



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KEFİRİN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNDE
İNHİBİTÖR ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Abdi-Fatah Bachir ABDİ-WAHİD

**GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tarık Halûk ÇELİK

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEFİRİN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNDE
İNHİBİTÖR ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Abdi-Fatah Bachir ABDİ-WAHİD

**GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tarık Halûk ÇELİK

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/~~Doktora~~ tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kefirin *Staphylococcus aureus* üzerinde İnhibitör Etkisinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Abdi-Fatah Bachir ABDİ-WAHİD

Tarih: 13.08.2021

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında
Abdi-Fatah Bachir ABDİ-WAHİD tarafından hazırlanan
“Kefirin *Staphylococcus aureus* Üzerinde İnhibitör Etkisinin İncelenmesi”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 13.08.2021

Prof.Dr.Tarık Halûk ÇELİK
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Haydar ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Raportör

Doç.Dr.Özgür ÇADIRCI
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr.Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kefirin kökeni	4
1.2. Kefir taneleri	5
1.2.1. Kefir tanelerinin yapısı	5
1.2.2. Kefir tanelerinin mikroflorası	7
1.2.2.1. Laktik asit bakterileri	8
1.2.2.2. Asetik asit bakterileri	9
1.2.2.3. Mayalar	11
1.3. Kefir üretimi	12
1.3.1. Geleneksel kefir üretimi	13
1.3.2. Endüstriyel kefir üretimi	13
1.4. Kefirin özellikleri	14
1.5. Kefirde bulunan biyoaktif maddeler	17
1.5.1. Ekzopolisakkaritler	17
1.5.2. Biyoaktif peptitler	20
1.6. Kefirin beslenmedeki yeri ve insan sağlığı üzerine etkileri	21
1.6.1. Kefirin beslenmedeki yeri	21
1.6.2. Kefirin insan sağlığı üzerine etkileri	23
1.6.2.1 Kefirin antimikrobiyal özellikleri	23
1.6.2.2. Gastro-intestinal sistemde kefire ait kültür bakterilerinin etkisi	24
1.6.2.3. Bağışıklık sistemi üzerine etkileri	25
1.6.2.4. Tümör gelişimini durdurması	25
1.6.2.5. Kefir ve laktoz intoleransı	26

1.6.2.6. Kefir ve kolesterol metabolizması	26
2. GEREÇ ve YÖNTEM	28
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
ÖZET	38
SUMMARY	39
KAYNAKLAR	40



ÖNSÖZ

Günümüzde fermente ürünlerin yüksek besin değerlerinin yanında sağlıklı ve güvenilir olmaları açısından büyük önem taşımasını sağlamaktadır. Tüketicilerin günlük ihtiyaçlarında gereksinimleri karşılayacak seviyelerde hayvansal gıda öğelerini düzenli olarak tüketmeleri önemlidir. Bu nedenle, süt ürünlerinden kefir tüm yaşlılar ve insan yaşamının her aşamasında besleyici değeri yüksek bir hayvansal besin maddesi olarak ve antimikrobiyal maddeleri de içermesi nedeniyle tüketilmektedir.

Süt kısa sürede bozulabilen bir besin olması nedeniyle birçok ülkede muhafaza süresi daha uzun kalabilmesi için fermente süt ürünlerine işlenmesi sağlamaktadır. Kefir de bunlardan birisi olduğu için muhafaza süresinin süte göre uzun olmasının yanında besin değeri, içerdiği yararlı mikroorganizmalar, doğal bağırsak mikroflarasını koruması, sindirilebilirliğinin yüksek oluşu ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeniyle kefir beslenme açısından vazgeçilmez bir besin olduğunu bilinmektedir. Kefir, tarihin en eski zamanlarında geleneksel yöntemleriyle üretimi yapılan bir besin olarak kabul edilmekte ve son yıllarda stater kültür kullanarak endüstriyel yöntemle üretmeye başlaması gerçekleşmektedir.

Kefirin *Staphylococcus* üzerindeki inhibitör etkisinin incelenmesi konusunda çalışmamın seçilmesi ve yürütülmesine vesile olan ve yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. T. Halûk ÇELİK'e, değerli hocalarıma ve çalışmalarım esnasında tüm yardımını esirgemeyen arkadaşlarıma (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AAB	Asetik Asit Bakterileri
ACE	Angiotensin-converting Enzyme
ATCC	America Type Culture Collection
BAP	Bioactive Peptides
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CO ₂	Carbon Dioxide
CVD	Cardiovascular Disease
EPS	Ekzopolisakkaritler
GRAS	Generally Recognized As Safe
LAB	Laktik asit Bakteriler
LI	Laktoz Intoleransı
LOG	Logarithmic
KOB	Koloni Oluşturan Birim
ML	Millilitre
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
TGK	Türk Gıda Kodeksi
UHT	Ultra – High – Temperature

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kefir tanesi	5
Şekil 1.2. Kefir tanelerinin elektron mikrofrafisi	7
Şekil 1.3. Geleneksel kefir üretim aşamaları	12
Şekil 1.4. Endüstriyel kefir üretim aşamaları	14
Şekil 1.5. Kefiran kimyasal yapısı	20



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Kefir tanesi, kefir kültürü ve kefirdeki mikroorganizma düzeyleri	7
Çizelge 1.2. Kefir ve kefir tanelerinde bildirilen bakteri türleri	9
Çizelge 1.3. Kefir tanesinden tespit edilen bazı mayalar.	11
Çizelge 1.4. Kefirin kimyasal bileşimi ve besinsel değeri.	16
Çizelge 1.5. Kefirde EPS üreten Laktobasiller ve biyolojik aktiviteleri	19
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan Kefir tanesindeki mikroorganizma çeşitliliği	28
Çizelge 3.1. <i>S. aureus</i> ilave edilmiş UHT süt ile yapılan kefirde mikrobiyel gelişim	32
Çizelge 3.2. Kontrol grubu Kefir örneklerinde mikrobiyel gelişim	33

1. GİRİŞ

Süt, çocuk ve yetişkinlerin sağlıklı büyüyebilmesi, gelişebilmesi için büyük önem taşıyan, küresel olarak en çok tüketilen gıdalardan biridir. Önemli miktarda doymuş yağ, protein ve kalsiyum gibi temel besin bileşenleri içerdiğinden, düşük maliyetle gerekli bir gıda olarak tanımlanmaktadır (Samanidou ve ark., 2008). Türk Gıda Kodeksi (TGK)'ne göre çiğ süt; bir veya daha fazla keçi, inek, koyun veya mandanın sağılmasıyla üretilen, 40 °C'nin üzerinde ısıtılma işlemi veya eşdeğer etkiye sahip herhangi bir işlem uygulanmamış kolostrum dışındaki meme bezi salgısı olarak bilinmektedir (Anonim, 2000).

Süt ve süt ürünlerinin besin değeri ve sağlık açısından öneminin farkındalığının artması sonucu günümüzde fermente ürün tüketiminin arttığı görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde tüketicilerin fermente ürünlere olan ilgisinin artırılması, sağlık yönünden öneminin vurgulanması ve bu ürünlerin tüketiminde istenilen düzeye ulaşabilmesi için süt ürünleri teknolojisinde yeni ürünlerin üretimi ve geliştirilmesi adına çalışmalar devam etmektedir (Sezer, 2003). Günümüz teknolojisinin yardımıyla gıda üretim tekniklerinde ürünün üretim zamanından tüketim zamanına kadar standartların istenen kalitede olmasını sağlamak için koruyucu önlemlere başvurulmalıdır. Bu koruyucu önlemler, fermantasyon sayesinde gerçekleşmekte ve bu alanın yeni ürünlerinden de elde edilebilmesi için büyük bir rol oynayabilmektedir (Ross ve ark., 2002). Çünkü fermantasyon, gıdaların lezzet ve aromasını artırmak, raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan en eski metotlardan birisidir (Sezer, 2003). Bu yöntemde mikroorganizmaların biyolojik aktiviteleriyle metabolit üretimi meydana getirilerek gıdalarda istenmeyen mikrofloranın büyümesi engellenmekte ve gıdaların uzun süre muhafazası kalabilmektedir (Ross ve ark., 2002).

Fermantasyon ile ilgili arkeolojik bulgulara göre binlerce yıl önce gıdalarda tesadüfen rastlandığı görülmektedir. Bununla birlikte, zamanla çoğu fermente olan

gıdaların daha uzun süre muhafaza edilebildiği, fermentasyona tabi tutulmadan üretilen gıdaların eşdeğerleriyle kıyaslandığında besin değerlerinin daha yüksek olduğu ve gıda sektöründe fermentasyon işleminin yaygın kullanılan bir uygulama haline geldiği açıkça görülmektedir. Bu nedenle bugün dünyada sebze, meyve, tahıl, et ve balık da dahil olmak üzere birçok gıdanın üretiminde fermentasyon yöntemi kullanılarak istenilen gıda ürünlerine dönüştürüldüğünü ve tüketildiği kabul edilmektedir (Farnworth, 2005).

Günümüzde süt, bitkisel gıda, et ve diğer ürünlerin fermentasyon işleminde birçok mikroorganizma starter kültür olarak kullanılmaktadır. En çok bilinen ve karakterize edilen starter kültürlerden ikisi *Lactobacillus delbreuckii* spp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'tur. Bu mikroorganizmaların sindirim sistem mikroflorasını olumlu yönde etkileyerek bağırsak mikroflorasındaki mikroorganizmaların toksik metabolik aktivitelerini azalttığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, süt ürünlerinin fermentasyonu konusunda günümüze kadar ilerleme kaydedilmektedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* dahil olmak üzere probiyotiklerin çoğu hem laktik asit üreten hem de laktik asit üretmeyen organizmalara sahiptir (Anukam ve Reid, 2007).

Probiyotik içeren gıdalar, çoğu yüzlerce yıldır üretilen yoğurt, kefir ve koumis gibi süt ürünleri olarak tüketildiği bilinmektedir (Parvez ve ark., 2006; Tamime, 2002). Probiyotikler, yeterli miktarda alındıklarında konakçıya olumlu etkisi açısından çok önemi sağlayan canlı mikroorganizmalara sahiptir (Hill ve ark., 2014). Yoğurt, koumis ve kefir gibi fermente süt ürünlerinde bulunan probiyotikler; bu mikroorganizmaları içeren gıdalar ve tahıllar gibi canlı mikroorganizmalardan oluşan takviyeler halinde gastro-intestinal sisteminde sağlık açısından risk oluşturmeyen düzeylerde tüketilebilmektedir.

Kefir, ayran, peynir ve yoğurt gibi süt ürünleri kadar yaygın olmasa da 100 yıldır tüketilen ve olumlu etkisi açısından pek çok yararlı olduğu ilişkisi göz önünde bulundurulmuş bir üründür. Kefir ilk olarak kökenini Kafkas dağlarında yaşayan

topluluklardan alarak üretildiği bilinmektedir. İçecek ekşi tada sahip, alkol oranı düşük ve bazı durumlarda hafif karbonatlaşma ile hafif viskoz yapıya sahiptir. Kefir, genellikle inek sütüyle yapılır ancak keçi, koyun, manda veya soya sütü gibi diğer kaynaklardan elde edilen sütlerle de yapılabilir (Bourrie ve ark., 2016).

Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran en önemli özelliği; kefir tanesinde bulunan bakteri ve maya türlerinin simbiyotik aktivitesi sonucunda laktik asit ve alkol fermentasyonlarının bir araya getirilmesidir (Bourrie ve ark., 2016). Bahsedilen kefir tanelerinin yapısında, kefir fermentasyonunda gerekli olan bir dizi bakteri ve maya türünü içeren mikrobiyal olarak meydana getirilen protein ve polisakarit matrisler bulunur. Bu matrisde bulunan laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların fermentasyonu sonucu kefirde laktik asit, karbondioksit (CO₂), az miktarda alkol ve aromatik bileşikler ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan bileşiklerin hepsi kefirin kendine has duyuşsal özelliklerinin şekillenmesinde katkı sağlamaktadır (Karatepe ve ark., 2012).

Kefirin bağışıklık sistemini güçlendirmek, sindirim sisteminde laktoz sindirimini kolaylaştırmak gibi sağlık açısından birçok faydası olduğu bildirilmektedir. Kefirin antitümöral, antibakteriyel ve antifungal özellikleri de bulunmaktadır. Ayrıca gram pozitif, gram negatif bakterilere ve bazı mayalara karşı in vitro koşullarda antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Kefirin antimikrobiyal aktivitesi iyi belgelenmekte ve içeceğin bir dizi bozulma mikroorganizmasını ve gıda kaynaklı patojenleri inhibe ettiği bilinmektedir (Powel, 2006). Bu inhibisyonun kesin nedeni bilinmemekle birlikte laktik asit, asetik asitler, hidrojen peroksit (H₂O₂), karbondioksit (CO₂), diasetaldehit ve asetaldehit veya bakteriyosinlerin üretilmesinden kaynaklanabildiği düşünülmektedir (Shahani ve Chanden, 1979; Suskovik ve ark., 2010).

1.1. Kefirin Kökeni

Türk Gıda Kodeksine göre kefir; “fermentasyonda spesifik olarak *Laktobasiller* kefir, *Lökonostok*, *Laktokoklar* ve *Asetobakter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da tanelerin kullanıldığı fermente süt ürünü” olarak ifade edilmektedir (Anonim, 2009). Türkçe’de keyif veren ve hoş giden anlamına gelen ‘keyif’ kelimesinden türetildiği düşünülmektedir (Shen ve ark., 2018). Eskiden beri bilinen bir süt içeceği olan kefir, Kafkas çobanları tarafından tökezlenmesinin nedeni, hayvanın derisinden yapılmış deri torbalarda süte koyarak belirsiz bir süre taşınmış ve bu taşıma esnasında torbanın içinde çalkalanarak oluşan fermente bir süt ürünü olduğunu, lezzetli ve köpüklü bir içecek haline geldiğini keşfetmişlerdir. Bundan sonra çobanlar, içinde süt bulunan deri bir torbaya kefir taneleri ilave ederek evin kapı girişine asarak kefir yapmaya başlamışlar. Çünkü, birisi giriş kapısından içeri girdiğinde, genellikle süt torbasındaki kefir taneleri ile karıştırılması ve böylece içeriğin hareketi gerçekleşmiştir (Gaware ve ark., 2011).

