

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

137853

**KEFİRDE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TÜR DÜZEYİNDE
ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. ÇİĞDEM SEZER
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

**Y.G. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

137853

**DANIŞMAN
Doç. Dr. ABAMÜSLÜM GÜVEN**

2003- KARS

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEFİRDE LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TÜR DÜZEYİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. ÇİĞDEM SEZER
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. ABAMÜSLÜM GÜVEN

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No:VF 06
2003- KARS**

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Hijyeni Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Çiğdem SEZER tarafından hazırlanmış olan “Kefirde Laktik Asit Bakterilerinin Tür Düzeyinde Araştırılması” adlı bu çalışma, yapılan tez savunma sınavı sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

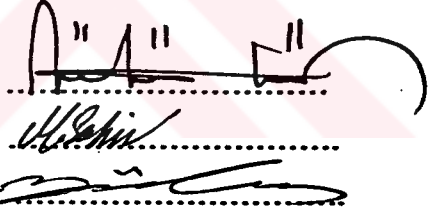
05.09.2003

Adı Soyadı :

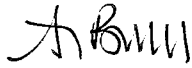
Başkan : Doç.Dr.Abamüslüm GÜVEN

Üye : Doç.Dr. Mitat ŞAHİN

Üye : Yrd.Doç.Dr. Murat GÜLMEZ


.....
.....
.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bil. Enst. Yönetim Kurulu'nun..08..09..03..gün ve ..09..130.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Yrd.Doç.Dr. Ayla ÖZCAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo listesi	I
Şekil listesi	II
Önsöz	III
Amaç	
1. GİRİŞ	1
1.1. Tanım ve tarihçe	3
1.2. Kefire ait genel özellikler	5
1.2.1. Mikrobiyolojik özellikler	5
1.2.1.1. Kefir tanesinin mikrobiyolojik özellikleri	5
1.2.1.2. Kefirin mikrobiyolojik özellikleri	10
1.2.2. Fiziksel özellikler	13
1.2.3. Kimyasal özellikler	14
1.2.3.1. Kefir tanesinin kimyasal özellikleri	14
1.2.3.2. Kefirin kimyasal özellikleri	15
1.3. Kefirin sağlık üzerindeki etkileri	20
1.3.1. Yüksek tansiyon üzerine etkisi	21
1.3.2. Kolesterol üzerine etkisi	21
1.3.3. Kansere üzerine etkisi	21
1.3.4. Toksin reseptörlerinin yıkılması	21
1.3.5. İmmün sistemin uyarılması	21
1.3.6. Anemi üzerine etkisi	22
1.3.7. Sindirim sistemi üzerine etkisi	22
1.3.8. Antibakteriyel ve antifungal etkisi	23
1.3.9. Laktoz intolerans üzerine etkisi	23
1.4. Kefir üretim teknikleri	24
1.4.1. Çiğ sütün seçimi	25
1.4.2. Çiğ sütün ısıtılması ve homojenizasyonu	25
1.4.3. Mayalama	27
1.4.4. Tanelerin geri kazanılması ve muhafazası	31

1.4.5.	Kefir starterleri ve taneler ile mayalama	31
1.4.6.	Kefir çeşitleri	33
1.4.7.	Ambalajlama ve muhafaza	34
1.5.	Kefirde görülen kusurlar ve önleme yolları	35
1.6.	Kefirde laktik asit bakterilerinin izolasyon ve identifikasyon yöntemleri	37
1.6.1.	İzolasyon yöntemleri	37
1.6.2.	Laktik asit bakterilerinin cins bazında identifikasyonu	39
2.	MATERYAL ve METOT	47
2.1.	Materyal	47
2.1.1.	Kefir taneleri	47
2.1.2.	Hammadde	47
2.1.3.	Alet ve ekipman	47
2.2.	Metot	47
2.2.1.	Kefir tanelerinin aktif hale getirilmesi ve çoğaltılması	47
2.2.2.	Kefir kültürü üretimi	48
2.2.3.	Kefir üretimi	48
2.2.4.	Kefir tanesinin aktif durumda muhafazası	50
2.2.5.	Mikrobiyolojik analizler	50
2.2.5.1.	Laktobasillus, löykonostok, pediokokkus sayımı	50
2.2.5.2.	Laktik streptokokların sayımı	50
2.2.5.3.	Maya ve küf sayımı	50
2.2.5.4.	Toplam mezofilik aerop mikroorganizma sayımı	51
2.2.5.5.	Koliform grubu mikroorganizmaların sayımı	51
2.2.5.6.	Enterokokların sayımı	51
2.2.5.7.	Laktik asit bakterilerinin izolasyonu	51
2.2.5.8.	İzolatların stoklanması ve muhafazası	52
2.2.5.9.	Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu	52
2.2.5.9.1.	Morfolojik özellikler	52
2.2.5.9.2.	Kültürel özellikler	52
2.2.6.	Kimyasal analizler	56
2.2.7.	İstatistiksel analizler	56

3. BULGULAR	57
3.1. Kefire ait mikrobiyolojik analiz sonuçları	57
3.1.1. Sayım sonuçları	57
3.1.2. İzolatların identifikasyonu	58
3.2. Kefire ait kimyasal analiz sonuçları	62
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
5. ÖZET	69
6. SUMMARY	71
7. KAYNAKLAR	73
8. ÖZGEÇMİŞ	85



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 1. Kefir ve kefir tanelerinin mikroflorası	11
Tablo 2. Ticari kefir ile laboratuarda üretilen kefirlerin kimyasal kompozisyonu	17
Tablo 3. Farklı aromatik nitelikteki kefirlerin kimyasal bileşimi	17
Tablo 4. Farklı sütlerden yapılan kefirlerin bazı kimyasal özellikleri	25
Tablo 5. Farklı sütler kullanılarak kefir tanesi ve kefir kültürü ile mayalanmış kefirlerin bazı kimyasal özellikleri	27
Tablo 6. Kefirdeki kusurlar ve nedenleri	36
Tablo 7. Çeşitli araştırmacıların izolasyonda kullandıkları yöntemler	38
Tablo 8. Laktobasillerin tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan özellikleri	41
Tablo 9. Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan özellikleri	43
Tablo 10. Löykonostokların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan testler	44
Tablo 11. Pediokokların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan testler	45
Tablo 12. Kefir tanesi ve kültürü kullanılarak hazırlanmış kefirde mikrobiyal sayım sonuçları	57
Tablo 13. İzolatlara uygulanan test sonuçları	60
Tablo 14. Suşlara uygulanan tolerans testleri sonuçları	61
Tablo 15. İdentifiye edilen suşlar	61
Tablo 16. Kimyasal analiz sonuçları	62

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1. Endüstriyel kefir üretim şeması	30
Şekil 2. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda yararlanılan testler	40
Şekil 3. Kefir tanelerinin aktif hale getirilmesi ve çoğaltılması	48
Şekil 4. Kefir kültürü üretimi	49
Şekil 5. Kefir üretimi	49
Şekil 6. Laktik asit bakterilerinin gruplandırılması	59

ÖNSÖZ

Bu araştırmada üç ilden (Ankara, Antalya, İzmir) temin edilen kefir taneleri kullanılarak elde edilen kefir içerisindeki laktik asit bakteri florası izole ve identifiye edilmeye çalışıldı. Araştırma sonucunda henüz tartışma konusu olan kefir florasının tespitine katkı sağlanmaya çalışıldı.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında çalışma azmini, bilgiyi ve uygulamayı öğrendiğim, her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Danışman hocam Doç.Dr. Abamüslüm GÜVEN'e, Yrd.Doç.Dr. Murat GÜLMEZ'e, Dr. Hilmi YAMAN'a, Arş.Gör. Berna DUMAN'a, maddi desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığına, maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen aileme ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Süt ve süt ürünlerinin beslenme ve sağlık açısından yararlarının bilincine varılmasına paralel olarak bu gıdaların tüketimi gün geçtikçe artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde tüketicilerin bu ürünlere olan ilgisinin artırılması ve tüketimin cazip hale getirilmesi için süt ürünleri teknolojisinde yeni ürünlerin üretimi ve geliştirilmesi faaliyetleri hızla devam ederken, bu ürünlerin sağlık açısından yararı da artırılmaktadır. Yeni ürünlerin elde edilmesi amacıyla fermantasyondan da yararlanılmaktadır. Fermantasyon, gıdaların lezzetini ve aromasını artırmak ve muhafaza süresini uzatmak için kullanılan en eski metotlardan biridir. Sütün fermantasyonu, mikroorganizmaların metabolik ve enzimatik faaliyetleri sonucu, sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerinde oluşan modifikasyon olarak tanımlanabilir. Fermente ürünler hayvansal ve bitkisel kaynaklıdır. Hayvansal ürünler içerisinde et ürünleri ve süt ürünleri başta gelir.

Sütün fermantasyonu, oldukça kontrollü ve bilinçli olarak laktik asit bakterileri, mikrokoklar, propiyonik asit bakterileri, küf ve mayaların tek veya kombine kültürlerinden yararlanılarak yapılmaktadır. En eski fermente süt ürünü yoğurttur. Kefir de yine önemli bir fermente süt ürünüdür. Orjinini Kafkasya'dan alan bu ürün dünya ülkelerinde giderek yaygınlaşmaktadır. Fermente süt ürünlerinin üretim metotları, besin değerleri, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri gün geçtikçe daha derinliğine araştırılmıştır.

Günümüz koruyucu hekimlik konuları arasında yer alan alternatif tıp ve onun konularından biri olan probiyotik gıdalar, bunlar içerisinde ise probiyotik süt ürünleri giderek önemsenmektedir. Başlıca probiyotik niteliklere sahip olan doğal fermente süt ürünü kefiridir. Bu nedenle kefirin koruyucu ve tedavi edici özellikleri diğer süt ürünlerine kıyasla oldukça önemsenmiş ve kefirin sağlık üzerine önemli yararlar sağladığı bildirilmiştir.

Ülkemizde kefirin endüstriyel üretimi olmamasına karşın, halk arasında kefire duyulan ilginin özellikle konu ile ilgili haber ve yayınlara paralel olarak gün geçtikçe arttığı belirlenmiştir. Kefirin sağlık açısından yararları anlaşıldıkça talebin daha da arttığı, ülkemizde ticari pazarı bulunmaması nedeniyle de ev tipi kefir yapımının giderek yaygınlaştığı gözlenmektedir.

Kefir üretiminde kullanılan kefir taneleri kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Kefir tanesi florasını laktik asit bakterileri ve mayalar oluşturur. Bu flora, laktozun mikrobiyal metabolizması sonucu oluşan glukoz ve galaktoz zincirlerini içeren kefiran adındaki polisakkarit yapı (kefir tanesi) içerisinde simbiyotik bir yaşam sürer. Kefir tanesi mikroflorasının çok özel ancak değişken olduğu bildirilmektedir (73, 81).

Orjinine bağlı olarak kefir tanesinde yerleşik olan mikroorganizmaların sayısı, cinsi ve türü değişebilir. Bu değişiklik elde edilen kefirin özelliklerine yansır. Özellikle bakteri/maya oranı, kefirin duyuşal özellikleri ile dayanma süresi üzerinde etkilidir. Bu nedenle kefir üretimi ve saklanması yoğurtta olduğu kadar kolay değildir. Kefir tanesi, birçok mikroorganizmanın gelişimini engelleyen bazı kimyasal ve fiziksel özellikler taşır.

Kefirin yapısı kullanılan hammaddeye, tanenin mikroflorasına ve bölgesel varyasyonlara bağlı olarak değişmektedir. Rapor edilen verilere göre tipik özellikler: %0.8-1.5 laktik asit, %0.1-2.0 etanol ve karbondioksit üretimine bağlı olarak köpürme yeteneği olarak bildirilmiştir (24, 130).

Yapılan çalışmalardan kefirin karakteristik özellikleri ve sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin mikroflora kompozisyonuna bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Ancak bu mikrofloranın sabit olmayıp birçok faktöre bağlı olarak az çok değişebildiği de bildirilmektedir. Bu durumda öncelikle kefir mikroflorasının detaylı olarak ortaya konmasının yapılacak olan birçok biyokimyasal araştırmaya başlamanın ön koşulu olabileceği de akla gelmektedir. Bu araştırmada üç farklı ilden (Ankara, Antalya, İzmir) temin edilen kefir tanesi örnekleri kullanılarak elde edilen kefirin içerisindeki laktik asit bakteri florası karşılaştırmalı olarak araştırıldı ve sonuçta kefir mikroflorasının açığa çıkarılması amaçlandı. Aynı zamanda kefir örneklerinde asitlik ve pH değişimi ile laktik mikroflora arasındaki ilişki araştırılmaya çalışıldı.

1. 1. Tanım ve Tarihçe

En iyi bilinen fermente süt ürünleri yoğurt ve peynirdir. Dünya'da 2000'den fazla fermente süt ürünü çeşidi bulunmaktadır. Bununla beraber son zamanlarda yapılan çalışmalar, çoğu ürünün benzer olduğunu, bazılarının ise sadece yöresel olarak üretildiğini, aynı veya benzer ürünlerin farklı isimler ile adlandırıldığını göstermiştir. Kullanılan sütlerin çeşidi ve dominant mikroorganizma florası dikkate alındığında, fermantasyon sonucu üretilen metabolik ürünlere göre fermente süt ürünleri gruplandırıldığında ürün çeşidinin çok daha az olduğu belirtilmiştir (129).

Süt teknolojisinde fermantasyona dayalı süt ürünleri kimi zaman "fermente süt ürünleri", kimi zaman da içerdikleri asitler nedeniyle ekşi bir aromaya sahip olduklarından "ekşi süt ürünleri" olarak adlandırılır. Laktik asit fermantasyonunun yanı sıra, alkol fermantasyonundan dolayı alkol içeren bazı süt ürünleri de "süt içkileri" olarak tanımlanmıştır (141).

Robinson ve Tamime (107) fermantasyon sonucu oluşan fermente süt ürünlerini üç grupta sınıflandırmıştır;

- Laktik asit fermantasyonu sonucu oluşan rnler
- Maya - laktik asit fermantasyonu sonucu oluşan rnler
- Kf -laktik asit fermantasyonu sonucu oluşan rnler

Yoğurt ve buttermilk birinci kategoride, kefir ve kırmız ikinci kategoride, Viili (Fin fermente süt ürünü) ise son kategoriye örnek verilmiştir (86).

Kefir, Sovyet Rusya'ya, oradan da Doğu Avrupa lkeleri (Polonya, ek Cumhuriyeti, Slovanya vb.) ile İskandinav ülkelerine yayılmıştır. Moğolistan'dan Doğu Avrupa'ya kadar olan coğrafyada geleneksel olarak üretilen içeceklerin başında gelmektedir (68, 128). Polonya ve diğer birkaç ülkede de en çok tüketilen fermente süt içeceğidir. Batı Avrupa'da kefir tüketimi Doğu Avrupa'ya göre daha az iken Ymer (Danimarka fermente süt içeceği) gibi diğer fermente süt rnleri İskandinavya'da daha çok tercih edilmektedir (128). Ondokuzuncu yüzyılın sonunda Doğu ve Orta Avrupa lkelerinde kefir, besleyici değeri yanında fizyolojik değerinin belirlenmesi ile popüler bir içecek halini almıştır (76).

Kesin bir tarih olmamasına rağmen yoğurt ve ayran yaklaşık olarak 6000 yıldan beri bilinmektedir (140). Kırmızın 13. yüzyıl kefirin ise 18. yüzyıldan beri üretildiği bildirilmiştir (146). En eski fermente süt ürünlerinden yoğurt, ayran ve

muhtemelen kırmızı sözcükleri Türk dilinden köken aldığı gibi (35, 67) kefir sözcüğünün de Türkçe'de içildikten sonra hissedilen iyi olma hali anlamındaki "keyf" ve sarhoş eden, başa vuran anlamında ki "kef" sözcüğüyle Kafkas dillerinde "en iyi kalite" anlamına gelen "keyf" sözcüklerinden türetildiği ileri sürülmüştür. Kefir Almanya'da "sevinç içkisi" olarak da tanımlanmaktadır (93). Ayrıca kefir kephir, kiaphur, kefyf, kepher, knapan, kepi, kippe gibi değişik adlarla da nitelendirilmektedir (52).

Kefir tanelerinin nasıl elde edildiği kesin olarak bilinmemektedir. Ancak, kefir taneleri Kafkasya'da keçi tulumu içinde inek sütünün dana veya koyun şirdenleri ile pıhtılaştırılması sonucunda tulumun iç yüzeyinde birkaç hafta sonra süngerimsi bir kabuk tabakasının oluşması ve bu kabuk tabakasının tulumdan kazandıktan sonra kurutulduğu ve daha sonra mayalama işleminde kullanılırken kefir tanelerinin elde edildiği bildirilmiştir (58).

Kefir tanelerinin karnabahar çiçeğinin minyatür şekline benzeyen küçük, düzensiz şekilli, sarımsı-beyaz renkte, kıvrımlı ve pürüzlü yüzeyli, elastik ve yarı sert yapıya sahip olduğu belirtilmiştir (17, 23).

Kefir; kefir taneleri, kefir kültürü ya da kefir starter kültürü kullanılarak sütün fermente edilmesi ile elde edilen hafif asitli, alkollü ve köpüklü bir fermente süt içeceğidir. Mayalanan süttten kefir tanelerinin süzülerek uzaklaştırılması ile elde edilen kısmı ifade eder. Bu süzüntü bir sonraki fermantasyonda kullanılmak üzere kültür olarak ısı işlem görmüş ve homojenize edilmiş süte %3-5 oranında aşılanarak *kefir kültürü* olarak kullanılır (75, 129, 146).

Geleneksel kefir yüzyıllardır evlerde yapıp tüketilmektedir. Rusya'da kefir üzerine en eski çalışma Dr.W. Podwysstzki'nin "kefyf" isimli kitabıdır. 1884 yılında Moritz Schulz tarafından tercüme edilmiştir. Bu eserde kefirin tarihi gelişimi, çeşitleri, nitelikleri, başta Kuzey Avrupa ve diğer bölgelere nasıl yayıldığı geniş olarak anlatılmıştır. Çalışmada kefirin ilk defa Kafkasya'da Elbe nehri kıyısındaki yüksek dağ köylerinde üretilmeye başlandığı, yayılmasında ise buralara gelen ziyaretçilerin etkili olduğu belirtilmektedir. Dr. Sipowitz kefirin ilk üretildiği yerin 2500 m yükseklikteki Karatscajeff dağ köyü olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı kefir üretiminin uzun yıllar bu yörede gizlilik içinde sürdürüldüğünü, üretimin bu dağ köylerinde deri tulumu içinde gerçekleştirildiğini belirtmiştir (118).

1. 2. Kefire Ait Genel Özellikler

1.2.1. Mikrobiyolojik Özellikler

1.2.1.1. Kefir Tanesinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Kefir üretiminde fermantasyonu sağlamak için kefir tanelerinden, kefir kültüründen ya da bunlardan üretilen starter kültürlerden faydalanılır. Kefir tanesi genel olarak laktik asit oluşturan mezofilik streptokoklar, aroma oluşturan streptokoklar, mezofilik ve termofilik laktik asit bakterileri, laktozu fermente eden ve edemeyen mayalarla asetik asit bakterilerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahip olduğu, bu mikroorganizmaların sayı ve oranlarının tanenin elde edildiği bölgeye ve üretim prosedürüne göre farklılık gösterdiği belirtilmiştir (55, 90, 109).

Kefir tanesi ağ benzeri lifsi uzantılar ve levhamsı yapıların sıkı birleşiminden ibarettir (16). Tanenin merkezinde mayaları ve bakterileri birlikte bulunduran ağın mayalar tarafından üretildiği, tanenin merkezden uzak bölgelerinin lifsi yapısının daha basit olduğu ve mikroorganizmaların taneden süte geçişini kolaylaştırdığı bildirilmiştir (16). Kefir tanelerinin iç kısımlarında laktozu fermente edebilen mayalar, dış yüzey kısımlarında ise laktozu fermente edemeyen mayalar bulunmuştur. Kefir tanesinde simbiyotik yaşam süren floraya ek olarak kefir viskozitesini ve kıvamını artıran *Acetobacter aceti* ve *Acet. ransens*'ın önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (76).

Bottazi ve Bianchi (16) tane mikroflorası içerisinde mayalar ile laktobasillerin rastgele karışmadıklarını; laktobasillerin dış yüzeyde, mayaların ise tanenin merkez kısımlarında bulunduğunu ve laktobasillerin daha yoğun olduğu bölgelere rastladıklarını rapor etmişlerdir. Bu bölgelerin varlığı Marshall ve ark. tarafından da doğrulanmıştır (81).

Kefir tanelerinin yaklaşık 10^8 kob/g maya ile 10^8 - 10^9 kob/g laktobasil ve laktik streptokok içerir. Genellikle mikrobiyal içeriğin % 65-80'i laktobasillerden (homo ve heterofermantatif, mezofilik ya da termofilik) oluştuğu, geri kalan kısımların ise streptokoklar (~%20) ile mayalardan (~%5) ibaret olduğu rapor edilmiştir (76). Mikrobiyal yapısındaki bu farklılıkların uygulanan üretim tekniklerindeki farklılıklarla ve/veya kefir tanelerinin farklı kaynaklardan alınmış

olmasıyla açıklanabileceği bildirilmiştir (21, 71).

Kefir tanesinde çiğ sütte mevcut pek çok mikroorganizma bulunduğu, ancak patojen bakterilerin ve diğer yabancı mikroorganizmaların tane içerisinde gelişemediği bildirilmiştir (109). Tanelerin içerdiği mikroorganizmaların esas fonksiyonunun laktoz fermantasyonu, laktik asit üretimi ile kefir sütünde patojenik mikroorganizmaların gelişimini engelleyen bakteriositlerin, peroksitlerin ve antibiyotiklerin üretilmesi olduğunu bunun da hastalıkların ya da uzun süren hastalık tedavisinin neden olduğu bağırsak bozukluklarında kefirin bağırsağın normal florası üzerine olumlu etkisi şeklinde yorumlanabileceği öne sürülmüştür (104).

Farklı organizmaların, popülasyon dengesini değiştirmeksizin nitrojen ve büyüme faktörleri açısından zayıf olan bu gibi içecekleri birlikte fermente etme yeteneği şaşırtıcıdır (73). Popülasyonun sabitliğinin nedenleri çok iyi açıklanamamasına rağmen kefir içerisindeki ekolojik dengenin sağlanmasında polisakkaritlerin önemli bir rol oynadığı tahmin edilmektedir (71). Ottogalli ve ark. (95) ile Rosi (112) bu stabiliteyi, laktik asit bakterileri ile mayalar arasındaki simbiyotik ilişkiye dayandırmıştır. Bakteri metabolik ürünleri mayalar tarafından bir enerji kaynağı olarak kullanılırken mayaların bakteriler için gerekli olan vitamin, aminoasit ve büyüme faktörlerini sağladığı bildirilmiştir. Buna rağmen bu hipotezi doğrulayıcı çok az sayıda çalışma yapılmıştır (79).

Rosi ve Rossi (113) kefir tanelerinde, *Lactococcus spp.* ve *Leuconostoc spp.* gibi diğer laktik asit bakterileri ile asetik asit bakterilerinden *Acetobacter spp.* ve *Enterobacteriaceae* üyelerinin bulunabileceğini fakat bunların kefir üretimi sırasında hijyen eksikliğinden ve kontaminasyondan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Buna rağmen diğer bazı araştırmacılar *Lactococcus ssp.* ve *Leuconostoc ssp.* bakterilerinin kefir tanelerinin normal florası olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kefirde kontamine mayalarla doğal mayalarının birbirinden ayırt edilebilmesinin oldukça zor olduğu bildirilmiştir (43, 98, 114).

Bazı kefir örneklerinde enterokokların ve koliform grubu bakterilerin bulunduğunu belirten araştırmacılar bu iki gruptaki mikroorganizmaların normal kefir mikroflorasında bulunmadığını ve çeşitli kaynaklardan kefire bulaşmış olabileceğini belirtmişlerdir (24, 62).

Kefirin doğal florasındaki mikroorganizmalar şu şekilde gruplandırılmıştır (58, 79, 81).

1. Mezofilik homofermantatif laktik streptokoklar (*Streptococcus lactis*, *Strep. lactis ssp. cremoris*)

- *Strep. lactis*: Mezofilik olan bu starterin buttermilk starteri olarak da kullanıldığı, pürivatı ilk olarak laktata, geri kalan pürivatı da diasetile, çok az bir kısmını da asetaldehite çevirdiği bildirilmiştir. Fermantasyonun ilk saatlerinde aktif oldukları ve asitliği geliştirdikleri, fakat yüksek asitlikte inhibe oldukları bildirilmiştir (58, 81).

2. Laktobasiller : Kefir tanesinde çok sayıda laktobasil türüne rastlanmıştır. Mezofilik laktobasillerin 10^2 - 10^3 kob/ml gibi az oranda oldukları ve bu yüzden de ürün kalitesi üzerine önemli bir etkileri olmadığı, obligat heterofermantatif *Lactobacillus brevis* ve *Lact. delbruecki ssp. bulgaricus* ve *Lact. helveticus* ile fakültatif heterofermantatif *Lact. casei ssp. rhamnosus* türlerine daha çok rastlanmadığı bildirilmiştir (79).

- *Lact. brevis*: Heterofermantatif olan bu laktobasilin sütte yavaş gelişmesine rağmen, karışık kültürlerde teşvik edici bir özelliği olduğu pürivat yoluyla CO₂ ve glukoz metabolizmasında asetat ve laktat ürettiği bildirilmiştir. Ayrıca asetoin ve diasetil üretenler sitratı da kullanabilir. Kefir tanesinde bulunan heterofermantatif bir suş olan *Lact. kefir* ile DNA/DNA dizilişleri benzeyiş gösterse de *Lact. brevis* suşlarının farklılığı sonradan tespit edilmiştir (58).

- *Lact. kefir*: Heterofermantatif bir laktobasildir. Kefir tanesinde izole edildiği zaman yalnız arabinoz, riboz ve glutamatı fermente etmektedir. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmaların arabinoz fermantasyonu ve diğer karbonhidratları fermente etme yeteneğinin kaybolmasına yol açan değişiklikleri teşvik ettiği bildirilmiştir. Fermantasyon ürünleri etanol ve CO₂'dir (58, 79).

- *Lact. acidophilus* : Sütteki gelişmesinin yavaş olması nedeniyle, kefirde az miktarda olduğu öne sürülmüştür (58).

