

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YARDIMCI KÜLTÜR İLAVE EDİLEREK ÜRETİLEN KEFİRLERDE
BİYOAKTİF PEPTİT OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİ SPEKTRUMLARININ ARAŞTIRILMASI

Merve ATALAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2019

ONAY SAYFASI

Tezin Başlığı : Yardımcı Kültür İlave Edilerek Üretilen Kefirlerde Biyoaktif Peptit Oluşturma Özelliklerinin ve Antimikrobiyal Etki Spektrumlarının Araştırılması

Tezi Hazırlayan : Merve ATALAY

Sınav Tarihi : 20.12.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞAHİNGİL

İnönü Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU

İnönü Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Bayram YURT

Bingöl Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Kazım TÜRK

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Yardımcı Kültür İlave Edilerek Üretilen Kefirlerde Biyoaktif Peptit Oluşturma Özelliklerinin ve Antimikrobiyal Etki Spektrumlarının Araştırılması**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Merve ATALAY



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YARDIMCI KÜLTÜR İLAVE EDİLEREK ÜRETİLEN KEFİRLERDE BİYOAKTİF PEPTİT OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN VE ANTİMİKROBİYAL ETKİ SPEKTRUMLARININ ARAŞTIRILMASI

Merve Atalay

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

87 + x sayfa

2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞAHİNGİL

Bu çalışmada, geleneksel üretim metodu ile elde edilen kefir örneklerine; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 (A), *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 (B), *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (C) ve kontrol (K) örneğine ise sadece kefir danesi ilave edilerek üretim gerçekleştirilip, 28 gün boyunca +4°C 'de olgunlaştırılmıştır. Yardımcı kültür ilave edilen kefirlerin pH ve titrasyon asitliği değerlerinin birbirinden farklı değerler aldığı; suda çözünen ve % 12 TCA'da çözünen azot değerlerinde de önemli düzeyde farklılık olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). RP-HPLC kromatogramları incelendiğinde, kefir üretiminde yardımcı kültür ilavesinin, olgunlaşma süresi boyunca peptitlerin oluşumunda ve konsantrasyonlarında birbirine benzer pikler oluşturmuştur. K örneğinin diğer örneklerden belirgin şekilde ayrıldığı tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. yardımcı kültürleri tarafından üretilen kefirin, kontrol kefir örneklerinden daha yüksek bir toplam FAA değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Kefir örneklerinin serbest amino asit değerleri ise, B ve K örneklerinde Trp, Asn, Ala, Gly içeriği depolanma sırasında artmıştır. B, C ve K örneklerinde Ile içeriği artarken, Olgunlaşma süresi boyunca Val içeriği azalmıştır. Depolamanın sonunda, *Lactobacillus* spp. kültürü ilaveli kefir örneklerinde en yüksek ACE-inhibisyon aktivite 28. gün *Lb. plantarum* örneğinde gözlemlenmiştir. Kefir örneklerinin peptit fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri* 95052 ve *Staphylococcus hominis* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etki kefir örneklerinde ise; *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*'e karşı belirlenmiş, ancak kefir örneklerinin ve peptit fraksiyonlarının *Candida albicans* ATCC 04055'i inhibe etmediği gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* spp. kültürlerinin fonksiyonel özelliği artırılmış kefir üretiminde yardımcı kültür olarak kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Biyoaktif peptit, fonksiyonel gıda, kefir, antimikrobiyal aktivite, ACE aktivitesi

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF BIOACTIVE PEPTIDE PRODUCTION PERFORMANCE AND ANTIMICROBIAL EFFECT SPECTRUM IN KEFIR WITH LACTIC ACID BACTERIA

