAB türlerinin; erythromycin, penicillin, tetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol, ampicillin'e karşı dirençlerinin düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Erythromycin'e ve penicillin'e karşı en düşük direnci *L. kefiranofaciens* KF16 ve *A. fabarum* KF27; 28 mm, diğerlerine kıyasla *L. lactis* KF46; 12mm olarak düşük direnç göstermiştir. Erythromycin, penicillin, tetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol, ampicillin'e karşı en düşük direnci *A. fabarum* KF27; ortalama 28 mm ve *A. orientalis* KF105; ortalama 26 mm olarak göstermiştir, diğerlerine nazaran biraz daha yüksek direnci *E. durans* KF65; ortalama 12 mm olarak göstermiştir.

Streptomycin ve kanamycin'e karşı *L. diolivorans* KF2, *L. kefir* KF25, *L. paracasei* KF39, *A. okinawensis* KF76, *L. paracasei* KF83 yüksek direnç göstermiştir. Kefir bakterilerinde antibiyotik direncin ortaya çıkması ve yayılması antibiyotik direnç genlerinin aktarılması açısından istenilen bir durum değildir. Bu bağlamda LAB

suşları arasında düşük düzeyde antibiyotik direnci, kefir ve kefir izolatlarının güvenlik perspektifinden umut verici bir bulgudur.

#### **4.8. LAB Türlerinin EPS Üretim Miktarı ve Temel EPS Yapısının Açığa Çıkartılması**

LAB türleri, sırasıyla bir tür şeker monomeri ve iki veya daha fazla şeker monomeri tarafından oluşturulan homopolimerik ve heteropolimerik EPS'leri üretebilir ve homopolimerik EPS, sırasıyla glikoz ve fruktoz birimleri tarafından oluşturulan glukoz ve fruktanlar içerir (Dertli vd, 2018). EPS üretimi kefir danelerinden izole edilen mikrobiyal türlerin önemli özelliklerinden biridir ve kefirde eşit miktarda glukoz ve galaktoz içeren bir glikogalakten olan kefiran denilen özel bir EPS üretildiği gösterilmiştir (Kooiman, 1968). Daha önce kefirden izole edilen LAB suşlarının birkaç farklı türünün bu yeni EPS'yi ürettiği gösterilmiştir (Riviére vd, 1967; Wang vd, 2008). Bu çalışmada kefir izolatlarının EPS üretim yetenekleri test edilmiştir ve kefir'den izole edilen LAB türleri tarafından üretilen EPS'nin şeker üniteleri HPLC analizi ile belirlenmiştir (Ek-1). Kefir danelerinden izole edilen tüm test edilmiş LAB suşları, EPS yapılarında şeker monomerleri olarak glukoz ve galaktoz içeren bir heteropolimerik EPS üretmiştir (Çizelge 4.5). ki Bu durum test edilen suşların kefir danelerinin oluşumuna ve kefir üretimine katkıda bulduklarını doğrulayan önemli bir özelliktir (Vinderola vd, 2006). Kefiran çalışan araştırmacılar, kefiran polimerinin ana yapısının 1:1 molar oranında galaktoz ve glukozdan oluştuğunu bildirmişlerdir (Mukai vd,1990b). Yokoi ve Watanabe (1992) tarafından LM-17 suşu standart laboratuvar koşullarında MRS-modifiye ortamında geliştirilmiştir ve kefiranın kültür süpernatantından 2 g / l'lik bir tekrarlanabilir verim elde edilmiştir.

**Çizelge 4.5** Kefir izolatlarının EPS üretim profili.

Kefir izolatı	Glukoz	Galaktoz	Fruktoz
<i>L. diolivorans</i> KF2	+	+	+
<i>L. kefir</i> KF3	+	+	-
<i>L. kefiranofaciens</i> KF4	+	+	-
<i>L. kefir</i> KF8	+	+	-
<i>L. kefir</i> KF12	+	+	-
<i>L. kefiranofaciens</i> KF16	+	+	-
<i>L. lactis</i> KF17	+	+	+
<i>L. otakiensis</i> KF23	+	+	+
<i>L. kefir</i> KF25	+	+	-
<i>L. kefir</i> KF30	+	+	-
<i>L. kefiranofaciens</i> KF32	+	+	-
<i>L. kefir</i> KF33	+	+	-
<i>L. kefir</i> KF34	+	+	-
<i>L. lactis</i> KF36	+	+	+
<i>L. paracasei</i> KF39	+	+	+
<i>L. lactis</i> KF42	+	+	+
<i>L. lactis</i> KF46	+	+	+
<i>L. lactis</i> KF48	+	+	+
<i>L. lactis</i> KF49	+	+	+
<i>L. lactis</i> KF50	+	+	-
<i>L. lactis</i> KF51	+	+	+
<i>L. lactis</i> KF53	+	+	-
<i>L. lactis</i> KF55	+	+	+
<i>L. lactis</i> KF57	+	+	+
<i>E. durans</i> KF65	+	+	+
<i>L. paracasei</i> KF83	+	+	-
<i>L. lactis</i> KF85	+	+	-

+ ve - EPS tekrarlayan birim yapısında şeker monomerlerinin varlığını ve yokluğunu temsil eder.

Tez çalışmasında test ettiğimiz suşlar farklı oranlarda EPS üretme kabiliyetleri sergilemişlerdir. Çizelge 4.5'te verildiği üzere önemli olarak bütün suşlar glukoz:galaktozdan oluşan heteropolimerik EPS ve *L. diolivorans* KF2, *L. lactis* KF17, *L. otakiensis* KF23 *L. lactis* KF36, *L. paracasei* KF39, *L. lactis* KF42, *L. lactis* KF46, *L. lactis* KF48, *L. lactis* KF49, *L. lactis* KF51, *L. lactis* KF55, *L. lactis* KF57 ve *E. durans* KF65 suşları ise glukoz ve galaktoz ile birlikte fruktoz içeren EPS üretmişlerdir. LAB türleri farklı yapılarda EPS üretim kabiliyetlerine sahiptirler (Ricciardi ve Clementi 2000; De Vuyst vd, 2001). Kefir danelerinden izole ettiğimiz suşların hepsinin kefiran yapısına katkı sağlayacak şekilde glukoz:galaktozdan oluşan

EPS ürettiği ve ek olarak bazılarında fruktan yapısında EPS ürettiği gösterilmiştir (Çizelge 4.5). Bu suşlarda tekrarlanan EPS yapısının belirlenmesi işlemi HPLC analizi ile gerçekleştirilmiş olup örnek HPLC kromatogramları EK kısmında verilmiştir.

LAB tarafından üretilen toplam EPS miktarı iç faktörlere, örneğin ilgili EPS genlerinin ekspresyon seviyesi gibi faktörlere, ve çoğunlukla dış faktörlere örneğin ortamın bileşimine (karbon ve nitrojen kaynakları) ve kültürel koşullara; sıcaklık, pH ve inkübasyon süresine bağlıdır. LAB türlerinde EPS üretim miktarları türler arasında hatta suş bazında değişkenlik gösterebilmekte olup genel olarak EPS üretim miktarları 0,150 ila 0,600 g/L arası EPS verimi şeklinde ortaya çıkar. Bununla birlikte litrede gram seviyesinde EPS üreten LAB türleri de rapor edilmiştir (Dertli 2013). Sadece karbon kaynağının doğası ve bazen monosakkaritlerin kombinasyonu değil, aynı zamanda konsantrasyonları da EPS biyosentezi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olabilir (Gamar vd, 1997). Mineraller, bazı amino asitler veya bazlar ve vitaminler gibi diğer ortam bileşenlerinin de üretilen EPS'nin kompozisyonunu etkilemektedir (Gamar vd, 1997; Mozzi vd, 1995). Maeda vd. (2004) kefir danelerinden izole edilen *L. kefiranofaciens* WT-2B suşu ile yaptıkları bir çalışmada ortam olarak pirinç hidrolizati kullanarak kefiran polisakkaritinin maksimum verimini, pH 5,0 ve 33 °C'de 7 günlük bir kültür süresinden sonra 2.5 g / L olarak bulmuşlardır. Tez çalışması kapsamında izole ettiğimiz kefir daneleri çizelge 4.6'dan da görüleceği üzere benzer oranlarda EPS üretim miktarı ortaya koymuşlardır. Suşlar arasından en düşük EPS üretimi *L. lactis* KF3 ile  $1467,692 \pm 2,175713 \mu\text{g}/10^7$  kob olarak belirlenirken en yüksek EPS üretimi *A. okinawensis* KF76, *L. lactis* KF48 ve *L. kefiranofaciens* KF4'te sırasıyla  $1846,154 \pm 17,40571 \mu\text{g}/10^7$  kob,  $1838,07735 \pm 35,534 \mu\text{g}/10^7$  kob ve  $1830 \pm 7,614996 \mu\text{g}/10^7$  kob olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** Kefir izolatları tarafından üretilen EPS miktarları ( $\mu\text{g}/10^7$  kob).