Kefir süte kefir taneleri ilave edilmesiyle üretilen geleneksel bir fermente süt ürünüdür (Gao ve Li, 2016). Kefir diğer fermente süt ürünlerinden ayıran özelliği; tekrar tekrar kullanılabilen ve fermente bir süt ürünü olarak elde edilmesini sağlayan kefir tanelerinin içinde simbiyoz halde yaşamakta olan laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve laktoz fermente olan ve fermente olmayan maya türleri arasındaki spesifik ve kompleks bir karışımdan kaynaklanmaktadır (Chen ve ark., 2008).

Kefirin kökeni Kafkasya, Tibet veya Moğolistan dağlarında olup, kefir taneleri M.Ö 2000’li yıllardan önce geleneksel olarak bir aile serveti kaynağı olarak Kafkas kabileleri arasında nesilden nesile aktarılmıştır (Rosa ve ark., 2017). Efsaneye göre, kefirin yabancılardan yüzyıllarca özenle saklanmış olduğu söylemişlerdir. Fakat nihayet, yirminci yüzyılın başlarında Irina Sakharova adında bir Rus kadının kefir tanelerini vermesi için bir Kafkas prensini ikna etmesi ile Moskova’da kefir yapmaya başlanmış ve o zamandan beri temel bir Rus malzemesi olarak üretilmiştir (Ataç,

2016). Ayrıca, kefir üretiminin 19. Yüzyılın sonlarına doğru Doğu ve Orta Avrupa ülkelerinde de üretilmeye ve yaygınlaşmaya başlandığı görülmüştür (Karatepe ve ark., 2012).

Günümüzde kefir üretimi, dünyanın birçok noktasında bulundurmış olmakta birlikte kefir; kephir, kiaphur, kefer, knapan, kepi ve kipi gibi değişik birçok isimle de yaygınlaşmaktadır (Dinç, 2008). Kefir özellikle Avrupa'da popüler bir içecek olarak kabul edilmektedir. Türkiye, Polonya, Macaristan, Rusya, Finlandiya, İsveç, Norveç ve Almanya'da üretilmektedir. Kefir Amerika, Japonya ve Brezilya'da da üretilmektedir (Kahraman, 2011).

1.2. Kefir Taneleri

1.2.1. Kefir tanelerinin yapısı

Kefir taneleri beyaz veya sarımsı beyaz renkte, loblu, düzensiz şekilli ve 1-3 cm'ye kadar değişen uzunluklarda olup mini karnabahar çiçeklerine benzemektedir (Farnworth, 2005). Kefir taneleri yaygın bilinen çözücülerde ve suda çözünmeyip jelatinimsi yapıdadırlar, 0,3-3,5 cm arasında değişen çaplarıyla düzensiz boyuttadırlar ve şekil 1.1'de göstermektedir (Adriana ve Socaciu, 2008). İyi bir kefir üretimi için bu taneler elastik bir yapıda olmalı; yapışkan ve yumuşak olmamalıdırlar (Tomar ve ark., 2017).



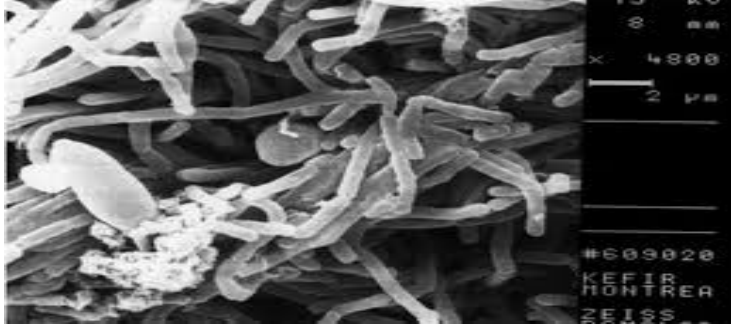
Şekil 1.1. Kefir tanesi

Kefir üretimi sırasında kefir taneleri doğal bir starter kültürü rolü oynamakta ve fermantasyon işlemi sonrasında sütün süzülmesi ile geri kazanılmaktadır (Leite ve ark., 2013). Kefir taneleri günlük taze süte aktarılır ve üreme yeteneğine elverişli olmasını sağlayan yaklaşık 20 saat süresince büyütülür; Bu esnada tanelerin kütlesi % 25 oranında artmaktadır. Eski ve kuru kefir tanelerinin çoğalma kabiliyeti çok az ve hiç olmadığından tanelerin çoğalma kabiliyetini kaybetmemeleri için bu işlem tekrarlanmalıdır (Adriana ve Socaciu, 2008).

Kefir tanelerinde polisakkaritler ve proteinler çoğunluklu olarak bulunur ve taneler mikrobiyal bir kompleksten oluşur. Laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların arasında karmaşık bir simbiyotik ilişki vardır; sırasıyla laktik asit ve alkolün fermente edilmesinden sorumlu olduğu bilinir (Magalhaes ve ark., 2011).

Kefir tanelerinin yapısının mikroskopisi, üçlü boyama şeması ve ardından konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM) kullanılarak hücre (bakteri ve maya) ve polisakkaritlerin dağılımının florasan incelemesi ile gerçekleştirilir (Schwan ve ark., 2016). Florasan krom SYTO9 (yeşil) kullanılarak görüntülenen mikrobiyal biyokütle, dış yüzeyin önemli bir kısmını kapsar ve konkavalin A conA (kırmızı) ile boyanmış alanların, yani polisakkarit matrisinin hem içine hem de dışına yerleşir. Kefiran olarak adlandırılan bu polisakkarit matrisi, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilir ve genellikle kefirin terapötik özellikleriyle ilişkilidir. Birçok yazar tarafından Laktobasil türleri kefir tanelerindeki kefiran polimerinin başlıca üreticisi olarak tanımlanır (Tada ve ark., 2007).

Kefir tanelerinin ilk çalışmalarında ışık mikroskobu kullanılırken, daha sonra yapılan araştırmalarda, içerdiği kompleks mikrobiyal popülasyonu tanımlamak için elektron mikroskobu kullanılmıştır. Moskova Süt Enstitüsü'nden elde edilen şekil 1.2'de kefir tanelerinin elektron mikrografisi görülmüştür. Kefir tanelerin kimyasal ve mikrobiyolojik bileşimleri dört farklı kaynaktan elde edilmekte ve farklı laboratuvarlar tarafından yayınlanan sonuçlar arasındaki karşılaştırmayı zorlaştırdığı görülmüştür (Farnworth, 2005).



Şekil 1.2. Kefir tanelerinin elektron mikrofrafisi

1.2.2. Kefir tanelerinin mikroflorası

Kefir taneleri karnabahara benzer; mikroorganizma bakımından zengindir (bkz. Çizelge 1.1) ve genellikle simbiyotik bir ilişkiyle yaşayan kompleks bir mikrobiyal yapıya sahiptir. Bu mikrobiyal yapısı içinde laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve maya türlerinin olduğu bilinmektedir (Farnmorth, 2005; Schwan ve ark., 2016).

Çizelge 1.1. Kefir tanesi, kefir kültürü ve kefirdeki mikroorganizma düzeyleri (log kob/ml) (Farnworth 2005).

	Laktokok	Laktobasil	Mayalar
Kefir Tanesi	7,37	8,94	8,30
Kefir Kültürü	8,43	7,65	5,58
Kefir İçeceği	8,54	7,45	5,24

1.2.2.1. Laktik asit bakterileri

Kefir tanelerinde önemli yer alan Laktik asit bakterilerin türlerinin çoğu laktobasil cinsine aittir ve bu cinsin iki gruba ayrıldığı bilinmekte olup bu iki grup; Homofermentatif türleri (*Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. Delbrueckii*, *Lb. gallinarum*, *Lb. Gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens*) ve isteğe bağlı veya

zorunlu heterofermentatif türleri (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefir*, *Lb. paracasei*, *Lb. parakefir*, *Lb. plantarum* ve *Lb. rhamnosus*) içermektedir. Laktobasillerden daha az türe sahip diğer laktik asit bakterileri homofermentansiyel cinse ait olan *Lactococcus* (*L. lactis*), *Pediococcus* ve *Streptococcus* (*St. thermophilus*); ayrıca heterofermentansiyel cinse ait *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroid* ve *Ln. lactis*) ve *Weissella* (*W. viridescens*) cinsine aittir (El hoda ve Rameissa, 2017). Laktik asit bakterileri mikrobiyal popülasyonunun en büyük kısmını (% 65-80) oluştururken, laktokoklar, mayalar ve bazen asetik asit bakterileri kefir tanelerindeki mikroorganizmaların geri kalanını oluşturur (Onaran ve Çufaoğlu, 2017). Heterofermentatif laktobasil popülasyonlarının homofermentatif popülasyonlardan daha yüksek (sırasıyla %74,5 ve %25,7) olduğu tespit edilmiş ve aynı dağılım yöntemi incelenerek 16 tane homofermentatif izolat ile karşılaştırıldığında 20 tane heterofermentatif laktobasil izolatı bulunduğu rapor edilmiştir (Schwan ve ark., 2016). Kefir tanelerinde bulunan bakterilerin (*Lb. kefir* ve *Lb. parakefir*) üzerinde çeşitli in vitro testlerin yapıldığı bir çalışmada Heterofermentatif olan bu laktobasillerin ikisinin de kısmen oto-aggregasyon ve hemaglutinasyon özellikleri ve daha önce yayımlandığı gibi S-tabakası proteinlerine sahip oldukları görülmüştür. Ek olarak, bu iki bakterinin aynı zamanda Caco-2 hücrelerine yapıştığı ve iyi birer probiyotik olma olasılığının yüksek olduğu görülmüştür (Garrote ve ark., 2004).

Genel olarak, kefir tanelerindeki laktik asit bakterilerinin kolon oluşum birimi (10^8 - 10^9 kob/g), mayalar (10^5 - 10^6 kob/g) ve asetik asit bakterilerinden (10^5 - 10^6 kob/g) çok daha yüksektir, ancak fermentasyon koşulları bu kalıbı etkilese de çizelge 1.2, dünyanın dört bir yanından gelen kefir ve kefir tanelerinde bildirilen çeşitli bakterilerin bir listesini göstermektedir (Farnworth, 2005).

1.2.2.2. Asetik asit bakterileri

Asetik asit bakterileri Gram-negatif, aside (pH 2,6'ya kadar) karşı dirençli ve Asetobakter ve Glukonobakter genleri dahil olmak üzere zorunlu aerobiktir.

Asetobakter türleri; Asetik asidi CO₂ ve suya okside etme kabiliyetine sahiptir. Asetik asit bakterileri doğada CO₂ veya etanol bakımından zengin bitki habitatlarında bulunabilir. Günümüzde AAB, asetik asidin ticari üretimi için çok önemlidir (Stadie, 2013).

Kefir ile ilişkili olan asetik asit bakterilerinin, kültürden bağımsız olarak tanelerde baskın cinsilerden biri halinde asetobakteri ortaya çıkardığını belirtmek gerekir. Bu önemli; çünkü asetobakter genellikle kefir kültürüne bağlı teknik yolla izole edilemez ve esnasında kefirin gereksiz bir kirletici maddesi olarak tanımlanır. Bazı çalışmalar kefir tanelerinde büyük miktar asetik asit bakterisi bulunduğunu; birçoğu ise kesin bir tanımlama için daha fazla test yapılması gerektiğini ve asetik asit bakterilerinin büyümesi için optimal izolasyon ortamı sağlanması gerektiğine dayanmaktadır (Bourrie ve ark., 2016).

Asetik asit bakteri türleri hem kefir taneleri hem de kefir içeceklerinde izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Ancak bazı ülkelerde bu türlerin varlığı istenmeyen bir durum olarak kabul edilir ve son üründe metabolit sonucunun hem mikrobiyal konsorsiyumda hem de duyuşal özelliklerde önemli bir rol oynamasına rağmen daha az ilgi görmektedir (Leite ve ark., 2013).

Çizelge 1.2. Kefir ve kefir tanelerinde bildirilen bakteri türleri (Farnworth, 2005).

Mikroorganizma türleri	Mikroorganizma türleri
Lactic acid bacteria	<i>L.kalixensis</i> , <i>L.rapi</i> ,
Lactobacillus	<i>L.dioliavorans</i> , <i>L.parafarraginis</i> , <i>L.gallinarum</i> , <i>Pediococcus</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>claussenii</i> , <i>P.damnusus</i> ,
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>P.halophilus</i> , <i>P.pentosaceus</i> , <i>P. lolii</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactococcus/Streptococcus
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis biovar diacetylactis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	

<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophiles</i>
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	<i>Streptococcus thermophiles</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Streptococcus durans</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	
<i>Lactobacillus viridescens</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Leuconostoc/Oenococcus</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Leuconostoc</i> spp.
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus parakefiri</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Cremoris</i>
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus garvieae</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	
<i>Lactobacillus sunkii</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	Acetic acid bacteria
<i>Lactobacillus instestinalis</i>	
<i>Lactobacillus amylovorus</i> ,	<i>Acetobacter</i>
<i>L.pentosus</i> , <i>L.salivarius</i> ,	<i>Acetobacter</i> spp.
<i>L.johnsonii</i> , <i>L.rhamnosus</i> ,	<i>Acetobacter sicerae</i>
<i>L.rossiae</i> , <i>L.sakei</i> , <i>L.reuteri</i> ,	<i>Acetobacter orientalis</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i>

Asetik asit bakterileri (AAB); Toplam mikrobiyal popülasyonun sadece %20'sini temsil eder ve düşük miktarlarda $<10^5$ kob g^{-1} bulundukları bildirilmektedir. Ancak bir başka çalışmada 10^8 kob g^{-1} 'e kadar yüksek seviyelerde bulunmuştur. AAB, B₁₂ vitamini ürettikleri için diğer mikroorganizmaların üremesini teşvik edebilmektedir. Kefir kıvamının AAB içeren bir stater kültür kullanılarak geliştirilebileceği; ancak 10^6 kob g^{-1} 'den daha yüksek bir seviyelerde geliştirilemeyeceği bulunması halinde bildirilmektedir. Bu seviyedeki, AAB'nin varlığı iyi bir kefir tutarlılığı; dolayısıyla kaliteli bir ürün elde edilmesi anlamına gelmektedir (Schwan ve ark., 2015).