3. **Mezofilik heterofermantatif laktik streptokoklar** (*Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* ve *Leuc. mesenteroides ssp. dextranicum*): Kefire özgülü tat ve aromayı verdikleri, bununla beraber ortamda gereğinden fazla gelişmeleri durumunda gaz oluşumu gözlemlendiği belirtilmiştir. *Leuc. dextranicum* suşları yüksek sıcaklık derecelerinde ve çok sayıda mayanın varlığında aktiftirler. *Leuc. mesenteoides* suşları da polisakkarit üretir. *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. cremoris*'e benzer ve bu nedenle buttermilk kültürünü andırır. *Leuc. cremoris*'in asetaldehiti 3 °C'de etanole değiştirebildiği tespit edilmiştir. 5-10 °C'de 1-3 gün süreyle olgunlaştırıldığı zaman kefirde alkol miktarının artmasına yardım ettiği rapor edilmiştir (81).

4. **Mayalar** (*Klyveromyces marxianus ssp. marxianus*, *Torulasporea delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir*): Kefir üretiminde laktozu fermente edemeyen mayaların da mevcut olduğu, glukoz ve galaktoz içeren ortamda sadece galaktozu metabolize edebildiği bildirilmiştir. Maya fermantasyonuyla diasetil oluşması uzun zamandan beri bilinmektedir. Asetaldehitin eklenmesiyle mayalarla asetoin üretimi teşvik edilmektedir. Kefirdeki uçucu maddelerce sağlanan tadın maya fermantasyonu yardımıyla oluşmasının zor olduğu bildirilmiştir. En çok izole edilen mayalar *C. kefir* ve *Sacch. cerevisia*'dır (58). İwasawa ve ark.(46) tarafından Danimarka'da, biri laktozu fermente edebilen ve diğeri ise fermente edemeyen iki maya izole edilmiştir. Bu araştırmacılar tarafından yapılan daha sonraki çalışmalarda laktoz negatif olan *Sacch. exiguus*'un tercihen glukoz varlığında galaktozu hidrolize ettiği rapor edilmiştir. Bu organizmanın glukozu tercihli olarak metabolize eden mikroorganizmalarla karışık kültürlerde üretken bir avantaj sağlayabileceği öne sürülmüştür.

Mayalar diğer mikroorganizmalarla simbiyotik yaşam sürerler. CO₂ oluşumunda, aroma ve yapı gelişiminde rol oynarlar. Fazla maya fermantasyonu sonucunda oluşumu artar, hacim artışı ve dolayısıyla ambalaj sorunları oluşur (79).

5. **Asetik asit bakterileri** : *Acet. aceti* ve *Acet. rasena* tanede simbiyoz yaşarlar. Asetik asit bakterileriyle, streptokoklar beraber kültüre edildiğinde asidifikasyon aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Kıvrım ve viskoziteyi düzenleyici rol oynadıkları rapor edilmiştir (58, 79, 81).

Kefir tanelerinde tanımlanan *Lact. caucasicus* ile ilgili olarak bazı karışıklıklar vardır. Bu bakteri taksonomide yer almamaktadır. Amerikan Tip Kültür Koleksiyonunda (ATCC) bulunan orijinal kültür, farklı laktobasillerin karışımından ibaret bulunmuştur. Kandler ve Kunath (48) tarafından bu organizma yeniden incelenmiş ve *Lact. kefir* olarak adlandırılmıştır. Bu organizmanın ticari ve ev yapımı kefirlerde varlığı saptanmıştır ve La Riviere ve ark. (73) tarafından *Lact. brevis* olarak kabul edilen izolat ile benzerlik gösterdiği, suşun fenotipik karakterlerinin *Lact. brevis* 190'a benzediği bildirilmiştir. Marshall ve ark. (82) bu suşu *Lact. kefir* olarak yeniden tanımlayarak adlandırmışlardır.

Kefir tanesinde yer alan mikroorganizmaların *Strep. lactis*, *Lact. brevis*, *Lact. acidophilus*, *Lact. caucasicus*, *Leuc. kefir*, *Sacch. torulopsis*, *Sacch. carlbergensis*, *Sacch. kefir*, *Candida tenuis*, *Candida pseudotropicalis*, *Torula kefir*, *Acet. rances*, *Sacch. fragilis* gibi çok çeşitli olduğu saptanmıştır (30, 79, 101). Diğer bir araştırmaya göre de tanede bulunan mikroorganizmalar, *Strep. lactis*, *Lact. bulgaricus*, çeşitli tür mayalar, *Strep. cremoris*, *Lact. dextranicum*, *Betabacterium kefir*, *Lact. casei*, *Torulopsis kefir*, *Sacch. fragilis*, *Sacch. cerevisia*, mikoderma tipleri ve asetik asit bakterileridir (5).

Kefir tanelerinin mikrobiyolojik kompozisyonlarının çok değişik olduğu bunlar arasında laktozu fermente eden laktik asit bakterileri ile proteinleri parçalayan proteolitik bakterilerin bulunduğu belirtilmektedir (44). Tanelerin yapısında bulunan mikroorganizmaları belirlemek amacıyla yapılan çalışmaları inceleyen Roissart ve Luquet (109), kefir tanelerinde, dolayısıyla kefirde *Lactococcus lactis ssp. lactis* ve *L. lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. lactis bivar. diacetylactis*, *Lact. brevis*, *Lact. kefir*, *Lact. casei*, *Lact. acidophilus*, *Lact. paracasei ssp. paracasei*, *Lact. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lact. kefiranofaciens*, *Leuc. lactis*, *Leuc. mesenteroides ssp. cremoris*, *Leuc. mesenteroides ssp. mesenteroides*, *Leuc. mesenteroides ssp. dextranicum* ile çeşitli mayaların bulunduğunu bildirmişlerdir.

Temel mikroflorayı laktokok, homofermantatif ve heterofermantatif laktobasil, maya ve asetik asit bakterilerinin oluşturduğu, taneden izole edilen maya türleri arasında *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. delbrueckii*, *Sacch. unisporus* ve *Sacch. lipolytica*, *C. holmii*, *C. kefir* bulunduğu saptanmıştır (4, 30, 81). Tanede bulunan laktik asit bakterilerinden, *Lact. brevis*, *Lact. viridescens*, *Lact. casei*, *Lact. kefir*,

Lact. kefiranofaciens, *Lact. kefirgranum*, *Lact. parakefir*, *Leuc. spp.* ve *L. lactis* türleri identifiye edilmiştir (30, 79, 126, 137). Bakteri ve mayaları bir arada tutan matriksin kuru ağırlığının (g/kg) % 34'ünün protein ve % 47'sinin polisakkarit olduğu bildirilmiştir (95).

Danimarka kefir tanesinden izole edilen mikroorganizmaların %70'i streptokok ssp, %25'i laktobasil ve %5'i mayalardır. Ticari Yunan kefirlerinde *Sacch. italicus*, *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* mayaları izole edilmiştir. Laktobasiller yaklaşık $3,4 \times 10^8$ kob/ml olarak belirlenirken az sayıda *Strep. lactis* ve *Strep. thermophilus* izole edilmiştir (34).

1.2.1.2. Kefirin Mikrobiyolojik Özellikleri

İyi bir kefir elde edilebilmesi için tanede bulunması gerekli mikroorganizmalar 10^8 kob/ml *Strep. lactis*, 10^8 kob/ml *Strep. diasetillactis*, 10^8 kob/ml *Lact. brevis* ve 10^6 kob/ml *Sacch. florentinus* olarak belirtilmektedir. *Strep. lactis* ve *Strep. cremoris* ilaveleri ile kültür aktiviteleri arttırılabilmektedir (7).

Kefir kültürü ya da tanesinin laktik mezofilik streptokoklar, aroma oluşturan streptokoklar, mezofilik ve termofilik laktik asit bakterileri, laktozu fermente eden veya edemeyen mayalarla, asetik asit bakterilerinden meydana geldiği ve kefir tanesinden mikroorganizmaların izolasyonunun oldukça zor olduğu belirtilmiştir (75).

Molska ve ark. (85) kefirde yer alan mikroorganizmalardan basillerin tek, çift ya da zincir, streptokokların çift veya zincir, mayaların ise tek hücre olarak bulunduğunu ve bu mikroorganizmaların ortamda yüzde dağılımlarının % 66.62-69.00 Laktobasil ssp, % 16.11- 22.00 Streptokok ssp, % 18.16- 20.00 maya şeklinde olduğunu rapor etmişlerdir.

Türkiye'de Ergüllü ve Üçüncü (26) tarafından kefir mikroflorası üzerine yapılan bir çalışmada, toplam mikroorganizma sayısı $2,6 \times 10^6$ – 26×10^8 kob/ml bulunurken laktobasil, maya ve streptokokların sayısı çok yüksek çıkmıştır. *Lactobacillus* genusundan *Lact. casei* ve *Lact. brevis* tüm örneklerde saptanmıştır. Bu nedenle kefirde bir yandan asitlik gelişmesinde diğer yandan proteinlerin parçalanmasında *Lact. casei*'nin etkili olduğu *Lact. brevis*'in ise CO₂ oluşumunda katkıda bulunduğu ortaya konmuştur.

Tane mikroflorasının kefirde farklı olduğu bulunmuştur (81). Tablo 1'de çeşitli araştırma sonuçlarına göre kefir tanesi ile kefirde belirlenen mikroflora popülasyonuna ait değerler verilmiştir.

Tablo 1. Kefir ve kefir tanelerinin mikroflorası

Mikroflora	Kefir Tanesi (kob/g)	Kaynak	Kefir İçeceği (kob/ml)	Kaynak
LAKTOBASİL	10^8	101	10^5	58
	10^8-10^9	76	$8,3 \cdot 10^9$	66
	$1,4 \cdot 10^8$	1	10^2-10^3	64
	$1,6 \cdot 10^7$	30	10^7-10^8	64
	$2,2 \cdot 10^8$	81	$1,2 \cdot 10^7$	1
	$2,0 \cdot 10^9$	81		
<i>Lact. kefir</i>	10^9	65,48,82	10^6-10^8	65,48,82
<i>Lact. brevis</i>	10^6	73,113,72	10^6	73,113,72
<i>Lact. acidophilus</i>	10^8	65	-	65
<i>Lact. casei</i>	-	85	-	85
STREPTOKOK	10^4	101	10^8	58
	10^8-10^9	76	$3,6 \cdot 10^{11}$	66
	$1,3 \cdot 10^7$	1	10^8-10^{10}	64
	$1,6 \cdot 10^7$	30	10^9	64
	10^2	81	$1 \cdot 10^7$	1
<i>Strep. durans</i>	-	113	10^6	113
<i>Strep. lactis</i>	-	65	10^9	65
LÖYKONOSTOK				
<i>Leuc. mesenteriodes</i>	10^6	113	10^6	113
	10^5		10^5	
ASETİK ASİT BAKTERİLERİ	10^2	112	10^5-10^6	58
	10^8	111	$2,5 \cdot 10^2-10^4$	59
			$7,6 \cdot 10^2-2 \cdot 10^4$	41
			10^3	112
		10^6	111	
MAYALAR	10^2-10^8	16	10^5	58
	10^6	101	$6,4 \cdot 10^6$	66
	10^6	113	$3 \cdot 10^5$	64
	10^8	76	10^4-10^5	64
	$2,5 \cdot 10^8$	1	10^9	113
	$4,2 \cdot 10^8$	30	$2,0 \cdot 10^7$	1
	$1,5 \cdot 10^4$	81	$7,3-1,4 \cdot 10^6$	41
	$2,2 \cdot 10^3$	81		
<i>Sacch. cerevisia</i>	10^6	73,112	10^5	73,112
<i>Sacch. delbrueckii</i>	10^6	73,112	10^5	73,112
<i>Sacch. exiguus</i>	-	46	-	46
<i>C. kefir</i>	10^8	62,65,48	10^6	62,65,48
<i>C. pseudotropicalis</i>	-	41	-	41

Streptokoklar kefir tanelerinde bulunmuş fakat kefir ieeğinde izole edilememiştir (65, 81, 112). Bu duruma depolama sırasında maya populasyonunun azalmasının neden olabileceği belirtilmiştir (81). Mikrobiyal kompozisyondaki farklılıklara; üretim sırasında hijyene dikkat edilmemesi, tanenin maya ve küflerle kontamine olması, üretim sırasında farklı tekniklerin uygulanması ve/veya farklı kökenli kefir tanelerinin kullanılmasının etkili olduğu, bununla beraber genel bir kanı olarak, tanede bulunan laktobasiller ve mayalar arasında istikrarlı bir ilişkinin varlığı bildirilmiştir (81).

Büyük çabalara rağmen, orjinal tanelerin mikroflorasında bulunan mikroorganizma kültürlerinin karışımından kefir tanesi yapımının henüz başaramadığı belirtilmiştir (76).

Kefir tanesinde yer alan mikroorganizmaların çevresel mikroorganizmalar ile kontamine olmalarının bu mikroorganizmaların fonksiyonunu engelleyemeyeceği öne sürülmüştür. Bununla birlikte kefir tanesi ve kefirde bir çok hatanın meydana gelmesinin ana nedeninin kültür üretimi ve ürün elde edilmesi sırasında mikrofloranın ortama hakim olamamasından kaynaklandığı ve kefir mikroflorasının çok karmaşık olması nedeni ile bu tür yabancı mikrofloranın belirlenmesinin oldukça güç olduğu belirtilmiştir (144). En önemli kontamine mikroorganizmalar şu şekilde sıralanmıştır

Koliform Grubu Bakteriler: Koliform grubu bakterilerin kefir tanesine ana kültür, işletme kültürü ve kefir üretiminde hijyene dikkat edilmediğinde bulaşabileceği ve ürünlerdeki gaz kabarcıklarının çoğu zaman koliform bakterilerin bir işareti olmayıp, şekeri parçalayan mayalardan ileri gelebileceği belirtilmiştir (144).

Kahm Mayaları : Kahm mayalarının (*Candida ssp.*) oğalmalarının, düşük ısı derecesinde uzun süre fermantasyon sonucu söz konusu olabileceği, kefirin üst kısmında sarı-beyaz, kremi bir tabaka oluşturarak ürün de hoş olmayan kuvvetli bir maya aroması algılanmasma neden olacağı belirtilmiştir (144).

***Geotrichum candidum* :** Kahm mayaları ile aynı koşullarda çoğalırlar. Kefirin üst kısımlarda beyaz renkte bir küf tabakasına neden oldukları ve kefirin penicillum, mucor gibi küf cinsleri ile nadiren kontamine olduğu öne sürülmüştür (144).

Sirke Asidi Bakterileri (*Acetobacter spp.*) : Normal kefir florası içinde yer almakla birlikte, düşük ısı derecelerinde çoğalarak, kefirin ekşi bir tat oluşumuna neden olduklarında sirke asidi bakterilerinin yabancı mikroflora olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir (144).

1.2.2. Fiziksel Özellikler

Taneler, küçük düzensiz şekilde, sarımsı-beyaz, karnabahar çiçeğinin minyatür bir şekline benzeyen yarı sert granüller olup pürüzlü ve kıvrımlı yüzeyleri, düzensiz formları, esnek yapıları ve asidik tatları ile karakterizedirler (17).

Kefir tanelerinin mayalanmış süttten bir sonraki kefir yapımında kullanılmak için geri kazanılması gerekmektedir. Taneler süttten geri kazanıldığında ve suyla yıkandığında değişen büyüklükte dirler (0.5-3.5 cm çapında). Taneler dayanıklı ve esnek olup koparıldığında elastikiyet gösterirler ve özel bir kokuya sahiptirler. Morfolojileri üzerine yapılan son çalışmalar ince tabaka formlarından ve kendi üzerine kıvrılmış formlardan globüler loblu yapılara kadar değişen farklı formlar gösterdiklerini ortaya koymuştur (79).



Resim 1. Kefir taneleri (Bu araştırmada kullanıldı)

1.2.3. Kimyasal Özellikler

1.2.3.1 Kefir Tanesinin Kimyasal Özellikleri

Yapılan çalışmalar kefir tanelerinin başlıca çözünmeyen tipte proteinlerle muko-polisakkaritler içeren bir protein çeşidi ve bazı polisakkarit ve lipit kompleksinden oluştuğunu ortaya koymuştur (23). Kefir tanesinin esasını oluşturan bu yapıya "Kefiran" denildiği ve tanenin yaklaşık %24'ünü oluşturduğu bildirilmiştir (62, 94).

Kefir üretiminde sütü fermente eden kefir tanesinin; süt proteini, maya ve bakterilerle süt yağının bir bileşiği olduğu, taze kefirin kurutulmuş parçasının %10-16'lık miktarının yaklaşık %30'unun protein ve yaklaşık % 25-50'sinin karbonhidrattan oluştuğu belirtilmiştir. Tanenin kütesinin, mikrobiyal hücreleri, otoliz ürünleri ile süt proteinleri ve karbonhidratların parçalanması sonucu meydana gelen ürünlerden oluştuğu bildirilmiştir (76). Kefir uzun süredir tüketildiği için bu polisakkarit güvenli olarak düşünülür (123)

Bakterilerin üremesi genellikle ekolojik ve fizyolojik fonksiyonlarıyla ilgili ekzopolisakkaritlerin üretimiyle beraber gerçekleşir. Gıda ve ilaç üretimindeki kullanım potansiyelleri nedeniyle bir çok çalışma yapılmaktadır.

Büyük miktarlarda kefir üretiminde tanelerin geri kazanılması zor ve pahalıdır. Bu nedenle bu büyük miktarda kefir üretimi için gerekli olan basit ve ucuz yöntemler üzerinde araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bir çok çalışmada kültürlerde ekzopolisakkarit üreten, kapsül oluşturan laktik asit bakterilerinin izolasyonuna yönelinmiştir. Çeşitli izolatlar rapor edilmiş ve bunlar *Lact. kefir* (48), *Lact. kefiranofaciens* (28), *Lactobacillus ssp. KPB_167B* (149), *Lact. kefirgranum* ve *Lact. parakefir* (126) olarak tarif edilmiştir. Kefirdeki bakteri türleri arasındaki kompleks taksonomik ilişkinin tam olarak araştırılmadığı düşünülmektedir. (4,108,114). Kefir tanelerinden ve *Lactobacillus* türlerinden ekstrakte edilen Kefiranın kimyasal yapısı Kooiman (57) ile Mukai ve ark. (87, 88) tarafından gösterilmiştir. Tarif edilen bu kimyasal yapı bir ya da iki şeker molekülünün rastgele bağlandığı penta sakkarit ünitelerinden oluşan tekrar edilmiş hekza veya hepta ünitelerdir (57, 87, 88).

Kefiranın, homofermantatif *Lact. kefir* (73, 150), *atipik streptobakterium* (113), *Lact. kefiranofaciens* (28, 136), ve laktik asit bakterilerinden henüz kesin olarak isimlendirilmemiş olan *KPB-16B* (149) suşu gibi kapsüllü bakterilerin metabolik faaliyetleri sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Kefiran yaklaşık olarak eşit oranlarda galaktoz ve glukoz kalıntılarından meydana geldiği bildirilmiştir (57). Reolojik çalışmalar, kefiranın tek başına solüsyonlarda çok düşük viskoziteye sahip olduğunu ve etanol yokluğunda katı jel oluşturamadığını göstermiştir (88, 89). Kefiranın yapısal ve hidrodinamik özellikleri gıdaların koyulaştırılması veya jelleştirilmesi için ticari alanda kullanımında bazı sınırlamalar getirirse de gıda katkı maddesi olarak kullanımının yararlı olacağı düşünülmektedir (101).

1.2.3.2 Kefirin Kimyasal Özellikleri

Tipik bir kefirin duyuusal özelliklerinin, acıya kaçmayan ve hoşça giden ekşi bir tat, hafif bir maya aroması, yumuşak bir yapı ve içerdiği CO₂ nedeniyle hafif köpüklü bir görünümle birlikte ferahlatıcı ve serinletici niteliklerden oluştuğu rapor edilmiştir (52).

Kefire özgü tadın, laktik asit, etanol, CO₂, asetaldehit ve aseton gibi aroma ürünlerinin ve simbiyotik bakteri ile maya türlerinin metabolik aktivitelerinin bir sonucu olduğu belirtilmiştir (143). Koroleva (59)'ya göre laktik asit bakterileri mayaların aktivitelerini teşvik eden laktik asidi kendi metabolizmaları sonucu üretirler.

Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran özellik, laktik asit ve alkol fermentasyonlarının birlikte yürümesidir. Laktik asit fermentasyonu yüksek sıcaklıkta alkol fermentasyonu ise düşük sıcaklıkta meydana gelir. Sıcaklığa bağlı olarak değişen alkol içeriği nedeniyle kefir kimi zaman bir süt içkisi, kimi zaman da ekşimiş süt ürünü olarak isimlendirilmektedir. Alkol ve CO₂ ile kefirde hoşça giden aroma ve keskin tat oluşumunun büyük ölçüde kefirin olgunlaşma döneminde gerçekleştiği belirtilmiştir (144). Kefir üretiminde alkol ve CO₂ miktarı, ürünün olgunluğuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Fermentasyonun farklı sıcaklık derecelerinde değişik seyrettiği, 5-15 °C'de daha çok CO₂ oluştuğu, buna karşın laktik asit oluşumunun oldukça yavaş geliştiği, 16-22 °C'de ise daha çok laktik asit meydana geldiği belirtilmiştir. Bu nedenle sabit bir sıcaklık seçimi yerine önce 16-22

°C'de asitlik gelişmesinin sağlanması, daha sonra 5-10 °C'de CO₂ oluşumunun gerçekleştirilmesi, dolayısıyla fermantasyonun kademeli uygulanması önerilmektedir (91).

Kefir tanelerinin modern üretimi her gün için canlı tanelerden % 3-5'lik bir kısmın sürekli şekilde süte inoküle edilmesi ve büyüüp gelişen tanelerin geri kazanılmasına dayanmaktadır. Hazır haldeki kefir içeceği, krema kıvamında ve ekşi, hafif köpüklü tadı ile karakterize edilmekte, kefirin özünü oluşturan diasetilin ve esas aromanın, sitrati kullanan *Strep. lactis ssp diacetylactis* ve *Leuconostoc ssp.* tarafından üretildiği ve kefirin süttten daha fazla vitamin B1, B2 ve folik asit içerdiği belirtilmiştir. Kefirin kimyasal kompozisyonu sütün çeşidi, tanenin tipi ve kullanılan teknolojinin çeşidi gibi birçok faktöre bağlıdır (76).

İyi bir kefirin aşağıdaki özelliklere sahip olması gerektiği rapor edilmiştir (44);

1. Ürünün asitliği 36-40 SH olmalıdır.
2. Akıcı kıvamda, homojen ve parlak görünümde, içildiğinde hafif maya tat ve aroması hissedilmeli ve serinletici bir nitelikte olmalıdır. Kefire özgü hafif acımsı tat hissedilmelidir.
3. % 0.6-0.9 laktik asit, % 0.8 alkol ve hacimce % 0.2 CO₂ içermelidir.
4. Cam şişelerde 3-4 °C'de 8-10 gün süreyle dayanabilmelidir.

Kefir asitlik, kıvam, tat ve koku bakımından değişkendir. İyi bir kefir ferahlık verici, hafif asidik tatta, tereyağmsı kokuda, su salmayan iyi bir kıvamda olmalı ve CO₂ içeriğinden dolayı hafif köpürmelidir. Ortalama %1.5 yağ içeren bir kefirin % 0.72 alkol, % 0.72 laktik asit ve yaklaşık 0.5 mg/ml diasetil içerdiği rapor edilmiştir (63). Ürün değişik yollarla olgunlaştırıldığından geleneksel bir kefirin tat ve kokusunu sağlamak zor olabilmektedir. 24 saat depolanmış zayıf kefirin % 0.67 asit içerirken, 48 saat depolanmış kefirin % 0.78 asite sahip olduğu, 48-56 saat depolanmış kuvvetli ve olgun kefirin ise %2 laktik asit içerdiği belirtilmiştir. Kefirin depolama sıcaklığının flora metabolitleri ile tat ve kokusu üzerine etkisi vardır. 18-20 °C'de, asitlik artarken CO₂ ve alkol oranının düştüğü, 2-4 °C'de laktik asit ve aroma bakterileri azalırken maya ve asetik asit bakteri sayısının arttığı öne sürülmüştür. Kefirde mayaların artması aynı zamanda istenmeyen bir kokunun oluşmasına da neden olur (61). Kefir kültürü ile *Propionibacterium shermanii*'nin

simbiyoz çalışması sonucu kefirin, başta B₁₂ vitamini olmak üzere diğer vitaminlerce zenginleştiği bildirilmiştir (87).

Kefir bileşiminde yer alan maddeler esas itibariyle yapıldığı sütün özelliklerine bağlıdır. Ayrıca bileşimi, tadı ve aroması üzerine sütün mayalama sıcaklığı ve bekleme süresi etkili olabilmektedir (152).

Kefirde asetaldehitin diasetile oranının 3:1 olduğunda en uygun lezzet dengesinin sağlandığı rapor edilmiştir (128). Tablo 2'de ticari kefir ile Laboratuvar şartlarında yapılan kefir arasında kimyasal özellikler karşılaştırılmıştır (91).

Tablo 2. Ticari kefir ile laboratuvarda üretilen kefirlerin kimyasal kompozisyonu (91).

Bileşimi	Ticari kefir (%)			Laboratuvar Yapılan kefir(%)		
	1.örnek	2.örnek	3.örnek	2 günlük	4 günlük	6 günlük
Alkol	0,70	0,60	0,80	0,23	0,81	1,10
Laktik asit	0,81	0,61	0,76	0,66	0,83	0,90
Laktoz	2,78	2,90	2,37	3,70	2,24	1,67
Kazein	2,98	2,74	2,99	2,57	2,59	2,56
Albumin	0,28	0,17	0,10	0,42	0,40	0,39
Peptonlar	0,05	0,07	0,08	0,07	0,09	0,12
Yağ	3,35	3,10	2,81	3,62	3,63	3,63
Kül	0,79	0,65	0,68	0,64	0,62	0,63
Su	88,26	89,10	89,41	88,09	88,79	89,00

Kefir yapımı isteğe bağlı olarak çeşitlilik gösterdiğinden tath, orta sert, sert ve çok sert kefir olarak fermantasyon süresi uzatılarak tüketime sunulabilmektedir. Bunların bileşimi Tablo 3'de gösterildiği gibidir (151).