Merve Atalay

İnönü University
Institute of Science
Department of Food Engineering

87 + x pages

2019

Supervisor: Assistant Prof. Üyesi Didem ŞAHİNGİL

In this study, kefir samples obtained by the traditional production method; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 (A), *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 (B), *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (C) and control (K) samples were added by adding only kefir grain and matured for 28 days at + 4 ° C. The pH and titratable acidity values of the kefir supplementary culture were different; There was also significant difference in water-soluble and nitrogen soluble in 12% TCA (P <0.05). When the RP-HPLC chromatograms were examined, the addition culture in the production of kefir produced similar peaks in the formation and concentrations of the peptides during the ripening period. It was found that the K sample was distinctly separated from the other samples. *Lactobacillus* spp. kefir produced by ancillary cultures were found to have a higher total FAA value than control kefir samples. The free amino acid values of kefir samples were increased during the storage of Trp, Asn, Ala, Gly contents in B and K samples. In the B, C and K samples, the Ile content increased while the Val content decreased during the ripening period. At the end of storage, the highest ACE-inhibition activity was observed at day 28 *Lb. plantarum*. Peptide fractions of Kefir samples have been found to have an antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus hominis*. In antimicrobial effect kefir samples; It was determined against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, but it was observed that kefir samples and peptide fractions did not inhibit *Candida albicans* ATCC 04055. It was determined that *Lactobacillus* spp. cultures in the increasing functional properties of kefir have the potential as additional culture.

KEY WORDS: Bioactive peptide, functional food, kefir, antimicrobial activity, ACE-
i activity

TEŞEKKÜR

Bu alıőmada, yardım, öneri ve desteğini esirgemeden beni yönlendiren çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞAHİNGİL'e, ilgi, bilgi ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOğLU ve İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki tüm hocalarıma, tezi değerlendiren ve çalışmaya pozitif katkılar sunan jüri yeleri hocalarıma, duysal analizlere katılan hocalarıma ve lisansüstü ğrenci arkadaőlarıma, FYL-2017-728 No'lu proje ile araőtırmamı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve çalıőmamın her aőamasında beni destekleyen sevgili anneme, babama, kardeőlerime ve bana daima destek olan sevgili eőime ve oğluma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Kefirin Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.2. Kefir Danesi ve Yapısı.....	3
2.3. Kefir Üretimi ve Bileşimi.....	5
2.3.1. Geleneksel Kefir Üretimi.....	8
2.3.2. Endüstriyel Kefir Üretimi.....	8
2.3.3. Yardımcı Kültür İlaveli Kefir Üretimi.....	8
2.4. Kefirin Beslenme ve Sağlık Üzerine Faydaları.....	9
2.5. Kefirin Muhafazası.....	11
2.6. Kefirdeki Laktik Asit Bakterileri.....	12
2.7. Kefirdeki Biyoaktif Peptitler.....	14
2.8. Kefirin Antimikrobiyal Etkisi.....	18
2.9. Kefirin Antihipertansif Etkisi.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Süt.....	22
3.1.2. Starter Bakteriler.....	22
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Kefir Üretiminde Kullanılacak Kültürlerin Hazırlanması.....	22
3.2.2. Kefir Üretimi.....	22
3.2.3. Kimyasal Analizler.....	24
3.2.3.1. Titrasyon Asitliği.....	24
3.2.3.2. pH Değeri.....	24
3.2.3.3. Kuru Madde Oranı.....	24
3.2.3.4. Yağ ve Kuru Maddede Yağ Oranları.....	24
3.2.3.5. Protein Oranlarının Belirlenmesi.....	26
3.2.3.6. Kefirdeki Azotlu Madde Fraksiyonlarının Ayrılması.....	26