1.2.2.3. Mayalar

Kefir tanelerinde büyük kısmı bakterilere ait olan popülasyonuna ek olarak bu bakterilerle simbiyotik bir ilişkide olan çok miktarda maya popülasyonu vardır. Genellikle kefir tanelerinden izole edilen ve maya popülasyonunun çoğunluğunu

oluşturan tipik mayalar; *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Candida* (Bourrie ve ark., 2016).

Mayaların aminoasitler ve vitaminler gibi büyüme için gerekli besinleri sağladıkları, pH'yı değiştirdikleri, etanol salgıladıkları ve CO₂ ürettikleri için fermente süt ürünlerinin hazırlanmasında önemli bir rol oynadıkları kabul edilmektedir (Farnworth, 2005). Kefirin tipik duyuşsal özelliklerine katkıda bulunan ve istenilen metabolitleri üretmelerine rağmen kefir mayası üzerine kefir bakterisinden daha az çalışma yapılmıştır. Kefir tanelerinde bulunan başlıca laktoz fermente maya türleri; *Kluyveromyces marxianus*/ *Candida kefir*, *Kluyveromyces lactis* var. *Lactis*, *Debaryomyces hansenii* Dekkera anomala; Laktoz fermente olmayan maya türleri; *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* ve *Debaryomyces occidentalis*'tir ve çizelge 1.3'de göstermektedir (Farnworth, 2005; Leite ve ark., 2013).

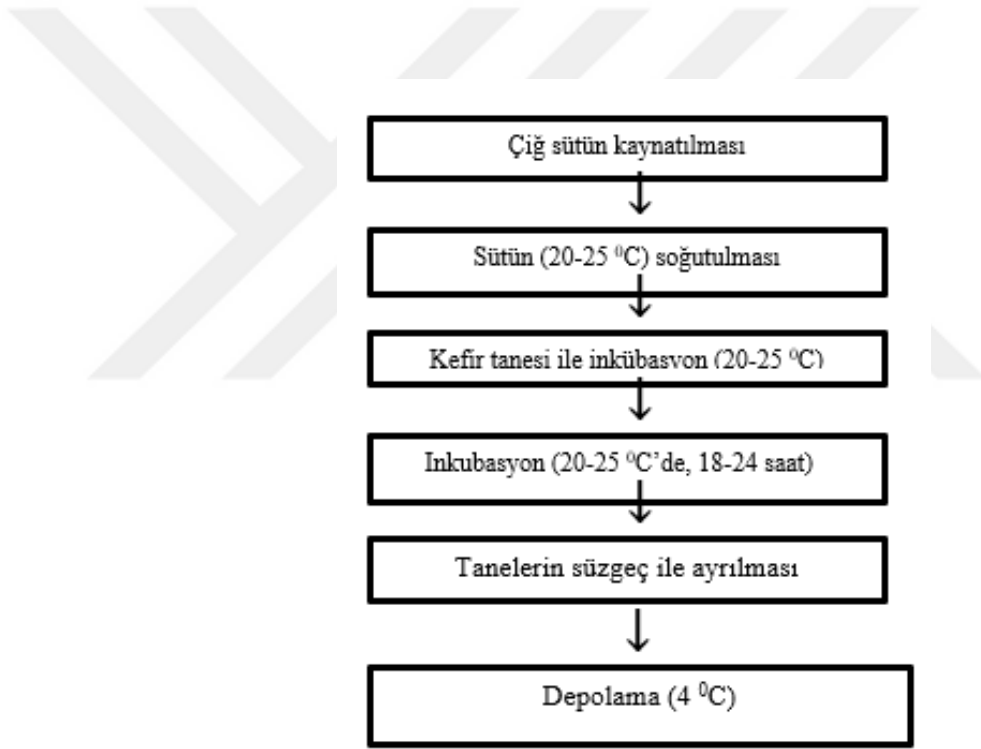
Kefire özgü mayalar, lezzet ve aroma oluşumunda önemli bir rol oynar; *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir*, *Saccharomyces unisporus*, *Pichia fermentans* ve *Yarrowia lipolytica* türleri ile temsil edilirler (Simova ve ark., 2002).

Çizelge 1.3. Kefir tanesinden tespit edilen bazı mayalar (Farnworth, 2005).

Mayalar	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida friedrichii</i>
<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Candida maris</i>
<i>Saccharomyces turicensis</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Saccharomyces dairensis</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Pichia fermentans</i>	

1.3. Kefir üretimi

Kefir üretiminde başta inek, keçi, koyun, deve ve manda sütü olmak üzere her türlü süt kullanılabilir. Bunların dışında kefir üretimi için hindistan cevizi, soya ve pirinç sütünden yararlanılabilmektedir (Kahraman, 2011). Kefir üretmek için çeşitli yöntemler vardır. Yaygın olarak geleneksel ve endüstriyel üretim yöntemleri kullanılmakta olup gıda bilimcileri günümüzde geleneksel kefirde bulunanlar ile aynı özelliklere sahip bir kefir üretimi için modern teknikler üzerinde çalışmaktadır (Otlar ve Çağındı, 2003). Ancak kefir üretimi amacıyla aşağıda belirtilen yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır.



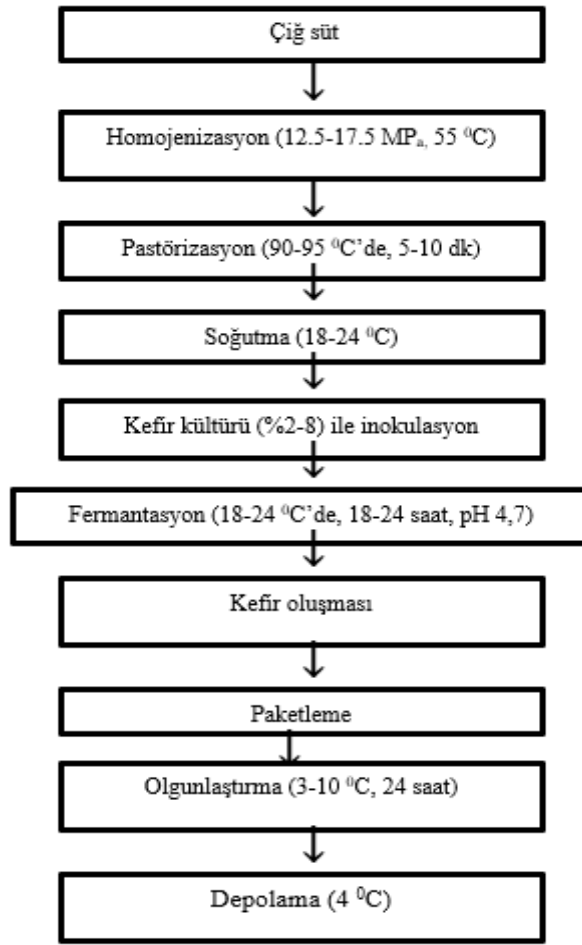
Şekil 1.3. Geleneksel kefir üretim aşamaları (Shen ve ark., 2018).

1.3.1. Geleneksel Kefir Üretimi

Geleneksel kefir üretimi pastörize edilmiş ve 20 ile 25 °C arasında sıcaklıklara soğutulmuş süte kefir tanelerinin direct olarak eklenmesiyle yapılır. Ardından (18-24) saate kadar 20 ile 25 °C (oda sıcaklığı) bir sıcaklıkta fermente edildikten sonra taneler bir elek yardımı ile süzülerek ve yine oda sıcaklığında kurutularak bir sonraki inokulasyonda kullanılmak üzere soğuk bir ortamda muhafaza edilir. Üretilen kefirde bir süre +4 °C sıcaklıktaki soğutucuda muhafaza edildikten sonra tüketime hazır hale gelir. Geleneksel kefir üretimi şekil 1.3'te görülmektedir (Shen ve ark., 2018).

1.3.2. Endüstriyel Kefir Üretimi

Bu yöntem farklı adlandırılmasına rağmen teknik olarak geleneksel kefir üretimi ile aynıdır. İlk aşamada süt homojenize edildikten sonra kuru madde %8'e kadar ayarlanır ve 85-87 °C'de 5-10 dakika veya 90-95 °C'de 2-3 dakika ısıtılma işlemi uygulanır. Daha sonrada 18 ile 24 °C arasındaki bir sıcaklıkta soğutulup (% 2-8 oranı) kefir kültürüyle eklenir ve (18-24) saat arası bir süre inkübasyon işlemine bırakılır. Pıhtı oluşturulduktan sonra pompa yardımıyla ayrılır ve kefir şişelere dağıtılır. 12-14 °C veya 3-10 °C'de olgunlaştırılır ve üretilen kefir 24 saat süresince +4 °C'de saklanır. şekil. 1.4'te endüstriyel kefir üretimi göstermektedir (Dinç, 2008).



Şekil 1.4. Endüstriyel kefir üretim aşamaları (Dinç, 2008).

1.4. Kefirin özellikleri

Kefirin kalitesi ve özellikleri söz konusu oldukça çok değişkendir (Aguiar, 2017). Bu durumun nihai kefir ürününün aroması, viskozitesi, mikrobiyal florası veya kimyasal bileşimi, süte ilave edilen starter kültür oranı veya hacmi, fermantasyon sırasındaki değişiklikler, fermantasyon sonrası soğutma ve olgunlaşma aşamalarının hızı, üretimde uygulanan inkübasyon sıcaklığı ve süresinden kaynaklandığı bilinmektedir (Farnworth, 2005). Ayrıca, Kefir hammaddelerinin doğası ve kalitesi, seçilen fermantasyon prosedürü, sanitasyon önlemleri ve depolama koşulları büyük ölçüde etkili olmaktadır. Dikkate alınması gereken birçok

parameter olmasından dolayı iyi kalitede kefir üretebilecek belirli bir parameter seti oluşturmak zordur (Aguiar, 2017). Bununla beraber kefir; akıcı kıvamı, homojen ve parlak bir görünümü serinletici etkisi ve hafif maya tad ve aromasıyla tüketici tercihi olmaktadır (Üstün ve Gökçe, 2001). Tüketici tercihini yönlendiren ürün duyuşal özelliklerini daha iyi anlamak ve üreticinin ürün hedef kitlesini belirleyebilmesi ve aynı zamanda ürün kalitesini takip edip üretimi optimize edebilmeleri için duyuşal analizler yapılmaktadır. Bu doğrultuda tüketiciler arasında seçilen panelistler ve süt ürünlerinin kalite özelliklerini iyi bilen uzman kişiler tarafından duyuşal değerlendirmeler yapılmaktadır.

Kefir tanesi kullanılarak üretilen kefirin viskozitesi starter kültür ilavesi ile üretilenlere kıyasla daha düşüktür. Bu değer ısıtma, homojenizasyon ve sütün bileşimine göre de farklılık göstermektedir. Kaynatılmış sütten üretilen kefirin viskozitesi pastörize ve sterilize sütten üretilenlere göre daha yüksek olmaktadır (Oktar ve Karagözoğlu, 1992).

Kefirin bileşimi ve kimyasal özelliklerinde üretimde kullanılan sütün kaynağı (inek, koyun, keçi) ve yağ miktarı (tam yağlı, yarım yağlı ve yağsız), tanelerin veya starter kültürün kompozisyonu ve uygulanan üretim teknolojisine bağılı olarak büyük farklılıkların olduğu bilinmektedir. Kefirin kimyasal bileşimi çizelge 1.4'te gösterilmektedir (Otles ve ark., 2003).

Kefirin pH'sı (4,2- 4,6) arasında değişmektedir (Otles ve ark., 2003). L (+)-laktik asit, fermantasyondan sonra başlangıç sütündeki orijinal laktozun yaklaşık %25'i seviyesindeki oranla en yüksek konsantrasyonda bulunan organik asittir. Kefir fermantasyonu sırasında homofermentatif laktik asit bakterilerinin salgıladıkları laktaz (B- galaktozidaz) enzimiyle laktoz kullanarak ilk aşamada glikoz ve galaktoza üretmekte olup; üretilen bu maddeler heterofermentatif bakteriler olan leukonostokların enzimatik aktivitesiyle laktik asit, CO₂ ve aroma verici bileşikler olan asetaldehit, diasetil ve aseton üretilmektedir. Mayalar ise laktozu glikoz ve galaktoza dönüştürmekte ve fermantasyon sonucu CO₂ ve az miktarda etil alkol elde

edilmektedir (Bensmira ve ark., 2010; Kök-Taş ve ark., 2013). *Streptococcus* ve *Leuconostoc* türlerinden diasetil üretilmektedir (Libudzisz ve Piatkiewicz, 1990).

Kefiri yararlı mikroorganizmaları içermesinin yanı sıra insan beslenmesi için gerekli olan temel aminoasit, yağ asidi, karbonhidrat, vitamin ve mineral maddeleri kimyasal bileşiminde bulundurmaktadır (Çetinkaya ve Mus, 2012; Dinç, 2008). Kefir, B1, B12, kalsiyum, aminoasitler, folik asit ve K vitamini bakımından zengindir. Bu vitaminlerin bir çok faydası olmakla birlikte sinir sistemi, böbrek ve karaciğerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde yer alarak cilt rahatsızlıklarını azaltır, enerjiyi artırır ve uzun ömürlülüğü desteklemeye yardımcı olur. Triptofan kefirde bulunan ve sinir sistemi üzerinde rahatlatıcı etki yarattığı bilinen bir aminoasittir. Ayrıca vücudumuzda en bol bulunan ikinci mineral olan iyi bir fosforun iyi bir kaynağı olan kefir bu yönüyle hücre büyümesi, bakımı ve enerji ihtiyacı için karbonhidrat, yağ ve proteinlerin kullanılmasına yardımcı olur. Süt şekeri olarak bilinen laktozla ilgili olarak Kefir; laktoz - intoleransından muzdarip kişiler için iyi bir gıdadır. Fermentasyon sonucu kefirde laktoz içeriği azalır ve D-galaktosidase seviyesi artar (Otles ve ark., 2003).