Tablo 3. Farklı aromatik nitelikteki kefirlerin kimyasal bileşimi (151).

Bileşimi (%)	Tath Sert Kefir	Orta Sert Kefir	Sert Kefir	Çok Sert Kefir
Su	88,2	88,9	89,4	89,0
Laktik asit	0,8	0,6	0,7	0,9
Etil Alkol	0,6	0,7	0,8	1,1
Laktoz	2,7	2,9	2,3	1,7
Kazein	2,9	2,7	2,9	2,5
Laktalbumin	0,3	0,2	0,1	0,1
Yağ	3,3	3,1	2,8	3,3
Mineral maddeler	0,8	0,6	0,7	0,6

Kefirde kuru madde miktarı kullanılan sütün kuru maddesine bağı olarak değişmektedir. Araştırmalarda kefir yağ oranlarına göre de sınıflandırılmıştır. Yağsız kefir; en az % 0.3 yağ, yarım yağlı kefir; % 1.5 -1.8 yağ, yağlı kefir; en az % 3.5 yağ, krema kefiri; en az % 10 yağlıdır. Piyasalarda % 3.5 yağlı veya az yağlı kefir bulunmaktadır (56).

En önemli kimyasal değişiklikler fermantasyon sırasında olmaktadır. Bu sırada CO₂'de artış gözlendiği, etanol miktarının yavaş geliştiği, sitrik asit miktarının, diasetil ve asetona dönüşme sonucu büyük ölçüde azaldığı ve kimyasal özelliklerdeki değişimin kullanılan tanenin veya kültürün aktivitesine büyük ölçüde bağlı olduğu belirtilmiştir (33).

Fermantasyonda oluşan CO₂ fermantasyonun ağzı kapalı bir kaptta yürütülmesi durumunda ürünün kprmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kefir alkollü ve köpürme özelliğine sahip bir süt içeceği olarak da değerlendirilir. Kefirin yapısında bulunan laktik asit, okzalik asit ve α - ketoglutarik asidin kefire ekşimsi ve ferahlatıcı bir lezzet kazandırdığı, kefirin tipik aromasının oluşmasında uçucu yağ asitleri, alkoller ve karbonil bileşikler ile kefirin olgunlaşma döneminde oluşan diasetil, propiyon aldehit, asetaldehit, n-propanol ve izoamil alkolün önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Bu nedenle kefirin kimyasal özellikleri (asitlik, laktoz, yağ, protein oranları, serbest yağ asitleri miktarı, alkol gelişimi, uçucu bileşikler) kefirin duyuusal özelliklerine direk etki etmektedir (44, 51, 132, 138).

Tüm kefirlerde fermantasyon sırasında oluşan olayların aynı olduğu ve bu olayların şöyle özetlenebileceği belirtilmiştir (56, 83).

1. Laktozdan laktik asit oluşumu (laktik fermantasyon)
2. Laktozdan etil alkol ve CO₂ oluşumu (alkol fermantasyonu)
3. Kefire özgü tipik maya aroması oluşumu
4. Sınırlı ölçüde proteinin pepton ve aminoasitlere parçalanması (yavaş proteoliz)

Kefir tanesi veya kefir kültürünün süte aşılanması ile içerikteki mikroorganizmalar sütteki besin maddelerini farklı düzeyde fermente ederek parçalarlar. Homo ve heterofermantatif olan laktik asit bakterileri laktozu laktik asit ve diğer organik asitlere, aroma maddelerine ve CO₂'e dönüştürürken biyolojik açıdan önemli antibakteriyel maddeler oluştururlar. Laktik asit bakterileri ve

mayaların salgıladıkları proteolitik enzimler sayesinde süt proteinlerini peptid ve amino asitlere kadar parçaladıkları, ayrıca sınırlı da olsa bu salgıladıkları lipolitik enzimlerin süt yağını hidrolize ederek ortamda serbest yağ asitlerinin artmasına neden oldukları belirtilmiştir. Kefirin üretimi sırasında başlayan bu biyokimyasal olayların muhafazası sırasında da devam ettiği, bir taraftan kefire has tat, aroma, görünüş gibi özellikler gelişirken, diğer taraftan sindirilme oranı yükselerek beslenme değeri arttığı ve böylece sağlık açısından süte göre çok daha yararlı bir içecek elde edildiği bildirilmiştir (54).

Yapılan bir çalışmada (51), üretilen kefirlerde depolama boyunca örneklerin pH'ları düşmüş, asitlikleri yükselmiştir. Kuru madde değerleri düşüş göstermiştir. Kefir tanesi ile üretilen kefirlerin kuru maddelerinde üretim sırasında kayıp, kültür ile üretilenlere göre daha fazla bulunmuştur. Üretim aşamasında yağ, protein ve laktoz miktarları azalma göstermiştir. Depolama sırasında yağ miktarı değişmezken protein ve laktoz miktarında az da olsa azalma meydana gelmiştir. Serbest yağ asitleri gerek üretim, gerekse depolama sırasında artış göstermiştir. Maya miktarı tüm kefir örneklerinde depolama boyunca $7,1 \times 10^4$ - $5,7 \times 10^5$ kob/ml arasında değişmiştir, depolama süresince bu değerde azalma gözlenmiştir. Oluşan alkol, asetaldehit ve aseton depolama sırasında artış göstermiştir. Alkol miktarı 41 ppm ile 48 ppm arasında değişmiştir. Tane ile üretilen kefirlerde alkol oranı daha yüksek bulunurken, kültür ile üretilenlerden daha düşük bulunmuştur. Aynı durum asetaldehit ve aseton için de geçerlidir. Viskozite depolama boyunca artmış, tane ile üretilenlerde kültür ile üretilenlere göre daha düşük bulunmuştur.

Kefir tanelerinde veya kefir kültüründe bulunan mayalar inkübasyon sırasında sütte bazı değişikliklere neden oldukları belirtilmiştir (146);

Laktozdaki değişiklikler: Homofermantatif laktik asit bakterilerinin salgıladıkları laktaz (β - galaktosidaz) enzimi ile laktozu önce glukoz ve galaktoza parçaladıkları, sonra bir molekül laktozdan dört molekül laktik asit oluşturdukları, heterofermantatif bakterilerden lökonostokların ise çıkardıkları enzimlerle laktozu önce glukoz ve galaktoza parçaladıkları; sonra glukoz ve galaktozdan laktik asit, CO_2 ile aroma maddeleri olan asetoin, diasetil ve aseton meydana getirdikleri belirtilmiştir. Mayaların ise çıkardıkları enzimlerle laktozu glukoz ve galaktoza

parçalayarak bir molekül glukoz ve galaktozdan iki molekül etil alkol ve iki molekül CO₂ oluşturdukları belirtilmiştir.

Proteindeki değişiklikler: Bazı laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalar salgıladıkları proteolitik enzimlerle proteinleri pepton, peptid ve serbest amino asitlere kadar parçaladıkları ve kefirde serbest amino asit miktarının çok fazla olduğu belirtilmiştir.

Süt yağındaki değişiklikler: Mikroorganizmaların oluşturduğu lipaz enzimi süt yağını parçalayarak kefirde serbest yağ asitleri miktarının artmasına neden olduğu saptanmıştır. Sütte bulunan laktoz, protein ve yağdaki değişimler sırasında çeşitli aroma maddeleri ile patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etki gösteren asetik asit, H₂O₂ gibi maddeler ile nisin benzeri antibiyotiklerin oluştuğu rapor edilmiştir. Asetik asit bakterileri proteinleri parçalar. Bu değişimlerin kefirin muhafazası sırasında da devam ettiği, böylece kefirin kendine özgü tat, aroma, görünüş ve özelliklerinin oluştuğu bildirilmiştir.

1.3. Kefirin Sağlık Üzerindeki Etkileri

Süt mamulleri içerisinde peynir ve tereyağı üretiminde yapım tekniği gereğince sütün önemli öğelerinden bir kısmı örneğin laktoz, yağ, protein ile bazı mineral maddeler peynir suyu ve yayık altına geçtiği halde kefir yapımında böyle bir kayıp olmamaktadır. Kefirin sütteki tüm besin maddelerini içerdiği için kefirin besleme değeri yoğurt gibi çok yüksektir. Sütün bileşimine bağlı olarak kolay sindirilebilen protein ve yağca zengin olduğu, laktozun fermantasyonda bir miktar azalması ile tüketicinin bilinçli diyet ve düşük kalori alma isteğini karşılama konusunda büyük bir potansiyele sahip olduğu, ayrıca ortaya çıkan bu yeni maddelerin serinletici, iştah açıcı, sevilen bir tat ve aromaya sahip olan bu süt mamulünün karakteristik özelliklerini oluşturduğu bildirilmiştir (52, 121).

Sütten yapılan bir ürün olması ve tüketim sırasında en az 10⁸ kob/ml mikroorganizma içermesi nedeniyle kefir fonksiyonel bir ürün olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda probiyotik bir üründür. Bir çok ülkede kefir yapımının artmasıyla beraber son on yıl içinde tedavi edici ve besleyici özelliğinin olduğu ileri sürülmüş; bu da kefire olan ilginin gün geçtikçe artmasına neden olmuştur (54).

Sindiriminin kolay, proteince zengin olması nedeniyle kefir, hastalar ve çocuklar için uygun bir besindir. Hatta 20-30 günlük bebeklere bile günde 1-2 kaşık içirilmesi önerilmektedir. Endüstriyel kefir üretiminde L (+) laktik asidin ortama hakim olması özellikle anne sütü ile beslenen çocukların beslenmesinde önem taşımaktadır (147).

1.3.1. Yüksek Tansiyon Üzerine Etkisi: Kefir bakterilerinin sütün fermantasyonu sırasında kazein üzerindeki proteolitik aktiviteleri sonucu oluşturdukları biyoaktif peptidlerin duyarlı insanlarda yüksek tansiyonu baskılayabileceği ileri sürülmüştür (76).

1.3.2. Kolesterol Üzerine Etkisi: Bazı kan lipitleri düzeyinin artması kalp-damar hastalıkları için risk faktörü olarak önemlidir. Kefirin serum kolesterol üzerine azaltıcı etkisinin nasıl oluştuğu tam olarak bilinmemekle birlikte *Lact. acidophilus*'un kolesterol molekülünü asimile edebilme özelliği olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca kefirdeki düşük pH'ya bağlı olarak kolesterolün presipitasyonu sonucu da kolesterol seviyesinin düşebileceği bildirilmiştir (3, 127).

Laktobasillerin enzimatik olarak safra asitlerini dekonjuge ederek onların vücuttan atılımlarını hızlandırmalarıyla safra asitlerinin yapımı için gerekli olan kolesterolün harcanması sonucu serum kolesterol düzeyinin azalabileceği ileri sürülmüştür (18).

1.3.3. Kanser Üzerine Etkisi: Probiyotik bir ürün olan kefirin kanserden özellikle kolon kanserinden konakçıyı korumaları ile ilgili çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Konakçının immun yanıtını arttırarak, yarışma kolonizasyonu veya inhibitör maddeler ile kısa zincirli yağ asitleri ve bakteriosinler üreterek, antimutajenik ajanlar üreterek, safra tuzlarının ikincil safra tuzlarına dönüşümünü engelleyerek etki ettikleri belirtilmektedir (42).

1.3.4. Toksin Reseptörlerinin Yıkınlanması : Probiyotik bakterilerin bazı bakteri toksinlerini nötralize etmeye elverişli metabolitleri üretme kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir (103).

1.3.5. İmmun Sistemin Uyarılması : *Lact. acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* gibi probiyotiklerin immun sistemin bazı fonksiyonlarını etkiledikleri

bildirilmiştir. Bu etkiler salgısal yanıt, hücrel ve spesifik olmayan immün yanıt şeklinde gruplandırılabilir (40, 110).

1.3.6. Anemi Üzerine Etkisi : Sovyetler Birliği'nde 4-6 yaş arasındaki 101 çocuk üzerinde yapılan bir araştırmada çocukların kanlarındaki hemoglobin miktarı, kefir ile beslenmeden önce 11 mg/100 ml iken bir ay sonra bu değerin arttığı rapor edilmiştir. Araştırma sonunda anemili çocukların kefir ile beslenmesi önerilmiştir (12).

1.3.7. Sindirim Sistemi Üzerine Etkisi : Kefir mikroflorasındaki bakterilerin bağırsak mikroorganizmalarına karşı yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ve kefirine sindirimi kolaylaştırmasında etkili olan faktörlerin arasında Kalsiyum tuzları ve CO₂'nin varlığı ile ürün salgısının sıvılaşması ve bu yolla idrarın artırılması olduğu belirtilmiştir (58).

Hayvanlarda ve insanlarda yapılan araştırmalarda *Lact. acidophilus* ve *Lact. bulgaricus* içeren fermente süt ürünlerinin tüketilmesiyle midedeki koliform grubu organizmaların sayısında düşme, laktobasillerde ise artma görüldüğü rapor edilmektedir. Bu raporlarda tüm fermente süt mamulleri gibi sürekli kefir tüketilmesinin bağırsak florasını düzelttiği ve buna bağlı olarak bazı bağırsak rahatsızlıklarını iyileştirdiği açıklanmıştır (105, 147).

Asiditesi nötrale edilmiş kefirle tedavi edilen mide ve duodenum ülserlerinde olumlu sonuçlar alındığı ve midede asitliğin düştüğü, ağrı ve sindirim rahatsızlıklarının azaldığı belirtilmiştir (83).

Hafif asidik kefir ve onun karakteristik mikroflorasının, tükürük, mide ve pankreas salgısını kolaylaştırdığı ve bağırsak hareketlerini düzenlediği bildirilmiştir. Kefirin bağırsakta gıdaların hareket etmesini ve laktik asit, asetik asit ve antibiyotik benzeri maddelerle de ince bağırsak faaliyetlerini kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (76).

Probiyotik bakterilerin bağırsak epitel yüzeyindeki bakterilerin yapışma alanlarına tutunma özelliklerinden dolayı yüzeyin dominant mikroflorasını oluşturdukları ve patojenlerin veya diğer bakterilerin üremelerini sınırlandırdıkları bildirilmiştir (110, 135).

1.3.8. Kefirin Antibakteriyel ve Antifungal Etkisi: Araştırmalar kefirin antitümoral aktivitesi, immünostümulan etkisi ile hem antibakteriyel hem de antifungal aktivitesini ispat etmiştir. Laktik asit bakterilerinden çok metabolik ürünlerin saprofit ve patojenik bakterilerin üremeleri üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (117). Bu etki, mevcut besinler için rekabet ve inhibitör metabolitlerin üretimi (H_2O_2 , organik asitler, diasetil ve bakteriosinler), gibi farklı mekanizmaları içerdiği ve çoğu durumda, bu faktörlerin birleşmesinin, inhibisyonu güçlendirebileceği bildirilmiştir. Ryan ve ark. (115) incelenen çoğu Gram pozitif bakterilerin, bazı laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriosine karşı duyarlı olduğunu fakat *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde etkili olmadığını göstermiştir.

Kefirin çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi olduğu ve kefirde oluşan asetik asit, H_2O_2 gibi maddeler ile antibiyotikler *E. coli* ve salmonella gibi bazı patojen bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda kefirin Gram pozitif koklar, stafilokoklar ve Gram pozitif basiller üzerine etkili olduğu ayrıca *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. crusei*, *C. albicans klaur*, *Sacch. cerevisiae*, *Rhodotula*, *Torulopsis glabrata*, *Microsporium nanum* ve *Trichopyton mentagrophytes*, *Trichopyton rubrum*'a karşı antifungal etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. İnvivo ve invitro olarak yapılan çeşitli çalışmalarda kefir ve tanelerinin antitümöröl, hipokolestemik ve immunomodüatör edici etkisi bulunduğu da bildirilmektedir (64, 127, 148).

1.3.9. Laktoz İntolerans Üzerine Etkisi: Kefir oluşumu sırasında mikroorganizmaların sütteki proteinleri pepton, peptid hatta amino asitlere; laktozu da laktik asit ve alkole kadar parçaladıklarından laktoz miktarının süte oranla daha düşük olması nedeniyle laktoza karşı duyarlılığı olan kişilerce daha kolay sindirildiği ve kefirde fermentasyon sonucu oluşan laktik asidin % 90 dan fazlasının L(+) laktik asit olduğu bildirilmiştir. Fermente süt ürünlerinde L(+) laktik aside özel bir önem verilmektedir. Laktik asidin izomer formundan sadece L(+) laktik asit insan metabolizmasının intermedier ürünü olarak oluştuğu ve daha sonra CO_2 ve H_2O 'ya parçalanarak enerji kaynağı olarak ve kısmen de glikojen yapımında yeniden kullanıldığı, böylece insan organizmasında kalıntısız ve hızlı bir şekilde parçalandığı

belirtilmektedir. Kefirde bulunan laktik asit içeriği % 0.6- 1 kadardır (2, 17, 19, 29, 52, 121).

Çeşitli hastalıkların iyileştirilmesinde hastalık süresince günde 1 litre kadar kefir alınması gerektiği, hatta bunun 6 aydan 1 seneye kadar devam edebileceği bildirilmektedir. Bu miktarın bir defa da değil, 2-3 içimde alınabileceği, ülser gibi mide rahatsızlıkları için, içilecek kefirin ekşi değil taze olması gerektiği belirtilmiştir (147).

Kefirin yüksek düzeyde besleyici, biyolojik ve diyetetik değere sahip olduğu gastrointestinal ve metabolik hastalıklar, hipertansiyon, kalp hastalığı ve alerjik hastaların yanı sıra sağlıklı insanlar için de tavsiye edildiği belirtilmiştir (76).

Ülkemizde süt içme alışkanlığının yaygın olmadığı dikkate alınırsa, fermente süt ürünleri tüketiminin önemi bir kat daha artmaktadır. Düzenli tüketildiğinde iyileşmeyi teşvik ettiği ve ağırlık artışı sağladığına da dikkat çekilmiştir (120). Ayrıca sinirsel rahatsızlık, iştahsızlık ve uykusuzluğa karşı doğal bir ilaç olduğu bildirilmiştir (147).

1.4. Kefir Üretim Teknikleri

Kefirin tarihsel kaynağı Kafkas dağlarında koyun veya keçi sütünün mezofilik şartlarda hayvan derisinden yapılan çantalarda, kilden yapılmış çömleklerde, deri torbalarda veya tahta kaplarda kefir taneleri ile fermantasyona bırakılmasıyla başlamıştır. Oluşan kefir alınıp yerine taze süt ilave edilerek bu işlem devam ettirilmiştir. Torbalara konan taze süt ve kefir taneleri gün boyu evin giriş kapısına asılarak buradan eve giriş-çıkış yapıldıkça deri torbanın çalkalanması sağlanarak asitliği yüksek, içilebilir kıvamda, köpüklü hafif alkollü kefirin üretildiği bildirilmiştir (108). Kefire işlenecek sütlerde fermantasyon, fiçı ya da tulumun iç yüzeyinde dağılmış olan jelatinimsi yapıda ve suda erimez özellikte, irili ufaklı, pişmiş pirince veya karnabahar çiçeklerine benzeyen beyazımsı sarı tanelerle başlatılmıştır (94).

Kaliteli bir kefir üretimi, kullanılan süte, uygulanan pastörizasyon ve homojenizasyon normuna, kültürün niteliğine, aşılama miktarına, inkübasyon süre ve sıcaklığına, ambalajlama ve muhafazaya bağlı bulunmaktadır.

1.4.1. Çiğ Sütün seçimi

Önceleri sadece kısırak sütünden hazırlanan kefir, sonraları geniş çapta inek sütünden işlenmeye başlamıştır. Kefirdeki yağ içeriği de ülkelere göre değişmektedir. Polonya'da %2 yağlı süttten kefir üretilmekte, Norveç'te ise tam yağlı süt kullanılmaktadır (100). Kefir rekonstitute süttten ya da UHT sülle de üretilebilir. Kefir üretiminde istenilen kıvamın elde edilebilmesi için süt proteinlerinin tamamen denatürasyonu gerekli olduğundan, üretim sırasında UHT süllere ikinci kez bir ısıtma işlemi uygulanması gerektiği ileri sürülmüştür (6).

Farklı tür süllter kullanılarak üretilen kefirlerde olgunlaşma sırasındaki değişikliklerin incelendiği bir çalışmada en iyi kefirin inek sütünden üretildiği fakat sağım hijyenine uyularak panelistlerin olumsuz puan verdikleri tat ve koku faktörü ortadan kaldırılırsa en iyi kefirin keçi sütünden de yapılabileceği bildirilmiştir. Kefir yapımında sütün dışında peynir suyu, yağsız süt ve yayık altı gibi sülleçülük artıklarını da kullanılmasının mümkün olduğu bildirilmiştir (141).

Şahan (125) farklı süllterle yapılan kefirin kimyasal özelliklerini Tablo 4'de verildiği gibi belirtmiştir .

Tablo 4. Farklı süllterden yapılan kefirlerin bazı kimyasal özellikleri (125).

Kefirin Özelliği	İnek sülle	Keçi sülle	Koyun sülle
PH	4,28	4,20	4,33
Asitlik (SH)	46,7	46,9	53,2
Fermente laktoz oranı (%)	33,7	34,6	40,3
Kuru madde azalma (%)	15,9	14,4	9,9
Vizkozite (sn)	2,73	2,87	93
Alkol miktarı (%)	0,26	0,29	0,37
CO ₂ içeriği (g/l)	1,61	1,10	2,14

1.4.2. Çiğ Sülle Isıtılması ve Homojenizasyonu

Çiğ sülle önce homojenizasyon sıcaklığına kadar ön ısıtma işlemine tabi tutulur ve 70 °C'de, 150-200 bar basınçta homojenize edilir. Bu sayede istenilen kıvam sağlanmış olur (22). Homojenize edilmiş sülle ısıtılması son ürün için çok büyük önem arz etmektedir. Bu işlem ile serum proteinlerinin büyük bir kısmı denatüre olur. Bu işlem 95 °C'de 5 dakika sürede yapılmaktadır. Denatüre olan serum proteinlerinin su tutma kapasiteleri artarak üründe viskozite artışı ve aynı zamanda su

salma da azalma oluşur. Isıtma işlemi ile sütteki istenmeyen mikroorganizmalar da yok edilir (22).

Wegner ve Zickrick (144), kuru madde miktarının, yağ oranının artması ve homojenizasyon ile kefirin yapısını düzeltmenin mümkün olmayacağını bildirmektedir. Bunun yanı sıra Thomsen (134) artan yağ içeriğinin üründe acılaşmaya neden olabileceğinden söz etmektedir.

Isı uygulamasının kefirin kalitesi üzerine etkisini inceleyen Bondarev (15), kefir üretiminde kullanılacak süte dört farklı ısı periyodu uygulamıştır. Bunlar; 85 – 87 °C'de 5-10 dakika, 92-95 °C'de 20-30 dakika, 110 °C'de otoklavda ve çifte pastörizasyonla (plakalı ısı değiştiricide), 72-76 °C'de ısıtma ve sonra 85-87 °C'de 20 dakika pastörizasyondur. Belirtilen normlarda ısı işlemi uygulanarak hazırlanan sütlere % 4 kefir kültürü ilave edilmiş ve 20 °C'de inkübasyon uygulanarak, üretilen kefirlerin aroma, viskozite ve su salma özellikleri incelenmiştir. Bulgularda; ısıya bağlı olarak kıvamdaki artışın, serum proteinlerinde denatürasyonun daha fazla olmasından ileri geldiği ve kefir sütünün 92-95 °C'de 20-30 dakika ısıtılmasının en iyi uygulama olduğu açıklanmıştır. Çifte pastörizasyonun ise ekonomik bir yöntem olmadığı bildirilmiştir.

Norveç'te yapılan diğer bir çalışmada, Piechocka ve ark. (100) tarafından, % 0.06, % 0.5, % 1, % 2, % 3.5 yağ içeren sütlere, ısı ve homojenizasyon basıncının 9 farklı kombinasyonu uygulanmıştır. Farklı işlem görmüş 9 örnek, 18 ve 22 °C'lerde 18 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada, % 0.5 yağlı ve yağı almış sütlerle yapılan kefirin üst kısmında serum ayrılmasının, diğerlerine oranla belirgin olduğu kaydedilmiştir. Kıvam, homojenizasyon ısısının artırılmasından olumlu yönde etkilenmiştir. 220 atü basınçta homojenizasyon ve 94 °C'de 10 dakika ısı işlemi en iyi kalite faktörleri olarak önerilmiştir. Yağ miktarının % 0.06'dan % 2'ye çıkması, duysal niteliklerin belirgin şekilde düzelmesine neden olmuştur.

Kusursuz bir kefir eldesi için, öncelikle kaliteli çiğ süte gereksinim vardır. Kullanılacak sütün antibiyotikten arınmış, bakteri sayısının 10^6 'nın altında ve asitliğinin 6.8 SH'yı geçmemiş olması gerektiği belirtilmiştir (134).

1.4.3. Mayalama

Günümüze değin laboratuvar koşullarında tane üretiminin başarıya ulaşamadığı, kefir üretiminde starter kültür olarak kullanılmak üzere yeni tanelerin sadece daha önce oluşmuş başka tanelerin kullanılmasıyla üretilebildiği belirtilmiştir (106).

Tavlaş (131), tane ve kültür ile yapılan üretimlerde en belirgin farklılığın kuru madde ve yağ oranlarında gözleendiğini, kefir kültürü ile üretilen kefirlerin kimyasal ve duysal nitelikler açısından tane ile yapılan üretime göre en iyi sonuçları verdiğini belirtmiştir.

Karagözlü (51)'nün kaynatılmış, pastörize ve steril süt kullanarak kefir kültürü ve kefir taneleriyle ayrı ayrı hazırladığı kefirlerde yaptığı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçlarını Tablo 5'de verildiği gibi belirtmiştir.

Tablo 5. Farklı sütler kullanılarak kefir tanesi ve kefir kültürü ile mayalanmış kefirlerin bazı kimyasal özellikleri (51).