3.2.3.6.1.	Suda Çözünen Azot Oranı ve Olgunlaşma Derecesi.....	26
3.2.3.6.2.	% 12 Trikloroasetik Asitte (TCA) Çözünen Azot Oranı.....	27
3.2.3.6.3.	Toplam Serbest Amino Asit Miktarı.....	28
3.2.3.6.4.	RP-HPLC Peptit Profillerinin Belirlenmesi.....	29
3.2.4.3.	RP-HPLC Serbest Amino Asit Miktarı.....	29
3.2.5.	Kefir Örneklerinin ve SÇA Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi	30
3.2.6.	ACE-İnhibitör Aktivitesinin Belirlenmesi.....	31
3.2.7.	Mikrobiyolojik Analizler.....	32
3.2.7.1.	Seri Dilüsyonların Hazırlanması.....	32
3.2.7.2.	Koliform Bakteri Sayımı.....	32
3.2.7.3.	Maya Sayımı.....	33
3.2.7.4.	Laktobasil Sayımı.....	33
3.2.7.5.	Laktokok Sayımı.....	33
3.2.8.	Duyusal Analiz.....	33
3.2.9.	İstatistiksel Analizler.....	35
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.1.	Bileşim Analizleri.....	36
4.2.	Proteoliz Oranları	40
4.2.1.	Kefirlerde Ters Faz Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile Belirlenen Peptit Profilleri.....	43
4.2.2.	Kefirlerde RP-HPLC Serbest Amino Asit Miktarı.....	46
4.3.	Kefir Örneklerindeki Toplam Serbest Amino Asit (FAA) Miktarları.....	52
4.4.	Kefirde ACE- İnhibisyon Aktivitesinin Bulguları.....	53
4.5.	Kefirde Antimikrobiyal Aktivite Bulguları.....	58
4.6.	Mikrobiyolojik Analizler.....	63
4.6.1.	Maya Sayısı.....	63
4.6.2.	Laktokok Sayısı.....	66
4.6.3.	Laktobasil Sayısı.....	67
4.7.	Duyusal Değerlendirme.....	70
5.	SONUÇ.....	74
6.	KAYNAKLAR.....	75
	ÖZGEÇMİŞ.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABS	Absorbans
ACE-i	Angiotensin converting enzyme-İnhibisyon
Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asn	Asparagin
Asp	Aspartic acid
Caco-2	Colon Adeno Carcinoma Cell, Kolon Adeno Karsinom Hücresi
Cd-Ninhidrin	Cadmium Ninhydrin
Cys	Cystine
Da	Dalton
dk	Dakika
FAA	Free amino acid, Serbest amino asit
g	Gram
g	Gravity, bağıl santrifüj kuvveti
Gln	Glutamin
Glu	Glutamic acid
Gly	Glycine
His	Histidine
Ile	Isoleucine
kDa	KiloDalton
kg	Kilogram
kob/g	Koloni oluşturan birim/ gram
l.a.	Laktik asit
LAB	Laktik asit bakterisi
Lb.	Lactobacillus
Lc.	Lactococcus
leu	Leucine
M	Molar
Met	Methionine
mg	Miligram
mM	Milimolar
nm	Nanometre

N	Normalite
PCA	Principal Component Analysis, Temel Bileşen Analizi
Pro	Proline
RP-HPLC	Reversed-Phase high performance liquid chromatography
s	Saniye
SÇA	Suda çözünen Azot
Thr	Threonine
Tyr	Tyrosine
Val	Valin
µm	Mikrometre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Kefir örneklerinin üretim akış şeması.....	23
Şekil 3.2.	Farklı konsantrasyonlarda Leu standardına karşı elde edilen absorban değerleri.....	28
Şekil 4.1.	Olgunlaşmanın 1. ve 7. günündeki (a) HPLC peptit profili.....	44
Şekil 4.2.	Olgunlaşmanın 21. ve 28. günündeki (b) HPLC peptit profili...	45
Şekil 4.3.	1. ve 28. gün kefir örneklerinin RP-HPLC serbest amino asit kromatogramı.....	49
Şekil 4.4.	Serbest Amino Asit değerlerine ait PCA Grafiği.....	51
Şekil 4.5.	Kefir örneklerine ait Toplam serbest amino asit değerleri.....	52
Şekil 4.6a.	Olgunlaşma süresince kefir örneklerindeki ACE-i değerleri....	54
Şekil 4.6b.	Olgunlaşma süresince kefir örneklerindeki IC ₅₀ değerleri.....	55
Şekil 4.7.	İnek sütü ile üretilen kefir örneklerindeki Maya değişimi.....	64
Şekil 4.8.	İnek sütü ile üretilen kefir örneklerindeki Laktokok değişimi...	66
Şekil 4.9.	İnek sütü ile üretilen kefir örneklerindeki Laktobasil değişimi..	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Kefir ve Kefir Danelerinin Mikroflorası.....	4
Çizelge 2.2.	Kefirin kimyasal bileşimi ve besinsel değeri.....	6
Çizelge 4.1.	Kefir örneklerinin kimyasal özellikleri.....	36
Çizelge 4.2.	Kefirde olgunlaşma boyunca belirlenen suda çözünen azot miktarı.....	40
Çizelge 4.3.	1. ve 28. günde 4 °C'de Kefir (mg / 100 g kefir) 'deki serbest amino asit miktarları.....	47
Çizelge 4.4.	Kefir ekstraktlarının (SÇA, 28.gün) antibakteriyel aktivitesi mm cinsinden inhibisyon bölgesi (IZ) cinsinden.....	59
Çizelge 4.5.	Kefirin (28.gün) antibakteriyel aktivitesi, inhibisyon zonu (IZ) cinsinden mm cinsinden.....	60
Çizelge 4.6.	Depolama boyunca belirlenen duyuşsal özellikler.....	73