Çizelge 1.4. Kefirin kimyasal bileşimi ve besinsel değeri (Otles ve ark., 2003).

İçerik	100g	İçerik	100g
Enerji	65 kals	Vitaminler (mg)	
Yağ (%)	3,5	A	0,06
Protein	3,3	Karoten	0,02
Laktoz (%)	4	B1	0,04
Su	87,5	B2	0,017
Süt asidi (g)	0,8	B6	0,05
Etil alkol (g)	0,9	B12	0,5
Laktik asit (g)	1	Niasin	0,09
Kolesterol (g)	13	C	1
Fosfatidler (mg)	40	D	0,08
		E	0,11
Esansiyel Amino Asitler (g)		Mineral (g)	
Triptofan	0,05	Kalsiyum	0,12
Fenilalanin + Tirosin	0,35	Fosfor	0,1
Lösin	0,34	Magnezyum	12
İsolösin	0,21	Potasyum	0,15
Treonin	0,17	Sodyum	0,05
Metionin + Sistin	0,12	Klorit	0,1
Lisin	0,27		
Valin	0,22		

. Kefirin kimyasal bileşimi ve besinsel değeri (Devam)			
İçerik	100g	İçerik	100g
Aromatik Bileşenler		İz Elementler	
Asetaldehit		Demir (mg)	0,05
Diastil		Bakır (ug)	12
Asetona		Molibden (ug)	5,5
		Manganez (ug)	5
		Çinko (mg)	0,36

1.5. Kefirde bulunan biyoaktif maddeler

Son yıllarda fonksiyonel gıdalar alanı tüketiciler büyük ilgi görmüş olduğu ortaya çıkmaktadır. Çünkü birçok gıdada sağlık yararları veya hastalık direnci sunan biyoaktif bileşenler bulunduğu kabul edilmektedir. Fonksiyonel gıdaların bir alt kümesi, birçok potansiyel biyoaktif bileşen kaynaklarının bulunduğu probiyotik gıdalardır. Mikroorganizmaların kendileri (ölü veya canlı), fermentasyon sırasında oluşan mikroorganizmaların metabolitleri (antibiyotikler veya bakterisitler dahil) veya peptitler gibi gıda matrisinin parçalanma sonucu olan ikinci metabolitleri bu sağlık yararları etkilerden sorumlu olduğunu bilinmektedir (Park, 2009). Süt ve fermente süt ürünlerinde biyoaktif bileşenlerin, özellikle insan ve inek sütündeki fonksiyonel özellikleri hakkında çok sayıda çalışma rapor edilmektedir (Park ve Nam, 2015). Ancak, kefir, özellikle Doğu Avrupa’da sağlık yararları sunma konusunda uzun bir geçmişe sahip olmaktadır. Kefirde biyoaktif özelliklere sahip olabilen birçok bileşik bulunmaktadır. Bu bileşikler kısaca aşağıda belirtilmiştir (Çetinkaya ve Mus, 2012; Farnworth, 2005).

1.5.1. Ekzopolisakkaritler

Son zamanlarda biyoemici, metal çıkarma ajanı, biyoflokulant, ilaç verme ajanı ve diğer fonksiyonlarıyla gıda, ilaç, kozmetik endüstrilerinde katkı maddesi olarak kullanılan ve önem arz eden polisakkaritlere dair çalışmalar artmıştır (Prado ve ark., 2015).

Mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salgılanan polisakkaritin yapısına sahip olan ekzopolisakkarit (EPS); esas olarak değişken oranlarda glikoz, galaktoz, mannoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktosamin ve ramnoz içeren şeker birimlerinin ve türevlerinin tekrarlanıp dallanması sonucu açığa çıkan uzun zincirli polisakkaritlerden oluşmaktadır (Dashen, 2016). *Lactobasillus delbrueckii*, *Lactobasillus bulgaricus*, *Lactobasillus rhamnosus* ve *Lactobasillus helveticus* tarafından salgılanan heteropolisakkaritlerde başta galaktoz, glikoz ve ramnoz gibi temel monasakkaritlerle birlikte düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. Aynı zamanda oldukça dallanmış ve karmaşık bir yapıdadırlar. Bunun genellikle monosakaritlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Prado ve ark., 2015).

Rapor edilen EPS'lerin miktar ve özelliklerinin fermantasyon işleminde kullanılan mikroorganizmalara, fermantasyon koşullarına ve kültürel ortamın bileşimine bağlı olduğu görülmüştür (Kim ve ark., 2008). EPS'ler sahip oldukları fizikokimyasal ve reolojik özellikleriyle stabilizatör, emülgatör, jelleştirici ajan ve viskozite arttırıcı gibi katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Ek olarak EPS'lerin sahip oldukları biyolojik özellikleriyle diğer rollerini yanı sıra antitümör ajan, antimikrobiyal ajan, antioksidan ve immünomodülatör olarak kullanılabileceği önerilmektedir (Madieto ve Reys-Gauillan, 2005; Piermaria ve ark., 2010; Zejsek ve ark., 2011).

Kefir mikroorganizmaları tarafından üretilen EPS, suda çözünür bir glukogalakattan hidrolize olan ve eşit miktarlarda D-glikoz ve D-galaktozdan oluşan kefiran olarak bilinmektedir. Kefiran bazı büyük, çubuk benzeri bakterilerin, özellikle de laktobasillerin kapsüler malzemesinde bulunmaktadır. Laktobasiller grubuna ait kefir, parakefir ve kefiranofasiyenler, kefir tanelerinin mikroflorasında bulunan başlıca EPS üreten ana bakterilerdir (Kök-Taş ve ark., 2013).

Kefir tanelerinin mikroskopik gözlemi; kefirin fermantasyon aşamasında yer alan laktik asit ile asetik asit bakterilerini ve maya kapsüle ettiğini ortaya koymaktadır (Dashen, 2016). Kefir düşük sıcaklıkta jel oluşturabilen, süt jelinin

viskozitesini ve viskoelastik özelliklerini geliştirebilen kendisi de ilginç viskoelastik özelliklere sahip GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilir) bir yapıdır (Kazazi ve ark., 2017; Piermaria ve ark., 2009).

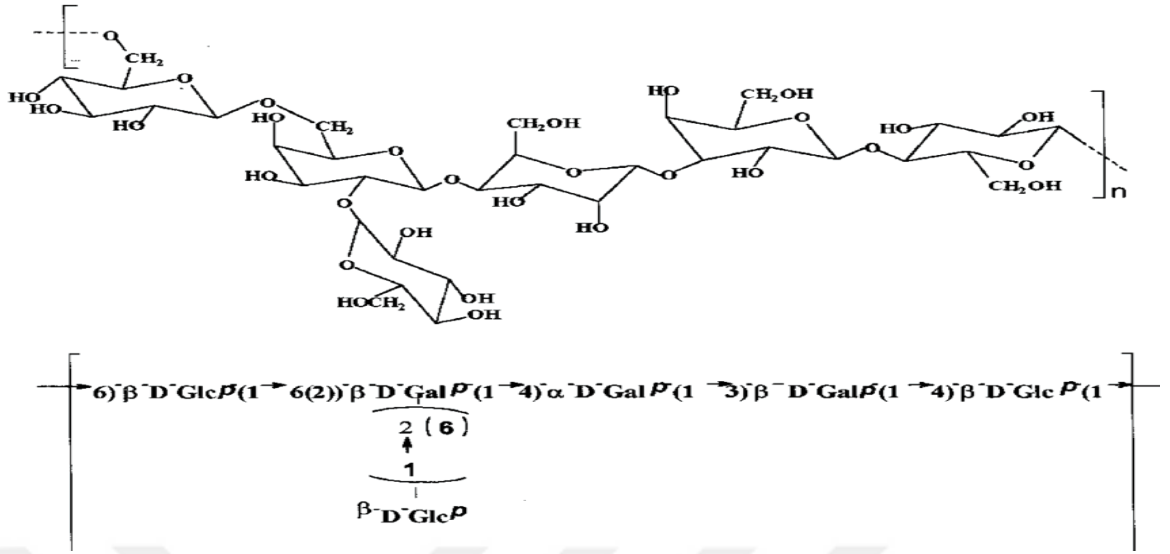
Kefir, besleyici özelliğinin yanı sıra sağlık açısından kayda değer bir probiyotik kaynağı olarak Kabul edilebilmektedir. Birkaç çalışma kefiran üreten LAB'lerin biyolojik aktivitesine bağlı olarak bu EPS'nin çizelge 1.5'te gösterildiği gibi birçok önemli yarara sahip olduğunun vurgulandığı bildirilmiştir (Patel ve ark., 2012; Prado ve ark., 2015; Radhouani, 2018).

Kefir tanelerinden ve izole edilmiş laktobasil türlerinden ekstrakte edilen kefirin kimyasal yapısı ortaya konmuştur (Maeda ve ark., 2004). Kefiranın kimyasal yapısı analiz edildiğinde dallanmış bir hekza- veya heptasakkaritten tekrarlanan birimlerinin olduğu ve kendisinin bir veya iki şeker kalıntısının rastgele bağlandığı düzenli bir pentasakkarit (kefiroz) biriminden oluştuğu görülmüştür (Moradia ve Kalanpour, 2019). Daha sonra polisakkarit yapısı kromatografi ve kızılötesi spektroskopi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi güncel tekniklerle analizler yapılmıştır. Şekil 1.5'te kefir yapısı gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. Kefirde EPS üreten Laktobasiller ve biyolojik aktiviteleri (Patel ve ark., 2012; Prado ve ark., 2015; Radhouani, 2018).

	EPS Üreten LAB	Bağ	Biyolojik aktivitesi
Kefiran	<i>L. kefiranofaciens</i> <i>L. kefir granum</i> <i>L. parakefir</i> <i>L. kefir</i> <i>L. delbrueckii spp.</i> <i>Bulgaricus</i>	Değişken glikozidik bağlardan glikoz ve galaktoz monomerleri.	Hipertasyonun neden olduğu kan basıncının düşmesi Peritoneal mikrofajların aktivitesini destekler Peritoneal IgA'da artış Antitumor aktivitesi Antimikrobiyal aktivitesi Bağırsak bağışıklık sisteminin modülasyonu ve epitel hücrelerinin basiller sereler hücre dışı faktörlere karşı korunması

KEFİRAN



Şekil 1.5. Kefiran kimyasal yapısı (Maeda ve ark., 2004)

1.5.2. Biyoaktif peptitler

Biyoaktif peptitler amid veya peptit bağları olarak bilinen kovalent bağlarla amino asitlerin bileşiminden oluşan organik maddelerdir. Bazı doğal kaynaklarında serbest BAP bulunmasına rağmen; bilinen BAP'nin büyük çoğunluğu ana proteinlerin yapısında bulunur ve enzimatik işlemlerle üretilir. Bazıları ise kimyasal sentez ile hazırlanır (Sanchez ve Vazquez, 2017).

Birçok organizma, ortamdaki proteini hidrolize edebilen, böylece peptitleri ve amino asitleri serbest hale getirerek mikroorganizmanın büyümesini destekleyen enzimlere (örneğin proteinazlar ve peptidazlar) sahiptir. Kefir tanesi bakteri izolatlarının proteinaz aktivitesi analiz edildiğinde birkaç izolatın yüksek proteinaz aktiviteye sahip olduğu görülmüştür; bu da kefirde biyoaktif peptid bulunma olasılığını artırmıştır. Kefirde bulunan peptidlerin içeriğiyle ilgili yapılan ön çalışmalar, kefirin çok sayıda peptid içerdiğini ve kefir peptidlerinin çoğunun molekül ağırlığının ≤ 5000 kDa olduğunu göstermiştir (Farnworth, 2005).

Kefir fermentasyon işlemi sırasında oluşan peptitlerin, hayvan numunelerinde bağışıklık sistemini uyardığı; hipertansif fare ve insanlarda tansiyonu düşürmek de dahil çeşitli biyoaktif ve fizyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmüştür. Kefirde bol miktarda bulunan esansiyel amino asitlerden biri olan triptofan, sinir sistemi üzerindeki rahatlatıcı etkisi ile bilinir. Hipertansiyon her ne kadar orta yaşta veya yaşlı hastalığı olarak bilinse de genç bireylerde görülebildiği bildirilmiştir (Park, 2009). Süt ürünlerinde biyoaktif peptidler esas olarak anjiyotansin dönüşüm enzimi (ACE) inhibisyonu, antitrombotik ve antioksidan aktiviteler, opioid, sito- ve immüno-modülatör etkileriyle mikrobiyal patojenlere karşı bakterisidal etkiye, kolesterol ve kan basıncını düşürme yeteneğine sahip olup sağlığı destekleyici potansiyel nutrasötik ve terapötik ürünler olarak bilinir. ACE inhibisyonu kan basıncını önemli ölçüde düşebilir ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltabilir (Cotarlet ve ark., 2019).

1.6. Kefirin beslenmedeki yeri ve insan sağlığı üzerine etkileri

Yüzyıllardır beslenmede yere sahip olan kefirin vitaminler, esansiyel amino asitler ve çeşitli mineral maddeleri içermesiyle son zamanlarda insan sağlığı üzerine etkileri ile ilgili çalışmaların sayısı artmış olup; antimikrobiyal etkisi, gastro-intestinal sistemde bakterileri dengesi oluşturması, Bağışıklık sistemine ve kolesterol metabolizmasına katkıları, laktoz intoleransı özelliği ve tümör gelişimini durdurması gibi tedavi edici etkiler yarattığı belirtilmektedir. Bu anlamına bakıldığında iki grup olarak aşağıdaki detaylardan bahsedilmektedir.

1.6.1. Kefirin beslenmedeki yeri

Dünyada sağlıklı gıdaları desteklenmesi şeklinde değişen yaşam tarzı ve artan sağlık bilinci nedeniyle pazardaki fermente diyet takviyelerinin sayısı son zamanlarda artış görülmektedir. Kefirin besleyici değeri mineraller, karbonhidratlar, proteinler, vitaminler ve yağlar da dahil olmak üzere zengin kimyasal bileşimine

sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu kimyasal bileşiminin yanı sıra kateşinler, vanilin, ferulik asit ve salisilik asit gibi ikincil biyoaktif bileşenler sayesinde fermentasyon işlemiyle kefirin besin değerini daha da artmaktadır (Frag ve ark., 2020).