Örnek kodu	EPS üretim miktarı ( $\mu\text{g}/10^7$ kob)
KF2	1763,846 <sup>*abcd</sup>
KF3	1467,692 <sup>f</sup>
KF4	1830,769 <sup>abc</sup>
KF8	1736,538 <sup>abcde</sup>
KF12	1742,692 <sup>abcde</sup>
KF16	1662,692 <sup>abcde</sup>
KF17	1653,077 <sup>bcdef</sup>
KF23	1641,538 <sup>def</sup>
KF25	1637,692 <sup>def</sup>
KF27	1704,231 <sup>abcde</sup>
KF30	1704,615 <sup>abcde</sup>
KF32	1659,231 <sup>abcde</sup>
KF33	1766,923 <sup>abcd</sup>
KF34	1701,538 <sup>abcde</sup>
KF36	1693,077 <sup>abcde</sup>
KF39	1692,308 <sup>abcde</sup>
KF42	1647,692 <sup>cdef</sup>
KF46	1772,308 <sup>abcd</sup>
KF48	1838,07735 <sup>ab</sup>
KF49	1742,308 <sup>abcde</sup>
KF50	1694,615 <sup>abcde</sup>
KF51	1627,308 <sup>def</sup>
KF53	1679,615 <sup>abcde</sup>
KF55	1750,385 <sup>abcde</sup>
KF57	1680 <sup>abcde</sup>
KF65	1658,462 <sup>abcde</sup>
KF76	1846,154 <sup>a</sup>
KF83	1719,615 <sup>abcde</sup>
KF85	1573,462 <sup>ef</sup>
KF105	1778,077 <sup>abcd</sup>

\* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $p < 0.05$ ).

Aslim vd. (2006), MRS ortamında büyüme sırasında Lactobacilli suşları tarafından üretilen EPS'nin 21 ve 211 mg/L arasında değiştiğini, buna karşın M17 ortamında büyüme sırasında streptokok suşları tarafından üretilenlerin 16 ve 114 mg / L arasında olduğunu göstermiştir. EPS üretiminin, biyofilm oluşumu, adhezyon, agregasyon, bağışıklık tepkileri ve sert koşullar altında korunmasının yanı sıra probiyotik fonksiyonlarla ilişkili patojenleri uzak tutarak etkilediği gösterilmiştir (Dertli vd, 2015; Fanning vd, 2012). EPS'nin fermentasyon sürecindeki teknolojik rollerine ek



olarak, EPS üretimi probiyotik eylemde EPS'nin fonksiyonları ile ilgili bu karmaşık ortamda LAB suşları için koruyucu rollere sahip olabilir (Dertli, 2015). Dolayısıyla kefir izolatları açısından üretilen EPS kefirin fonksiyonel niteliklerine katkı sağlamanın yanısıra kefirin teknolojik özelliklerine de katkı sağlayabilir. Bu tez kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar test ettiğimiz bütün izolatların önemli miktarda EPS üretme kabiliyetinde olduklarının gösterilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar ülkemizin beş farklı ilinden temin edilen kefir danelerinde LAB ve maya türlerinin çeşitliliğinin önemli ölçüde mevcut olduğu ve bu türlerin önemli fonksiyonel etkiler gösterebildiklerini ortaya koymuştur. Kefirden izole edilen suşların antifungal ve patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri ve önemli olarak EPS üretim miktarlarının ve EPS üretimlerinin açığa çıkarılması işlemleri ile kefir izolatlarının önemli fonksiyonel etkileri tez kapsamında değerlendirilmiştir. Kefir danelerinin mikrobiyal çeşitliliği kefirin fonksiyonel ve teknolojik özellikleri için doğrudan bir role sahiptir. Bu çalışmada kefir danelerinde *L. lactis*, *L. kefir* ve *L. kefiranofaciens*'in dominant LAB türleri olduğu ve ülkemizden bu tez kapsamında temin edilen geleneksel kefir danelerinde on farklı türe ait otuz farklı bakteri suşunun mevcut olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde *Pichia kudriavzevii*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces marxianus*'a ait on iki farklı maya suşunun varlığı kefir danelerinde tespit edilmiştir.

LAB türleri arasında farklı türlere ait farklı suşların varlığı açığa çıkarılmış ve *L. lactis*'in *L. kefir* ve *L. kefiranofaciens* ile birlikte kefir danelerinde baskın LAB türü olduğu ortaya konmuştur. Daha önce yapılan çalışmalar, bulgularımıza uygun olarak, kefirdeki *L. lactis*'in baskın varlığını ortaya koymuştur. *L. kefir*, kefir fermentasyonu ve kefiran üretimi için önemli rollere sahip olduğu bildirilen süt kefirindeki LAB mikroflorasının önemli üyelerinden biridir. Ayrıca birkaç çalışma potansiyel probiyotik fonksiyonlarını (*L. kefir* yüzey tabakası (S-tabakası) proteinlerini taşıması gibi) göstermiştir ve bu türlerin geleneksel kefir danelerindeki varlığı hem kefirin oluşumu hemde kefirin fonksiyonel özelliklerine katkısı sebebiyle son derece önemli olabilir. İlerleyen dönemde kefirde izole ettiğimiz türlerin suş bazında potansiyel probiyotik niteliklerinin ortaya konabilmesine dönük çalışmalar gerçekleştirilecektir. Benzer şekilde *L. kefiranofaciens*, esas olarak kefiran üretimi ile ilgili olan diğer önemli kefir odaklı LAB türüdür. Aynı şekilde *L. paracasei*, *L. diolivorans*, *L. otakiensis* suşlarının kefirde varlığı tanımlanmış olup önümüzdeki dönemlerde bu türlerin kefir üretiminde oynayabileceği roller üzerinde durulacaktır. Ek olarak *E. durans*, geleneksel kefir danelerinde düşük seviyelerde bulunmuş olup bu türün özellikle Enterokoklara özgü potansiyel patojenik etkisinin olup olmadığı test edilmesi gereken bir diğer parametredir.

Kefirden izole edilen LAB türleri patojenlere karşı geniş spektrumlu ve güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Özellikle *L. lactis* KF48 ve *L. lactis* KF49 suşlarının bakteriyosin üretme yetenekleri daha ayrıntılı olarak araştırılacaktır. Önemli olarak, test edilen tüm suşlar, esas olarak kefiran yapısı ile uyumlu olan glukoz-galaktoz tarafından oluşturulan EPS'yi üretmiştir. *L. kefiranofaciens* ve *L. kefiri* kefir daneleri içerisindeki ekosistemdeki temel LAB türlerindedir ve bu iki türün bu çalışmada elde ettiğimiz suşlarının kefiran ürettiğinin gösterilmesi ayrıca önemlidir. Kefiranın asit süt jellerinin viskoelastik özelliklerini etkileyebilmesine dönük olarak ilerleyen dönemde çalışmalar gerçekleştirilebilir.

Gıda ürünlerinden kaynaklanan mikrobiyal türlerin antibiyotik direnci, halk sağlığı açısından önemli sorunlara neden olabilen dünya çapındaki başlıca sorunlardan biri olarak test edilmesi gereken bir başka özelliktir. Bu açıdan kefir izolatları arasında düşük düzeyde antibiyotik direnci saptanmıştır. Böylelikle kefirin bakteriyel bileşiminin güvenli olduğu gösterilmiştir.