	Kaynatılmış süt Kullanılarak yapılan kefir örneği		Pastörize ve steril süt kullanılarak yapılan kefir örneği	
	Tane ile mayalama	Kültür ile mayalama	Tane ile mayalama	Kültür ile mayalama
PH	4,17	4,16	4,03 ve 4,17	4,00 ve 4,15
Asitlik (SH)	40,98	38,85	37,02 ve 39,48	36,72 ve 37,70
Kuru madde (%)	11,46	11,77	9,31 ve 9,62	9,87 ve 9,65
Yağ (%)	2,80	2,75	2,60 ve 2,60	2,65 ve 2,60
Protein (%)	3,39	3,48	2,71 ve 2,87	2,67 ve 2,93
Laktoz (%)	3,30	3,75	3,23 ve 2,69	3,50 ve 2,94
Kül (%)	0,69	0,72	0,63 ve 0,58	0,61 ve 0,64
Serbest yağ asitleri (mleq/100 g)	44,84	39,05	27,41 ve 42,07	19,87 ve 58,22

Kurutulmuş kefir taneleri 30-32 °C'deki su içerisinde 3 saat tutulur. Süre sonunda taneler şişer ve yüzeyde toplanır. Yüzeydeki bu taneler alınarak kaynatılmış-soğutulmuş suyla yıkanır. Sterilize edilmiş yağsız süte 1 kısım tane 3 kısım süt oranında aşılır. 19-20 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda yüzeydeki taneler alınır, daha önce aşılandığı gibi süte aşılır. Bu işlem

sütte gaz kabarcıkları görününceye kadar tekrarlanır. Sütte gaz oluşumu kefir mayasının aktif hale geldiğinin bir göstergesi olarak belirtilmiştir (50).

Kuru kefir tanelerinin, sporlu bakterilerle kontamine olması sonucu sağlığa zararlı olabilirler. Büyük kefir tanelerinin ise iç kısımlarında bozulmalar olabileceğinden tehlike yaratabileceği ve bu nedenle kuru kefir taneleri ve büyük tanelerin kullanılmadan önce kontrolünün zorunlu olduğu bildirilmiştir (114).

Kefir taneleri ısıtılmış, homojenize edilmiş ve inkübasyon ısı derecesine dek soğutulmuş süte aşılır. Bulaşma riskini ortadan kaldırmak için üretim aşamasında hijyene çok dikkat edilmesi gerekmektedir. Üretim iki basamaklı olabilmektedir. Bu durumda üretimin birinci basamağında, ana kültür için süte % 5 oranında kefir taneleri aşılır. İnkübasyon 23 °C'de 20 saatte tamamlanır. İnkübasyon genellikle 2 aşamadan meydana gelir. Önce 20 °C'de (16-23 °C) laktik asit fermantasyonu olur. İnkübasyonda arzu edilen pH (4.5-4.6) değerine ulaşıldıktan sonra kefir taneleri steril bir süzgeç yardımıyla pıhtıdan ayrılır ve su ile yıkanır. İnkübasyonun ikinci aşamasında ise pıhtılaşan süt 10 °C (5-15 °C)'de olgunlaşmaya bırakılır. Bu aşamada alkol fermantasyonu ağırlıktadır. Birinci aşama için süre 8-12 ya da 24 saat, ikinci aşama için ise 1-3 gündür (22, 55, 118).

Üretimin ikinci basamağında ise, işletme kültürü hazırlamak için süt ana kültürden aşılır. Bunda da aynı şekilde ısıtılmış ve homojenize edilmiş süt kullanılır. İlave edilen miktar yaklaşık % 3-5 oranındadır. 23 °C'de 20 saat inkübe ettikten sonra elde edilen işletme kültürü, esas kefir üretiminde kullanılır (22). Süt, işletme kültürü ile aşılır ve 18-20 saat inkübasyona bırakılır. pH 4.5-4.6 olduğunda, kefir 4-6 °C'ye kadar soğutulur. pH'nın daha da düşmemesi için, bu soğutma işleminin 20 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Soğutmadan sonra ürünün stabilitesinin sağlanması için kefir depolama tankına alınır. Burada denatüre olan proteinler serbest suyu absorbe ederler. Böylece ürünün viskozitesinin daha da arttığı belirlenmiştir. Dolum ünitesine pompalanarak ambalajlanır ve soğukta depolanır. Ambalajlanmış kefirin pH değeri 4.3-4.5 ve SH değeri ise 40-60 arasında olması gerektiği rapor edilen veriler arasındadır. Teknolojisine uygun bir üretim yapıldığında alkol oranının % 0.2-0.8 kadar olduğu kaydedilmiştir. Normal süt şişelerinin kullanılmasından dolayı uçucu alkolün büyük bir kısmı ayrılmaktadır. Yağ oranı sütte % 2.5 olarak ayarlanabilir (22). Düşük

fermantasyon ısı, maya gelişimini sağladığından alkol fermentasyonuna neden olur. Fermentasyon ısısının yüksek olması ise laktik asit bakterilerinin daha fazla gelişmesi nedeni ile asitliğin artmasına neden olur (80).

Shmeleva ve Yakovlev (124), Rusya'da tanklarda kefir üretimi yerine kefir kültürü ve kefir sütünün sürekli üretim yöntemlerinin geliştirilmesi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Rus patenti alan bu üretim yönteminde pastörizasyondan sonra sıcaklığın 20-25 °C'ye soğutulması ve olgunlaşma tanklarına alınması şeklinde planlanmış ve olgunlaşma tanklarında pıhtılaşan ürün hidrostatik bir basınç altında süzülerek tanelerden ayrılmıştır. Süzme aşamasında asitliğin 24 SH olduğu bildirilmektedir. Olgunlaşma tankından sürekli süzülen ürünün kültür olarak değerlendirilebileceği ifade edilmektedir. Bu yöntem Rus patenti almıştır.

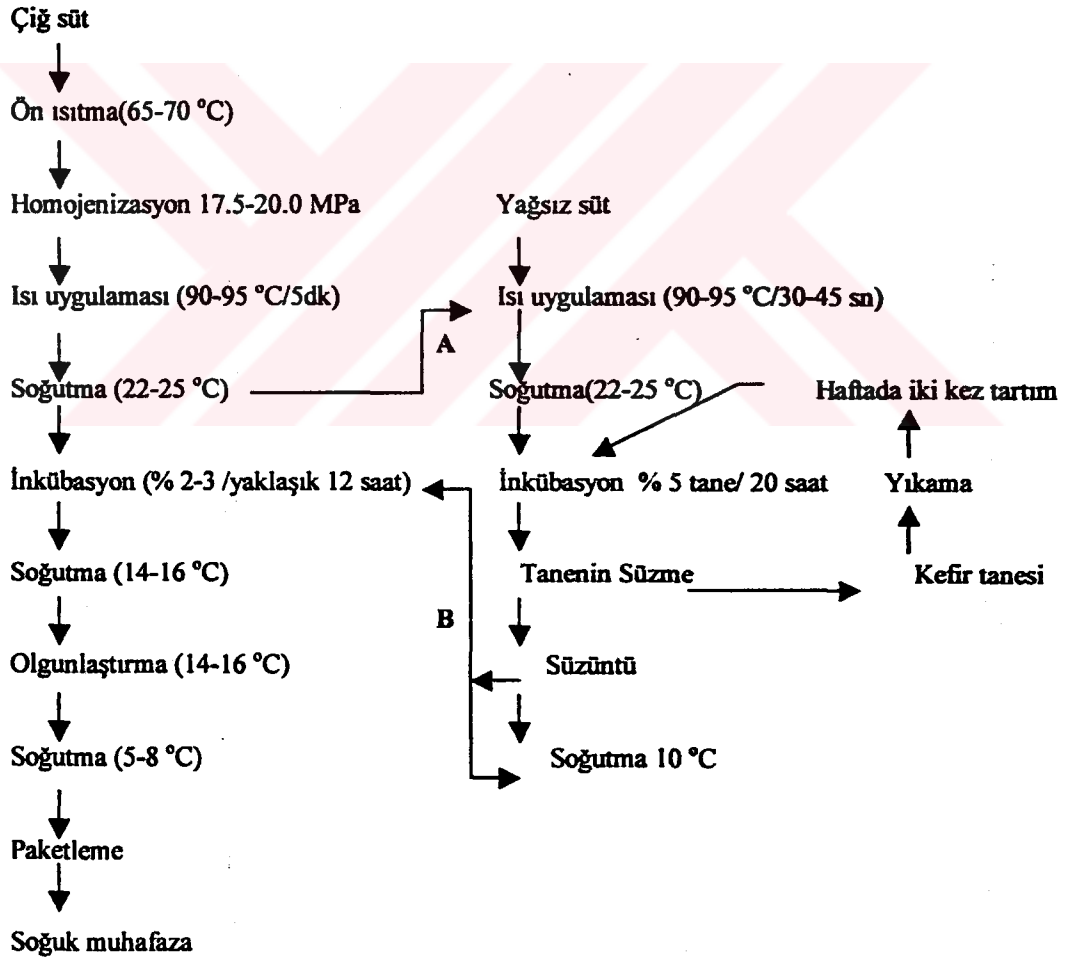
Geleneksel Kefir Üretimi : Bu yöntemde kefir yapılacak süt 90-100 °C'de 5-10 dakika ısıtıldıktan sonra 20-25 °C'ye kadar soğutulur. Bu süte % 2-10 oranında kefir tanesi katılır ve iyice karıştırılır. 20-22 °C'de 18-24 saatlik fermentasyondan sonra pıhtı homojenize edilir, taneler süzgeçten geçirmek sureti ile ayrılır. Süzgeçte kalan taneler yeni bir kefir yapımında kullanılacağı gibi yıkanarak veya oda ısısında kurutulduktan sonra 4 °C'de muhafaza edilebilir. Rus metodu olarak bilinen diğer yöntem ise daha büyük oranlarda kefir üretiminde uygulanmakta olup, üretimde iki aşama vardır. İlk aşamada taneler süte % 2-3 oranında inoküle edilir. Fermentasyon sonunda taneler süzülerek ana kültür olarak, üretimde % 1-3 oranında tekrar kullanılabilir. Bu tip üretimler çok aşamalı olduğu için kontaminasyona açıktır. Ayrıca her üretim standart olmadığı için mayaların fermentasyonu ile CO₂ ambalajda şişme ve patlamaya neden olabilir. Geleneksel yolla üretilen kefirin raf ömrü 3 gün kadardır (36, 138, 153).

Kefir, değişik yöntemlerle elde edilebilir. Henneberg evde kefir üretimi için şu bilgileri vermektedir. 20 gram kefir tanesi, ısıtılmış ve 20 °C'ye soğutulmuş 1 litre süte aşılır. 24 saat sonra taneler süzülerek ayrılır ve kefir CO₂ gazı kaçmayacak şekilde kapaklı bir şişeye alınır. Kapalı ve serin bir yerde ara sıra çalkalamak koşulu ile 24 saat bekletildikten sonra tüketilir (134).

Endüstriyel Kefir Üretimi : Endüstriyel kefir üretimi ile ilgili farklı yöntemler bildirilmekle beraber temel işlemler aynıdır. Kefir tanelerinden saf kültür hazırlanır. Bu amaçla liyofilize veya dondurulmuş kefir kültürü kullanılır.

Homojenize edilmiş ve %8 civarında kuru madde içeren inek sütü 90-95 °C civarında 5-10 dakika ısıtılır. Süt 18-24 °C'ye kadar soğutulduktan sonra % 2-8 civarında kefir kültürü ile mayalanır ve aynı ısı derecelerinde 18-24 saat inkübasyona bırakılır. Bu sırada sık sık karıştırılarak mikrofloranın homojen bir şekilde dağılması sağlanır. İnkübasyon sonunda pH 4.4-4.9 arasında değişmektedir. Bazı işletmelerde kefir 12-14 °C'de 24 saat olgunlaşmaya bırakılırken, bazılarında ise doğrudan 3-10 °C'de ki soğuk odaya alınır (44, 66, 146). Endüstriyel kefir üretim şeması Şekil 1'de verilmiştir (129).

Şekil 1. Endüstriyel kefir üretim şeması (129).



A : Önceki veya sonraki gün için kefir üretimi

B : Bir gün ya da iki önceki gün için starter üretimi

İşletmelerde kefir üretimi için gerekli donanımlar şu şekilde sıralanabilir; Kefir kültürünü üretmek ve muhafaza etmek için ekipman, kefir sütünü fermente etmek için tank ve süzgeç ya da filtre, pıhtılaşan kefir sütünü depolama tankı ve doldurma makinesi (90).

1.4.4 Tanelerin Geri Kazanılması ve Muhafazası

Kefir taneleri kullanıldıktan sonra süzülüp, kaynatılmış soğutulmuş suda yıkanır. Kısa süre içinde kültür ya da kefir üretiminde kullanılmayacak taneler 8-10 gün 4-5 °C'de yaş durumda saklanabilir. Uzun süren fermantasyon sürelerinden sonra aktivasyon azalması sonucu lezzet ve kıvamda azalma meydana gelebilir. Yıkama işleminden sonra, normal starter mikrofloranın yapısının düzeleceği, taneler uzun süre kullanılmayacaksa oda sıcaklığında 36-48 saat kurutulup alüminyum folyo içerisine sarılarak soğuk ve kuru bir yerde 12-18 ay aktivitelerini kaybetmeden saklanabileceği bildirilmiştir (47, 58, 62).

1.4.5 Kefir Starterleri ve Taneleri ile Mayalama

Kefir fermantasyonu sonrası tanelerin geri kazanılması özellikle büyük miktarlarda üretimde yorucu ve zaman gerektiren bir iştir. Petterson (97) tanelerin geri kazanılmasını gerektirmeyen ticari kefir üretimi için liyofilize starter geliştirmiştir. Homolaktik streptokok, laktobasil ve *Candida kefir*'in selektif suşları her bir ekinde aynı pH'da, konsantre ve liyofilize etmiş, son içeriği % 75 *Lact. lactis*, % 24 *Lact. lactis biovar diasetilactis*, % 0.5 *Lact. lactis biovar lactobacilli* ve %0.1 maya olacak şekilde karıştırmıştır. Bu starterler üretimde daha iyi bir aroma ve tat elde etmek için kullanılmıştır (daha çok diasetil, daha az maya tadı). Fakat mayaların düşük sayısı üründe daha az CO₂ ve daha az etil alkol oluşumuna neden olmuştur.

Klupsh (55) iki starter içeren tek kullanımlık kefir starteri patentini almıştır. *Lact. lactis ssp, lactis* ve onun *biovar diasetil* ve *cremoris* ile *Lact. acidophilus*, *Lact. brevis* ve *Lact. lactis*'i de içeren karışık bir starterden %2 oranında süte aşlanarak 24-27°Cde pH 4.4'e düşene kadar inkübe edilmiştir. Süt soğutulduktan sonra *Lact. brevis* ve *C. kefir* kültürü ilave edilmiştir. Fakat inkübasyon devam etmemiştir. Ürün bu nedenden dolayı maya içermiş fakat mayalarca fermente edilememiştir. Petterson

(97)'un starterlerinde olduğu gibi yukarıda bahsedilen ürünün daha az etil alkol içerdiği ya da gazsız olduğu görülmüştür. Bu ürünün ambalajlanmasında gaz oluşumundan kaçınılmıştır. Fakat bu üründe istenilen köpürme kalitesini sağlayamamıştır (55).

Kefir taneleri kompleks bir mikrofloraya sahip olduklarından, optimum koşullarda stabil kompozisyonlu bir starter elde etmek güç olmaktadır. Kefir tanelerinin aktive edilmesi ve üretimi için gerekli koşullardan birinin olmaması, starterlerin mikrobiyal kompozisyonunda değişmelere ve fermantasyon süresinin uzamasına yol açar. Bunun sonucunda da arzulanan kalitede bir ürün elde edilemez. Kefir tanelerini oluşturan mikroorganizmalar kendi kendilerini regüle etme özelliğinde olduklarından arzulanan kompozisyonlu bir starter elde etmek için uygun koşulların sağlanması gerekir. Endüstriyel kefir üretiminde, tanelerin bu özelliğinden yararlanılır (114).

Kefir florasını ve kompozisyonunu etkileyen faktörler şunlardır (114):

1. *Tanenin Süte Katılma Oranı*; kefir tanelerinin 1:10, 1:20 gibi büyük oranlarda süte ilave edildiklerinde homofermantatif ve heterofermantatif laktik asit streptokokları ve mayaların minimum düzeyde geliştiği ve bunun nedeninin hızlı asitlik gelişimi olduğu bunun sonucu olarak asitliğin hızlı gelişmesinin fermantasyon süresinin kısılmasına neden olacağı belirtilmiştir. Termofilik laktobasiller ve asetik asit bakterileri starterlerinin süte katılma oranındaki değişmelerden etkilenmedikleri tanelerin süte katılma oranı azaldığında, asıl mikroflorayı oluşturan mikroorganizmaların sayısında artış görüldüğü ifade edilmiştir. Kefirdeki tüm mikroorganizmaların aktif olarak geliştiği katılma oranı 1/50 olarak saptanmıştır. Tanelerin süte 1/10 oranında katıldıklarında pH değeri 3.6-3.8 olurken, 1/30-1/50 oranında katıldıklarında bu değer 4.4-4.6 olmaktadır. 1/30-1/50 katılma oranı yüksek düzeyde uçucu yağ asitleri ve CO₂ oluşturmaktadır. Bu durum starterdeki heterofermantatif laktik asit streptokoklarının ve mayaların fazla gelişme göstermelerinden kaynaklanabileceği belirtilen veriler arasındadır.

2. *İnkübasyon Sıcaklığı ve Süresi*; kefir tanelerinin yüksek inkübasyon sıcaklığına maruz bırakıldığında homofermantatif laktik asit bakterileri (streptokoklar ve laktobasiller) daha az geliştiği çünkü bu suşların mezofilik karakterde olduğu belirlenmiştir. Kefir starterlerinde temel olan tüm mikroorganizma

gruplarını hakim kılabilmek için, tanelerin inkübasyon sıcaklığında 5-6 saat daha pıhtı ile birlikte tutulması gerektiği öne sürülmüştür. Bazı durumlarda pıhtı oluştuktan sonra sıcaklığı 7-10°C ye düşürerek, taneler ile starter 24 saat bir arada bekletilir. Bu işlemin mikrofloranın kantitatif kompozisyonunu ve karakterini değiştirmedeği ancak bu sırada Mycoderma tipi mayaların bulaşmasının engellenmesi gerektiği, bekletme süresi çok uzarsa *Geotricum candidum*'un gelişerek tat ve kalitenin bozulmasına neden olacağı belirtilmiştir.

3. *Karıştırma ve yıkama*; karıştırma işleminin starterin homofermantatif laktik streptokok ve maya içeriğini 10 kat artıracak diğer bakteriler üzerinde ise bir etkisi olmadığı ayrıca karıştırma ile süt içinde mikrobiyal metabolitlerin daha iyi dağılımı sağlanacağı belirtilmiştir. Kefir tanesinde bulunan mikroorganizmalardan sadece mayaların yıkama işleminden etkilenmediği, hatta bu işlemin mayaların gelişimini stimüle ettiği bildirilmiştir.

Gerekli tüm koşullar hazırlanarak elde edilen kefir starterinin 1 ml'sinde bulunması gereken mikroorganizma çeşidi ve sayısının, homofermantatif mezofilik laktik streptokokları 10^8 - 10^9 kob/ml, termofilik laktobasiller 10^5 adet/ml, heterofermantatif laktik asit streptokoklar 10^4 - 10^8 kob/ml, mayalar 10^5 - 10^6 kob/ml, asetik asit bakterileri 10^5 - 10^6 kob/ml ve asitliğin 42-44 SH olması gerektiği öne sürülmüştür (114).

1.4. 6. Kefir Çeşitleri

Yağsız süttten veya yağlı sütle elde edilen normal kefirin yanı sıra son zamanlarda kefir üretiminde ilginç gelişmelerden biri meyve ile aromatize edilen kefir sütüdür. Antonov ve ark. (10) tarafından geliştirilen yöntemde, standardize edilen süte 74-76 °C'de 15-20 saniye ve sonra 85-87 °C'de 5-15 dakika çifte pastörizasyon normu uygulanmış ve sonra homojenize edilen süt soğutulup meyve ve şeker şurubu karışımı ile 1:1 ya da 1:2 oranında ya da kefirin % 12 -20'si oranında meyve suyu ile karıştırılıp şişelenebileceğini bildirmişlerdir.

1.4.7. Ambalajlama ve Muhafaza

Kefir koyu renkli cam şişelerde veya tetrapak ambalajlarda 3-4 °C'de 2-3 gün buzdolabında muhafaza edildikten sonra satışa sunulabilir. Buzdolabında bekleme sırasında mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu kefirin tadı ve aroması değişebilir. Bu şekilde buzdolabında 1-2 gün bekletilen kefirin daha kıvamlı hoş aromalı olduğu ve daha çok beğeni kazandığı ve ticari üretimde şişelenmiş kefirin raf ömrünün 3-4 °C'de 8-10 gün olduğu belirtilmiştir (58).

Kefir taneleri hemen kullanılmayacaksa kuru veya yaş olarak muhafaza edilebilir. Her iki yöntemde de tanelere uygulanan işlemlerde hijyen ve sanıstasyona dikkat edildiğinde taneler birçok kez kullanılabilir. Evde kefir üretiminde tanelerin muhafazası için basit yöntemler vardır. Taneler öncelikle içilebilir özellikteki su ile yıkanır ve oda ısısında 36-48 saat bir kağıt ya da temiz bir bez parçası üzerinde kurutulur. Serin ve kuru bir yerde muhafaza edilir. Bu basit yöntemin tanelerin kontamine olmasına, bundan dolayı da simbiyotik floranın değişmesine yol açabileceği, bu nedenle su hijyeninin yeterince iyi olmadığı bölgelerde kontaminasyondan korunmak için tanelerin yıkanmasında kaynatılmış soğutulmuş su kullanılması gerektiği belirtilmiştir (64, 145).

Taneler yaş olarak 4°C'de veya oda ısısında 36-48 saat kurutularak muhafaza edildiğinde kuru kefir taneleri 12-18 ay aktivitelelerini koruyabilirken, yaş tanelerin ancak 8-10 gün aktivitelelerini koruyabileceği belirtilmiştir (30).

Durtschaever (25) tanelerin soğuk su ile yıkanıp 2-4 °C'de 2-3 gün bekletildikten sonra sıvı nitrojen içinde aylarca muhafaza edilebileceğini bildirmiştir.

Bu yöntemlere alternatif olarak, yıkanmış taneler % 0.9 steril fizyolojik tuzlu su içinde 4°C'de önemli bir aktivite kaybına uğramadan 2-3 ay saklanabilir (145). bununla beraber taneler dondurulup kurutularak saklanabilir. Fakat bu yöntemde mayaların % 80'inin tahrip olabileceği, taneler tekrar kullanılırken, daha önce taneden izole edilmiş mayaların ilavesiyle tanenin standardize edilmesi gerektiği öne sürülmüştür. Bu şekilde muhafaza edilen taneler ticari şekilde piyasaya sunulmaktadır (97).

Garrote ve ark.(30) Tanelerin farklı muhafaza yöntemlelerini karşılaştırmış ve tanelerin muhafazasında alternatif bir metodun daha kullanılabileceğini

belirtmişlerdir. Araştırmacılar tanelerin süt içinde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 120 gün mikroflorasını koruyabildiklerini, diğer yöntemlerle muhafaza edilen tanelere göre ağırlıklarının bir miktar arttığını belirtmişlerdir. Süt içinde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulan tanelerle yapılan kefirin normal tane ile yapılan kefire benzer bir mikrofloraya ve CO_2 içeriğine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

1. 5. Kefirde görülen kusurlar ve önleme yolları

Kefir üretiminde görülen tat, koku ve görünümdeki birçok bozukluğa üretim sırasında hijyene dikkat edilmemesi veya tanenin mikrobiyal florasının bozulması neden olabilir.

Wegner ve Zickrick (144) tarafından kefirdeki hatalar spesifik olmayan ekşi süt tadı, fazla gaz oluşumu veya köpürme, serum ayrılması, kültür aktivitesinin azalması ve tat kusurları şeklinde belirtilmiştir.

Kefir taneleri üretim sırasında su veya sütle yıkanarak bir sonraki üretim için hazırlanır. Fakat aşırı yıkama işlemi tanedeki mikroflorayı azaltacağından kültür üretimindeki süreklilik bozulur ve kalite kötüleşir. Kefirde spesifik olmayan maya, aroma yapan ve sirke asidi bakterilerinin azlığı, fermantasyon sıcaklığının yüksek olması, fazla kültür aşılması ve kısa inkübasyon süresinin de kültür üretimindeki sürekliliğin bozulmasına yol açabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte aroma yapan bakterilerin ya da mayaların fazla gelişmesi, düşük sıcaklık derecesinde uzun süre inkübasyon sonucu üründe görülen aşırı gaz ve asitlik oluşumu problemlerini giderebilmek amacıyla tanelerin yıkanması gerektiği de belirtilmiştir (60).

Starter oranının iyi ayarlanamaması ve / veya uygun olmayan fermantasyon koşullarından dolayı kefirde görülen bazı hatalar Tablo 6'da verilmiştir (114).

Tablo 6. Kefirdeki kusurlar ve nedenleri (114).

Kusurlar	Nedenleri
Ekşi süt tadı	Mayaların, aroma ve asetik asit bakterilerinin yetersiz üremesi, çok uzun ya da çok kısa inkübasyon ve katılan kültür miktarının fazla olması
Acı tat	Üretimde yağ oranı fazla süt kullanılması
Metal tat	Kefirin uzun süre uygun olmayan metallere (Fe, Cu, Mn) temas etmesi
Maya tadı, peynir tadı, sirke tadı	Kefirin <i>Candida ssp.</i> , <i>Oospora lactis</i> , sirke asidi bakterisi ile kontamine olmasından kaynaklanır.
Aşırı gaz oluşumu ve köpürme	Kültür/süt oranının 1/30'dan az olması, mayaların ve aroma bakterilerinin aşırı üremesi inkübasyon sıcaklığının yetersiz ve inkübasyon süresinin uzun olması
Starter aktivitesinin zayıflaması	Sütte inhibitör varlığı, kefir tanelerinin yıkanması ve sütte tutulma süresinin uzaması
Tanelerin yumuşak ve mukozumsu kıvamda olması	Mayaların aşırı gelişmesi, zararlı mayaların karışması, inkübasyon sıcaklığının yetersizliği ve inkübasyon süresinin uzun tutulması
Süt serumunun ayrılması	Koagülasyon tamamlanmadan karıştırma işlemine başlanması
Alkol ve CO ₂ noksanlığı	Maya miktarının yetersizliği.
Kefirde uzayan bir yapı	Laktik asit bakterilerinin yıkımlanması

Kefir üretimini sınırlayan faktörlerden biri paketlemedeki sorunlardan kaynaklanmaktadır. Kefirin olgunlaşma aşamasında maya faaliyetleri, laktik asit bakterilerinde olduğu gibi durdurulamadığından, depolama sırasında CO₂ miktarının artması söz konudur. Günümüzde tüketici plastik kaplarda meydana gelen herhangi bir şişmeyi, bozulmanın bir işareti olarak kabul etmektedir. Bu nedenle kefirli plastik kaplara paketleyebilmek için olgunlaşmada ürün içerisinde CO₂ gelişiminin durdurulması gerektiği belirtilmiştir. Kefir tanesinden elde edilen starterlerin ilavesi ile üretiminin yönlendirilmesi ve böylece CO₂ üretiminin sınırlanmasının mümkün olabileceği ifade edilmiştir. Kültürün olgunlaşma derecesi, kültür miktarı, aşılama sıcaklığı, pıhtılaştırma süresi ürünün niteliklerini yönlendirmede ve aroma oluşumunda etkili olmaktadır. Yüksek inkübasyon sıcaklığında CO₂ miktarı azalabilmektedir. Bu durumda mikrobiyolojik, kimyasal duyuşal niteliklerin klasik kefir niteliklerine oranla sapmalar gösterebileceği belirtilmiştir (80).