Kefirde iyileşmeye ve homeostaza faydalı olan vitaminler, mineraller ve esansiyel amino asitler bulunmaktadır (Arslan, 2015). Kefir, B1, B2, B5 ve C vitaminlerini içermektedir. Kefirin vitamin içeriği hem kullanılan süt türü hem de mikrobiyolojik floradan etkilenmektedir (Sarkar, 2007). Çeşitli süt türlerinden yapılan kefirin vitamin profilleri rapor edilerek Tiamin (B1), piridoksin (B6) ve folik asit ile vitamin konsantrasyonunun >% 20 oranında zenginleştiği bulunmuştur (Arslan, 2015).

Kefir, merkezi sinir sisteminde önemli bir rol oynayan serin, treonin, alanin, lizin, valin, izolösin, metiyonin, fenilalanin ve triptofan amino asitleri bakımından zengindir. Kefir ayrıca vücut tarafından sindirime ve emilimine yardımcı olan kısmen sindirilmiş proteinler (kazein gibi) içerir. Kefirde bol miktarda bulunan esansiyel amino asitler ayrıca protein, glikoz ve yağ metabolizmasını düzenler ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde, bağışıklık yanıtının ve enerji dengesinin korunmasında olumlu bir etki gösterir. Amino asitler sakatlığı önler ve yaşlı insanların sağlıklı yaşam beklentilerini uzatır ve kefirde bulunan dallı zincirli amino asitler ciddi beyin hasarı olan hastalar için bilişsel iyileşmeyi artırır (Frag ve ark., 2020).

Mineral içeriği ile ilgili olarak; kefir iyi bir kalsiyum ve magnezyum kaynağıdır. İnsan vücudunda en çok bulunan ikinci mineral olan ve hücre büyümesi, bakımı ve enerjisi için karbonhidrat, yağ ve proteinlerin kullanılmasına yardımcı olan fosfor da kefirde bol miktarda bulunur (Arslan, 2015). Metabolizma ve kan üretiminde özel değeri olan demir, çinko ve bakır gibi mikro-elementler içerir (Frag ve ark., 2020).

1.6.2. Kefirin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

1.6.2.1. Kefirin antimikrobiyal özellikleri

Probiyotik bir süt ürünü olan kefirin besleyici ve organoleptik özellikleri, patojenik mikrobiyal enfeksiyonlara karşı mücadele potansiyeli sunmaktadır (Behera ve ark., 2017). Ancak, daha önce yapılan birkaç çalışma bazı laktobasillerin, laktik asit ve asetik asit gibi organik asitlerin ve karbon dioksit, hidrojen peroksit, etanol, diasetil ve peptitler (bakteriyosinler) dahil olmak üzere yararlı olabilecek çok çeşitli antimikrobiyal bileşiklerin üretebildiğini gösteren veriler vardır, tüm bu maddeler sadece gıda üretimi ve depolanması esnasında gıda kaynaklı patojenlerin ve bozulmaya neden olan bakterilerin azaltılmasında değil, aynı zamanda bağırsak rahatsızlıklarının tedavisinde de rol oynamaktadır (Farnworth, 2005). Ayrıca, Kefir fermantasyon sırasında mikrofloranın ürettiği faydalı faktörlere sütün kalıtsal özellikleri de dahil olmaktadır. Kefir, küçük peptitleri, diasetilleri ve kefir mikroflorası tarafından üretilen organik asitler gibi birincil ve ikincil metabolitler tarafından patojenleri inhibe etmektedir (Ahmed ve ark., 2013).

Kefirin genellikle doğrudan veya dolaylı olarak Gram-negatif organizmalara karşı bakteriyostatik aktiviteye ve Gram-pozitif organizmalara karşı bakterisidal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Aguiar, 2017). Kefir taneleri ile fermente edilmiş bir inek sütünün bir süpernatantının Gram-negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı önleyici aktivitesini test edilmiş ve Gram-pozitif mikroorganizmalar, Gram-negatif mikroorganizmalardan daha fazla inhibe edilmiştir; ayrıca, süpernatantlarda hem laktik hem de asetik asit bulunmuştur. Kefir süpernatantında bulunan konsantrasyonlarda laktik asit veya laktik asit artı asetik asit ile desteklenen sütün de *E. coli*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Garrote ve ark., 2000).

Kefir fermantasyonu sırasında üretilen organik asitlerin, süt fermantasyonunun ilk aşamalarında bile önemli bakteriyostatik özelliklere sahip olabileceği sonucuna

varılmıştır (Farnworth, 2005). Gram-pozitif kok, *Staphylococcus* ve Gram-pozitif basil'e karşı benzer sonuçlar bulunmuş ve kefir tanelerinin antibakteriyel özellikleri bakımından nihai kefir ürününden daha etkili olduğu kaydedilmiştir (Cevikbas ve ark., 1994). Öte yandan, kefir taneleri ile fermente edilen tüm sütün *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* ve *S. enteritidis*'e karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, ancak *P. aeuginosa* ve *C. albicans*'ı inhibe etmedikleri gözlemlenmiştir (Leite ve ark., 2013). Ancak, kefir tanelerinin kendileri, özellikle gliserol bir kriyo-prezervatif olarak eklendiğinde, liyofilizasyon sırasında ortaya çıkabilen bakterilere karşı inhibitör güce sahiptir (Farnworth, 2005).

1.6.2.2. Gastro-intestinal sistemde kefire ait kültür bakterilerinin etkisi

Probiyotik, gastrointestinal sistemde bulunan ve yeterli miktarda kullandığında konakçıya sağlık açısından yararlı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak ifade edilmektedir. Gastrointestinal sistemde, dört yüzden fazla bakteri türünün yaşadığı ve bu endojen bakterilerin bağırsak mikroflorasını içerdiği tahmin edilmektedir. Mide ve ince bağırsaktan geçtikten sonra, bazı probiyotikler hayatta kalarak kalın bağırsağa geçici olarak yerleşmektedir. Probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemde hayatta kalması ve kolonileşmesi için asit ve safraya karşı yüksek bir toleransa ve bağırsak yüzey yapışma alanlarında tutunma özelliklerine sahip olması ayrıca istenmeyen bakterilerin veya diğer patojenlerin üremelerini önleyebilmesi gerekmektedir (Guzeyl-Seydim ve ark., 2016; Marquina ve ark., 2002; Sezer, 2003). Fermente süt ürünleri, istenmeyen florayı inhibe ederek normal laktik bağırsak florasını geri kazanabilir ve antibakteriyel aktivite; kültür aktivitesi, sıcaklık ve muhafaza süresi ve başlangıçtaki kontaminasyon seviyesinden etkilenir (Sarkar, 2007).

Kefir tüketimi, bağırsak mukozasındaki LAB sayısını önemli ölçüde arttırdığı için enterobakteri ve klostridia popülasyonlarında bir azalmaya neden olur (Leite ve ark., 2013). Ayrıca, kefir tüketimi civciv bağırsağında *Campylobacter jejuni*'nin kolonizasyonunu engellemiş (Marquina ve ark., 2002), genç sıçanlarda bağırsak

mukozasını ve sistemik bağışıklık tepkisini etkilemiş ve sıçanlarda gastrointestinal enfeksiyona bağlı mukoza direncini artırmıştır (Sarkar, 2007). Kefir, postoperatif hastaların veya gastrointestinal rahatsızlıkları olan hastaların tedavisinde yararlı olabileceği bağırsak hareketini destekleyip şişkinliği azaltabileceği ve daha sağlıklı bir sindirim sistemi oluşturmaya yardımcı olabileceği rapor edilmiştir (Sarkar, 2007; Otles ve ark., 2003).

1.6.2.3. Bağışıklık sistemi üzerine etkileri

Fermente süt gıdaları üzerinde yapılan çalışmalarda, terapötik özelliklere sahip oldukları ve bu gıdaları tüketenlerin bağışıklık sistemini güçlendirebileceğini, kronik ishal semptomlarını hafifletebileceği ve kolon kanseri riskini azaltabileceği bildirilmiştir (Shen ve ark., 2018). Bunun için, fermente sütün sindirim ve bağışıklık sistemi ile doğrudan ilişkisi vardır. Kefirin bağışıklık mekanizması üzerinde düzenleyici etkisi olduğu hem insanlarla yapılan çalışmalarda hem de hayvan deneylerinde rapor edilmiştir (Kadioglu, 2017). Ayrıca, son zamanlarda yapılan bir hayvan deneyinde, kefirin farelerde bağırsak mukozal bir immün yanıtı ile bağışıklık sistemine bağlanma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Lopitz-Ostoa ve ark., 2006).

1.6.2.4. Tümör gelişimini durdurması

Kefir ve kefir tanelerin yapısında bulunan polisakkaritlerin antitümör aktivitesi üzerinde birkaç çalışma yapılmıştır ve son çalışmalar kefirin daha iyi bir antiaterosikreze ve antidiyabetik fonksiyona sahip olduğunu ve tüberküloz için iyileştirici özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Shen ve ark., 2018). Ayrıca, kefirin kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmaya ve kolon kanseri, meme kanseri vb. gibi belirli kanser türlerini önlemeye ve tümörlerin boyutunu azaltmaya yararlı olduğu bildirilmiştir (Gaware ve ark., 2011). Chen ve ark., 2007 yılında yapılan bir çalışmada, kefir ekstraktlarının insan meme kanseri hücrelerinin gelişimini özellikle

hedefleyen ve durduran bileşenlere sahip olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle kefirin meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde kullanılabileceği önerilmiştir.

1.6.2.5. Kefir ve laktoz intoleransı

Süt ve süt ürünlerinde bulunan ana karbonhidrat olan laktozu sindirmek için gerekli olan bu enzim (β -galaktosidaz), ince bağırsığı kaplayan hücrelerde laktaz-flor hidrolaz geninin ifadesi ile üretilmektedir. Laktaz enziminin yetersizliği durumunda, süt tüketiminden 30 dakika ile 2 saat sonra şişkinlik, bağırsakta gaz oluşumu, kramplar, bulantı ve ishal gibi laktoz intoleransı (LI) semptomları ortaya çıkmakta ve bu ürünlerin diyetten çıkarılma kararına katkıda bulunmaktadır (Devaraja ve Vasudhaa, 2018; Madry ve ark., 2011). Bununla birlikte, dünya nüfusunun büyük bir kısmı, süttan kesildikten sonra laktoz sentezinde genetik olarak programlanmış bir düşüşe uğramakta ve bu da laktoz malabsorpsiyonu ile sonuçlanmaktadır. Laktoz malabsorpsiyonunun nedeninin, laktaz seviyesindeki bir eksikliğe bağlı olarak laktozun sindirilebilme yetersizliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (Madry ve ark., 2011). Kefir tanelerinde doğal olarak bulunan β -galaktosidaz enzimi, fermentasyon sırasında kefirdeki laktoz içeriğini azaltarak son ürünü laktoz intoleransı olan kişiler için uygun hale getirmektedir. Ayrıca, kefir gibi fermente ürünler, laktozun sindirilmesine yardımcı olan midenin gecikmeli boşaltılması yeteneğine sahiptir (Rosa ve ark., 2017).

1.6.2.6. Kefir ve kolesterol metabolizması

İnsanların kan akımındaki yüksek bir kolesterol konsantrasyonu, Kardiyovasküler hastalığı (CVD) için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Genellikle bazı laktobasiller veya bifidobakteri içeren fermente süt ürünlerinin tüketiminin insanların kan dolaşımında kolesterol konsantrasyonunu düşüşdüğü iddia edilmiştir (Zheng ve ark., 2013).

Birçok bilim adamının raporu, aşırı kolesterolünü tükettiklerinde farelerde kandaki kolesterol seviyesini düşürmek için ekzopolisakkaridin rolü olduğunu bildirmiştir. En son çalışmada, Çin Tibet kefirinden *Lactobacillus plantarum* MA2'nin hem in vitro hem de in vivo kolesterol düşürme aktivitesinde etkili olduğu bulunmuştur (Ahmed ve ark., 2013). Kefir tanelerinin fermentasyon işlemi yoluyla süt kolesterol seviyelerini azaltmış ve 24 saat fermentasyon ve 48 saat de depolamadan sonra mevcut kolesterol seviyelerini % 41 ile 84 arasında azalttığı gösterilmiştir (Bourrie ve ark., 2016).

Kefir kültürünün sütte kolesterolü asimile etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, kolesterol bakımından zengin bir diyetle beslenen erkek hamsterlarda kefir sütünün hipokolesterolemik etkisini kanıtlamıştır (Wang ve ark., 2009).

Bu çalışmada, kefirin *S.aureus* üzerinde inhibitör etkisinin incelenmesi amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla, mikroflorası bilinen kefir taneleri kullanılarak, üretim öncesi kefir üretilecek süte katılan *S. aureus*'un kefir üretimi sonrası etkileşimi incelenmiştir. *S.aureus*'un hazırlandığı; (10^6 , 10^5 , 10^4) farklı dilüsyonlardan UHT süt gruplarına (a_1 , b_1 , c_1) sırasıyla ilave edilerek kefir taneleri ile fermentasyona bırakıldıktan sonra ekim yaparak elde edilen sonuçlara göre kefirin patojenler üzerinde etkinliğini değerlendirilmiştir. Daha sonra sonuçların literatürle uyumlu olup olmadığı tespit edilmiştir. Kefir'in çeşitli hastalıklardan korunmak amaçlı kullandığı bilindiğinden halk sağlığının korunması kapsamında elde edilmiş olan veriler ışığında bazı öngörüler gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Süt

Araştırmada UHT tekniği ile üretilmiş %3,3 yağlı süt kullanılmış olup ; TS En ISO 9001/2008 kalite yönetim sistemi, çevre yönetim sistemi ve gıda güvenliği yönetim sistemi belgelerine sahiptir.