Kefirden izole edilen LAB'nin biyokoruyucu özellikleri açısından değerlendirilebilmeleri için antifungal aktiviteleri test edilmiştir ve izolatların tamamına yakın bir kısmının tür düzeyinde yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak *A. niger* ve *P. chrysogenum* antifungal aktiviteye en dirençli ve inhibe edilmesi en zor olan küf türleri olarak bulunmuştur.

Patojen küf türlerine karşı LAB'ın antifungal etkisi, aktif antifungal bileşiklerin üretimi ve stabilitesinden kaynaklanabilir. Bu bileşiklerin birarada bulunmaları veya tek başlarına olmaları antifungal etkinlik düzeyini değiştirebilir. Dolayısıyla antifungal etkinin kaynağının bulunması sonraki çalışmalara konu olabilir.

Bulgularımız, daha önceki gözlemlere göre kefir danelerinde asetik asit bakterilerinin LAB ile karşılaştırıldığında daha düşük olmasına rağmen, kefir danelerinde LAB ile birlikte asetik asit bakterilerinin varlığını doğrulamıştır. Elde edilen veriler sonucunda kefirde izole edilen *Lactobacillus*, *Lactococcus* suşlarının önemli özellikleri ve bu doğrultuda etkileri, maya türlerinin simbiyotik metabolik aktiviteleri belirtilmiştir. Bu çalışmada EPS üretimi gerçekleştirebilen, antimikrobiyal ve antifungal etkileri belirlenen suşların tanımlanmış olması bu suşların tek başına veya diğer probiyotiklerle kombinasyon halinde gelecekteki uygulamalarda yararlı olacağı

anlamına gelmektedir. Ayrıca, gıdadan izole edilen suşlar oldukları için bu suşlar fonksiyonel gıda üretimi konularına dahil edilebilirler.

*L. diolivorans* KF2, *L. lactis* KF17, *L. otakiensis* KF23, *L. paracasei* KF39 ve *E. durans* KF65 gibi bazı LAB türleri heteropolimerik EPS ile birlikte bir fruktan tipi EPS üretmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışmada ilk kez *L. diolivorans* KF2, *L. otakiensis* KF23 ve *E. durans* KF65 gibi bazı LAB suşlarının EPS üretim karakteristikleri gösterilmiştir. Özellikle süt endüstrisinde, *in situ* EPS üretiminin teknolojik rolüne bağlı olarak EPS üreticisi LAB suşları oldukça önemlidir. EPS'nin teknolojik performansının EPS üretim seviyelerine ve EPS yapılarına bağlı olması nedeniyle bu çalışmada EPS yapıları ve yeni EPS üretici suşları belirlenmiştir. Bulgularımız genel olarak, kefir danelerinden elde edilen ve şeker monomerleri olarak glukoz ve galaktoz içeren bir heteropolimerik EPS üreten LAB suşlarının önemli bir oranının kefiran oluşumu sırasındaki rollerini göstermesi açısından önemli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan geleneksel kefir örneklerinin çeşitli mikrofloraya sahip olduğunu ve önemli ölçüde farklı suşların sayısının oldukça yüksek olduğunu ve kefir izolatlarının önemli fonksiyonel etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur.

## KAYNAKLAR

- Amanatidou, A., Bennik, M.H., Gorris, L.G., Smid, E. J. (2001), *Super oxidedismutase plays an important role in the survival of Lactobacillus sake upon exposure to elevated oxygen*, **Arch. Microbiol**, 176, 79–88.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A. and Khan, ST.( 2013). *Characterization of exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 isolated from Tibet kefir–Part II*. **Food Hydrocolloid**, 30, 343-350.
- Ahmed, Z., Wang, Y. and Ahmad, A., (2013). *Kefir and health: a contemporary perspective*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Volume 53, 422-434.
- Altay, F., Karbancıoğlu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C. and Heperkan, D. (2013). *A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics*. **Int. J. Food Microbiol**, 167 (1), 44-56.
- Anonymous, 2002. Milk and Milk Products – Fermented Milks. PN-A-86061, Polski Komitet.
- Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O. and Ozdemir, C. (2004). *Some characteristics of Lactobacillus isolates from infant faeces*. **Food Microbiology**, 21(1), 19-24.
- Arslan, S. (2015). *Chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir*. **CyTA-J Food**, 13, 340-345.
- Anonim, (2009). *Türk Gıda Kodeksi. Fermente Sütler Tebliği (2009/25)*. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. 16 Şubat 2009 tarih ve 27143 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- Aslim, B., Yuksekdağ, ZN., Sarıkaya, E. and Beyatlı, Y. (2005). *Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products*. **LWT Food Sci Technol**, 38, 691–94.
- 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.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E. and Majkowska, A. (2002). *Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness*, **Food Res. Int**, 35 125.
- Boutrou, R. and Gueguen, M. (2005). *Interests in Geotrichum candidum for cheese technology*. **International Journal of Food Microbiology**, 102, 1–20.

- Brandão, RL. Castro IM, Bambirra EA., Amaral C, Fietto LG., Tropia, MJM., José, M., Dos Santos, RG., Gomes NCM, Nicoli R, Amaral, SC. and Jos, M. (1998). *Intracellular signal triggered by cholera toxin in Saccharomyces boulardii and Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Env Microbiol**, 64,564–568.
- Brown, J. M. and Hazen, S. L. (2015). *The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases*. **Annu. Rev. Med**, 66, 343–359.
- Carasi, P., Ambrosio, NM., De Antoni, GL., Bressollier, P., Urdaci, MC., and de Serradell, ML. (2014a). *Adhesion properties of potentially probiotic Lactobacillus kefir to gastrointestinal mucus*. **J Dairy Res**, 81, 16–23.
- Ceming, J., Renard C.M., G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. and Topisirovic, L. (1994). *Carbon source requirements for exopolysaccharide production by Lactobacillus casei CG11 and partial structure analysis of the polymer*. **Appl. Environ. Microbiol**, 60(11), 3914–3919.
- Cerning, J. (1990). *Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria*. **FEMS Microbiol. Rev**, 87, 113–130.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud M., J. (1992) *Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria*. **J. Dairy Sci**, 75, 692–699.
- Cerning, J. (1995). *Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria*. **Lait**, 75, 463–472.
- Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2003). *Enhanced kefir production by mixed culture of Lactobacillus kefirifaciens and Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol**, 100, 43–53
- Chang, S.K., and Hassan, H.M. (1997), *Characterization of superoxide dismutase in Streptococcus thermophilus*, **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 3732–3735.
- 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 Microbiol**, 25 (3), 492–501.
- Chuang, L.C., Huang C.S. and Ou-Yang L.W. (2011). *Probiotic Lactobacillus paracasei effect on cariogenic bacterial flora*. **Clin Oral Invest**, 15, 471–476.
- Czerucka, D., Piche, T. and Rampal, P. (2007). *Yeast as probiotics-Saccharomyces boulardii*. **Aliment Pharmacol Ther**, 26, 767–778

- Çon, AH. ve Gokalp, HY. (2009). *Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples*. **Meat Sci**, 55, 89–96.
- De Angelis, M. and Gobbetti, M. (1999), *Lactobacillus sanfranciscensis CBI: manganese, oxygen, superoxide dismutase and metabolism*. **Applied and Environmental Microbiology**, 51, 358–363.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. and Lionetti, P. (2010). *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107, 14691-14696.
- Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A. A., Yılmaz, M. T., and Dertli, E. (2017). *Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs*. **LWT - Food Science and Technology**, 79, 361-366.
- Dertli, E., (2013). *Biochemistry and functional analysis of exopolysaccharide production in Lactobacillus johnsonii*. **Doctoral dissertation**, School of Biological Sciences.
- Dertli, E. ve Çon, A. H. (2017). *Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma*. **LWT-Food Science and Technology**, 85, 151-157.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Côté, G. L., Le Gall, G. and Narbad, A. (2018). *Structural analysis of the  $\alpha$ -D-glucan produced by the sourdough isolate Lactobacillus brevis E25*. **Food chemistry**, 242, 45-52.
- De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F. and Degeest B. (2001). *Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. **International Dairy Journal**, 9, 687-707
- Diosma, G., Romanin, DE., Rey-Burusco, MF., Londero, A. and Garrote, GL. (2014). *Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization*. **World J Microbiol Biotechnol**, 30,43–53.
- Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, P. and Hill, C. (2011). *High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain*. **FEMS Microbiol. Lett.** 320 (1), 56-62.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. **Analytical Chemistry**, 28 (3). 350-356.
- Duboc, P., Mollet, B. (2001). *Applications of Exopolysaccharides in the Dairy Industry*. **International Dairy Journal**, 11, 759- 768.