Pıhtılaşan ürünün pompalanması, soğutulması, akışı ve doldurulmasında özen göstermek gerekir. Özellikle hava girmesine engel olunmalıdır. Aksi halde üründe serum ayrılması, çökme ve tat bozuklukları görüleceği bildirilmektedir (6, 144).

Koroleva ve Bavina (60), son ürünün kalitesinin düzeltilmesi ve çeşitli kusurların giderilmesi için kefir tanelerinin çoğaltılmasına ilişkin sorunları araştırmışlardır. Buna göre; kefir taneleri çoğaltılırken tane ile süt arasındaki oranın 1/30- 1/50 arasında olması halinde tane içindeki tüm mikroorganizmaların aktif hale gelebileceği bildirilmektedir. Tanelerin 18-22 °C'ler arasında çoğaltılması ile tane aktivitesinin azalmayacağı da ifade edilmektedir.

1.6. Kefir Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

1.6. 1. İzolasyon Yöntemleri

Araştırcıların kullandıkları besiyerleri ve inkübasyon şartları Tablo 7'de verilmiştir. Laktik asit bakterilerinin izolasyonunda en çok kullanılan metotta; Laktobasiller, löykonostoklar ve pediokoklar için MRS agarda 30 °C'de 72 saat aerobik ve anaerobik inkübasyon, Laktik streptokoklar için ise M17 agarda 30 °C'de 48 saat aerobik inkübasyon uygulamasıdır. Ayrıca bazı araştırcılar mayaların üremelerini baskılamak amacıyla besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda cycloheximide, etanol kullanmışlardır (77, 78, 101). Leroi ve Pidoux (74) zayıf üreyen laktobasillerin üremesi için Yeast Glukoz Broth'u önermiştir. Çeşitli araştırcıların kefirde laktik asit bakterilerinin izolasyonu amacıyla kullandıkları yöntemler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Çeşitli araştırmacıların izolasyonda kullandıkları yöntemler

Mikroorganizma	Besiyeri	İnk. Isısı/süre	İnk. Ortamı	Kaynak	
Lactobacillus Pediococcus Leuconostoc	MRS agar + Cycloheximide 50 µ/ml Lactobacillus agar (LS) + Cycloheximide (50 µ/ml)	30°C 72 h	Anaerobik	78	
	Lactic acid bacteria agar Lee's agar Reinforced clostridial agar	37°C'de 72h	Anaerobik (%10 CO ₂ , %5 H ₂ , %85N ₂)	20,122	
	Lee's agar MRS agar	30°C'de 72 h	Aerobik	30	
	Lactobacillus selective agar	37°C'de 18h	Anaerobik	92	
	MRS agar	30°C'de 72 h	Aerobik Anaerobik (%80N ₂ , %10 CO ₂ , %10H ₂)	1,80,82	
	MRS agar	30°C'de 72 h	Anaerobik (%80N ₂ , %10 CO ₂ , %10H ₂)	136	
	MRS agar	30°C'de 72 h	Anaerobik	99	
	MRS agar +% 2 laktoz	30°C'de 72 h	Anaerobik	145	
	Lactobacillus culture agar (LC) Bromine Cresol Purple Plate Count Agar (BCP)	30°C'de 72 h	Anaerobik	43	
	MRS L	30°C'de 72h	Mikroaerobik	149	
	Kefir grain polysaccharide-producing lactobacillus agar (KPL)	30°C'de 72h	Anaerobik (%100 CO ₂)	28	
	MRS + %3 etanol (w/v) + cycloheximide %0.5(w/v)	30°C'de 72 h	Anaerobik	101	
	MRS agar+ Cycloheximide 200mg/l	30°C'de 72 h	Anaerobik (%90 N ₂ , %10 CO ₂)	77	
	Rogosa agar	37°C'de 72h	Anaerobik (%10CO ₂ , %5 H ₂ , %85 N ₂)	20	
	Glucose yeast extract broth (GYE)	30°C'de 48h	Aerobik	74	
	MRS broth	30°C'de 72h	Aerobik	1,92	
	APT agar SL agar	30°C'de 72h	Aerobik	49	
	Streptococcus	M17 agar	37°C'de 72h	Aerobik	20,122
		M17 agar+ %3 etanol (w/v) + cycloheximide %0.5(w/v)	30°C'de 72h	Aerobik	101
		M17 agar+ cycloheximide 200mg/l	30°C'de 72h	Aerobik	77
PMP agar (Modifiye M17 agar)		21°C'de 48h	Aerobik	116	

1.6.2. Laktik Asit Bakterilerinin Cins Bazında İdentifikasyonu

Laktobacillaceae familyasının üyesi olan laktik asit bakterilerinin en belirgin özellikleri Gram pozitif, katalaz negatif ve sporsuz olmalarıdır. Familya 4 genusa ayrılır (53).

a. Laktobacillus Genusu

- Thermobacterium grubu,
- Streptobacterium grubu,
- Betabacterium grubu

b. Streptococcus Genusu

- Viridans grup
- Enterococcus grubu (Fekal streptokok, D grubu)
- Lactococcus grubu (Laktik streptokok, N grubu)

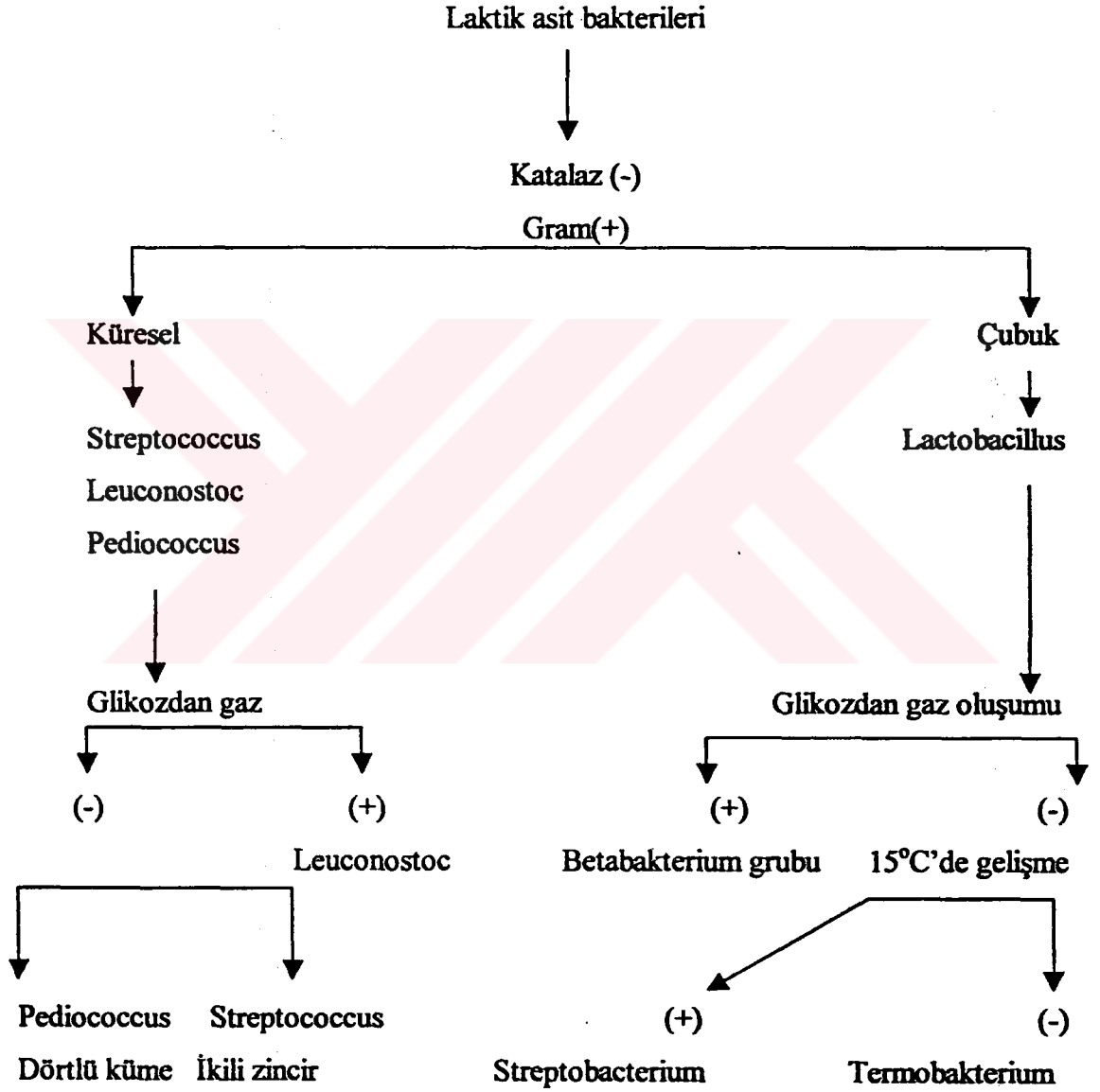
c. Leuconostoc Genusu

d. Pediococcus Genusu

Laktik asit bakterilerinin genel ayrımında kullanılan en önemli testler ve bu test sonuçlarına göre gruplandırılmaları Şekil 2’de verilmiştir. Tablo 8, 9, 10 ve 11’de ise tür bazında identifikasyonda kullanılan özellikler verilmiştir.

a. Kültürel Teknikler

Şekil 2. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda yararlanılan testler (132)



Laktobasillerin Tür düzeyinde identifikasyon

Tablo 8. Laktobasillerin tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan özellikleri(49)

Tür	150C'de	Arginin hidroliz	Amigdalın	Arabinoz	Sellobz	Eskulim	Fruktoz	Galaktoz	Glukoz	Glukonat	Laktoz	Maltoz	mannitol	Mannoz	Melçitoz	Melibioz	Rafinoz	Ramnoz	Riboz	Salisin	Sorbitol	Suktoz	Trehaloz	Xylöz	
<i>L.delbrueckii</i> subsp. delbrueckii	-	D	-	-	D	+	+	-	+	-	-	D	-	+	-	-	-	-	-	+	+	D	-	-	
<i>L.delbrueckii</i> subsp. lactis	-	D	+	-	D	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>L.delbrueckii</i> subsp. bulgaricus	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L.acidophilus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	D	-	-	-	+	+	+	D	-	-
<i>L.amylophilus</i>	+	B	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>L.amylovorus</i>	-	B	+z	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+z	+	+	+	-	-
<i>L.animalis</i>	-	-	D	D	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>L.crispatus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>L.farcininis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>L.gasseri</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	D	D	-	+	-	D	D	-	-	+	+	+	D	-	-
<i>L.helveticus</i>	-	-	-	-	-	-	D	+	+	-	+	D	-	D	-	-	-	-	-	-	+	-	D	-	-
<i>L.jensenii</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	D	D	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>L.ruminis</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	D	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>L.salivarius</i>	-	-	-	-	-	D	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	D	-	D	+	+	+	-	-
<i>L.siarpeac</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>L.vitulinus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	D	+	D	-	-
<i>L.yamashiensis</i>	+	-	+	-	D	+	+	D	+	-	-	-	-	+	-	-	-	D	-	+	+	+	+	-	-
<i>L.agilis</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>L.alimentarius</i>	+	-	O	D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>L.bavaricus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>L.casei</i> subsp. casei	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>L.casei</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu

Tablo 9. Streptokokların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan özellikleri (37)

	S.pyogenes	Sagalactiae	S. equi	S. infantis	S. pneumoniae	S. salivarius	S. sanguis	"S. mitis"	"S. milleri"	S. mutans	S. ratti	S. scrofa	S. sobrinus	S. ferus	S. faecalis	S. faecium	S. avium	S. gallinarum	S. lactis	S. raffinolactis	S. morbillorum	S. hansenii	S. pleomorphus	S. parvulus	S. acidominimus	S. ubers	S. bovis	S. equinus	S. thermophilus
10°C'de üreme	-	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
45°C'de üreme	-	-	-	-	D	D	D	D	D	D	D	D	D	-	+	+	+	+	-	-	N	N	N	N	N	D	D	+	+
%6.5 NaCl'de üreme	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	N	N	N	N	N	-	-	-	-
pH 9.6'da üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	N	N	N	N	N	-	D	-	-
%40 safra tuzunda üreme	-	D	-	-	-	D	D	D	D	D	D	D	D	N	+	+	+	+	-	-	N	N	N	N	N	D	+	+	-
α - hemoliz	-	-	-	-	+	D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	D	D	D	D	D	D	-	-	-	D	G	G	G	D
β-hemoliz	+	D	+	+	-	-	-	-D	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Z	Z	Z	-
Arginin hidrolizi	+	+	+	NT	+	+	+	D	D	-	+	-	-	-	+	+	-	-	D	D	-	-	N	-	-	+	-	-	D
Hipurat hidrolizi	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	D	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Eskulin hidrolizi	D	-	D	+	D	+	D	D	D	+	+	D	D	+	+	+	+	+	D	D	-	D	-	+	E	+	+	+	-
Obligat anaerob	-	-	-	-	-	-	-	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

E: Yavaş reaksiyon, F : Bazı suşlar mikroaerofilik ,gz : genellikle zayıf reaksiyon, Nt: Test edilmedi, O : Reaksiyon belirlenmedi

Tablo 10 . Löykonostokların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan testler (31)

	L.mesenteroides .mesenteroides	L.mesenteroides dextranicum	L.mesenteroides cremoris	L.paramesenteroides	L.lactis	L.oenos
ASİT OLUŞTURMA						
Amigladin	D	D	-	(D)	-	B
Arabinoz	+	-	-	D	-	D
Sellobioz	D	D	-	(D)	-	D
Fruktoz	+	+	-	+	+	+
Galaktoz	+	D	D	+	+	D
Gkuloz	+	+	+	+	+	+
Laktöz	(D)	+	+	(D)	+	-
Maltoz	+	+	D	+	+	-
Mannitol	D	D	-	(D)	-	-
Mannoz	+	D	-	+	D	D
Mellibioz	D	D	-	+	D	D
Rafinoz	D	D	-	D	D	-
Riboz	+	B	B	B	B	B
Salisin	D	D	-	-	D	D
Sukroz	+	+	-	+	+	-
Ksiloz	D	D	-	D	-	D
Eskulin hidrolizi	D	D	-	D	-	+
Üreme için ihtiyaç						
Urasil	-	-	+	-	-	-
Guanin+adenin+xanthine+urasil	-	D	+	D	-	+
Riboflavin	D	D	+	+	+	+
Pyridoxal	D	D	+	+	-	+
Folik asit	D	D	+	+	-	+
Tomato juice factor	-	-	-	-	-	D
Domates suyu kullanımı	-	-	-	-	-	D
Niçasta yıkımı	+	+	-	-	-	-
Sitrat disimilasyonu	D	D	+	D	D	D
Mallat disimilasyonu						
Karbonhidratsız ortam	D	-	-	D	-	B
Karbonhidrat	D	-	-	D	-	+
Yeast glukose litmus milk	+	+	+	+	+	D
Asit pıhtılaşma	D	D	D	D	D	-
Redüksiyon	D	D	-	D	(D)	D
Gaz	D	D	-	-	-	-
%3 NaCl'de üreme	+	D	-	D	D	B
%6.5 NaCl'de üreme	D	-	-	D	-	B
pH 4.8'de üreme	-	-	-	D	-	+
pH 6.5'de üreme	+	+	+	+	+	D
37°C'de üreme	D	+	-	D	+	D
Glukoz brotta son pH	4.5	4.5	5.0	4.4	4.7	B

Tablo 11. Pediokokların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan testler (32)

	P.damnosus	P.parvulus	P.inopinatus	P.dextrinicus	P.pentosaceus	P.acidilactici	P.hatophilus	P.urnaequi
45°C'de üreme	-	-	-	-	D	+	-	-
pH 7.0 üreme	-	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5 üreme	+	+	B	-	+	B	-	-
%10 NaCl 'de	-	-	-	-	D	-	+	-
Katalaz üretimi	-	-	B	-	+	+	-	-
Arginin hidroliz	-	-	-	-	+	+	-	-
Asit üretimi								
Arabinoz	-	-	-	-	+	D	+	D
Riboz	-	-	-	-	+	+	+	B
Ksiloz	-	-	-	-	D	+	-	D
Ramnoz	-	-	-	-	D	D	-	B
Laktoz	-	-	+	D	D	D	-	D
Maltoz	D	+	+	+	+	-	+	+
Melezitoz	D	-	-	-	-	-	+	-
Sukroz	D	-	D	D	-	-	+	+
Trehaloz	+	D	+	-	+	D	+	+
Maltotrioz	D	D	D	+	-	-	+	B
Dextrin	-	-	D	+	-	-	-	
Nişasta	-	-	-	+	-	-	-	-
Gliserol	-	-	-	-	-	-	+	-
Mamitol	-	-	-	-	-	-	-	D
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	D	B	B	B	+	B	B	B
α -metilglukozid	D	D	D	+	-	-	+	

b. Hızlı identifikasyon teknikleri

Kefir florasının izolasyon ve identifikasyonunda HPLC, PCR, API testi, kromatografi, DNA-RNA hibridizasyonu, G+C oranının belirlenmesi, toplam çözünebilir protein oranı, obligat homofermantatif veya fakültatif heterofermantatif suşların belirlenmesi gibi hızlı yöntemlerde kullanılmaktadır (84, 116, 149, 150).

Diğer fermente süt ürünlerine kıyasla kefirin mikroflorası hakkında kesin bir bilgi mevcut değildir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, kefir florası, tanenin mikroflorasına, orjinine, üretim tekniğine bağlı olarak değişmektedir. Kefir fermantasyonu pH değeri, asitlik, ısı ve ortamdaki besin durumu gibi birçok faktöre bağlıdır. Bununla birlikte kefirde mikrobiyolojik ve kimyasal olaylar sonucu meydana gelen antimikrobiyal ve inhibitör maddeler gibi ürünler floradaki bakteri maya oranı üzerinde etkili olabilmektedir.

Standart ve iyi kalitede kefir eldesi için kefirin mikroflorasının belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle araştırmacılar öncelikle florayı belirlemeye, daha sonra bu florayı standart hale getirip kefir starteri oluşturmaya çalışmışlardır. Bu amaçla tane florasında bakteri maya ilişkisini inceleyen çeşitli araştırmacılar (71, 74, 95) bakteri maya oranının özel olduğunu ve tane içerisinde bunların rastgele dağılmadıklarını belirtmişlerdir. Tanenin mikroflorasını inceleyen araştırmacılar baskın florayı laktobasillerin oluşturduğunu belirtmişlerdir (4, 81, 101).

Sonuçta bu çalışmada temel amaç; kefir mikroflorasından laktik asit bakterileri izole ve tanımlamak, kefir florası açığa çıkarmak, farklı kefirlerin mikrofloralarını karşılaştırmak, kefir örneklerinde pH ve asitlik değişimi ile laktik flora arasındaki ilişkiyi araştırmak olarak belirlendi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kefir Taneleri

Kefir üretiminde kullanılan kefir taneleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden koyu renkli cam şişelerde steril fizyolojik tuzlu su içerisinde sağlandı ve sırasıyla A, B, C grubu kefir olarak adlandırıldı.

2.1.2 Hammadde

Kefir üretiminde %3 yağ içeren ticari UHT süt kullanıldı. Sütler bir litrelik tetrapak ambalaj olarak satın alındı. Sütlerin kimyasal analizleri Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

2.1.3. Alet ve Ekipman

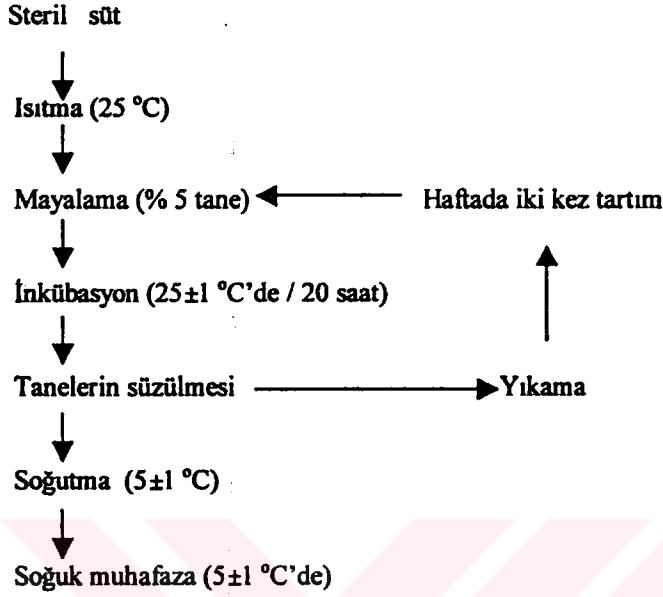
Üretim ve analizler için Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarında mevcut olan alet ve ekipmanlardan yararlanıldı. Suşların doğrulanması İngiltere'de Bristol Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvansal Gıdalar Bölümü bünyesindeki Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı'nda yapıldı.

2.2. METOT

2.2.1 Kefir Tanelerinin Aktif Hale Getirilmesi ve Çoğaltılması

5 kısım süte 1 kısım tane mayalanarak 25 ± 1 °C'de 20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda taneler steril bir süzgeç kullanılarak alınıp, steril su ile yıkandı. Mayalama işlemi sütte gaz kabarcıkları görülünceye kadar tekrarlandı. Sütte gaz oluşumu görüldüğünde kefir tanelerinin aktif hale geldiği kabul edildi (80, 129). Şekil 3'de tanelerin çoğaltılma aşamaları verilmiştir.

Şekil 3. Kefir tanelerinin aktif hale getirilmesi ve çoğatılması.



2.2.2 Kefir Kültürü Üretimi

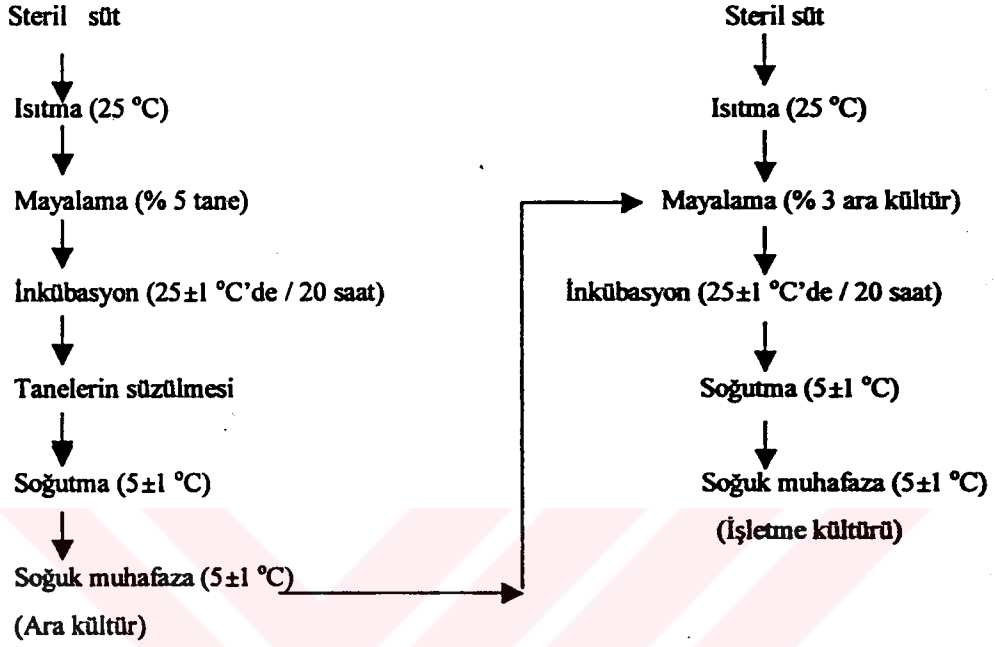
Kefir kültürü aktif hale getirilmiş kefir taneleri kullanılarak üretildi. UHT süt 25 °C'ye kadar ısıtıldıktan sonra % 5 oranında kefir tanesi ile mayalandı. 25±1 °C'de pH 4.5-4.6 oluncaya kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pıhtı karıştırılıp steril bir süzgeç yardımıyla taneler pıhtıdan ayrıldı. Elde edilen süzüntü bir sonraki üretimde ara kültür olarak UHT süte % 3 oranında mayalandı. 25±1 °C'de pH 4.5-4.6 oluncaya dek inkübe edildi. Bu şekilde işletme kültürü hazırlanmış oldu. Kefir üretiminde kullanılacak süte % 3 oranında bu işletme kültüründen mayalandı. Kültürler kullanılmaya dek 5±1 °C'de muhafaza edildi. Şekil 4'de kefir kültürü üretim şeması verilmiştir.

2.2.3 Kefir Üretimi

Kefir üretimi geleneksel yöntem kullanılarak yapıldı. UHT steril sütler 6 adet steril erlene 100'er ml dağıtıldı. Sütler 25°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra 3 erlen %5 oranında kefir taneleri ile; geri kalan 3 erlen ise %3 kefir kültürü ile mayalanıp 25±1 °C'de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pıhtı karıştırıldıktan sonra taneler steril bir süzgeç yardımıyla pıhtıdan ayrıldı ve steril su ile yıkandı. Kefir 5±1 °C'ye soğutulduktan sonra 5±1 °C'de olgunlaşmaya bırakıldı (80, 129).