1. GİRİŞ

Süt, bebekler ve yetişkinler için önemli besin elementlerini içeren, bağışıklık sistemini koruyucu, biyolojik olarak aktif bileşenlerin kaynağı olan bir gıdadır (Clare ve Swaisgood, 2000). İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan süt proteinleri son 20 yıl içerisinde yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip peptitlerin ortaya çıkmasıyla daha da önem kazanmıştır. Bundan dolayı süt sadece bir gıda olarak değil, aynı zamanda biyoaktif bileşenlerin en önemli kaynaklarından biri olma özelliğini taşımaktadır (Dağdemir vd., 2003). Sütün temel bileşenleri; kazein (α , β , κ , γ), α -laktalbumin (α -La), β -laktoglobulin (β -Lg), immunoglobulin, laktoferrin, proteoz-pepton, transferin ve kan serum albumindir. Bu protein fraksiyonlarından kaynaklanan peptitler, sinir sistemini düzenleyici (opioid), damar tıkanıklığını önleyici (antitrombotik), yüksek tansiyon önleyici (antihipertansif), bağışıklık sistemini düzenleyici, antimikrobiyel ve mineral taşıyıcı özellikleri bulunmaktadır (Clare ve Swaisgood, 2000; Tokatlı vd., 2005; Çelikel vd., 2005; Korhonen vd., 2006; Ong vd., 2007; Haque vd., 2009).

Son yıllarda yaşam standartlarının yükselmesine bağlı olarak sağlıklı beslenmenin önemi her geçen gün artmaktadır. İnsanları hastalıklardan koruma potansiyeli ve sağlığımızı destekleyici faydaları olan, fonksiyonel gıda olarak tanımlanan ürünlere talep de fazladır (Otleş vd., 2003). Fonksiyonel gıdaların tanımı Gıda mevzuatında yapılmıştır. Bu tanımlaya göre fonksiyonel gıdaların önde gelen özellikleri arasında besleyici olmaları, bir veya birden fazla bileşene sahip oldukları için sağlığı koruyucu özelliklerinin olması, hastalıklara yakalanma riskini azaltmaları bulunmaktadır.

Fonksiyonel gıdalarda, içerisinde sağlığımıza yararlı canlı mikroorganizmalar bulunduran veya canlı mikroorganizmalarca üretilmekte olan faydalı gıdalar probiyotik olarak tanımlanmaktadır (Farnworth, 2005). Başka bir tanımda ise; 19. yüzyıl sonunda sağlıklı kişilerde hastalıklı kişilerden farklı olarak gastrointestinal yollarda bulunan mikroflara 'Yaşam için' anlamına gelen 'probiyotikler' olarak belirtilmiştir (Nielsen, 2014). Nobel ödül sahibi Rus bilim insanı Elie Metchnikoff, 1908 yılında laktik asit bakterilerini keşfetmiş ve ardından daha uzun ve daha sağlıklı bir yaşam için içerisinde bu bakterileri bulunduran fermente süt ürünlerini tüketmeyi önermesi ile birlikte probiyotik gıdalar daha dikkat çekici hale gelmiştir. Günümüzde

alternatif tıp ve hastalık tedavi süreçlerinde destekleyici takviye gıda olarak probiyotik gıdalar ve özellikle probiyotik süt ürünleri önemsenmektedir.

Fermente ürünler 'Fermantasyon' işlemi ile elde edilen ürünler olup, mikroorganizmaların metabolik ve enzimatik reaksiyonları sonucu gıdaların fiziksel ve kimyasal yapısını değiştirerek muhafaza süresini, lezzetini ve aromasını artırması işlemidir.

Sağlıklı ve uzun süreli yaşam için fermente süt ürünleri önemlidir. Sütün fermantasyonu özellikle laktik asit bakterileri, küf ve mayaların tek veya birlikte kullanılması ile sağlanır. Kefir önemli fermente süt ürünlerindedir ve orjini Kafkasya bölgesidir. Kefir çok eski tarihe sahip olup; inek, koyun, keçi sütüne kefir daneleri veya kefir danesindeki mikroorganizmalardan üretilmiş olan starter kültürler ilave edilerek etil alkol ve laktik asit fermantasyonları sonucu elde edilen, köpüklü, koyu kıvamlı, hafif ekşi fermente bir süt ürünüdür (Güzel-Seydim vd., 2005).