- Erkaya, T., Öztekin, A., Özdemir, H. and Şengül, M. (2015). *Change in Some Quality Properties of Kefir during Storage and Inhibition Effect of Water Soluble Extracts on Angiotensin-I Converting Enzyme Purified by Human Plasma Int. J. Food Eng*, 11(5),659-665.
- Ersoy, M.ve Uysal, H. (2003) *Süttozu, Peyniraltı Suyu Tozu ve Yayıkaltı Karışımları ile Üretilen Kefirlerin Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. II. Bazı Fiziksel ve Duyusal Özellikler. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 40(1), 79-86.
- Esmek, E.M.ve Güzeler, N. (2015). *Kefir ve Kefir Kullanılarak Yapılan Bazı Ürünler. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 19(4), 250-258.
- Fadda, M.E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M.B. and Cosentino S. (2017). *In vitro screening of Kluyveromyces strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. LWT - Food Science and Technology*, 75, 100106.
- Farnworth, ER. and Mainville, I. (2008). **Kefir -A Fermented Milk Product**. In: Farnworth, E. R. (2th ed.), **Handbook of Fermented Functional Foods**, (2 ed). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 89-127.
- Felix, ASH. (2016). A Review About Probiotic Foods: *Kefir, Kimchi and Kombucha. Journal of Food Process Technology*, 7(11), 635-636.
- Floch, M.H., Binder, H.J., Filburn, B. and Gershengoren, W. (1972). *The effect of bile acids on intestinal microflora, Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1418–1426
- Foligné, B., Daniel, C. and Pot, B., (2013). *Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. Current Opinion on Microbiology*, 16, 284-292.
- Fooks, L.J., Fuller, R. and Gibson, G.R., (1999). *Prebiotics, probiotics and human gut microbiology, Int. Dairy J*, 9, 53–61
- Franzetti, L., Galli, A., Pagani, M. and Noni, I. d. (1998). *Microbiological and chemical investigations on sugar kefir drink. Annali di Microbiologia ed Enzimologia (Italy)*.
- Fuller, R. (1989). *Probiotics in man and animals, J. Appl. Bact.* 66, 365–378.
- Gamar, L., Blondeau, K. and Simonet, J. M. (1997). *Physiological approach to extracellular polysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus strain C83. J. Appl. Microbiol.* 83, 281–287.)
- Gao, J., Gu, F., Abdella, N.H., Ruan, H. and He, G. (2012). *Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. J. Food Sci.* 77 (8), 425-433.



- Garrote, G.L., Abraham, A.G. and De Antoni, G. L. (1998). *Characteristics of kefir prepared with different grain: Milk ratios*. **Journal of Dairy Research**, 65, 149–154.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G. and De Antoni, G. L. (2001). *Chemical and microbiological characterisation of kefir grains*. **J Dairy Res.** 68, 639-652.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G. and De Antoni, G. (2010). *Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink*. In F, Mozzi., R, R. Raya. and G, M. Vignolo. (Eds.) **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria -Novel Applications** pp.. Iowa: Blackwell Publishing, 327-340.
- Gedek, B. R. (1999). *Adherence of Escherichia coli serogroup O 157 and the Salmonella Typhimurium mutant DT 104 to the surface of Saccharomyces boulardii*. **Mycoses**, 42, 261–264
- Gerbino, E., Carasi, P., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E. and Go 'mez-Zavaglia, A. (2015a). *Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by Lactobacillus kefir*. **World J Microbiol Biotechnol**, 31, 583–592.
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M.A., and Go 'mez-Zavaglia, A. (2015b). *Role of S-layer proteins in bacteria*. **World J Microbiol Biotechnol**, 31, 1877–1887.
- Gerez, C.L., Carbajo, M. S., Rollan, G., Torres G. L. and Font de Valdez G (2010) *Inhibition of Citrus Fungal Pathogens by Using Lactic Acid Bacteria*. **Journal of Food Science**, 75, 354–359.
- Ghoneum, M. and Gimzewski, J. (2014). *Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism*. **International Journal of Oncology**, 44(3), 830-837.
- Ghoneum, M., Felo, N. and Agrawal, S. (2018). *A novel kefir product (PFT) activates dendritic cells to induce CD4+T and CD8+T cell responses in vitro*. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M. B. (1995). *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*, **J. Nutr.**, 125, 1401–1412.
- Gilliland, S.E. (1990). *Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria*. **FEMS Microbiol. Rev.**, 87, 175–188.
- Goh, Y. J. and Klaenhammer, T.R. (2010). *Functional roles of aggregation promoting-like factor in stress tolerance and adherence of Lactobacillus acidophilus NCFM*. **Applied and Environmental Microbiology**, 76, 5005-5012.

- Guzel-Seydim, Z., Seydim, A. C. and Greene, A. K. (2000). *Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir*. **Journal of Dairy Science**, 83, 275–277.
- Guzel-Seydim, Z., Wyffels, J. T., Seydim, A. C. and Greene, A. K. (2005). *Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation*. **Int J Dairy Technol**, 58, 25-29
- Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K. and Seydim, A. C. (2011). *Review: Functional Properties of Kefir*. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 51, 261-268.
- Hamet, M.F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G.L., Huys, G., Vandamme, P. and Abraham, A.G. (2013). *Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of Lactobacillus kefiranofaciens in microbial consortia present in kefir grains*. **Food Microbiology**, 36, 327-334.
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A. and Abraham, A. G. (2015). *Selection of EPS-producing Lactobacillus strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks*. **LWT – Food Science and Technology**, 63, 129-135.
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. **Academic Press., San Diego, USA**. 532.
- Hertel, C., Schmidt, G., Fischer, M., Oellers, K. and Hammes, W.P. (1998). *Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene katA of Lactobacillus sakei LTH677*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64, 1359–1365.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J. H. J (1998). *Overview of gut flora and probiotics*. **Int. J. Food Microbiology**, 41, 85–101.
- Huggett, A.C., Ph. D. and Schliter. B. (1996). *Research needs for establishing the safety of functional foods*. **Nutr. Rev.** 54, 143–148.
- İspirli, H. (2016). *Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (Lab) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit (Eps) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi*. **Yüksek Lisans Tezi**, Bayburt üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 42-44.
- Irigoyen, A., Akana, I., Castiella, M., Torre, P. and Ibanez, F. C. (2005) *Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage*. **Food Chemical**, 90, 613-620.