2.1.2. Kefir tanesi ve starter kültür

Üretimde kullanılan kefir tanesi Danem Süt ve Süt ürünleri LTD. Şti. Laboratuvarı'nda Endanem, Türk Patent Enstitüsü tarafından onaylanan patentlenmiş yöntem ve önerilen faydalı model tasarımıyla uygun tekniklerle korunarak üretilen kuru doğal kefir mayasıdır. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bir litre UHT %3,3 yağlı sütünde 0,5 gr kuru doğal kefir mayası aktifleştirildikten sonra eklenip kefir tanesi üretilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan Kefir tanesindeki mikroorganizma çeşitliliği

<i>Lactobacillus kefir</i>	
<i>Lactobacillus kefiranoferiens subsp. kefiranoferiens</i>	
<i>Lactobacillus kefiranoferiens subsp. kefirgranum</i>	
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Lactobacillus asidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Laktobasiller helveticus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>leuconostoc mesentereoides</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Streptococcus termophilus</i>
<i>Bifidobakterium bifidum</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	

2.1.3. *Staphylococcus aureus* suşu

Çalışmada, gıda hijyeni ve halk sağlığı açısından önem taşıyan *S. aureus* (ATCC 25923) kullanılmıştır. *S. aureus* suşu, Brain Heart Infusion (BHI)'da inkübasyonu (37 °C 18 saat) ile aktiveştirilmiştir. Aktif hale gelen bakteri kültürü, dilisyonları hazırlanarak ekimleri yapılmış ve sayısal değerleri hesaplanmıştır. Değerlendirmede spektrofotometrik ölçüm de yapılmıştır.

2.1.4. Kullanılan Besiyerleri

- Plate Count Agar (PCA)
- Baird Parker Agar (BP) + Egg yolk-tellurite emulsion
- Rose bengal Chloramphenicol Agar (RBCA) + Chloramphenicol Supplement
- Brain Heart Infusion (BHI)

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Endanem kuru doğal kefir mayasından kefir tanesinin hazırlanması

0,5 gr Endanem yarım çay bardağı ılık (25 °C) UHT Süte eklendi. Maya inkübasyon 25 °C sıcaklığında 7 - 10 saat aktiveştirildi. Aktifleşen maya 1000 ml ılık UHT süte eklendi. Aktifleşen danelerin çalkalanarak süte tamamen karıştığından emin olundu. Oda sıcaklığında 20 - 24 saat bekletildi. Kıvam gelişimi tamamlandıncaya, hazırlanan kefir kullanıma alındı. Bir sonraki mayalama için taneler buzdolabında en fazla 5 gün saklandı.

2.2.2. Kefirin *S. aureus* üzerinde inhibitör etkisinin belirlenmesi

1000 ml UHT sütünde 0,5 gram endanem eklenerek kefire üretildi ve üretilen kefirten 1 gr kefir taneleri alındı. BHI Broth'da zenginleştirilmiş *S. aureus*'un hazırlandığı; (10^6 , 10^5 , 10^4) farklı dilüsyonlardan 2,5 ml alınarak, 250 ml UHT süt gruplarına (a_1 , b_1 , c_1) sırasıyla aşılınıp, kefir tanesi ile fermantasyona bırakıldı. Fermantasyon süresi sırasında kefirin *S.aureus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması için a_1 , b_1 , c_1 olarak gruplandırılan kefir örneklerinden birer ml deneysel olarak alınarak 9 ml distile suda karıştırılarak damla plak yöntemiyle PCA ve BP agar üzerine yayılmış ve 24 saat 37 °C'de inkübasyon yapılmıştır. Ayrıca, RBC agar üzerine damla plak yöntemiyle ekim yapılarak 72 saat 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kefir grupları 0., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde fermantasyon öncesi ve sırasında hemen ekim yapılarak sayısal değerlendirmeleri yapılmıştır.

Kontrol grupları olarak aynı işlemler kefir tanesi eklenmeden kontamine edilen süt örneklerinde uygulandı. BHI Broth'da Zenginleştirilmiş *S. aureus*'un hazırlandığı; (10^6 , 10^5 , 10^4) farklı dilüsyonlardan 2,5 ml alınarak, 250 ml UHT süt gruplarına (a_2 , b_2 , c_2) sırasıyla ilave edilerek 0., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde aynı şekilde ekimleri yapılmıştır.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, endanem kefir mayası ile üretilmiş olan kefirin içerisindeki mikroorganizma çeşitliğinin kolon oluşum birimini elde etmek için genel canlı bakteri ve maya sayısı kullanılan PCA ve RBC agar üzerine yayılmış ve 24 saat 37 °C ve 72 saat 25 °C’de inkübasyon sırasıyla yapılmıştır. Bu yapılan çalışmada genel canlı bakteri ve maya sayısının sonucu ($2,4 \times 10^9$, $4,8 \times 10^4$ kob/ml) sırasıyla elde edilmiş ve bu sonuçların diğer sonuçlara göre istediğimiz bir sonuç olduğunu ortaya çıkmıştır. Kefir üretiminde kullanılan kefir taneleri probiyotik özelliğe sahip olan laktokoksi, laktobasili, asidik asit bakterileri ve maya içermiştir. Bu bakteriler bağırsak mikroflorasını olumlu yönde değiştirerek sindirim sistemini düzenlemeye, bağışıklık sistemini güçlenmeye yardımcı olduğunu bildirmiştir (Bulduk, 2016).

Staphylococcus aureus, birçok ülkede gıda zehirlenmesi salgınlarına neden olan *Salmonella*’dan sonra en yaygın ikinci patojen olarak kabul edilmektedir. *S. aureus*’un süt ürünlerinde bulunabildiği ve halk sağlığı riski taşıdığı bildirilmektedir (Karagözlü, 2007). Gıda zehirlenmesinde yer alan enterotoksinler, *S. aureus*’un koagülaz pozitif suşlarının yaklaşık üçte biri tarafından üretilir. Enterotoksinler birçok gıda kaynaklı hastalıklarla, *Staphylococcus* Enterotoksin A (SEA) ve Enterotoksin D (SED) en sık bulunanlar ile ilgili ilişkilendirilmektedir (Portocarrero ve ark., 2002).

Stafilokokal enterotoksin oluşumunda etkenin ortamda bulunma düzeyi önem taşımaktadır; 10^6 log kob/ml ve üzerinde toksin oluşum riski yüksek düzeyde olmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda elde edilen bulgular da dikkate alındığında kefir de kontaminasyon düzeyi de dikkate alınarak enterotoksin oluşum riskini göz önüne almak ve muhafaza koşullarına dikkat etmenin önemli olduğu düşünülmektedir.

Kefir taneleri ve *S. aureus*'un farklı dilüsyonları ile kontamine edilmiş (SSK a₁, b₁, c₁) UHT süte üretilmiş kefir örneklerinden ekim yapılarak (0., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde) değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi, kefir, kefir taneleri ve *Staphylococcus aureus* ile kontamine örneklerde Baird Paker Agar (BP) ' yapılan ekimlerde 0., 6., 12. ve 24. saatlerde sayısal artış olurken ; özellikle 48. ve 72. saatlerde belirgin bir azalma saptanmıştır. Buna göre birinci grup (a₁ = 10⁶) örneklerde 0., 6., 12. ve 24. saatlerde sırasıyla 4,2; 7,15; 7,0 ve 6,89 log kob/ml saptanırken ; 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 6,04 ve 4,6 log kob/ml olarak belirlenmiştir. İkinci grup (b₁ = 10⁵) örneklerde 5,34; 6,64; 7,0; 6,69; 5,08 ve 3,81 log kob/ml ; üçüncü grup (c₁ = 10⁴) örneklerde 4,15; 7,1; 7,2; 7,32; 5,45 ve 3,66 log kob/ml olarak saptanmıştır.

Çizelge 3.1. *S. aureus* ilave edilmiş UHT süt ile yapılan kefirde mikrobiyel gelişim (log kob ml⁻¹)

SSK	Besiyerler	0. Saat	6. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
A ₁	BP	4,2	7,15	7,0	6,89	6,04	4,6
	PCA	5,69	7,32	7,46	7,30	7,53	6,1
	RBC	5,04	5,34	5,76	6,94	6,2	5,91
B ₁	BP	5,34	6,64	7,0	6,69	5,08	3,81
	PCA	5,52	6,91	7,32	7,1	7,18	7,0
	RBC	4,91	5,04	5,91	6,6	6,95	7,04
C ₁	BP	4,15	7,1	7,2	7,32	5,45	3,66
	PCA	5,36	7,41	7,56	7,45	7,46	6,26
	RBC	4,69	5,34	6,0	6,58	6,91	6,6

Kob/ml: a₁ = 10⁶, b₁ = 10⁵, c₁ = 10⁴

Çizelge 3.2'de gösterdiği gibi, *S. aureus* farklı konsantrasyonu ile Kontamine edilmiş olan süt örneklerinde toplam genel canlı sayısı ve maya-küf sayıları değerlendirildiğinde, *Staphylococcus aureus* ile kontamine edilmiş olan süt örneklerinde genelde 72. saate kadar bir artış olduğu saptanmıştır.

Kontamine edilen süttten yapılan kontrol grubu örneklerinden yapılan ekimler sonucunda, incelenen mikrobiyel sayıların belirlenen zaman dilimlerinde belirgin bir artışla ilerlediği saptanmıştır.

Çizelge 3.2. Kontrol grubu süt örneklerinde mikrobiyel gelişim (log kob ml-1)

Ss	Besiyerler	0. Saat	6. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
A ₂	BP	3,78	3,89	4,45	7,11	sayılmaz	sayılmaz
	PCA	4,0	3,98	4,04	7,04	sayılmaz	sayılmaz
	RBC	0	0	0	0	0	0
B ₂	BP	2,3	0	2,3	6,53	sayılmaz	sayılmaz
	PCA	2,9	2,78	3,08	5,94	sayılmaz	sayılmaz
	RBC	0	0	0	0	0	0
C ₂	BP	0	0	2,3	5,53	sayılmaz	sayılmaz
	PCA	0	2,3	2,3	4,53	sayılmaz	sayılmaz
	RBC	0	0	0	0	0	0

Kob/ml, a₂=10⁶, b₂=10⁵, c₂=10⁴

Sonuç olarak, *S. aureus* ile kontamine edilmiş kefir örneklerinde, kefir tanelerinin ve oluşturduğu ortamın *S. aureus* üzerinde inhibe edici bir etkisinin olduğu ve bunun ilerleyen zaman diliminde gerçekleştiği; dolayısıyla ortam iç faktörlerinin ve rekabetçi floranın bu inhibisyonda etkili olabileceği düşünülmektedir.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kefirin *S. aureus* üzerinde inhibitör etkisini incelenmiştir. Kefir, kefir taneleri ve *S. aureus*'un farklı UHT sütüne ilave edilmiş ve ilave edildikten sonra ekim yaparak elde edilen sonuçlar vardır ve bu elde edilen sonuçlar, SSK BP a₁, b₁, c₁ (0., 6., 12., 24., 48. ve 72. saat) ; 4,2; 7,15; 7,0; 6,89; 6,04 ve 4,6 log₁₀ kob ml⁻¹, 5,34; 6,64; 7,0; 6,69; 5,08 ve 3,81 log₁₀ kob ml⁻¹ ve 4,15; 7,1; 7,2; 7,32; 5,45 ve 3,66 log₁₀ kob ml⁻¹ sırasıyla ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, kolonilerin büyümesinde sıfır saatten bir güne kadar artış elde etmiştir, ancak ikinci ve üçüncü güne kadar kolonilerin büyümesinde bir azalma ortaya çıktığını gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, kefir tanelerin antibiyotik gibi tamamen ortadan kaldırarak değil, süte bulaşan bakterileri yavaş yavaş etkileme yeteneğine sahip olduğu ortaya çıktığını gözlemlenmiştir. Buna karşın, 10⁶ log kob/ml düzeyinde bir artış gözlemlenen koşullarda enterotoksin oluşum riski göz önüne alınmalı; Kefir kontaminasyonu ve bakteri üremesinin kontrol altında olacağı şekilde muhafaza edilmelidir.

Karagözlü ve ark. (2007), bu yapılan bir çalışmada, *E. coli* 0157: H7, *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus*'un kefir fermentasyonu sırasında büyüebilme ve hayatta kalabilme nedeni üzerine araştırılmıştır. Suşların iki farklı aşılama seviyesi gerçekleştirilmiş; 10² kob ml⁻¹ (EC-1, SA-1 ve S-1) ve 10³ kob ml⁻¹ (EC-2, SA-2 ve S-2) seviyeleriymiş. Kefir fermentasyonunda 0., 6., 12. ve 24. saat ve 23±1 °C numuneler alınarak *E. coli* 0157: H7, *S. typhimurium* ve *S. aureus* sayıları belirlenmiştir. **EC-1** 2,29 log kob ml⁻¹'den 4,13 log kob ml⁻¹'ye büyürken, **EC-2** 3,22 log kob ml⁻¹'den 6,78 log kob ml⁻¹'ye büyümüştür. Hem **S-1** hem de **S-2** canlı popülasyonları, fermentasyon sırasında büyümüştür; burada örnek **S-1** 2,37 log kob ml⁻¹'den 4,64 log kob ml⁻¹'ye ve örnek **S-2** 3,52 log kob ml⁻¹'den 5,60 log kob ml⁻¹'ye büyümüştür. **SA-2** suşları 3,06 log kob ml⁻¹'den 3,64 log kob ml⁻¹'ye büyümüş, SA-1 suşu 2,28 log kob ml⁻¹'den 2,66 log kob ml⁻¹'ye büyümüştür. Bulgulara göre *E. coli* 0157:H7, *S. typhimurium* ve *S. aureus*'un fermentasyon sırasında kefirde yaşayabildiği saptanmıştır.

Dias ve ark. (2012), Kefir taneleri, deneysel olarak *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella Typhimurium* ve *Enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* ile kontamine olmuş UHT yağsız sütüne eklenmiştir. Bu süt örneklerinde mikroorganizma izolasyonunun analizleri 0., 6., 12., 48. ve 72. saatlik fermantasyon işleminde gerçekleştirilmiştir. *Salmonella Typhimurium* ve *Enteritidis*, fermente kefirde 24 saatlik bir süre boyunca hayatta kalmıştır. *E. coli* 0157: H7, *S. aureus* ve *L. monocytogenes*, fermantasyon süreci başlatıldıktan sonra 73 saatten daha kısa bir sürede geri kazanılmıştır. Bu çalışmada belirlenen koşullar ve mikroorganizma konsantrasyonları altında, analiz edilen patojenik bakteriler, ev yapımı kefir fermantasyonu için kullanılanlardan daha uzun bir süre canlı kaldı ve bu, insan tüketimi için potansiyel bir tehlike olabilir.