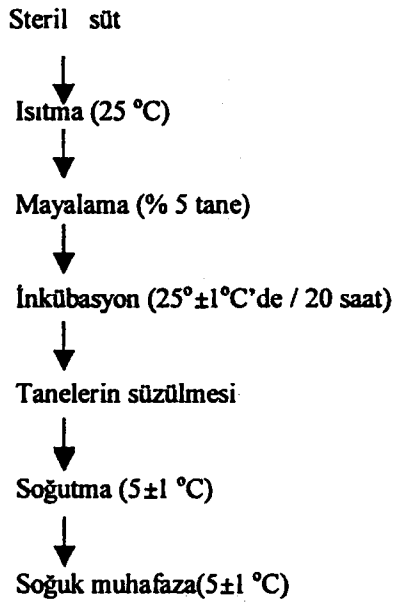
Şekil 5'te kefir üretim şeması verilmiştir.

Şekil 4. Kefir kültürünün üretimi

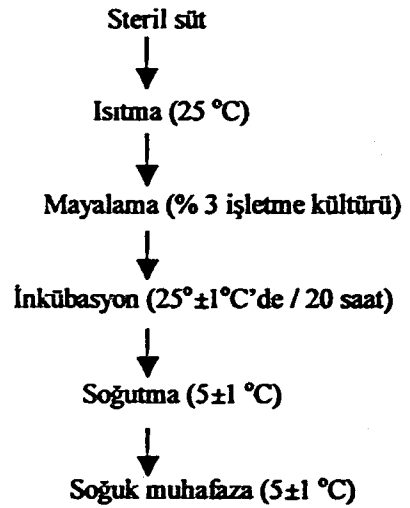


Şekil 5. Kefir üretimi

Kefir tanesi ile



Kefir kültür ile



2.2.4. Kefir Tanesinin Aktif Durumda Muhafazası

Kefir üretiminde kullanılan taneler iki gün arayla UHT süte mayalandı ve 25 ± 1 °C'de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda taneler steril bir süzgeç yardımıyla pıhtıdan ayrılarak steril saf su ile yıkandı. Haftada iki kez tanelerin tartımı yapıldı. Taneler bir sonraki üretime kadar buzdolabında 5 °C'de muhafaza edildi. Böylece aktif halde kalmaları sağlandı.

2.2.5. Mikrobiyolojik Analizler

Kefir kültürü ve kefir tanelerinden elde edilen kefirde, farklı morfolojide koloni izole etme şansını arttırabilmek amacıyla farklı muhafaza süreleri kullanıldı. Muhafaza süresinin 12. 24. ve 36. saatlerinde ekimler yapıldı ve bu işlem 4 kez tane ile mayalanmış kefirde, 3 kez ise kefir kültürü ile mayalanmış kefirde olmak üzere 7 kez tekrarlandı. Dilüsyon sıvısı olarak $\frac{1}{4}$ Ringer solüsyonu kullanıldı

2.2.5.1. Laktobasillus, Löykonostok ve Pediokokkus Sayımı : Bu grup mikroorganizmaların sayımında % 2 laktoz ilaveli MRS Agar (Oxoid, CM 361) ve Rogosa Agar (Oxoid, CM 627) kullanıldı. Rogosa Agar 50°C'ye soğutulduktan sonra, glasiyel asetik asit ile pH'sı 5.4'e ayarlandı, dökme plak metodu ile ekim yapılarak paralel şekilde aerob ve anaerobik ortamda 30 °C'de 5-7 gün inkübe edildi. Anaerobik ortam sağlamak amacıyla petrilere üzerine ikinci bir kat besiyeri döküldü ve petrilere anaerobik jarda inkübasyona bırakılarak oluşan koloniler sayıldı (38).

2.2.5.2. Laktik Streptokokların Sayımı: Bu amaçla M17 Agar (Oxoid, CM 785) kullanıldı. Sterilize edilen besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra % 10'luk steril laktoz çözeltisinden 50 ml ilave edildi. Dökme plak yöntemiyle ekim yapıldı ve 30 °C'de 48 saat aerobik şartlarda inkübe edildikten sonra, oluşan koloniler muhtemel laktik streptokoklar olarak değerlendirildi (139).

2.2.5.3. Maya ve Küf Sayımı : Besiyeri olarak Patoto Dextrose Agar (PDA, Oxoid, CM139) kullanıldı. Sterilize edilen besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra %10

tartarik asitle pH 3.5'e ayarlandı. Dökme plak metodu ile ekim yapılarak petriler 20-22 °C'de aerobik şartlarda inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayıldı (9).

2.2.5.4. Toplam Mezofilik Aerop Mikroorganizma Sayımı : Genel bakteri sayımı için Plate Count Agar (PCA, Oxoid, CM 325) kullanıldı ve örneklerin dilüsyonlarından dökme plak yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan petriler 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılıp oluşan koloniler sayıldı (9)

2.2.5.5. Koliform Grubu Mikroorganizmaların Sayımı: Violet Red Bile Agar'da (VRBA, Oxoid, CM 107) dökme plak yöntemiyle ekim yapıldı ve 30 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayıldı (9).

2.2.5.6. Enterokokların Sayımı : Bu amaç için Slanetz and Bartley Agara (SB, Oxoid CM 377) dökme plak metoduyla ekim yapıldı ve petriler 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılarak oluşan koloniler sayıldı (9).

İnkübasyon sonrası De Man Rogosa Sharpe Agar, Rogosa Agar ve M17 Agar üzerinde gelişen morfolojik görünümleri birbirinden farklı düz, şekilsiz, yuvarlak, yaygın, şişkin, konveks, mat, parlak, şeffaf, beyaz, renksiz, küçük ve büyük 20 koloni belirlendi. Farklı görünümdeki bu kolonilerden toplam 250'si denemelere alındı. MRS Agar ve Rogosa Agar'dan seçilen koloniler MRS Broth (Oxoid, CM 359)'a, M17 agardan seçilen koloniler ise Yeast Glucose Buyyona (Pepton: 10.0g, Meat Extract:10.0g., NaCl: 5.0g., D-Glucose:5.0g., Yeast Extract:3.0g., Distile su:1000ml) ekildi (38).

2.2.5.7. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Sıvı besiyerine ekilen kolonilerin hepsi safılıklarını kontrol etmek amacıyla izole edildikleri katı besiyerlerine öze ile çizilerek ekildi. İnkübasyon sonrası zayıf üreyen laktik asit bakterileri yeast glukoz buyyonda inkübe edildi ve tekrar MRS agara ekilerek koloniler incelendi. Gram boyama sonunda mikroskopta süşların safılıkları kontrol edildi. Saf koloni elde edilinceye kadar aynı işlem tekrarlandı. Saf olarak elde edilen her bir süş paralelli olarak M17 Agar, MRS Agar ve Rogosa

Agara ekilerek 30 °C'de inkübe edildikten sonra 4 °C'de muhafaza edildi. Suşlar testler sonuçlanıncaya kadar iki ayda bir yenilendi (133).

2.2.5.8. İzolatların stoklanması ve muhafazası

Laktik streptokok izolatları yatık olarak hazırlanan Yeast Glukose agara ekilerek 30 °C'de 48 saat inkübe edildi. Laktobasillus ve löykonostok izolatları yatık olarak hazırlanan MRS ve Rogosa Agara ekilerek 30 °C'de 3-5 gün inkübe edildi. Tüm izolatlar üreme görüldükten sonra buzdolabında 5 °C'de muhafaza edildi.

2.2.5.9. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonu :

2.2.5.9.1. Morfolojik Özellikler

Genel morfoloji : Mikroorganizmaların büyüklüğü, şekli ve dizilişi gibi morfolojik özellikleri Gram boyama ile boyanan preparatlarda incelendi (119).

Gram Reaksiyonu : Bu amaçla 18-24 saatlik genç kültürler kullanıldı. Temiz bir lam üzerine yuvarlak uçlu öze ile bir damla buyyon kültürü alındı, Gram boyama ile boyandıktan sonra, immersiyon objektifinde incelenen kültürlerden mavi-mor renkte olanlar Gram pozitif, pembe-kırmızı olanlar ise negatif olarak değerlendirildi. Kontrol suş olarak gram negatif bir suş olan *Escherichia coli* kullanıldı (119).

2.2.5.9.2. Kültürel Özellikler

Mikroorganizmaların kültürel özellikleri izole edildikleri besiyerinde ve kültive edildikleri buyyonda incelendi. Koloniler; şekil, büyüklük, yükseklik, parlaklık, renk gibi özellikler dikkate alınarak sonuçlandırıldı. Buyyonda ise; dip kısımda üreme, yaygın üreme, kalın ya da ince zar oluşturma gibi özellikler dikkate alınarak değerlendirildi (119).

a. Katalaz Testi : Taze bakteri kültüründen bir öze yardımıyla temiz bir lam üzerine alınıp yayıldı. Üzerine 1-2 damla %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Kabarcıkların çıkması pozitif olarak kabul edildi. Kontrol suş olarak *Escherichia coli* kullanıldı (11).

- b. **Glukozdan Gaz Oluşturma:** MRS broth (triamonyum citratsız)'tan 8'er ml koyulmuş tüplerin içine durham tüpü yerleştirildi. Sterilizasyon sonrası tüplere taze kültürlerden 0.5 ml inokülasyon yapıldı ve 30 °C de 24 saat inkübe edildi. Gaz oluşumu pozitif kabul edildi (38).
- c. **Tolerans Testleri :** Laktobasil ve streptokok türlerinin 15, 37 ve 45 °C'de üreyebilme yetenekleri, % 4 ile % 6.5 NaCl'de, pH 3.7, 5.5, 9.6 ile % 10 ve % 40 safra tuzunda üreyebilme yeteneklerinin tespiti amacıyla laktobasil kültürlerinden MRS Buyyona, streptokok kültürlerinden Yeast Glukoz Buyyona (70 g/l glukoz, 0.62 g/l yeast extract) ekim yapıldı. İnkübasyon sonrası besiyerlerinde görülen bulanıklık ve tortu oluşumu üreme açısından pozitif olarak kabul edildi (15-45 °C'de 3 gün, 37 °C'de 1 gün inkübe edildi) (38).
- d. **Voges Proskauer Testi :** Mikroorganizmaların asetil metil karbonil meydana getirip getirmediğini belirlemek amacıyla, test edilecek mikroorganizma MR-VP medium'a (MR-VP, Oxoid, CM 43B) ekildi ve 30 °C de 2-7 gün inkübasyondan sonra, temiz bir deney tüpüne 1 ml buyyon kültürü konuldu, bunun üzerine 0.5 ml alfa naftol çözeltisi (% 95 lik etil alkolde hazırlanmış) ve 0.5 ml % 40'lık KOH çözeltisinden eklendi ve tüp kuvvetlice çalkalandı. 5 dakika içinde kırmızı renk meydana getirenler pozitif kabul edildi (133).
- e. **Nişasta Hidroliz Testi :** Nutrient agar (Difco R0001-17-0) eritilerek sterilize edilmiş (121 °C'de 15 dak.) ve petri kutularına dökülerek katılaşması sağlandı. Bunun üzerine % 0.3 (w/v) oranında eriyebilir nişasta içeren nutrient agar döküldü. Besiyeri yüzeyi katılaştıktan sonra denenecek kültürler çizilerek ekildi ve 30°C'de 3 gün inkübe edildi. Bunu takiben petri kutularının üzerine 5-10 ml Gram'ın iyot çözeltisinden döküldü. Berrak, açık renkte zon ile çevrili koloniler pozitif sonuç şeklinde değerlendirildi (38).
- f. **Potasyum tellürite Tolerans Testi :** Deneyde %0.04 oranında potasyum tellürit içeren Yeast Glukoz Buyyon kullanıldı. Denenecek kültürle inoküle edilen tüpler

30°C'de 24 saat inkübe edildi, bulanıklık ve üreme görülen tüpler pozitif kabul edildi (39).

- g. Arginin Hidroliz Deneyi:** Arginin buyyonu (Tryptone : 5 gram, Yeast extract: 2.5 gram, D glucose 0.5 gram dipotassium hydrogenphosphate: 2.0 gram, L-arginin monohydrochloride: 3 gr, distile su 1 litre) tüplere dağıtıldıktan sonra, 121 °C'de 15 dakika steril edildi. Denenecek kültürler inoküle edildi ve 30 °C'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra temiz bir tüpe 1 ml üreme olan buyyondan konulup üzerine 1 ml Nessler reaktifi (potasyum iode: 7 gram, mercuric iode: 10 gram, potassiumhydroxide: 10 gram distile su:100 ml) damlatıldı. Turuncu kahverengi renk pozitif olarak değerlendirildi (38).
- h. TTC Redüksiyonu :** Steril şartlarda hazırlanan ve 1 gece 37 °C'de bekletilerek kontamine olup olmadığı test edilen Slanetz and Bartley besi yerine şüpheli suştan iğne uçlu öze ile çizim yapılarak aynı sıcaklıkta 24 saat inkübe edildi. Etrafi kırmızı-pembe hale ile çevrili koloniler TTC pozitif olarak değerlendirildi (8).
- i. Beta Hemoliz Testi :** Steril olarak hazırlanmış Nutrient agara % 8-10 oranında steril defibrine koyun kanı ilave edilerek hazırlanan besiyeri, petri plaklarına döküldü ve bir gece 37 °C'de bekletilerek, kontamine olmadığı belirlendikten sonra şüpheli suşlar bu besiyerine iğne uçlu öze ile çizim yapılarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Etrafi açık beyaz renkte zon ile çevrili koloniler pozitif olarak kabul edildi (9).
- j. Eskulin Hidrolizi:** Eskulin ilaveli modifiye MRS brotha öze ile ekim yapıldı. 30 °C'de 2-5 gün inkübe edildikten sonra besiyerinde siyah rengin görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (38).
- k. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri :** Laktobasillus grubu mikroorganizmalar için MRS fermantasyon buyyonu, streptokoklar için de nutrient buyyon, 4.5 ml tüplere dağıtıldı. 121 °C'de 15 dakika sterilize edilerek

kullanıldı. MRS fermantasyon buyyonuna % 2 oranında test edilecek karbonhidrat ve %0.004 oranında klorfenol red indikatörü katılarak Nutrient buyyona da % 2 oranında test edilecek karbonhidrat ve % 0.01 oranında fenol red indikatörü katılarak testler yapıldı (38, 133).

- l. **Nitrat Redüksiyonu** : Nitrat redüksiyon testi alfa naftil amin metodu ve çinko granülleri kullanılarak test edildi. 5 ml brotha kültür ekildi ve 30 °C'de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere greis ayırıcı damlatıldı ve renk değişimi gözlemlendi. Kırmızı renk pozitif kabul edildi (9).
- m. **Anaerob Üreme ve Hareketlilik** : Tüplere dağıtılan yumuşak agarlı besiyerinin (SIM medium) sterilizasyondan sonra dik olarak donması sağlandı. Bu besiyerine genç bakteri kültürlerinden iğne öze ile ekim yapıldı. Besiyeri üzerine ikinci bir kat olarak agar döküldü. Donması beklendikten sonra anaerobik jarda 30°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Tüplerdeki üreme ve bulanıklık anaerob pozitif olarak değerlendirildi (9).
- n. **Endospor Oluşturma** : Taze bakteri kültüründen, ateşte fiske edilerek preparat hazırlandı. Lamin üstü malaşit yeşili ile örtüldü. Preparat hafif ateş üzerinde tutularak, boya kaynatılmadan, buharlaştırıldı fakat kurutulmadı. Preparat su ile yıkandı. Zıt boya olan karbol füksin ile 30 saniye boyandı. Su ile yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon objektifinde incelendi. Referans suş olarak boyamada *Bacillus cereus* kullanıldı. *Bacillus cereus*'un sporları mikroskop altında incelendi (9).

API TESTİ : Çalışmada laktik asit bakterilerinin tanımlanmasına yönelik üretilmiş API 50 CHL (Biomérieux) test kiti kullanıldı.

Testin esasları farklı karbonhidratların test edilecek suşlar tarafından fermente edilip edilmemesinin belirlenmesine dayanmaktadır. Test edilecek suşlar ayrı ayrı MRS broth'ta 18-24 saat süreyle üretildi. Testin yapılış prosedürüne uygun olarak testin plastik kabına 10 ml olacak şekilde su dağıtıldı. Karbonhidratları içeren şeritler yerlerine yerleştirilerek test kullanıma hazırlandı.

10 ml test broth besiyerine test edilecek suşlardan istenilen yoğunlukta ve miktarda ilave edilerek farklı karbonhidrat içeren her bir kutucuğa bu besiyerinden dolduruldu. Plastik kabın üst kapağı kapatılarak 30 °C'de 24 saat inkübe edildi. Besiyerindeki renk değişimleri 1'den 5'e kadar değerlendirilerek okuma yapıldı (API Software). Bu değerler belirlenerek sonuçlar muhtemel laktobasiller olarak identifiye edildi.

2.2.6. Kimyasal Analizler

Kefir üretiminde kullanılan süte ve üretilen kefiirlere uygulanan kimyasal analizler şunlardır;

- a. **Kuru Madde Tayini** : Örneklerde kuru madde tayini gravimetrik yöntemle saptanmıştır. Bu amaçla 5 ml örnek 105 °C'de kurutulmuş ve soğutulup darası alınmış porselen krozelere konulup 105 °C'de yaklaşık 3 saat tutulduktan sonra kurutma dolabından çıkarılarak soğutulduktan sonra tartıldı. Bu işlem, krozelerin ağırlığı sabitlenene kadar her 20 dakika da bir tekrarlandı. Bulunan değerlerden % kuru madde oranı hesaplandı (69).
- b. **Yağ Tayini** : Süt yağı Gerber yöntemi ile tayin edildi (69).
- c. **pH Ölçümü**: Kefirlerde muhafaza süresinin 12, 24, ve 36. saatlerde pH değişimini incelemek amacıyla 100 ml'lik bir cam behere kefir örneklerinden konuldu ve 25°C'deki kefir örneği içine pH metrenin probu daldırılarak pH değeri pH metre (Jenway 3150) ile okundu (69).
- d. **Titrasyon Asitliğinin Belirlenmesi**: Örneklerde asitlik tayini, titrasyon yöntemiyle fenolftalein indikatörü kullanılarak yapıldı ve sonuçlar % laktik asit cinsinden verildi. Titrasyonun sona erdiği noktanın saptanmasında ayrıca pH metreden de yararlanıldı (69).

2.2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizde ANOVA testi kullanıldı. Test Minitab bilgisayar programı ile yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Kefire Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

3.1.1. Sayım Sonuçları : Üç farklı kefir tanesinden elde edilen kefirlerden muhafaza süresinin 12., 24. ve 36. saatlerinde yapılan mikrobiyolojik ekimlerden elde edilen sayım sonuçları Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. Kefir tanesi ve kültürü kullanılarak hazırlanmış kefirde mikrobiyal sayım sonuçları (log₁₀ cfu/ml)

A Kefiri Taneden	Laktobasil ssp.		Laktik streptokok ssp.	Enterokok ssp.	Maya-Küf	Toplam mezofilik aerop canlı
	Anaerob	Aerob				
SAAT						
12.	8,69±8,56	7,90±7,13	8,83±8,79	5,38±4,95	5,20±4,85	8,44±7,76
24.	8,49±8,34	8,44±8,18	7,84±7,26	5,07±4,83	5,28±5,09	8,30±7,86
36.	9,21±9,08	8,57±8,30	7,27±7,14	5,64±5,02	6,38±5,67	8,60±7,81
Kültürden						
12.	9,50±9,44	8,30±7,062	10,37±10,01	4,80±4,71	7,50±7,37	8,20±8,13
24.	8,20±7,72	9,01±8,48	8,86±8,82	5,20±4,98	7,38±7,59	8,82±8,71
36.	10,40±10,12	9,48±9,24	8,81±8,29	4,55±4,40	7,53±7,39	10,07±9,00
B Kefiri						
Taneden						
12.	8,41±8,34	8,76±8,48	8,76±8,50	4,45±3,46	6,00±5,15	8,14±7,46
24.	8,36±8,32	7,94±7,94	8,07±7,85	4,55±3,33	7,74±7,10	7,90±7,63
36.	8,40±8,38	8,14±7,71	7,96±7,65	4,39±4,02	8,00±7,15	8,20±7,58
Kültürden						
12.	8,70±8,64	7,50±7,35	7,20±6,47	5,07±4,99	5,97±5,90	7,03±6,394
24.	7,23±6,78	8,30±8,17	7,30±6,95	4,50±4	7,07±6,98	8,11±8,07
36.	9,39±8,69	11,75±10,96	6,90±6,78	2,01±0,76	8,00±7,62	11,97±11,85
C Kefiri						
Taneden						
12.	9,80±8,93	9,44±9,08	9,20±8,76	5,64±5,00	8,50±8,27	10,20±9,68
24.	9,23±9,18	9,30±8,85	9,07±8,85	6,77±6,50	9,56±9,38	8,88±8,12
36.	9,23±9,21	9,29±9,10	8,38±8,36	4,90±4,63	8,78±8,15	10,44±9,76
Kültürden						
12.	9,80±8,92	9,44±9,04	9,00±8,99	5,55±5,43	8,07±7,74	8,51±8,44
24.	9,22±9,12	9,14±9,04	9,08±9,03	6,20±6,03	8,75±8,66	9,00±8,30
36.	9,20±9,01	9,38±8,94	8,48±8,31	5,01±4,90	9,07±8,90	10,03±9,92

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde C kefir taneleri ile mayalanan kefirde %37.49 maya, % 41.66 laktobasil, % 31.24 laktik streptokok izole edildiği görüldü. B kefirinde %26.69 maya, % 36.93 laktobasil, % 36.93 laktik streptokok, A kefirinde ise %28.69 maya, % 39.81 laktobasil, % 31.47 laktik streptokok izole edildi.

Farklı muhafaza sürelerinde yapılan ekimlerde sayım sonuçları değerlendirildiğinde 12. saatte laktobasillerin sayısı 10^8 - 10^{10} kob/ml arasında değişirken 24. saatte bu sayıda bir azalma gözlemlendi. 36. saatte ise sayı en yüksek değere ulaştı. Maya sayısı ise muhafaza süresi boyunca arttı. Laktik streptokok sayısı mayaların aksine muhafaza süresi boyunca azaldı.

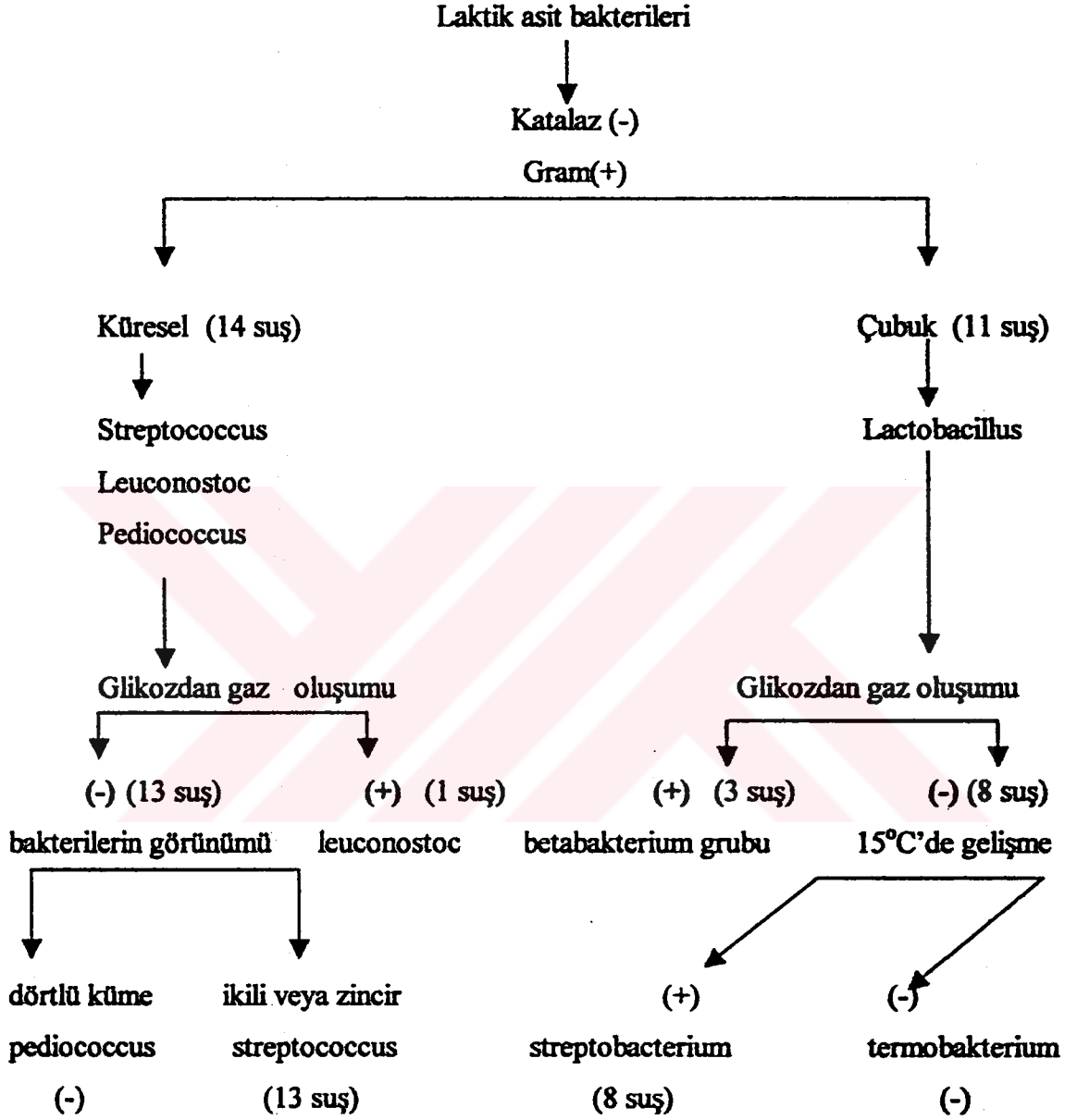
Farklı kefir örneklerinde maya, laktik streptokok ve laktobasil sayıldı. Her üç örnekte de streptokok ve laktobasillerin sayısı mayalardan yüksek çıktı. C kefir örneğindeki maya sayısının diğer iki örneğe göre daha fazla olduğu gözlemlendi.