- Jeong, D., Kim, D. H., Kang, B., Kim, H., Song, K.Y., Kim, H. S. and Seo, K. H. (2017). *Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefiranofaciens DNI isolated from kefir*. **Food Control**, 78, 436-44
- Jeong, D., Kim, D. H., Song, K. Y. and Seo, K. H. (2018). *Antimicrobial and anti-biofilm activities of Lactobacillus kefiranofaciens DD2 against oral pathogens*. **Journal Of Oral Microbiology**, 10, 1472985
- Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J. and Mingsheng, D. (2009). *Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis*. **Food Microbiology**, 26 (8), 770-775.
- John, SM. and Deeseenthum, S. (2015.) *Properties and benefits of kefir -A review Songklanakarin*. **J. Sci. Technology**, 37(3), 275-282.
- Johnston, M. A. and Delwiche, E. A. (1965), *Distribution and characteristics of the catalases of Lactobacillaceae*, **Journal of Bacteriology**, 90, 347–351
- Jost, R. (2012). **Encyclopedia of Industrial Chemistry: Milk and Dairy Products**, Wiley VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 360 s.
- Kabak, B. and Dobson, A. D. (2011). *An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey*. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 51 (3), 248-260.
- Kadioğlu, B.U. (2017). *Probiyotik Süt Ürünü Olarak Kefirin Sağlıklı Beslenmedeki Yeri* **The Journal of Academic Social Science Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi**, 60(5), 135-145.
- Kahouli, I., Malhotra, M., Alaouijamali, M. and Prakash, S. (2015) *In-Vitro Characterization of the Anti-Cancer Activity of the Probiotic Bacterium Lactobacillus Fermentum NCIMB 5221 and Potential against Colorectal Cancer*, **Journal of Cancer Science & Therapy**, 07 (07), 224–235,
- Kanbak, G., Uzuner, K., Ol, K.K., Oğlakçı, A., Kartkaya, K. and Şentürk, H. (2014). *Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unihypertensive rats with 4 weeks salt diet*. **Clin Exp Hypertens**, 36, 1–8.
- Karatepe, P. ve Yalçın, H. (2015). *Kefirli Sağlık*. **Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.** 4(2), 23-30.
- Keele, C.A. Nei, I, E. Secretion of digestive juices, in: Samson Wright's Applied Physiology, **Oxford University Press, London**, 1965, pp. 1353–1363.
- Kesenas, H., Dinkci, N., Seckin, K., Kinik, O., Gönc, S., Ergönül, P. G. and Kavas, G. (2011). *Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of soymilk kefir*. **African Journal of Microbiology Research**, 5, 3737–3746.

- Kesmen, Z. ve Kacmaz, N. (2011). *Determination of lactic microflora of kefir grains and kefirbeverage by using culture-dependent and culture-independent methods*, **J. Food Sci.** 76 276e283.
- Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H. and Seo, K. H. (2015a). *Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration*. **Food Science and Biotechnology**, 24, 1397-1403
- Kim, D. H., Jeong, D., Kang, I. B., Kim, H., Song, K. Y. and Seo, K. H. (2017). *Dual function of Lactobacillus kefir DH5 in preventing high fat diet induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR $\alpha$  in adipose tissue*. **Molecular nutrition & food research**, 61(11), 1700252.
- Koçak, H. ve Kalkan, S. (2014). *Üniversite Öğrencilerinin Probiyotik Gıda Tüketim Alışkanlıklarının Belirlenmesi – Bahçe Meslek Yüksek Okulu Örneği*. **DBHAD Uluslararası Beslenme Araştırmaları Dergisi**, 1(1), 27-37.
- Kooiman, P. (1968). *The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain*. **Carbohydrate research**, 7(2), 200-211.
- Köroğlu, Ö., Bakır, E., Uludağ, G. ve Köroğlu, S. (2015). *Kefir ve Sağlık* **KSÜ Doğa Bil. Dergisi**, 18(1), 26-30.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. (2002), *Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics,* *International Journal of Food Microbiology*, 72, 215–224.
- Kumthavee, N. (2000). *Action of bacteriocin from Lactobacillus casei spp. Rhamnosus (SN11) against pathogenic bacteria*. **In: Proceedings of the 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology**.
- Lago, A. D. L., Cardoso, G.P., De Cruz Pedrozo Miguel G.M. and Schwan, F.R. (2010). *Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods*. **Food Research International**, 43(5), 1523-1528.
- Lahtinen, S. and Ouwehand, A. (2009). *Adhesion to intestinal mucus and epithelium by probiotics*. Lee, Y.K. and Salminen, S. (eds.) **Handbook of probiotics and prebiotics, 2nd edition**. Wiley, Hoboken, NJ, pp. 377-384.
- Latorre-Garcia, L., del Castillo-Agudo, L. and Polaina, J. (2007.) *Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23, 785–791.

- Lee, M.Y., Ahn, K. S., Kwon, O. K., Kim, M. J., Kim, M. K., Lee, I. Y., Oh, S. R. Lee, H. K. (2007). *Antiinflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model*. **Immunobiology**, 212(8), 647654.
- Lee, SH. and Kim, YJ. (2014). *A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries*. **Arch Microbiol**, 196, 601–609.
- Leite, A. M. O., Mayo, B., Rachid, C. T. C. C., Peixoto, RS., Silva, J. T., Paschoalin, V. M. F. and Delgado, S. (2012). *Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis*. **Food Microbiol**, 31, 215-221.
- Leite, A. M. O., Miguel, M. A., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T. and Paschoalin, V. M. (2013a). *Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage*. **Braz. J. Microbiol.** 44 (2), 341-349.
- Leite, A. M., Leite, D. C., Del Aquila, E. M., Alvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A., Silva, J. T. and Paschoalin, V. M. (2013b). *Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes*. **J. Dairy Sci.** 96 (7), 4149-4159.
- Lengke, H. A. W. and Adriani, L. (2009). *Effects of milk fermented with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp., on lactic acid and acetic acid content and on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa*. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**.
- Lim, S. L. and Tay, S. T. (2011). *Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples*. **Tropical Biomedicine**, 28, 438– 443.
- Lin, M.Y. and Yen, C.L. (1999). *Antioxidative ability of lactic acid bacteria*, **J. Agric. Food Chem**, 47, 1460–1466.
- Liu, C.T., Chu, F. J., Chou, C. C. And Yu, R.C. (2011). *Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from Lactobacillus casei 01*. **Mutation Research**, 721, 157–162.
- Liu, S., Han, Y. and Zhou, Z. (2011). *Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods*. **Food. Res. Int.**, 44, 643-651.
- Liutkevicius, A. and Sarkinas, A. (2004). *Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass*. **Veterinarija ir Zootechnika**, 25, 64 –70.

- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J. (2006). *Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities*. **Rev Iberoam Micol**, 23, 67-74.
- Loretan, T., Mostert, J.F. and Viljoen, B. C. (2003). *Microbial flora associated with South African household kefir*. **South African Journal of Science**, 99, 92–94.
- Lu, M., Wang, X., Sun, G., Qin, B., Xiao, J., Yan, S., Pan, Y. and Wang, Y. (2014). *Fine Structure of Tibetan Kefir Grains and Their Yeast Distribution, Diversity, and Shift*. **PLoS ONE**, 9(6), e101387.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. and Kitamura, S. (2004). *Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation*. **Biofactors**, 22, 197-200.
- Magalhães, K.T., Pereira, G.V.M., Dias D. R. and Schwan, R. F. (2010a). *Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir*. **World J Microbiol Biotechnol**, 26,1241-1250.
- Magalhães, K.T., Pereira, M.A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L, Teixeira, J.A., Silva, J. B. A. and Schwan, R. F. (2010b) *Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations*. **Bioresour Technol**, 101, 8843-8850.
- Magalhães, K.T., Pereira, G. V. M., Campos, C. R., Dragone, G. and Schwan, R. F. (2011). *Brazilian Kefir: Structure, Microbial Communities and Chemical Composition*. **Braz J Microbiol**, 42, 693-702.
- Magalhaes, K. T., Dias, D. R., de Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A. and Schwan, R. F. (2011b). *Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture*. **International Journal of Food Science and Technology**, 46, 871–878.
- Mansour, S., Beckerich, J. M. and Bonnarme, P. (2008). *Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica**. **Applied and Environmental Microbiology**, 74, 6505–6512.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P. and Cotter, P. D. (2013). *Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources*. **FEMS Microbiol. Lett.** 348 (1), 79-85.
- Marsh, A. J, O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., and Cotter, P. D. (2013) *Sequence-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources*. **PLoS ONE**, 8e69371.
- Martins, F.S., Dalmasso, G., Arantes, R. M. E., Doye, A., Lemichez, E., Lagadec, P., Imbert, V., Peyron, J-F., Rampal, P. and Nicoli, J.R. and Czerucka, D. (2010).