Kim ve ark. (2016), bu çalışmada, (24., 36., 48. veya 72. saat) fermente edilmiş dört tür kefirin (A, L, M ve S) antibakteriyel spektrumlarını, gıda kaynaklı sekiz patojene karşı karşılaştırmıştır. Test suşları olarak *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* ve *Cronobacter sakazakii* kullanılmış ve çim üzerinde nokta yöntemi ile antibakteriyel aktivite araştırılmıştır. aktivite spektrumları, potensleri ve başlangıçları kefir türüne ve fermantasyon süresine göre farklılık göstermiştir. En geniş ve en güçlü antimikrobiyal spektrum, tüm kefirler için en az 36 ile 48 saat fermantasyon süresinden sonra saptanmıştır, ancak kefirin geleneksel fermantasyon yöntemi 25 °C’de 18 ile 24 saattir. Kefir A için *B. cereus*, *E. coli*, *S. aeruginosa* ve *C. sakazakii* inhibe edilirken *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* ve *C. sakazakii* kefir L, M ve S tarafından farklı derecelerde inhibe edilmiştir. Dikkatli bir şekilde, *S. aureus*, *S. enteritidis* ve *C. sakazakii*, kefir L, M ve S tarafından inhibe edilirken, *L. monocytogenes* belirli süreleri için fermantasyondan sonra kefir M tarafından inhibe edilmiştir, bu da antimikrobiyal aktivitenin yalnızca düşük bir pH’sı değil, aynı zamanda fermantasyon esnasında salgılanan antimikrobiyal maddelere de atfedilebileceğini düşündürmüştür.

Aguiar (2017), çalışmasında *Listeria monocytogenes* CECT 935, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* DSMZ 682 ve *Salmonella enteritidis* CECT 4300'ün temsili suşları, hazırlanma sırasında kefire aşılانmıştır. canlı hücre sayımları, kefirin hazırlanmasından sonraki 120 saat içinde izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kefir örneklerinde dört patojenik suşun tamamının inhibisyonunu ortaya çıkarmıştır. *S. enteritidis* en hızlı inhibisyonu ortaya çıkarmış, bunu *E. coli* ve *L. monocytogenes* ve *S. aureus* izlemiştir. Bununla birlikte, test edilen tüm suşlar, en yüksek büyümlerini, fermentasyondan sonraki 24 saat içinde göstermiş, bu da tüketici için potansiyel bir tehlike oluşturabileceği bildirilmiştir.

Kivanc ve Yapıcı (2018), gıda kaynaklı patojenler olan *E. coli* 0157: H7 ve *S. aureus*'un kefirin fermentasyonu ve depolanması sırasında hayatta kalma nedeni araştırmıştır. Kefir taneleri, tam yağlı UHT inek sütünün %5'i ile aşılانmış ve *E. coli* 0157: H7 ve *S. aureus* kültürleri, 10^5 kob ml^{-1} verecek şekilde ayrı ayrı ilave edilmiş ve ilk depolamada 22 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyon sırasında bakteri ve maya sayımları, pH ve titre edilebilir asitlik (TA) miktarları belirlenmiş. ikinci aşamada, *E. coli* 0157: H7 ve *S. aureus* kültürleri, 10^5 kob ml^{-1} kefir üretmek için ayrı ayrı eklenmiş ve 3 gün boyunca 5°C'de depolanmıştır. her gün numuneler alınmış ve aynı testler yapılmıştır. fermentasyon sırasında, tüm numunelerde başlangıçta TA %0,14 iken, fermentasyon sonunda %1,0 ve %1,01 olmuştur. *S.aureus*, fermentasyon işlemi sırasında önemli ölçüde inhibe olurken *E. coli* inhibe olmamıştır. Ancak, depolamanın 2. gününden sonra *E. coli* 0157: H7'nin inhibisyonu gerçekleşmiştir. Buna bağlı olarak, Kefirin sağlıklı bir ürün olma özelliğine sahip olduğu ifade edilmiştir

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, deneysel olarak *S. aureus*'un farklı konsantrasyonlarının UHT süte ilavesiyle gerçekleştiren kefir yapımı sonrası, Kefirin *S. aureus* üzerindeki inhibitör etkisinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada elde edilen bulgular çerçevesinde, *S. aureus* standart suşu ilave edilmiş control grubu süt örneklerine göre, *S. aureus*'un farklı konsantrasyonları ve kefir taneleri ilave edilmiş süt örneklerinde belirgin bir düzeyde bir inhibisyon olduğu saptanmıştır. Çalışmada elde edilen verilere göre, kefir yapımında sütte 24. saate kadar *S. aureus* dahil genel olarak mikrobiyel sayıda bir artış olmakla beraber, 48. saat ve sonrasında *S. aureus* sayılarında önemli düzeyde bir azalma olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, kefir oluşumu ile bunu sağlayan ve yararlı grupta sayılan mikroorganizmaların oluşturduğu ortam ve rekabetçi özellikleri ile *S. aureus* özellikleri ile *S. aureus* üzerinde eradikasyon etkilerinin belirgin bir şekilde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu bağlamda, kefirin çeşitli şekillerde ifade edilen sağlıklı bir içecek olması yanında, patojenler üzerindeki baskılayıcı etkisi ile halk sağlıklı yönünden de önem taşıdığı sonucuna varılmıştır. Sağlık açısından faydalı olduğu bilinen kefir tüketiminin kişisel olarak, Türk ve Cibuti halkı için önerilebileceği görüşündeyim.

ÖZET

Kefirin *Staphylococcus aureus* üzerinde inhibitör etkisinin incelenmesi

Bu çalışma, kefirin *Staphylococcus aureus* üzerindeki inhibitör etkisinin incelenmesi amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla, mikroflorası bilinen kefir taneleri kullanılarak, üretim öncesi kefir üretilen sütte katılan *S. aureus*'un kefir üretimi sonrası etkileşimi incelenmiştir. *S.aureus*'un hazırlandığı; (10^6 , 10^5 , 10^4) farklı dilüsyonlardan UHT süt gruplarına (a_1 , b_1 , c_1) sırasıyla ilave edilerek kefir tanesi ile fermantasyona bırakıldı. Kefir grupları 0., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde fermantasyon öncesi ve sırasında hemen ekim yapılarak sayısal değerlendirmeleri yapılmıştır. Kontrol grupları olarak aynı işlemler kefir tanesi eklenmeden kontamine edilen süt örneklerinde uygulandı. *Staphylococcus aureus* ile kontamine örneklerde 0., 6. ve 12. saatlerde sayısal artış olurken ; özellikle 48 ve 72.saatlerde belirgin bir azalma saptanmıştır. Buna göre, ilk grup ($a_1= 10^6$) örneklerde 0., 6., 12. ve 24. saatlerde sırasıyla 4,2; 7,13; 7,0 ve 6,89 log kob/ml saptanırken; 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 6,04 ve 4,6 log kob/ml olarak belirlenmiştir. İkinci grup ($b_1= 10^5$) örneklerde 5,34; 6,64; 7,0; 6,69; 5,08 ve 3,81 log kob/ml ; üçüncü grup ($c_1= 10^4$) örneklerde 4,15; 7,1 7,2; 7,32; 5,45 ve 3,66 log kob/ml olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, *S. aureus* ile kontamine Kefir örneklerinde, kefir tanelerinin ve oluşturduğu ortamın *S. aureus* üzerinde inhibe edici bir etkisinin olduğu ve bunun ilerleyen zaman diliminde gerçekleştiği ; dolayısıyla ortam iç faktörlerinin ve rekabetçi floranın bu inhibisyonunda etkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal madde, inhibisyon, kefir, *S. aureus*, süt.

SUMMARY

Investigation of the inhibitory effect of kefir on *Staphylococcus aureus*

This study was planned to investigate the inhibitory effect of kefir on *Staphylococcus aureus*. For this purpose, the interaction of *S. aureus* after kefir before production, which is added to the milk to be produced, was investigated by using kefir grains with known microflora. *S. aureus* was prepared; (10^6 , 10^5 , 10^4) and added to UHT milk groups (a1, b1, c1) from different dilutions, respectively, and allowed to fermented with kefir grains. Kefir groups were sown immediately before and during fermentation at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours and their numerical evaluations were made. As control groups, the same procedures were applied to the contaminated milk samples without adding kefir grains. In the samples contaminated with *Staphylococcus aureus*, there was a numerical increase at 0, 6 and 12 hours; A significant decrease was observed especially at 48 and 72 hours. accordingly, in the first group (a1= 10^6) samples were 4,2; 7,13, 7,0 and 6,89 log cfu/ml at 0, 6, 12 and 24 hours, respectively; It was determined as 6,04 and 4,6 log cfu/ml at 48 and 72 hours, respectively. The second group (b1= 10^5) samples 5,34; 6,64; 7,0; 6,69; 5,08 and 3,81 log cfu/ml; the third group (c1= 10^4) was determined as 4,15; 7,1; 7,2; 7,32; 5,45 and 3,66 log cfu/ml in the samples.

As a result, kefir grains and the environment they created had an inhibitory effect on *S. aureus* in kefir samples contaminated with *S. aureus*, and this happened in the following time; therefore, it is thought that internal environmental factors and competitive flora may be effective in this inhibition.

Keywords: Antimicrobial agents, inhibition, Kefir, *S. aureus*, milk.

KAYNAKLAR

- ADRIANA P, SOCACIU C (2008). Probiotic activity of mixed cultures of kefir's Lactobacilli and Non-Lactose fermenting Yeasts, Dept. Of food science and Technology. Bulletin UASVM, Agriculture **65**(2), pISSN 1843-5246; eISSN 1843-5386.
- AGUIAR MMN (2017). Assessing the inhibitory activity of Kefir produced with a lyophilized starter towards common foodborne Pathogens. <https://web-cache.googleusercontent.com/search>.
- AHMED Z, WANG Y, AHMAD A, KHAN ST, NISA M, AHMAD H, AFREEN A (2013). Kefir and Health: A Contemporary Perspective. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **53**(5): 422-434. Doi:10.1002/9780813-821504.
- ANONİM (2000). Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. 14.02.2000-23964 nolu Resmi Gazete. 2000/6 Nolu Tebliğ.
- ANONİM (2009). Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği. Sayı: 27143, Tebliğ No: 2009/25.
- ANUKAM KC, REID G (2007). Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. Canadian Research and Development Center for Probiotics, Lawson Health Research Institute, 268 Grosvenor Street, London, Ontario, N6A 4V2, Canada. www.researchgate.net/publication/228915782.
- ATAÇ F (2016). Doğal Kefir Danesinden Üretilen Kefirin Ekşi Maya Ekmek Yapımında Kullanılması. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Isparta. Issue 9406 ; 23-359. <http://tez.sdu.edu.tr/tezler/tf03370>.
- ARSLAN S (2015). A review : chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. CyTA-Journal of Food, **13**(3): 340-345, DOI: 1080/19476-337.981588.
- BEHERA SK, PANDA SK, KAYİTESİ E, MULABA-BAFUBİANDİ AF (2017) Kefir and Koumiss Origin, Health Benefits and Current Status of Knowledge. Fermented Food-Part II: Technological Interventions Not for Circulation Ramesh C. Ray and Didier Montet(eds.). ISBN978-1-1386-37849. <https://www.researchgate.net/publication/316824128>.

- BENSMİRA M, NSABİMANA C, JİANG B (2010). Effects of fermentation conditions and Homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *State Key Laboratory of Food Science and Technology*, **43**(8):1180-1184. <https://doi.org/10.1016/j.lwt>.
- BOURRIE B C T, WILLING B P, COTTER P D (2016). The Microbiota and Health promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Agricultural Food and Nutritional Sciences*, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada, 2 Teagasc Food Research Centre, Fermoy, Ireland, 3 APC Microbiome Institute, Cork, Ireland. <https://doi.org/10.3389/fmicb.00647>.
- BULDUK S (2016). Gıda Teknolojisi, 8. Baskı, **141** sayfa. www.detayyayin.com.tr.
- CHEN CH, CHAN H M, KUBOW S (2007). Kefir extracts suppress in vitro proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells but not normal mammary epithelial cells. *Journal of Medicinal Food, J Med Food* **10**(3), 416–422. PMID:17887934. Doi:10.1089/jmf.2006.236.
- CHEN HC, WANG SY, CHEN MJ (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* **25**:492-501. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.003>.
- CETINKAYA F, MUS TE (2012). Determination of microbiological and chemical Characteristics of kefir consumed in Bursa. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **59**: 217-221. <http://vetjournal.ankara.edu.tr/698384>.
- CEVİKBAS A, YEMNİ E, EZZEDENN F W, YARDİMCİ T, ÇAVİKBAŞ U, STOHS S J (1994). Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grains. *Phytotherapy Reseach*, **8**(2): 78-82. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650080205>.
- COTARLET M, VASLEI AM, CANTARAGIU AM, GASPAPINTILIESCU A, CRACIUNESCU O, MORARU A, MORARU I, BAHRIM GA (2019). Colostrum derived bioactive peptides obtained by fermentation with kefir grains enriched with selected yeasts. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*, **43**(1), 54-68.
- DASHEN MM (2016). Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough and their baking potentials. Department of Microbiology, Faculty of Science, Ahmadu Bello University, Zaria. In partial fulfillment for the award of doctor of philosophy in microbiology. <http://kubanni.abu.edu.ng/jspui/bitstream/123456789/9290/1>.
- DEVARAJA G, VASUDHAA M (2018). Lactose intolerance with special emphasis on probiotics for management. Department of Microbiology, Davangere University, Davangere, Karnataka, India. **13**(5): 325-332. <https://www.semanticscholar.org/paper>.