Taneden elde edilen kefirde bulunan laktobasil sayısı, kefir kültürü ile mayalanan kefirde ki laktobasil sayısından daha düşük bulundu ($p<0,05$). Maya sayısının da aynı şekilde seyrettiği gözlemlendi.

Enterokokların sayılarında muhafaza süresi artışına bağlı olarak oluşan asitlikten ve laktobasillerin baskılayıcı özelliğinden dolayı azalma görüldü ($p<0,05$). Örneklerin hiç birinde koliform grubu bakteriye rastlanmadı.

3.1.2. İzolatların İdentifikasyonu : MRS agar ve M17 agarda izole edilen 250 suştan, 48 tanesi maya, 67 tanesi Gram negatif, 66 tanesi katalaz pozitif, 44 suşun izolasyonunda başarı sağlanamadı. Laktik asit bakteri özelliği gösteren toplam 25 suş üzerinde çalışma yürütüldü. Bu suşların tümü fakültatif anaerob ya da mikroaerofilik kolonilerdi. Morfolojik karakterleri laktik asit bakterilerine benzeyen bu izolatların Gram pozitif, sporsuz, katalaz negatif, çubuk ve kok şeklinde olduğu görüldü. 25 suş yapılan temel testlerin sonuçlarına göre 4 gruba ayrıldı. 13 suş *Streptococ ssp*, 1 suş *Leuconostoc ssp*, 3 suş betabakterium grubunda ve 8 suş streptobacterium grubunda değerlendirildi. Şekil 6'da suşların gruplandırılmasında kullanılan test sonuçları verilmiştir. Suşların identifikasyonunda kullanılan önemli özellikleri Tablo 13 ve 14'te verilmiştir.

Şekil 6. Laktik asit bakterilerinin gruplandırılması



Tablo 13. İzolatlara uygulanan test sonuçları

Suş No	Gram Reak.	Katalaz Testi	Endospor oluşurma	Glukozdan gaz oluşurma	Arginin hidrolizi	Nitrat redüksiyonu	Voges-Proskauer testi	Potasyum elfitrit indirgeme	Hareket	Anaerob üreme	Nişasta Hidroliz	TTC indirgeme	Eskulin hidrolizi	Hemoliz
1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,6,7,9,10,11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
5, 8	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+ zayıf	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
13	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
14	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
17	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
18	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
19,20,22,23	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
25	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+ zayıf	-	-	-	-

Tablo 14. Suşlara uygulanan tolerans testleri sonuçları

Suş no	15°C	37°C	45°C	%4	%6,5	pH 9,6	%10safra tuzu	% 40safra tuzu
1		+	-				+	-
2,3,6,7,9,10,11	+	+	+				+	-
4	+	+	-				+	-
5,8		+	-				+	-
12		+	+	+	+zayıf	+	+	+
13		+	+	+	+	-	+	-
14		+	+	+	-	-	+	-
15		+	+	+	+	-	+	-
16		+	-	+	+		+	-
17		+	+	+	+	+	+	-
18		+	+	+	+	+	+	-
19,20,22,23		+	-	+	-	-	+	+
21		+	+	+	+	+	+	-
24		+	+	+	+	-	+	-
25		+	-	+	+		+	-

25 izolattan 10 tanesi *Lactobacillus ssp.*, 7 tanesi *Streptococcus ssp.*, 1 tanesi *Leuconostoc ssp.* olarak tanımlanmıştır. 7 tane izolat isimlendirilemedi. İzolatların tanımlanmasını API CH 50 testiyle doğrulandı. Tablo 15'te tanımlanmış suşların bir listesi verilmiştir.

Tablo 15. Tanımlanmış suşlar

İzolat No	Adı
1	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
2,3,6,7,9,10,11	<i>Lactobacillus casei</i>
5,8	<i>Lactobacillus brevis</i>
12	<i>Streptococcus avium</i>
14	<i>Streptococcus thermophilus</i>
16	<i>Streptococcus cremoris</i>
19,20,22,23	<i>Streptococcus lactis</i>
12	<i>Streptococcus avium</i>
14	<i>Streptococcus thermophilus</i>
25	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>

3.2. Kefire Ait Kimyasal Analiz Sonuçları

Kefir örneklerinde muhafaza süresinin 12, 24 ve 36. saatlerinde yapılan kimyasal analiz sonuçları incelendiğinde; B grubu kefir örneğinde pH değerinin 5.01'den 4.04'e düştüğü, asitliğin ise 0.59'dan 1.24'e yükseldiği gözlemlendi. A grubu kefirlerde pH değeri 4.95'den 3.97'e kadar düşerken, asitlik 1.06'dan 1.30'a kadar yükseldi. C grubu kefirlerde ise pH değeri 4.92'den 3.94'e kadar düştü. Asitlik 0.60'dan 1.35'e kadar yükseldi.

Kefir üretiminde kullanılan sütün yağın %2.9 olarak ölçüldü. B grubu kefir örneğinde yağ oranı %2.6 olarak ölçüldü. Yağ miktarında %0.3'lük bir azalma gözlemlendi. A grubu kefirlerde ise yağ oranında bir değişiklik olmayıp bu değer %2.9 olarak kaldı. C grubu kefir örneklerinde ise %0.2'lik bir azalma ile yağ oranı %2.7 olarak ölçüldü.

Kefirlerde yapılan kimyasal analiz sonuçları Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Kimyasal analiz sonuçları

KEFİR ÖRNEĞİ	pH			Asitlik			Kuru madde	Yağ
	12.s	24.s	36.s	12.s	24.s	36.s		
A	4,95	4,10	3,97	1,06	1,01	1,30	9,82	2,9
B	5,01	4,27	4,04	0,59	0,996	1,24	9,63	2,6
C	4,92	4,08	3,94	0,60	1,06	1,35	9,72	2,7

3.3. Hammaddeye Ait Analizler

Süte ait kimyasal analizler :

pH : 6.4

Kurumadde : % 12

Asitlik : % 0,16

Yağ : % 2,9

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada Türkiye’de kullanılan kefir taneleri ve kefir kültürü ile üretilen kefirin temel mikroorganizma gruplarının sayımı ile laktik asit bakterileri tanımlanmaya ve bunlar üzerinde etkili olan pH ve titrasyon asitliği değişimi incelenmeye çalışıldı.

Farklı bölgelerden elde edilen kefir tanelerinin morfolojileri Kosikowski (62) ile Marshall ve ark. (81)’nin tarif ettiklerine benzer olarak sarımsı-beyaz, karnabahar çiçeği görünümünde elastik, parlak ve mukozumsu olduğu görüldü. Tanelerin yapısı Marshall ve Cole (81) ile Bottazzi ve Bianchi (16)’in rapor ettiği bilgilere benzer olarak 2-3 mm ve 0.5-3.5 cm büyüklüğündeydi. Üç ilden alınan tanelerin boyutu ve morfolojilerinde farklılıklar mevcuttu. Fermantasyon boyunca tanelerin boyutu ve sayısında artma görüldü.

Farklı kefir örneklerinde maya, laktik streptokok ve laktobasil sayıldı. Her üç örnekte de streptokok ve laktobasillerin sayısı mayalardan yüksek bulundu. C grubu kefir örneğindeki maya sayısının diğer iki örneğe göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu sonuç Kuo ve ark. (66)’nin bulduğu sonuçla benzerlik göstermektedir.

En yüksek laktobasil sayısı C grubu kefirde bulundu. Kroger (64) Avrupa’da marketlerde satılan kefirlerde 10^5 kob/ml maya, $10^8 - 10^{10}$ kob/ml laktik streptokok ve 10^{10} kob/ml laktobasil identifiye etmiş ve Rusya’da iyi kaliteli bir kefirde 10^9 kob/ml laktik streptokok, $10^7 - 10^8$ kob/ml laktobasil ve $10^4 - 10^5$ kob/ml maya bulunduğunu rapor etmiştir. Maya sayısı Kroger (64)’in sonuçlarına göre üç kefir örneğinde yüksek çıkmasına rağmen, laktobasil sayısı benzerlik gösterdi. Fakat maya sayısı Kuo ve ark. (66)’nın, Garrote ve ark. (30) ile Marshall ve ark. (82)’nin bulduğu sonuçlara benzer bulundu.

C grubu kefirde %37,49 maya, %41.66 laktobasil, %31.24 laktik streptokok, A grubu kefirde %28.69 maya, %39,81 laktobasil ve % 31.47 laktik streptokok, B grubu kefirde ise bu oranlar %26.11 maya, %36.93 laktobasil, %36.93 laktik streptokok olarak belirlendi. Molska ve ark. (85) kefir florasını %66-69 laktobasil, %16-22 laktik streptokok ve %18-20 maya şeklinde belirtmişlerdir. Libudzis ve ark. (76) işç florayı %65-80 laktobasil, %20 laktik streptokok ve % 5 maya olarak

belirtmişlerdir. Danimarka'da tüketilen kefirlerde ise %70 laktik streptokok, %20 laktobasil ve %5 maya bulunmuştur (34). Araştırmamızda bulunan bakteri sayılarının Molska ve ark.(85) ile Libudzis ve ark. (76)'nın belirttiği sonuçların aksine yüzde olarak dağılımları birbirine daha yakın çıktı.

Besin maddelerinin fazla olduğu muhafaza döneminin başında, diğer mikroorganizmalarla birlikte Laktobasil- Löykonostok- Pediokok grubu bakterilerin sayısı artmıştır. Daha sonra tüm mikroorganizma gruplarının faaliyeti sonucu ortamdaki laktoz ve diğer besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak Laktobasil- Löykonostok- Pediokok grubu bakterilerin sayısı da azalmış, ancak olgunlaşma sonuna doğru diğer mikroorganizma gruplarının çeşitli sebeplerle (bacteriosin, yüksek asitlik, düşük pH) azalmasıyla ortama yeniden Laktobasil- Löykonostok- pediokok grubu bakteriler hakim olmuştur. Bu durum İşleyici (45)'nin peynir florasında laktik asit bakterilerini izole ettiği çalışmasında bulduğu verilerle benzerlik göstermektedir.

Laktik streptokok grubu mikroorganizmalarla Laktobasil- Löykonostok- Pediokok grubu bakterileri arasındaki ilişki, laktik streptokoklar için kullanılan M17 Agar'da bu mikroorganizmalarında üremesine bağlanabilir. Laktik streptokok grubu bakteriler ile maya-küf sayısı arasındaki ilişki, maya ve küflerin de düşük pH derecelerine nisbeten daha dayanıklı olmalarından ve olgunlaşma süresinin ilerleyen saatlerinde canlı kalarak daha yüksek sayılara ulaşmalarından kaynaklanmış olabilir. Bu sonuçlar Ünlütürk ve ark.(142) 'nin elde ettiği sonuçlarla benzerdir.

Kefir örneklerinde koliform grubu bakteriye rastlanmadı. Poulet ve ark.(102) laktik streptokok grubu bakterilerin koliform grubu bakteriler üzerine inhibitör etkili olduklarını belirtmişlerdir. Rosi ve Rossi (113) kefir florasında Enterobacteriaceae familyasının kontamine flora oluşturduğunu belirtmiş ve normal kefir florasında olmaması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

Enterokokların sayısı muhafaza boyunca azaldı. Bunda en önemli etkenin fermantasyonda asitliğin hızla yükselmesi, düşük pH değeri ve laktobasillerin baskılayıcı özelliğinin olduğu sanılmaktadır.

Diğer bazı bakterilerin yanında kefirin normal florası olarak kabul edilen kefir florasından *Leuconostoc paramesenteroides* identifiye edildi. Rosi ve Rossi (113) *Leuconostoc ssp*, asetik asit bakterileri (*Acetobacter ssp.*) ile

Enterobacteriaceae familyası üyelerinin kefir tanesinde bulunabileceğini fakat bunların kefirin normal florası olmadığını ileri sürmüşlerdir. Buna karşın birçok araştırmacı (4, 43, 73, 98, 114), löykonostok ve asetik asit bakterilerinin kefirin doğal florası olduğunu belirtmişlerdir. Kefir florasını inceleyen Libudzsiz ve ark.(76) *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*; Angulo ve ark.(4) *Leuconostoc ssp.*; Lin ve ark. (77) *Leuconostoc mesenteroides*; Ergüllü ve Üçüncü (26) *Leuconostoc cremoris* ve *Leuconostoc mesenteroides*; Bavina (14) *Leuconostoc dextranicum*'u tanımlamışlardır.

Kefir örneklerinde fekal streptokoklara rastlanmadı. Toba ve ark.(151), Takizawa ve ark.(126), Garrote ve ark.(30), Hosono ve ark.(43) kefirde *Streptococcus faecalis* identifiye etmişler ve bunu hijyen kurallarına uyulmamasına bağlamışlardır. Birçok araştırmacının (65, 82, 112) da identifiye ettiği gibi bu araştırmada *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus avium* identifiye edildi. Kunath ve Kandler (65), Rosi (112), Marshall ve ark.(82) streptokokları kefir tanelerinden izole etmiş fakat kefirde bulamamışlardır. Buna karşın Toba ve ark.(137), Takizawa ve ark.(126), Garrote ve ark.(30) kefirde streptokok cinsi izole etmişlerdir. Ergüllü ve Üçüncü (26) *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris*; Bavina (14) *Streptococcus lactis*, Karagözlü (51) *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecalis*, Libudzsiz ve ark. (76) *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus filent*; Yaygın (145) *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus faecalis*; Marshall ve ark. (82) *Streptococcus lactis*, identifiye etmiştir.

Kefir florasında yüksek sayıda laktobasil ssp. izole edildi. Hosono ve ark. (43) *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, identifiye etmiş fakat çoğu araştırmacının identifiye ettiği *Lactobacillus kefir*'i identifiye edememiştir. Pidoux ve ark. (99) *Lactobacillus casei ssp. casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus hilgardi*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus buncheri* identifiye etmişlerdir. Marshall ve Cole (80) ise sadece *Lactobacillus brevis*, Michelli ve ark. (84) *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*; Garrote ve ark. (30) *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* ve *Lactobacillus parakefir* bulmuşlardır.

İdentifikasyonda, Yaman (145)'ın kefir tanelerinden tanıfıye ettiği ve diğer çoğu araştırıcı (30, 81, 98, 137)'nın kefir tanesinde veya kefirde tanıfıye ettiği *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus delbruencki* tanıfıye edilemedi.

İdentifiye edilen suşlardan biri de *Lactobacillus cellobiosis*'dir. Libudzisz ve ark. (76), Kwak ve ark. (70) kefirde *Lactobacillus cellobiosis* tanıfıye etmiştir.

Kefirde yüksek oranda *Lactobacillus casei* bulundu. Molska ve ark. (85) kefir tanesinde yaptıkları mikrobiyolojik analizlerde *Lactobacillus casei* tanıfıye ederken kefirde bu suşu tanıfıye edememişlerdir.

Çalışma süresince bazı araştırıcıların (75,144) da belirttiği gibi laktobasillerin identifikasyonunda birçok zorlukla karşılaşıldı. Laktik asit bakterileri ve mayaların simbiyotik bir ortam oluşturduğu kefirde laktobasillerin izolasyonunda, mayaları baskılamak için besiyerine katılan cycloheximide katılmadığı için izolatların seçiminde yoğun maya remesinden dolayı zorluklar yaşandı. Araştırıcıların bir kısmı izolasyon besiyerinde cycloheximide kullanırken (77, 78, 101) bazı araştırıcılar ise kullanmamışlardır (1, 20, 30, 80, 82, 99, 122, 136, 145, 149).

MRS Agarın ve özellikle Rogosa Agarın pH'sının düşük olması laktik asit bakterileri için bir avantaj olduğu gibi aynı zamanda mayalar içinde iyi bir ortam oluşturmaktadır. Bu yüzden cycloheximide katkısının dışında MRS Agar ve Rogosa Agarın laktobasiller için çok selektif bir besiyeri olmadığı gözlendi. Gram negatif bakterileri ve mayaları baskılayabilecek, laktik asit bakterileri için tam selektif bir besiyeri bulunmaması identifikasyonda gklere neden oldu.

İzolatların saflaştırılması aşaması hijyene ve tüm saflaştırma kurallarına uyulmasına rağmen çok zaman aldı. Bazı suşlarda 9-10 kez saflaştırma yapıldı. İzolatların muhafazasında 5 °C'de muhafaza edilen suşların bir kısmı canlılığını yitirdi. Salama ve ark.(116)'nın yaptıkları çalışmada benzer bir durumla karşılaşmış, izole ettikleri suşların bir kısmının buzdolabında canlılığını yitirdiğini bildirmişlerdir.

Zayıf üreyen laktobasiller Pidoux ve ark.(99)'nın önerdiği şekilde Yeast Glukoz brothta üretildi. Daha sonra Yeast Glukoz yatık agar da muhafaza edildi. Bazı suşların üremesini güçlendirmesine rağmen bu besiyeri yine de zayıf üreyen diğer suşlar için etkili olmadı.

Laktobasillerin inkübasyon süresi oldukça uzun olduğundan çalışma süresi de uzadı. İnkübasyonun başında maya-laktik asit bakteri kolonilerini birbirinden ayırmak zor olduğundan ancak inkübasyonun 5-6. günü maya kolonilerinin büyümesi ile ayırım sağlandı. Bazı laktobasil kolonilerinde inkübasyon süresi ne kadar uzatılırsa uzatılsın koloni çapında artış olmadı. Bazı suşlar ise çok zayıf üreyip besiyeri yüzeyini belli belirsiz sıvı bir tabaka halinde kapladı. Bu suşların çoğunun izolasyonu zor veya başarısız oldu.

İdentifikasyonda kültürel yöntem kullanan çoğu araştırmacılar (4, 30, 77, 99, 101) kriter olarak Bergey's Manual'i göstermiştir. Laktobasillerin ayırımında temel testlerden biri olan karbonhidrat testleri kültürel yöntemler için yetersiz kalmıştır. Zaten bu test için API test kiti hazırlanmıştır. Bunun dışında bu çalışmada kullanılan ve bazı araştırmacıların kullandığı identifikasyon test sonuçlarını toplu olarak gösteren geçerli bir kaynak bulmakta zorluk çekildi.

İzole edilen çoğu suş var olan kaynaklarda verilen Laktobasil türlerinin özelliğine uymadığı için elimine edildi. Oysa kültürel yöntemde kullanılabilecek testleri ve bu testlerin sonuçlarını gösteren detaylı ve geniş bir kaynak olsaydı çok daha fazla suş identifiye edebilme şansı doğabilirdi.

Kefir örneklerinde pH değeri ile titrasyon asitliği arasındaki ilişki incelendiğinde, pH değeri düştükçe titrasyon asitliğinin artması Aerobik mezofilik mikroorganizmaların ve laktik streptokokların üremesinin yavaşlamasına, Laktobasil- Lökönostok- Pediokok grubu bakterilerin ortama hakim olarak, diğer mikroorganizmaları baskılamasına böylece laktik asit üretiminin artarak pH'nın düşmesine bağlanabilir. Bu veriler İşleyici (54) ve Özalp (109)'in peynirlerde yaptıkları çalışmalarında bildirdikleri sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Freitas ve ark.(27)'nin da belirttiği gibi olgunlaşma boyunca muhafaza süresinin 24. saatinde özellikle titrasyon asitliğindeki hızlı artış, bu saatte laktik streptokokların sayılarının azalması, ve muhafaza süresinin artmasıyla Laktobasil- Lökönostok- Pediokok grubu bakterilerinin sayılarında artış görülmesi Laktik streptokokların Laktobasil- Lökönostok- Pediokok grubu bakterileri kadar yüksek asitlik derecelerini iyi tolere edemediklerine bağlanabilir.

Kefir örneklerinden A grubu kefirde yağ miktarında bir değişiklik gözlenmedi, fakat diğer iki grupta yağ miktarında azalma görüldü. Karagözlü (51) ve Tavlaş (131) yaptıkları çalışmada kefir kültürü ile ürettikleri kefirlerde yağ miktarında hiçbir değişme olmadığını fakat tane ile yaptıkları üretimlerde yağ miktarında kayıp olduğunu belirtmişlerdir.

Muhafaza boyunca farklı sürelerde yapılan kimyasal ve mikrobiyolojik analizler kefirde fermantasyonun muhafaza boyunca sürdüğünü göstermiştir. Bu durum Lin ve ark. (77) ile Atasever ve ark.(13)'mın belirttiği verilerle benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak analiz edilen kefir örneklerinde identifiye edilen türlerin tanenin orjinine ve üretimde kullanılan yöntemlere bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. Bu konuda yapılacak çalışmaların kefirin temel florası yanında farklı florasını belirlemede ve bu farklılığın kefirin probiyotik özelliğine ne yönde etkide bulunabileceği araştırılmalıdır. Fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan birçok suşu içermesi ve probiyotik nitelik taşıması açısından kefir önemli fermente süt içeceğidir. Ülke halkının sağlığı ve doğru beslenmesi bakımından kefirin tanıtımının çok iyi yapılması gerekmektedir. Diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde endüstriyel üretim için çalışmaların yapılmasında yarar vardır.

5. ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye’de üç farklı ilden alınan kefir tanesi ve bu tanelerden elde edilen kefir kültürü ile mayalanan kefirlerin mikrobiyal florası belirlendi ve laktobasil cinsi bakteriler identifiye edilmeye çalışıldı. Aynı zamanda kefir örneklerinde asitlik ve pH değişimi ile laktik flora arasındaki ilişki araştırılıp, kefirin nitelikleri belirlenmeye çalışıldı.

Kefir üretiminde %3 yağlı UHT steril süt kullanıldı. Kefir üretimi geleneksel yöntem kullanılarak yapıldı. Sütler 500 ml’lik 6 tane steril erlene 100 ml dağıtıldı. Sütler 25°C’ye kadar ısıtıldıktan sonra 3 erlen %5 oranında kefir taneleri ile mayalandı, geri kalan 3 erlen ise %3 kefir kültürü ile mayalanıp 25±1 °C’de, 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pıhtı karıştırıldıktan sonra taneler steril bir süzgeç yardımıyla pıhtıdan ayrıldı ve steril su ile yıkandı. Kefir 14-16 °C’ye soğutulduktan sonra 5±1°C’de olgunlaşmaya bırakıldı.

Kefir kültürü ve kefir tanelerinden elde edilen kefirde, farklı morfolojide koloni izole etme şansını arttırabilmek amacıyla farklı muhafaza süreleri kullanıldı. Muhafaza süresinin 12. 24. ve 36. saatlerinde ekimler yapıldı ve bu işlem 7 kere tekrarlandı. Dilüsyon sıvısı olarak ¼ Ringer solüsyonu kullanıldı.

Laktobasillus, Löykonostok, Pediokokkus Bakterileri Sayımı için % 2 laktoz ilaveli MRS Agara ve Rogosa Agar ekim yapıldı. Laktik streptokokların sayımı için M17 Agara ekim yapıldı. 30°C’de 5-7 gün inkübe edildi. Kefirlerde ayrıca Toplam Mezofil Aerobik Bakteri, Maya-küf, Enterokok ve Koliform Grubu Bakteriler de araştırıldı.

İnkübasyon sonrası MRS, Rogosa ve M17 agarda görülen tüm farklı koloniler alınarak klasik yöntemler ve API test kitleri kullanılarak identifikasyona gidildi. Bunun yanında kefirde fermantasyon boyunca asitlik ve pH değişimi incelendi.

Fermantasyon boyunca pH değeri düşerken, asitlik arttı. Mikrobiyolojik analizler sonucu kefirde kontaminasyonun işareti sayılan koliform grubu bakteriye rastlanmadı, enterokok sayısı ise fermantasyonun ilk saatlerinde artmasına karşın fermantasyon süresi ilerledikçe artan yüksek asitlik nedeniyle baskılandı. Farklı

bölgelerden orjin alan 3 kefir örneğinde de laktobasil-maya oranları farklı bulundu. Bunun tanenin orjinine ve üretim metotlarına bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. Yapılan identifikasyon testleri sonucunda kefirde, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc paramesenteroides* identifiye edildi.



6. SUMMARY

In the present study, microbial flora of kefir grains obtained from three cities and kefir made by using kefir cultures which were prepared from these kefir grains were investigated. Lactobacilli isolated from these samples were identified. Additionally, the relation between acidity and pH, and lactic flora were monitored to determine the quality of kefir.

UHT sterile milk containing 3% fat was used and kefir was made by traditional method. Sterile milk was distributed into six 500 ml bakets in quantities of 100 ml and heated to 25°C. subsequently, milk in 3 bakets were inoculated with 5% kefir grains and rest of milk in 3 bakets were inoculated with 3% kefir culture. They were incubated at 25±1°C for 20 hours. End of incubation, kefir was mixed and kefir grains were regained by using a sterile sieve. Kefir grains were cooled to 14-16 °C and was stored at 5±1°C for ripening.

To increase the chance of isolation of different colonies that have different morfologies, kefir was stored at different time periods. Kefir samples were taken at 12, 24, and 36 hours and were plated on agar. This procedure was repeated seven times. ¼ Ringer solution was used as diluent. MRS containg 2% lactose and Rogosa Agar were used to isolate lactobacillus, leuconostoc and pediococcus bacteria. Lactic streptococcus were counted on M17 Agar. Incubation was carried at 30°C for 5-7 days. Also, total mesophilic aerobik bacteria, yeast-fungi, enterococ and coliform group bacteria were investigated.

After incubation, colonies appeared with different colonies on MRS, Rogosa and M17 Agar were chosen for identification using classic methods and API test. Also, the acidity and pH of kefir during fermentantion were monitored.

During fermentantion pH decreased while acidity increased. Microbial examination of kefir samples did not shour any coliform group bacteria which is considered as a sing of contamination. Although number of enterococ bacteria increased during the begining of fermentantion, their numbers were suppress in the end of fermentantion due to high acidity. The rates of lactobacilli- yeast in the 3 different kefir samples were found to be varried.

This was observed depending on the origin of kefir grains and the methods used to make kefir. *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc paramesenteroides* were identified.