*Interaction of Saccharomyces boulardii with Salmonella enterica serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection.* **PLoS One**, 5e8925

- Martins, F.S., Vieira, A. T., Elian, S. D. A., Arantes, R. M. E., Tiago, F. C. P., Sousa, L.P., Araújo, H. R. C., Pimenta, P. F., Bonjardim, C. A., Nicoli, J. R. and Teixeira, M. M. (2013). *Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of Saccharomyces boulardii against Salmonella infection in mice.* **Microbes Infect**, 15, 270–279
- Mathur, S. and Singh, R. (2005). *Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review.* **Int. J. Food. Microbiol**, 105, 281–295.
- Medrano, M., Hamet, M. F., Abraham, A. G. and Pérez, P. F. (2009). *Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by Bacillus cereus infection.* **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, 9, 505–513.
- Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G. and Perez, P. F. (2011). *Oral Administration of Kefiran Induces Changes in the Balance of Immune Cells in a Murine Model.* **J. Agric. Food Chem**, 59, 5299–5304.
- Mendes, F., Sieuwerts, S., De Hulster, E., Almering, MJ. and Luttik, MA. (2013) *Transcriptome-based characterization of interactions between Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in lactose-grown chemostat cocultures.* **Appl Environ Microbiol**, 79, 5949–5961.
- Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S.S., Webb, C., Fukuda, H. ve Kondo, A. (2006). *Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of Lactobacillus plantarum under gastrointestinal tract conditions.* **Biochemical Engineering Journal**, 28, 73–78.
- Mobili, P., Serradell, M. A., Trejo, S. A., Avilés Puigvert, F. X., Abraham, A. G. and De Antoni, G. L. (2009). *Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and nonaggregating Lactobacillus kefir strains.* *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95(4), 363–372.
- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T., Nimura, T. and Adachi, S. (1990b), *Carboxymethyl kefiran: preparation and viscosimetric properties.* **J Food Sci**, 55, 1483–1484.
- Mumy, K.L., Chen, X., Kelly, C.P. and Mc Cormick, B. A. (2008). *Saccharomyces boulardii interferes with Shigella pathogenesis by postinvasion signaling events.* **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 294, G599– G609.
- Mozzi, F., Savoy De Giori, G., Oliver, G. and Font De Valdez, G. (1995) *Exopolysaccharide production by Lactobacillus casei. I. Influence of salts.* **Milchwissenschaft**, 50, 186–188.

- Nalbantoglu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek D., Sayood, K. and Can, H, (2014). *Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains*. **Food Microbiology**, 41, 42–51.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R. A. (1999), *Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB)*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 38(1), 13-126.
- Ninane, V., Mukandavambaje, R. and Berben, G., (2007). *Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions*. **J. AOAC Int.** 90 (4), 1111-1117.
- Otles, S. ve Cagindi, O. (2003). *Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects*. **Pakistan Journal of Nutrition**, 2, 54–59.
- Öner, Z., Karahan, A. G. and Çakmakçı, M. L. (2010) *Effects of Different Milk Types and Starter Cultures on Kefir*. **Journal of Food**, 177- 182.
- Özdestan, Ö. and Üren, A. (2010). *Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product*. **European Food Research and Technology**, 231, 101–107.
- Padilla, C., Lobos, O. and Brevis, P. (2004). *In vitro antibacterial activity of the peptide PsVP-10 against antimicrobial-resistant Enterococcus faecalis isolated from clinical samples*. **J Animicrob Chemother**, 53, 390–2.
- Pichhardt, K. (2004). *Gıda Mikrobiyolojisi ve Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar*. **Literatür Yayınları**, Manisa, 176-178s.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F. and Van Sinderen, D. (2011). *Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria*. **Genes Nutr**, 6, 285-306.
- Prado Acosta, M., Ruzal, S. M. and Cordo S. M. (2016). *S-layer proteins from Lactobacillus sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor*. **Int J Biol Macromol**, 92, 998–1005.
- Ramchandran, L. and 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.
- Ratray, F.P. and O'Connell, M. J. (2011). *Fermented Milks Kefir*. In: Fukay, J. W. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2th ed). **Academic Press, San Diego, USA**, p. 518-524.
- Rea M.C., Lennartsson, T., Dillon, P., Drina, F.D., Reville, W.J., Heapes, M., and Cogan, T.M. (1996). *Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics*. **J Appl Microbiol**, 8, 83-94.



- Ricciardi, A. and Clementi, F. (2000). *Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications*. **Italian Journal of Food Science**, 23-45.
- Rivière, J. W., Kooiman, P. and Schmidt, K. (1967). *Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by Lactobacillus brevis*. **Archives of Microbiology**, 59 (1), 269-278
- Rojo- Bezares, B., S'aenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C. and Ruiz-Larre,a F. (2007). *Antimicrobial activity of nisin against Oenococcus oeni and other wine bacteria*. **Int J Food Microbiol**, 116, 32–36.
- Roy, U., Batish, VK., Grover, S. and Neelakantan, S. (1996). *Production of Antifungal Substance by Lactococcus lactis subsp. lactis CHD-28.3*. **International Journal of Food Microbiology**, 32(1-2), 27-34.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. (2002) *An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. **Int Dairy J**, 12, 163-171.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*. **Molecular Biology and Evolution**, 4, 406-425.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. and Marquina, D. (2003). *The antimicrobial properties of different strains of Lactobacillus spp. isolated from kefir*. **Systematic and Applied Microbiology**, 26(3), 434-437.
- Sa'ra, M. and Sleytr, U.B. (2000) *S-layer proteins*. **J Bacteriol**, 182, 859–868
- Sarkar, S. (2007). *Potential of kefir as a dietetic beverage—A review*. **British Journal of Nutrition**, 109, 280–290.
- Sarkar, S. (2008). *Biotechnological innovations in kefir production- A review*. **Br. Food J**, 110, 283-295.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. and Finlay, B. B. (2010). *Gut Microbiota in Health and Disease*. **Physiol. Rev.** 90, 859-904.
- Sert, S. (2002). **Genel mikrobiyoloji laboratuvar notları**. (3. Baskı). Erzurum: Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 138.
- Servin, A.L. (2004). *Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens*. **FEMS Microbiology Reviews**, 28, 405-440.
- Shemesh M, Tam A. and Steinberg, D. (2007). *Expression of biofilm-associated genes of Streptococcus mutans in response to glucose and sucrose*. **J Med Microbiol**, 56, 1528–1 535.

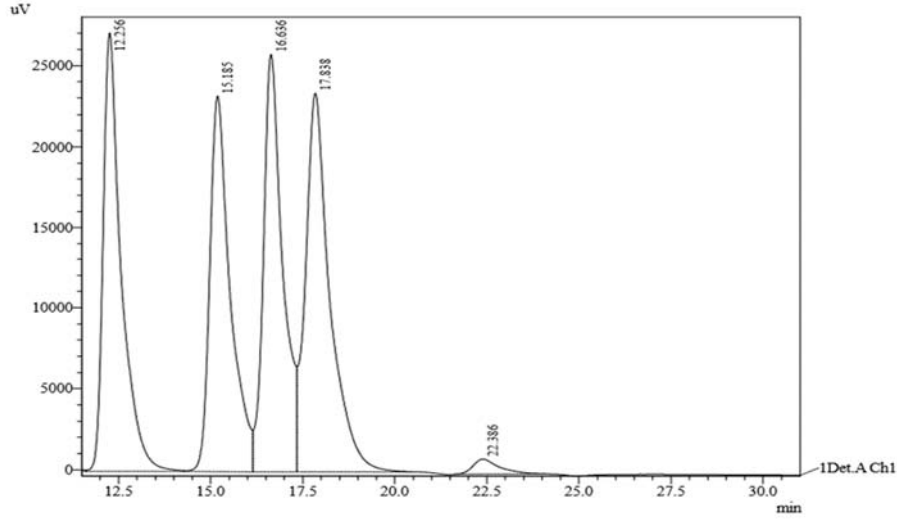
- Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M. and Aibara, K. (1982). *Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain*. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, 35, 75-80.
- Simark-Mattsson, C., Jonsson, R. and Emilson, C. G. (2009). *Final pH affects the interference capacity of naturally occurring oral Lactobacillus strains against mutans Streptococci*. **Arch Oral Biol**, 54, 602–607.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov A, A., Hristozova, T., Frengova, G. and Spasov, Z. (2002). *Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, 28, 1–6.
- Sirilum, S., Chaiyasust, C., Kantachote, D. and Luxananil, P. (2010). *Characterization of non human origin probiotic Lactobacillus plantarum with cholesterol lowering property*. **Afr. J. Microbiol. Res.** 4 (10) 994-1000
- Sleytr, U.B., Schuster, B., Egelseer, E-M. and Pum, D. (2014). *S-layers: principles and applications*. **FEMS Microbiol Rev**, 38, 823– 864.
- Smith, I.M., Baker, A., Arneborg, N., and Jespersen, L,. (2015). *Non Saccharomyces yeasts protect against epithelial cell barrier disruption induced by Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*. **Lett Appl Microbiol.** 61, 491-497.
- Song , M., Park , S., Lee , H., Min , B., Jung , S., Park , S., Kim , E. and Oh, S. (2015). *Effect of Lactobacillus acidophilus NS1 on Plasma Cholesterol Levels In Diet-Induced Obese Mice*. **J. Dairy Sci.**, 98, 1492–1501
- Suzuki, K., Tani H, Yabumoto, T., Yabumoto, Y., and Yoshida, Y. ( 2011). **Novel fermented milk product and use there of**. US Patent No. US 20110123640 A1. May
- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, Y. Benno. and T. Nakase, (1998). *The composition of the Lactobacillus flora in kefir grains*, **Syst. Appl. Microbiol**, 21 121e127. ,
- Tamime, A.Y. (2006). Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, AY (ed.), **Fermented Milk Blackwell Science Ltd**, Oxford, UK, p.174-216.
- Tiago, F. C. P., Martins, F. S., Souza, E. L.S., Pimenta, P. F. P. and Araujo, H. R. C., Castro, I. M., Brandão, R. L. and Nicoli, JR. (2012). *Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by Saccharomyces probiotics*. **J Med Microbiol**, 61, 1194–1207.