- DÍAS PA, SÍLVA DT, TEJADA TS, LEAL MC GM, CONCEÍCAO RC S, TÍMM C D (2012). Survival of pathogenic microorganisms in kefir. *Rev Inst. Adolfo Lutz. Sao Paulo*; **71**(1): 182-6. ISSN 0073-9855.
- DİNÇ A (2008). Kefirin Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara Türkiye. <http://hdl.handle.net/20>.
- EL HOUDA HN, RAMEÏSSA A (2017). Etude des paramètres physicochimique et biochimiques et analyse des profils protéiques de laits additionnés de Grains de kéfir. Université des Frères Mentouri, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Option Nutrition Moléculaire et Santé. <https://webcache.googleusercontent.com/search>.
- FARAG MA, JOMAA SA, ABDEL-WAHED A, EL-SEEDİ HR (2020). The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients*, **12**(2): 346. doi: 10.3390/nu12020346. www.mdpi.com/journal/nutrients.
- FARNWORTH ED (2005). Kefir– a complex probiotic. Food research and development centre, Agriculture and Agri-food Canada, St. Hyacinthe. Canada J2S 8E3. *Food Science and Technology Bulletin Functional Foods* **2**(1):1-17. Doi:10.1616/1476-2137.13938.
- GAO X, Lİ B (2016). Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Food Science and Technology, Cogent Food and Agriculture*, **2**(1), 1272152. ISSN:2331-1932. Doi: 10.1080/23311932.
- GARROTE G, ABRAHAM AG, ANTONİ GL (2000). Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *Journal of Food Protection*, Vol. **63**(3): 364-369. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.3.364>.
- GARROTE LG, DELFEDERİCO L, ABRAHAM AG, PEREZ PF, SEMORİLE L, ANTONİ GL (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the Presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, **71**(2): 222-230. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000160>.
- GAWARE V, KOTADE K, DOLAS R, DHAMAK K, SOMWANSHİ S, NİKAM V, KASHİD AK V (2011). The magic of kefir : A Review, News-letter, *Pharmacology Online* **1**: 37-386.

- GUZEYL-SEYDİM ZB, DİBEKÇİ M, CAGDAS E, SEYDİM AC (2016). Effect of kefir on *Fusobacterium nucleatum* için potentially preventing intestinal cancer. *Functional Foods in Health and Disease*. University Faculty of Engineering Department of Food Engineering, Isparta 32260, Turkey. **6**(7): 469-477. https://d1_wqtxts1xzle7.cloudfront.net/55102029.
- HİLL C, GUARNER F, REİD G, GIBSON GR, MERENSTEİN DJ, POT B, MORELLİ L, CANANİ RB, FLİNT HJ, SALMİNEN S, CALDER PC, SANDERS ME (2014). Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and Appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**: 506-514. doi: 10.1038/nrgastro.66. PMID:24912386.
- KADIOĞLU B U (2017). Probiyotik süt ürünü olarak Kefirin Sağlıklı Beslenmedeki Yeri1. *The Journal of Academic Social Sciences* **60**(60): 135-145. Doi:10.16992/ASOS. 13103.
- KAHRAMAN C (2011). Production of kefir from bovine and oat milk mixture. Thesis Submitted to the Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology, in partial fulfilment of the Requirements for the Dgree of Master Science, in Food Engineering. ID: 90013414.
- KARAGÖZLÜ N, KARAGÖZLÜ C, ERGÖNÜL B (2007). Survival characteristics of *E. Coli* 0157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during kefir fermentation. *Czech J. Food Sci.*, **25**(4): 202-20.
- KARATEPE P, YALÇIN H (2014). kefirli sağlık. Iğdır Ün. Fen Bilimleri Enst. Der. /Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech. **4**(2): 23-30. <https://dergipark.org.tr/tr/-download/article-file/417196>.
- KARATEPE P, YALÇIN H, PATIR B, AYDIN I (2012). Kefir ve kefirin mikrobiyolojisi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, **10**: 1-10. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702120101.
- KAZAZİ H, KHODAIYAN F, REZAEİ K, PİSHVAEİ M, MOHAMMADİFAR M A, MOİENİ S (2017). Rheology and microstructure of kefiran and whey protein mixed gels. *Journal Food Science Technology*. **54**(5): 1168 –1174. PMID: PMC 5380631. Doi:10.1007/s13197*017-2553-4.
- KİM DH, JEONG D, KİM H, KANG B, CHON JW, SONG KY, SEO KH (2016). Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean J Food Sci. Anim Resour.* Vol. **36**(6): 787-790. Doi:10.585-1-/kosfa.

- KİM Y, Jİ UK, OH S, YOUNG JK, KİM M, SAE HK (2008). Technical optimization of culture conditions for the production of exopolysaccharide (EPS) by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. *Food Sci. Biotechnol.* **17** (3): 587–593.
- KIVANC M, YAPICI E (2019). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Staphylococcus aureus* during the fermentation and storage of kefir. *Food Sci. Technol.* **39**(1). <https://doi.org/10.1590/fst.39517/>
- KÖK-TAŞ T, SEYDİM AC, ÖZER B, GÜZEYL-SEYDİM ZB (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *J. Dairy Sci.* **96** (2):780–789 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.5753>. American Dairy Science Association, 2013.
- LEITE A M O, MIGUEL L M A, PEIXOTO R S, ROSADO A S, SILVA J T, PASCHOALIN V M F (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage, *Braz J Microbiol* **44** (2): 341-349, PMC 3833126. Doi: 10.1590/S1517-83822013000200001.
- LIBUDZISZ, Z., PIATKIEWICZ., A. (1990). Kefir production in Poland. *Dairy Industry. International*, **55**: 31-33.
- LOPÍTZ-OSTOA F, REMENTERÍA A, ELGUEZABAL N, GARAÍZAR J (2006). Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología* **23** (2): 67–74.
- MADIÉDO RP, REYS-GAVILAN CGL (2005). Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* **88**: 843–856. American Dairy Science Association.
- MADRY E, KRASIŃSKA B, WOZNIEWICZ M, DRZMALA- CZYZ S, BOBKOWSKI W (2011). Tolerance of different dairy products in subjects with symptomatic lactose malabsorption due to adult type hypolactasia. *Prze-glad Gastroenterologiczny*; **6**(5): 310-315. Doi:10.5114/pg.2011.25381.
- MAEDA H, ZHU X, OMURA K, SUSUKI S, KITAMURA S (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose and constipation. **22**(1-4): 197-200. PMID: 15630283. <https://doi.org/10.1002/biof.5520220141>.
- MAGALHAES KT, DRAGONE G, PEREIRA GVM, OLIVEIRA JM, DOMINGUES L, TEIXEIRA JA, SILVA JBA, SCHWAN RF (2011). Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir, *Food Chemistry, Biology Department, Federal university of Lavras*, 37200-000. 249-253. www.elsevier.com/locate/foodchem.

- MARQUINA D, SANTOS A, CORPAS I, MUNOZ J, ZAZO J, PEINDO JM (2002). Dietary influence of kefir on microbial activities in the Mouse bowel. *Letter in Applied Microbiology*, **35**: 136–140. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x>
- MORADIA Z, KALANPOUR N (2019). Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, Vol. **223**. <https://doi.org/10.1016/j.carpol.115100>.
- OKTAR E, KARAGÖZOĞLU C (1992). Farklı ısı işlem uygulanmış inek sütlerinden kefir kültürü ve tanesi ile üretilen kefirlerin dayanıklılığı ve nitelikleri üzerine Araştırmalar. *Gıda* **17**(4). <https://dergipark.org.tr/tr/pub/gida/issue/695692773>.
- ONARAN B, ÇUFAOĞLU G (2017). Comparison of microbial population of household and commercial kefir in Ankara, Turkey. *Vet Hekim Der Derg* **88**(1): 52- 58.
- OTLES S, ÇAGINDI Ö (2003). Kefir: A probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects, Food Engineering Department, Engineering Faculty, Ege University. 35100, Bornova-İzmir, Turkey. <http://translateyar.ir/wpcontent/uploads/2018/12/8721>.
- PARVEZ S, MALİK KA, AH KANG S, KİM HY (2006). Probiotics and their Fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* **100** (6): 1171–1185. doi: 10.1111/j.1365-2672.02963.
- PARK YW (2009). Bioactive Components in Milk and Dairy Products. Georgia. Small Ruminant Research and Extension Center Fort Valley State University Fort Valley, GA 31030 and Adjunct Professor Department of Food Science And Technology University of Georgia Athens, GA 30602.
- PARK YW, NAM MS (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. *Korean J Food Sci Anim Resour.* **35**(6): 831-840.
- PATEL, S.; MAJUMDER, A.; GOYAL, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian J. Microbiol.*, 52 (1) : 3-12.
- PIERMARIA JA, PINOTTI A, GARCIA MA, ABRAHAM AG (2009). Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains: development and characterization. *Food Hydrocolloids*, **23**: 684-690.
- PIERMARIA J, BOSCH A, PINOTTI A, YANTORNO O, GARCIA MA, ABRAHAM AG (2010). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocoll.* **25**: 1261–1269. doi: 10.1016/j. foodhyd.

- PORTOCARRERO SM, NEWMAN M, MİKEL B (2002). Staphylococcus aureus survival, Staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of countrycured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Science*, **62**: 267-273.
- POWEL EJ (2006). Bacteriocins and bacteriocin producers of present in Kefir and kefir grains. Department of Food Science, Faculty of Agrisciences, Stellenbosch University. ISSN-L 2310-7855. <http://hdl.handle.net/10019.1/2140>.
- PRADO MR, BLANDON LM, VANDENBERGHE LPS, RODRÍGUES C, CASTRO GR, THOMAZ-SOCCOL V, SOCCOL CR (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. Review article, *Frontiers in Microbiology*, **6**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.011-77>.
- RADHOUANI H, GONÇALVES C, MAIA FR, OLIVEIRA JM, REIS (2018). Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 1–18. Article reuse guidelines: sagepub.com/journals-permissions DOI: 10.1177/0883911518793914 journals.sagepub.com/home/jbc.
- ROSA DD, DIAS MM S, GRZESKOWIAK LM, REIS SA, CONCEIÇÃO LL, PELUZIO MC G (2017). Milk Kefir. Nutritional, Microbiological and Health Benefits. *Nutrition Research Review*, Vol **30**, Issue 1, 82-96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>.
- ROSS RP, MORGAN S, HILL C (2002). Preservation and fermentation: past, Present and future. *International Journal of Food Microbiology*, **79**(1-2): 3 –16.
- SAMANİDOU V, NISYRIOU S (2008). Multi-residue methods for Confirmatory determination of antibiotics in milk. *Laboratory of analytical of Chemistry. Aristotle University of Thessaloniki*, **31** (11): 2068-90. Doi: 10.1002/jsc.-200700647.
- SANCHEZ A, VAZQUEZ A (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, Volume 1, Issue 1, pages **29-46**. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>.
- SARKAR S (2007). Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, Vol. 109 No. 4, pp. 280-290. <https://doi.org/10.1108/0007070070-736534>.
- SEZER Ç (2003). Kefirde laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde araştırılması Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Referans (153). Doi:10.13140/RG.2.2.32403.07205.

- SCHWAN RF, GUEDES KTM, DÍAS DR (2016). Milk Kefir: Structure, Chemical and Microbiological Composition. *Fermented milk and dairy products*, **17**: 461 -482. <https://www.researchgate.net/publication/317974232>.
- SCHWAN RF, GUEDES KTM, DÍAS DR (2015). Kefir-grains and beverages: A review. *Scientia Agraria Paranaensis*, **14**(1): 1-9. SAP; ISSN: 1983-1471.
- SHAHANİ KM, CHANDAN CR (1979). Nutritional and Healthful Aspects of Cultured and Culture-Containing Dairy Foods. *Journal of dairy science*, **62**: 1685-1694.
- SHEN Y, KİM DH, CHON JW, KİM H, SONG KY, SEO KH (2018). Nutritional Effects and Antimicrobial Activity of Kefir (Grains). *J. Milk Sci. Biotechnol*, **36**(1): 1-13. pISSN:2384-0269, eISSN:2508-3635. <https://doi.org/10.22424/jmsb>.
- SİMOVA E, BESHKOVA D, ANGELOV A, HRİSTOZOVA TS, FRENGOVA G, SPASOV Z (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28** (1): 1-6. Doi:10.1038/si/jim/7000186.
- STADIÉ J (2013). Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and Yeasts in water kefir. Technische Universität München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie. Pages 139. <http://mediatum.ub.tum.de/id=1161074>.
- SUSKOVİK J, KOS B, BEGANOVİK J, PAVUNC AL, HABJANİK K, MATOSİK S (2010). Antimicrobial activity - the most important property of Probiotic and starter lactic acid bacteria, *food technol. Biotechnol.* **48**(3): 269-307. ISSN 1330-9862.
- TADA S, KATAKURA Y, NİNOMIYA K, SHİOYA S (2007). Fed-Batch Coculture of *Lactobacillus kefirianofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for Effective Production of Kefiran. Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamdooka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.
- TAMİME AY (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications-a Review. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56** (4), S2–S15. Doi: 10.1038/sj.ejcn.1601-657.
- TOMAR O, ÇAĞLAR A, AKARCA Ç (2017). Kefir ve Sağlık Açısından Önemi, Afyon kocatepe Üniversitesi, Mühendislik fakültesi, Gıda mühendisliği Bölümü, Derg Park, **17**(2): 834-853.
- ÜSTÜN Ö, GÖKÇE R (2001). Yurtdışında Üretilen fermente Süt İçecekleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **10**: 24-29.

- WANG Y, XU N, XI A, AHMED Z, ZHANG B, BAI X (2009). Effects of lactobacillus planarum MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84**:341-347. Doi: 10.1007/s00253.
- ZEJSEK K, KOLAR M, GORRSEK A (2011). Characterisation of the exopolysaccharide kefir produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology* **64**(4): 544-548. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00704.x>.
- ZHENG Y, LU Y, WANG J, YANG L, PAN C, HUANG Y (2013). Probiotic properties of lactobacillus strains isolated from Tibetan kefir grains. *Plos one*, **8**(7): e69868. Doi:10.1371/journal.pone.0069868.