7. KAYNAKLAR

1. **Abraham A.G., Antonı G.L.D.:** Characterization of kefir grains grown in cows' milk and soya milk. *J. Dairy Res.* 66: 327-333, 1999
2. **Aıkman, L.:** Nature's Healing Arts. National Geographic Magazine Special Publication, Div. Washington, 1977
3. **Anderson, J.W., Gilliland S.E.:** Effect of fermented milk (Yoğurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Ame. Coll. Nutr.* 18(1): 43-50, 1999
4. **Angulo, L., Lopez, E., Lema, C.:** Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-west of Spain), *J. Dairy Res.* 60: 263-267, 1993
5. **Anon:** Cheese, Cheese products and fermented milk. Universty of Reading Food Science and Technology Department, Reading England. 65s., 1978
6. **Anon:** Dairy handbook, Alfa Laval AB. Sweden. 301s., 1980
7. **Anon:** Microbiologie Tierischer Labensmittel Verlag Harri Deutsch. Thun. Frankfurt, 211-217, 1981
8. **Anon:** The Oxoid Manual, 7th. Ed., Compiled by E.Y. Bridson., Published by Unipath Limited, Academic Pres, 197-198, Hampshire, England, 1995
9. **Arçelik, M., Kamuran, A., Çaker, İ., Doğan, H. B., ve ark.:** Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Böl. 2. baskı. Sim Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara, 2000
10. **Antonov, N. I. Merkulova, N. G., Klimova, V. I., D'yakova, L. M.:** Method of prepuring fruit kefir "Alınmıştır" *FSTA* 1980 : 12(10):166, 1979
11. **Arda, M.:** Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayın No: 402, (3.baskı), s.1-531, Ankara, 1985
12. **Arıpov, O. T.:** Effect of biolakt enriched in vitamins and trace elements on immunobiological reactivity of preschool children, *Zdravookhranenie Kirgizii* 1978 No: 3 (28-31), "Alınmıştır" *D.S.A.* 1980 (42) 2 (1206), 1978
13. **Atasever, M., Uçar, G., Köse, Z.:** Muhafaza süresinde kefirin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal niteliklerinde değişiklikler. *Tarım Bakanlığı Yayınları.* No: 132, 2002

14. **Bavina, N. A.:** Quantitative characteristics of the microflora of kefir cultures, *Moloch. Prom.* 32 (2):18-19, 1971
15. **Bondarev, V. YA.:** Effect of heat-treatment on the quality of acid coagulum (kefir). *Moloch. Prom.* 1977. No: 5, 29-30 "Alınmıştır" D.S.A. 1977 (39) 11 (6251), 1977
16. **Bottazzi, V. and Bianchi, F.:** A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule, *J. Appl. Bact.*, 48:265-268, 1980
17. **Bottazzi, V., Zacconi, C., Sara, P.C.:** Kefir: Microbiologica, chimica e tecnologia. *Ind. Latte* 30: 40-62, 1994
18. **Brashears, M.M. Gilliland S.E., Buck, L.M.:** Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 81: 2103-2110, 1998
19. **Cevikbaş, A, Yemni E, Ezzedenn F.W., Yardimici T., Cevikbas U, Stohs S.J.:** Antitumoral antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother Res* 8: 78-82, 1994
20. **Dave R.I. and Shah, N.P.:** Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* 79: 1529-1536, 1996
21. **Demeter, K. J. :** *Lactobacteriology* pp.217-218 Zaragoza : Acribia,1969
22. **Demirci, M. Şimşek, O.:** Süt İşleme Teknolojisi. Hasad Yayıncılık Ltd. Şti. İstanbul, 1997
23. **Dmitrichenko, M.:** Microstructure and composition of kefir grains (Lecture). (Kemerovski Tekh. Inst. Pishchevoi promyshlennosti, Kemerovo, Former USSR) pp34-46, 1976
24. **Drathen, M.:** Untersuchungen zur mikrobiologischen ernährungsphysiologischen und sensorischen qualitätsbeurteilung von kefir. In: Reihe Milchwissenschaft. Vol 4 (Eds. E. Renner) pp. 8-11. Gieben: B. Renner, 1987
25. **Duitschaever, L.C., Kemp, N. Emmons, D.:** Comparative evaluation of five procedures for making kefir. *Milchwissenschaft* 43(6): 1988
26. **Ergüllü, E., Üçüncü, M.:** Kefir mikroflorası üzerinde araştırma. *Gıda Tekn. Derg.* 8(1): 3-10, 1983

27. Freitas, A. C., Pais, C., Malcata, F.X., Hogg, T.A.: Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. *J. Food Prot.* 59(2):155-160, 1996
28. Fujisawa, T., Adachi, T., Toba, T., Arihara, K., and Mitsuoka, T.: *Lactobacillus kefirifaciens* sp. nov. isolated from kefir grains, *Int. J. of Syst. Bact.*, 38:12-14, 1988
29. Furukawa, N., Matsuoka, A., Yamanaka, Y.: Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.* 43: 450-453, 1990
30. Garrote, G. L., Abraham, G. A., and De Antoni, G. L.: Preservation of kefir grains, a comparative study, *Lebensm-Wiss. U. Tech.*, 30: 77-84, 1997
31. Garvie, E.J. : Genus *Leuconostoc*: In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2 (Eds P.H.A. Sneath N.S. Mair and M.E. Sharpe) Baltimore, MD: Williams and Wilkins pp 1071-1075, 1986a
32. Garvie, E.J. : Genus *Pediococcus*: In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2 (Eds P.H.A. Sneath N.S. Mair and M.E. Sharpe) Baltimore, MD: Williams and Wilkins pp 1075-1079, 1986b
33. Gawel, J., Gromadka, M.: Chemical changes during fermentation and ripening of kefir. 20 th. Int. Dairy Cong. France 1978. Published by Congilait ; Paris Vole (839-840) ,1978
34. Georgantas, S.: Microbial flora of Greek kefir *Lettl* 44(8):568-570 "Alınmıştır" D.S.A. 1972 (34) 7 (3289) ,1970
35. Gerhard, J. H.: Alcoholic beverages and fermented foods, In *Industrial Microbiology*, pp.165-191 ,1976
36. Halle, C., Leroy, F., Dousset, X., et all.: Les Kefirs: des associations Bacteries Lactiques-Levures In *Bacteries Lactiques: Aspects Fondamentaux et Technologies*, Vol.2 Fm Luquet, Uriage, France, 169-182, 1994
37. Hardie, J. M.: Genus *Streptococcus*: In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2 (Eds P.H.A. Sneath N.S. Mair and M.E. Sharpe) Baltimore, MD: Williams and Wilkins pp 1043-1071, 1986
38. Harrigan, W. F. and McCance, M. E.: *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press Inc. Ltd., London, 1976

39. **Hartmann, P. A. and La Grange, W. S.:** Coliform bacteria. In: G.H. Richardson. (Editor), Standart Methods for the Examination of Dairy Products. 15th Ed. A.P.H.A. Washington, 1985
40. **Herich, R., Leukut, M.:** Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Vet. Med.- Czech 47(6):169-180, 2002
41. **Hirota, T., and Kikuchi, T.:** Studies on kefir grains. I. Isolation and classification of microorganisms from kefir grains and their characteristics, Reports of research of snow brand milk products Co. Laboratory No: 74: 63-82, 1976
42. **Hooliman, K.L.:** Prophylactic and therapeutic use of probiotics: A review. J. American Dietetic Assoc., 1001(2): 229-241, 2001
43. **Hosono, A., Tanabe, T., and Otani, H.:** Binding properties of lactic acid bacteria. Isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates, Milchwissenschaft, 45: 647-651, 1990
44. **İnal, T.:** Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi . Final Ofset, İstanbul, 558-566, 1990
45. **İşleyici, Ö.:** Otlı peynir mikroflorasındaki laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve bu peynir yapımında kullanılabilecek starter kültürlerin tespiti. Doktora tezi. Yüztüncü Yıl Üniv. Fen Bil. Enst. Gıda Müh. AB. 1999
46. **İwasawa, S, Ueda, M., Miyata, N., Hirota , T. , Ahiko K.:** Identification and fermentation character of kefir yeast. Agric. Biol. Chem., 46 2631-2636, 1982
47. **İzmen, E. R.:** Süt ve mamülleri bilgisi ders kitabı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları 63, D.K. 28:(229-231) Ankara, 1995
48. **Kandler, O., Kunath, P.:** Lactobacillus kefir sp. nov., a component of the microflora of kefir. Syst. Appl. Micro. 4, 286-294
49. **Kandler, O., Weiss N.:** Genus Lactobacillus: In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2 (Eds P.H.A. Sneath N.S. Mair and M.E. Sharpe) Baltimore, MD: Williams and Wilkins pp 1209-1234, 1986
50. **Kaptan, N.:** Toplum sağlığında kefirin önemi. Bil. Tek Derg. 176 (33) 33-35, 1982
51. **Karagözlü, C.:** Farklı ısı işlem uygulanmış inek sütlerinden kefir kültürü ve kefir tanesi ile üretilen kefirlerin dayanıklılığı ve nitelikleri üzerine araştırmalar. Y.Lisans Tezi. Ege Üniv. Fen Bil. Enst. 1990

52. Kemp, N.: Kefir, The champagne of cultured dairy products. *Cultured Dairy Products Journal* 19(3): 29-30, 1984
53. Kılıç, S. : Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Yardımcı ders kitabı. Ege Üniv. Ziraat Fak. yayınları No: 542, Bornova-İzmir. 2001
54. Kılıç, S., Güre, A., Akbulut, N.: Kefirin invivo koşulda bağırsak florası ve canlı ağırlık artışına etkisi. XII. Biyoteknoloji kongresi, 17-21 Eylül 2001 Bildiri Özeti. Ayvalık/ Balıkesir, 1996
55. Klupsch, H.J.: Method for producing kefir. German Federal Republic Patent Application (1984) DE 3300122A1 "Almmıştır" D.S.A. 1985 (47) 7 (3913), 1984
56. Konar, A., Şahan, N.: İnek, keçi ve koyun sütlerinden üretilen kefirlerin özellikleri ve bu özelliklere olgunlaştırma süresinin etkisi üzerine bir araştırma. Bursa I. Uluslararası Gıda Semp. 184-197, 1989
57. Kooiman, P.: The structure of kefiran, The water-soluble polysaccharide of kefir grain, *Carbohydr. Res.*, 7:200-211, 1968
58. Koroleva, N.S.: Technology of Kefir and Kumys starters. *IDF Bulletin*. No 227, (96-100), 1988
59. Koroleva, N. S.: Starters for fermented milks. Section 4 : Kefir and kumys starter. *Bulletin of the IDF 227, Chap. 2. International Dairy Federation, Square Vergotte, Brussels, Belgium, 1998*
60. Koroleva, N. S. und Bavina, N. A.: Empfehlungen für die Züchtung von kefir pilzen zur herstellung von kefir kultur und kefir. *Moloc. Prom. Moskva* 8: 43-44, 1975
61. Korolava, N.S., Bavina, N. A., Rohkova, I.V.: Changes in the microflora of kefir of during storage XX. *Int. Dairy Cong France-1978 Publishing by Congrailit Paris 1978 Vol. E. (844), 1978*
62. Kosikowski, F. V.: Cheese and fermented products 2nd End. Pp. 40-41. *Ann Arbor. Michigan: Edwards Brother Inc, 1977*
63. Kramkowska, A. , Kornacki, B. Bauman, B., Fesnak, D.: XXI *Int. Dairy Congress* 1, 304, 1982
64. Kroger, M.: Kefir. *Cultured Dairy Prod. J.* 28: 26-29, 1993
65. Kunath, P., Kandler, O.: Symposium on lactic acid bacteria in foods, Wageningen, The Netherlands , 1983

66. Kuo, Y. C., Lin, C. W.: Taiwanese kefir grains: Their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Aust. J. Dairy Technology*, 54(1): 19-35, 1999
67. Kurman, J. A.: The production of fermented milks in world. II. Aspects of the production of fermented milks., *IDF Bulletin*, 179, 16-26, 1984
68. Kurman, J.A., Rasic, J. L., Kroger, M.: *Encyclopedia of fermented fresh milk products*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992
69. Kurt, A., Çakmakçı, S. Çağlar, A.: *Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metodları Rehberi*. Atatürk Üniv. yayınları no: 252/d. Erzurum. 238 s., 1993
70. Kwak, H. S. Park, S. K. and Kim, D. S.: Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *J. Dairy Sci.* 79, 937-942, 1996
71. La Riviere, J. W.: Ecology of yeasts in kefir grain, *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 35 (suppl.) D15-D16, 1969
72. La Riviere, J. W. M.: Studies on kefir grain. *Journal of General Microbiology*, 31, 5. (Proceedings of the Society for General Microbiology), 1963
73. La Riviere, J. W. M., Kooiman, P. and Schmidt, K.: Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Microbiol.* 59: 269-278, 1967.
74. Leroi F. and Pidoux M.: Detection of interactions between yeast and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Bact.* 74: 48-53, 1993
75. Lılı, J. A. P. Moon N. J.: Kefir-A "new" fermented milk product. *Cultured Dairy Products Journal*. (August-1983) 11-12, 1983
76. Libudzisz, Z. and Piatkiewicz, A.: Kefir production in Poland. *Dairy Ind. Inter.* 55 (7). 31-33, 1990
77. Lin, C.W. Chen, L.H., Liu, J. R.: Identification and characteristics of lactic acid bacteria and yeast isolated from kefir grains in Taiwan. *Aust. J. Dairy Tech.* 54: 5-9, 1999
78. Lopez, S., Moya, B.: Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. *L. Appl. Micro.* 25: 233-238, 1997
79. Marshall, V. E. M.: The microflora and production of Fermented milks. *Prog. Und. Microbiol* 23:1-44, 1986

80. Marshall, W. M., Cole, W. M.: Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *J. Dairy Res.* 52: 451-456, 1985
81. Marshall, V. M., Cole, W. M. and Broker, B.E.: Observations on the structure of kefir grains and the microflora. *J. App. Bact.* 57, 491-497, 1984
82. Marshall, V. M., Cole, W. M., and Farrow, J. A. E.: A note on the heterofermentative lactobacillus isolated from kefir grains, *J. Appl. Bact.*, 56, 503-505, 1984
83. Metin, M., Tavlaş, B.: Kefir tanesi ve kefir kültürü kullanılarak üretilen kefirlerin kalitesi üzerine olgunlaştırma koşullarının etkisi. *Ege Üniv. Müh. Fak. Derg Seri B. Gıda Müh.* 4(1):51-68, 1986
84. Michelli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., Crescenzi, V.: Isolation and characterisation of ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Appl. Microbiol Biotech.* 53: 69-74, 1999
85. Molska, I., Moniuszko, I., Komorowska, M., and Merilamen, V.: Characteristics of bacilli of *Lactobacillus casei* species appearing in kefir grains, *Acta Aliment. Polon.*, vol. IX (XXXIII), No: 1-4, 79-88, 1983
86. Muir, D. D. , Tamime, Y.A., Wszolek, M.: Comparison of sensory profiles of kefir, buttermilk and yoğurt. *Int. J. Dairy Techn.* 52 (4): 129-134, 1999
87. Mukai, T., Toba, T, Itoh, T., and Adachi, S.: Structural microheterogeneity of kefiran from kefir grains, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 59 (2): 167-176, 1988
88. Mukai, T., Toba, T., Itoh, T., and Adachi, S.: Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lact. Kefiranofaciens* K1, *Carbohydr. Res.* 204: 227-232, 1990
89. Mukai, T., Watanabe, N., Toba, T., Itoh, T, Adachi, S.: Gelforming characteristic and rheological properties of kefiran. *J. Food Sci.* 56: 1017-1026, 1991
90. Nielsen, F.S. und Nielsen P.S.: Herstellung von kefir die molkerei-zeitung welt der milch. 22: 850-852, 1968
91. Nielsen, F.S. und Nielsen, P.S.: Kefirmilch Molkerei und Kaeserei-Zeitung 19: 383-384, 1968
92. Nighswonger, B. D., Brashears M.M. and Gililand, S.E.: Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* 79:212-219, 1996

93. **Novil, S.:** Kefir, Lifeway Foods, Inc, 7625 N. Austin Ave. Skokie, IL 60077, USA, Personal Communication, 1998
94. **Oberman, H.:** Fermented milks B.J.P. Wood Microbiology of fermente foods. Elsevier AppliedSciemle Publishers London and Newyork s.167-195 ,1986
95. **Ottagalli, G., Galli, A., Resmini, A., and Volontero, P.:** Microbiological and chemical composition and ultrastructure of kefir grains, *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 23: 109-121, cited by Molska, I., Momuszko, I, 1973
96. **Özalp, E.:** Salamuradaki tuz miktarının inek sütü ile yapılan beyaz peynirler üzerine etkisi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 26(3-4): 260-275, 1979
97. **Petterson, H.E., Christiansson, A., Ekulund, K.:** Making kefir without grains. *Scan. J. Dairy Techn. and Know-How* NM 2-85
98. **Pidoux, M.:** The microbial flora of sugary kefir grain. The gingerbeer plant. Biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *Mircen J. Appl Micro. and Biotech.* 5: 223-238, 1989
99. **Pidoux, M., Marshall, V. M., Zanon, P. Broker, B.:** Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *J. Appl. Bact.* 69: 311-320, 1990
100. **Piechocka, M. Holmen, T. B., Abrahamson, R. K.:** Heat treatment, homogenization and incubation of milk for production of kefir, of various fat levels. *Nordevropaeisk Mejeri Tidsskrift* 10:334-344, 1977
101. **Pintado, M.E., Lopez Da Silva, J. A., Fernandes, B. P., Malcata, F. X., and Hogg, A. T.:** Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains, *Int. J. Food Sci. and Tech.*, 31: 15-26, 1996
102. **Pouillet, B., Huertas, M., Sanchez, A., Caceres, P., Larriba, G.:** Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Caceres cheese. *J. Dairy Res.*, 60:123-127, 1993
103. **Rao, D.R., Chawan, B.C., Pulusani, S.R.:** Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rats. *J. Food Sci.* 46(1339), 1981
104. **Rehm, H. J.:** Starter cultures for other purposes, In *biotechnology*, Vol 3, 203-208 (Eds H. J. Rehm and V. CH. Reed), Weinheim: Verlag Chemie, 1983

105. Renner, E., Renz-Schauen, A.: Nahrwerttabellen für Milch und Milchprodukte Verlag B. Renner, 6330 Gießen, W. Germany, 1986
106. Robinson, R.K., Tamime, A. Y.: Microbiology of fermented milks. Dairy Microbiology Vol.2. (245-278) Appl. Sci. Pub. London, New York, 1981
107. Robinson, R. K. and Tamime, A.Y.: Microbiology of fermented milks, In: Dairy Microbiology- The microbiology of milk products, Vol.2, 2nd., ed. Robinson, R.K., Elsevier Science Publishers, London, pp. 291-343, 1990
108. Roginski, H.: Fermented Milks, The Aust. J. Dairy Techn. November. Review Article, 1988
109. Roissart, H. and Luquet, F. M.: Bacteries Lactiques II. Loriga Chemin de Saint Georges f- 38410 Uriage ISBN : 2- 9507477-0-1 614 s., 1994
110. Rolfe, R.D. : The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. Symposium: Probiotic Bacteria J. Nutr. 130: 369-402, 2000
111. Rosi, J.: The kefir micro-organisms : Acetic acid bacteria . Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria 29: 221-227, 1978
112. Rosi, J.: The kefir micro-organisms: The yeasts. Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria 29:59-67, 1978
113. Rosi, J., Rossi, J.: The kefir micro-organisms: The lactic acid bacteria. yeasts. Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria 29: 291-305, 1978
114. Rossi, J., Gobbetti, M.: (Multistarter for making kefir by continuous process) Annali di Microbiologia e Enzimologia 41:223-226, 1991
115. Ryan, M.P., Rea, M. C., Hill, C., Ross, R.P.: An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Appl and Environ. Micro, 62: 612-619, 1996
116. Salama, M.S., Musafija-Jeknić, T., Sandme, W.E. and Giovannoni, S. J.: Ecological study of lactic acid bacteria. Isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. J. Dairy Sci., 78:1004-1017, 1995
117. Saloff-Coste, C. J.: Kefir. Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. Danone world Newsletter 11: 1-7, 1996
118. Schulz, M. E.: 100 Jahre kefir in nordeuropa und die heutige bedeutung der kefir- sauermilch. Deutsche Molkerei- Zeitung 13:489-492, 1968

119. Sert, S.: Genel mikrobiyoloji Laboratuvar Notları. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Ders Yayınları No: 138, A.Ü.Z.F. Ofset Tesisi. Erzurum, 1992
120. Sezgin, E.: Fermente süt ürünlerinin besin değeri ve insan sağlığı açısından önemi. Ulusal Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu MPM No: 394,1989
121. Sezginer, A.: Kefirin hikayesi. Bilim Teknik Dergisi. 13(151):37-39, 1986
122. Shah P.N.: Symposium :Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J Dairy Sci. 83:894-907, 1999
123. Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., and Arıbara, K.: Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. Jpn. Med. Sci. Biol. 35: 75-80 , 1982
124. Shmeleva, L.I., Yakovlev, D.A.: Ver fahren der kefir herstellung. Russ. Patent: 180949. Milk Industry 62 (5): 26-28, 1968
125. Şahan, N.: İnek ve koyun sütlerinden üretilen kefirlerin özellikleri ve bu özelliklere olgunlaştırma süresinin etkisi üzerinde bir araştırma. Y. Lisans Tezi Çukurova Üniv. Fen Bil. Enst. Tarım Ürünleri Tekn. ABD.Adana, 1987
126. Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y., Nakase, T.: Lactobacillus kefirgranum sp. nov. And lactobacillus parakefir sp. nov., Two new species from kefir grains. Int. J. Syst. Bact. V44 (3):435-439, 1994
127. Tamai, Y., Yoshimitsu, N., Watanabe, Y., Kuwabara, Y. and Nagai, S.: Effects of Milk fermented by culturing with various Lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. J. Fermentation and Bioengineering. 81(2): 181-182, 1996
128. Tamime A Y and Marshall V M E: Microbiyology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, pp 57-152. Law B A , ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997
129. Tamime A Y, Muir D D and Wszolek M: Traditional fermented milks-kefir, koumiss and kishk. Dairy Indust. Inter 64 (5): 32-33, 1999
130. Tamime, A. Y. and Robinson,R. K.: Fermented milks and future trends. Part II. Technological aspects. Review Article, J. Dairy Res., 55: 281-307, 1988
131. Tavlaş, B.: Kefir Tanesi ve Kültürü kullamlarak üretilen kefirlerin kalitesi üzerine olgunlaştırma koşullarının etkisi. Y. Lisans Tezi. Ege Üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Böl. İzmir, 1986

132. Tekinşen, O. C., Atasever, M.: Süt ürünleri üretiminde starter kültür. Selçuk Üniv. Vet. Fak. Yayın Ünitesi, Konya , 1994
133. Temiz, A.: Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri., 2. Baskı, Hatipoğlu Yayınevi, s. 1-405, Ankara, 1994.
134. Thomsen, H.: Kefir, das moussierende Sauermilch – getraenk. Deutsche Molkerei - Zeitung 4 :1379-1381, 1950
135. Thoreux, K., Schmucker, D.L.: Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. The J. Nutr. 131(3) 807-812, 2001
136. Toba, T., Arihara, K., and Adachi, S.: Comparative study of polysaccharides from kefir grains, an encapsuled homofermentative Lactobacillus species and Lactobacillus kefir, Milchwissenschaft, 42 (9): 565-568
137. Toba, T., Uemura, H., Mukai, T., Fuji, Y., Itoh, T., and Adachi, S.: A new fermented milk using capsular polysaccharide producing Lactobacillus kefiranofaciens isolated from kefir grains. J. Dairy Res. 58, 497-502,1991
138. Toklu, Ş. : Süt Şampanyası, Kefir. Gıda Derg. Dünya Yayıncılık, 99/6, 51-53, 1999
139. Terzaghi, B., Sandine, W. E.: Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol 29:807-813, 1975
140. Tunail, N. ve Köşker, Ö.: Süt Mikrobiyolojisi , A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1116, 138s., Ankara, 1986
141. Üçüncü, M.: Süt içkilerinin toplum sağlığı ve Türkiye sütçülüğündeki yeri ve önemi. Gıda Fak. Derg. 1: 249-266, 1980
142. Ünlütürk, A., Karapınar, M., Turantaş, F.: Gıdalarda önemli mikroorganizmalar.(Ed. Ünlütürk, A., Turantaş, F.) Gıda mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, s.1-650, Çınarlı-İzmir, 1998
143. Vedamutlu, E.R.: Exotic fermented dairy foods. J. Food Prot. 40:801-802, 1977
144. Wegner, K. Zickrick, K. Ve ark.: Mikrobiologie trerischer Lebensmittel. Verlag Harri Deutsch Thun und Frankfurt/M, 1981
145. Yaman, H.: Partical characterisation of Lactobacilli isolated from commercial kefir grain. A thesis submitted to the partical fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosopy, 2000

146. Yaygın, H.: Kefir ve özellikleri, III. Milli Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu, 2-3 Haziran 1994, İstanbul, MPM yayın No : 548: 246-252, 1996
147. Yaygın, H.: Yoğurt, III. Süt ve Süt ürünleri Sempozyumu 2-3 Haziran 1994-İstanbul, MPM yayımları, No: 548, 1995
148. Yemni, E.: Kefirin antibakteriyel, antifungal ve antitumoral etkisi. Y. Lisans Tezi. Marmara Üniv. Sağ. Bil. Enst., İstanbul, 1987
149. Yokoi, H. Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T., and Adachi, S.: Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide, *Int. J. Food Microbiol.*, 13: 257-264, 1991
150. Yokoi, H., Watanabe, T., and Fujii, Y.: Isolation and characterization of polysaccharide producing bacteria from kefir grains, *J. Dairy Sci.*, 73:1684-1689, 1990
151. Yöneş, Z.: Süt ve Mamülleri Muayene ve analiz Metodları (2. baskı) Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. No. 491. D. K. 165. A. Ü. Basımevi, 1973
152. Yüksekdağ, N. Z. , Beyatlı, Y.: Kefir mikroflorası ile Laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve Genetik özellikleri. *Orlab On-line Mikrobiyoloji Dergisi*. 1 (2): 49-69, 2003
153. Zourari, A., Anifantakis, E. M.: Le kefir; caracteres physicochimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Technologie de production, Une revue. Le Lait* 68: 373-92, 1988

8. ÖZGEÇMİŞ

Kars 1978 doğumluyum. İlköğretimimi ve lise öğrenimimi Kars'ta tamamladım. 1995 yılında girdiğim Atatürk Üniversitesi Gıda mühendisliği Bölümünden, 1999 yılında "Gıda Mühendisi" ünvanı alarak Lisans eğitimimi tamamladım. 2000 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak Yüksek lisans'a başladım. 2001 yılında Araştırma görevlisi olarak aynı birimde çalışmaya başladım. Halen Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