- Underhill, D. M. and Lliev, L. D. (2014). *The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system*. **Nat. Rev. Immunol.** 14, 405-416.
- Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K. and Jespersen, L. (2005). *In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains*. **International Journal of Food Microbiology**, 101, 29-39.
- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E. and Matar, C. (2006). *Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity*. **Cytokine**, 36(5), 254-260.
- Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J. and Cotter, P. D. (2016). *Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir*. **Msystems**, 1, (5).
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D., Gänzle, M., and Tannock, G. (2008). *Glucosyltransferase A (*GtfA*) and inulosucrase (*Inu*) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract*. **Microbiology**, 154, 72-80.
- Wang, S. Y., Chen, H. C., Liu, J. R., Lin, Y. C. and Chen, M. J. (2008). *Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and viili starters*. **Journal of Dairy Science**, 91, 3798–3805.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S. (2008). *Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 43(3), 283-288.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y. and Yang, Z. (2015). *Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir*. **Carbohydr Polym**, 125, 16-25.
- Welman AD, Maddox, IS. (2003). *Fermentation performance of an exopolysaccharide-producing strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus**. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 30, 661-668.
- Wen, Z. T. and Burne, R. A. (2002). *Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans**. **Appl Environ Microbiol**. 68, 1196–1203
- Witthuhn, R.C., Schoeman, T. and Britz, T.J. (2004). *Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains*. **Int. J. Dairy Technol.** 57 (1), 33-37.

- Witthuhn, R.C., Schoeman, T. and Britz, T.J. (2005). *Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation*. **Int. Dairy J.** 15 (4), 383-389.
- Wszolek, M., Tamime, A. Y., Muir, D. D. and Barclay, M. N. I. (2001). *Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures*. **LWT – Food Science and Technology**, 34, 251 – 261.
- Yalçın, B. (2005). *Allerjik Reaksiyonların Patogenezi: T Hücreleri ve Eozinofillerin Rolü*. **İç Hastalıkları Dergisi**,12(4), 209-214
- Yilmaz, A., Bozkurt, F., Cicek, P. K., Dertli, E., Durak, M. Z. and Yilmaz, M. T. (2016). *A novel antifungal surface-coating application to limit postharvest decay on coated apples: Molecular, thermal and morphological properties of electrospun zein–nanofiber mats loaded with curcumin*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 37, 74-83.
- Yokoi, H. and Watanabe, T. (1992). *Optimum culture conditions for production of Kefiran by Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains*. **J Ferment Bioeng**, 74, 327-329
- Yuksekdag, Z. N., Beyatli, Y. and Aslim, B. (2004b). *Metabolic activities of Lactobacillus spp. strains isolated from kefir*. **Nahrung**, 48, 218– 220.
- Zabala, A., Martín, R., Haza, A., Fernández, L., Morales, P. and Rodríguez, J. M. (2001b), *Inhibition of the proliferation of myeloma cells by the meat origin strain Enterococcus faecium CH3*, **Meat Science**, 59, 79-85.
- Zajsek K, Gorsek, A. and Kolar, M. (2013). *Cultivating conditions effects on kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains*. **Food Chem** 139, 970-977.
- Zanirati, F.D., JR. A.M., Sandes, C.D.H.S., Nicoli, R.J., Nunes, C.A. and Neuman, E. (2015), *Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures*. **Anaerobe**, 32, 70-76.
- Zhou, J., Liu,X., Jiang, H. and Dong, M. (2009). *Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis*. **Food Mikrobiol.** 26, 770-7

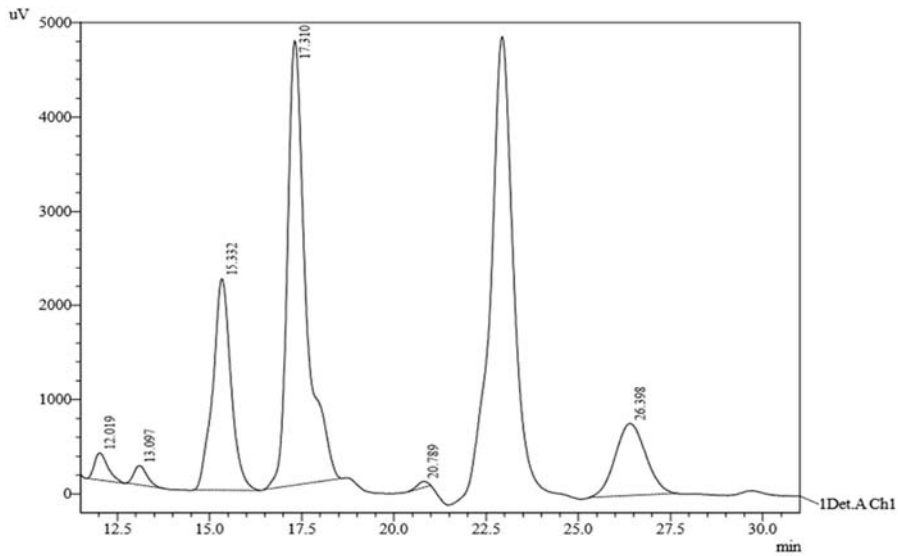
## EKLER

### EK-1

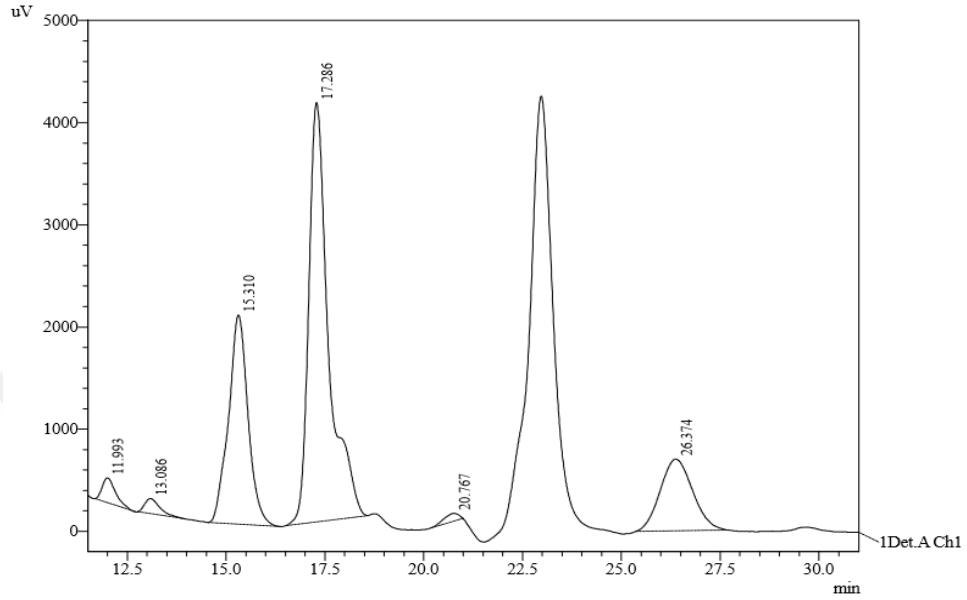


Standart olarak kullanılan maltoz, glukoz, galaktoz ve fruktoz'un HPLC kromatogramı. Kromatogramda maltoz, glikoz, galaktoz ve fruktoz sırasıyla 11.951 dk, 15.282 dk, 17.259 dk ve 18.758 dk'dan sonra tespit edilmiştir.

### EK-2

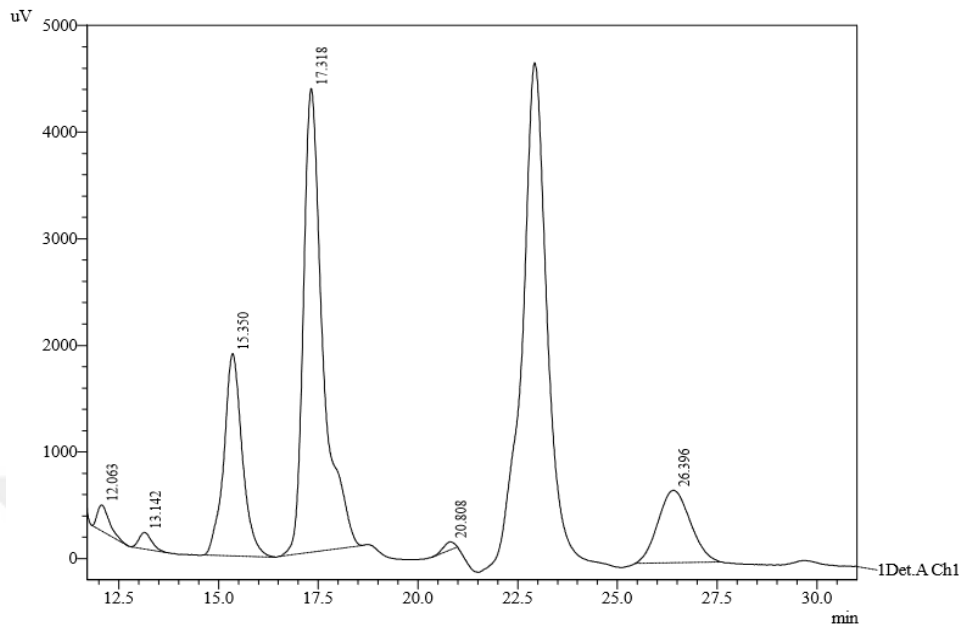


*L. kefir* KF8 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 12,019 dk dan sonra maltoz, 15,332 dk dan sonra glikoz, 17,310 dk dan sonra galaktoz tespit edilmiştir.

**EK-3**

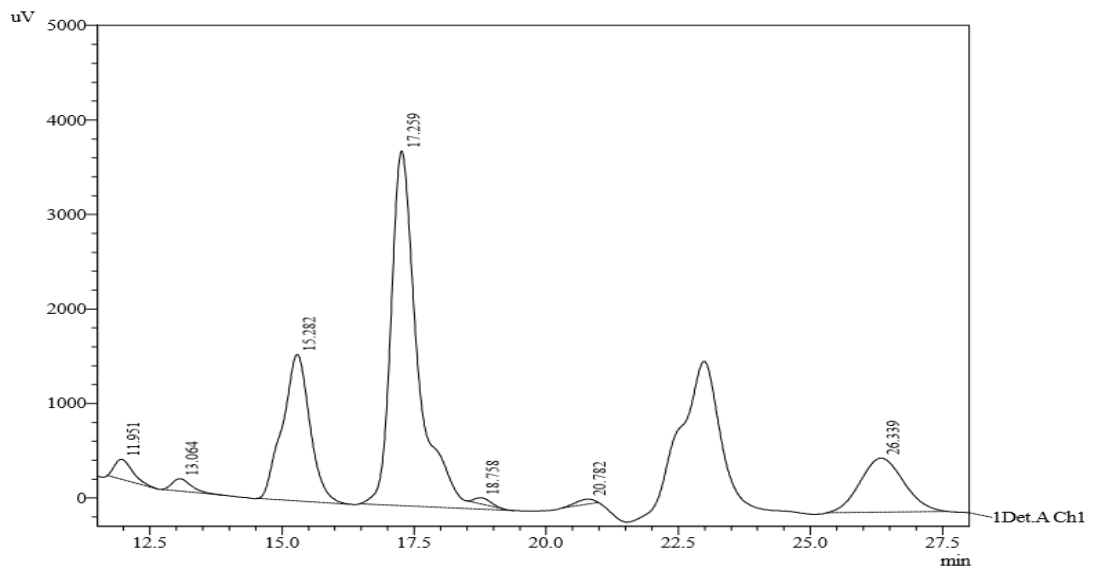
*L. kefiranofaciens* KF16 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 11,993 dk'dan sonra maltoz, 15,310 dk'dan sonra glikoz, 17,286 dk'dan galaktoz tespit edilmiştir.

### EK-4



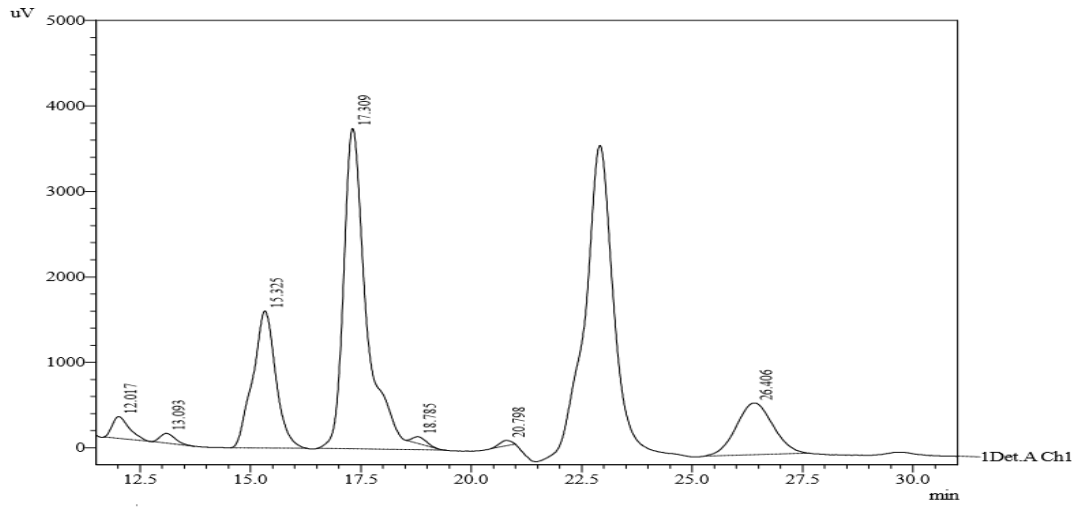
*L.kefiri* KF30 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 12,063 dk'dan sonra maltoz, 15,350 dk'dan sonra glikoz, 17,318 dk'dan sonra galaktoz tespit edilmiştir.

### EK-5



*Lactobacillus paracasei* KF39 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 11,951 dk'dan sonra maltoz, 15,282 dk'dan sonra glikoz, 17,259 dk'dan sonra galaktoz, 18,758 dk'dan sonra fruktoz tespit edilmiştir.

## EK-6



*Lactococcus lactis* KF42 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı. 12,017 dk'dan sonra maltoz, 15,325 dk'dan sonra glikoz, 17,309 dk'dan sonra galaktoz, 18,785 dk'dan sonra fruktoz tespit edilmiştir.



## ÖZGEÇMİŞ



**Kübra PURUTOĞLU**

1985 yılında Bayburt’ da doğmuştur. 2015 yılında Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nü bitirmiştir. 2016 yılında Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.