Kefirin fonksiyonel özelliklerini arttırmak için ilave edilen yardımcı kültürler, fermantasyon esnasında simbiyotik olarak yaşayan mikroorganizmaların birlikte çalışmalarına yardımcı olmaktadır. Danede bulunan maya türleri proteolitik özellikleriyle aminoasit oluşturur, LAB tarafından oluşturulan laktik asidi kullanarak pH'ı artırır ve bakteri üremesini harekete geçirir. İlave edilen LAB probiyotik özelliklerinden dolayı proteolize katkı sağlayarak ve oluşan metabolitlerle, kefir danelerinde bulunan diğer mikroorganizmaların gelişmesine yardımcı olmaktadır (Tomar, 2017). Yardımcı kültür olarak kullanılan LAB, kefirlerin probiyotik özelliğine ve proteolizine katkı sağlayıp fonksiyonel özelliklerini arttırmasından dolayı endüstriyel üretimlerde kullanılabilir.

Bu çalışmanın amacı, geleneksel yöntem ile üretilen yardımcı kültür ilaveli kefirlerin biyoaktif peptit oluşturma özelliklerini, antihipertansif ve antimikrobiyal etkilerini araştırmaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kefirin Tanımı ve Tarihçesi

Kefir 'keyif verici içecek' anlamına gelmektedir (Kurman, 1984). Türk Gıda Kodeksinde de kefirin tanımı yapılmıştır bu tanımda kefir: Fermentasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin farklı değişik suşları ile laktozu fermente etmeyen (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) ve fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) mayaları ihtiva eden starter kültürler veya kefir tanelerinin kullanılmış olduğu fermente süt ürünüdür (Anonim, 2009).

Kafkasya'da çok uzun yıllardan beri yaygın olarak üretilip tüketilmekte olan kefirin tarihçesi hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır. O bölge de yaşayan halkın inek ve keçi sütünden starter kültür olarak kefir danesi adı verilen özel bir yapıyı kullanarak kefir ürettikleri bildirilmektedir. Kefir danelerinin ilk olarak nerede ve ne şekilde meydana geldiği konusu açık olarak bilinmemekle birlikte; kefir danelerinin Kafkasya'da keçi tulumunda, inek sütünün koyun ve dana şirdenleri ile pıhtılaştırılması neticesinde elde edildiği tahmin edilmektedir. Pıhtılaşmanın gerçekleştiği tulumun iç yüzeyinde yaklaşık birkaç hafta sonra süngerimsi bir kabuk tabakası oluştuğu, bu kabuk tabakasının alınarak kurutulduğu ve kuruma neticesinde meydana gelen küçük topakların kefir danesi olduğu belirtilmektedir (Koroleva, 1988).

2.2. Kefir Danesi ve Yapısı

Kefir, kefir daneleri veya starter kültürler ile fermentasyon sonucu elde edilmektedir. Kefir danesi, ana kültürü koyun bağırsak florasına aşılınıp, yavaş yavaş polisakarit tabakası oluşmuş ve deri yüzeyinden alınarak pastörize sütte çoğaltılmıştır. Kefir daneleri 3 ile 20 mm arasında değişen parçalardan oluşmaktadır.

Bu daneler laktik asit bakterileri (laktobasil, laktokok ve lekonostoklar) ve kazein (süt proteinleri) ve kompleks şekerlerle bir polisakarit matrisi ile karıştırılmış maya karışımı içermektedir (Bottazzi vd., 1980). Bir glikoz ve galaktozdan oluşan esnek çözünmeyen bir polisakarit ve protein matrisine gömülmüş yaklaşık 30 tür Laktik Asit Bakterisi ve mayadan oluşan karmaşık bir mikrobiyotadan oluşmaktadır (Oliveira vd., 2013).

Çizelge 2.1. Kefir ve Kefir Danelerinin Mikroflorası (Marshall, 1993)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Lb. Kefir</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Lb. Brevis</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb. Casei</i>	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>
<i>Lb. Lactis</i>	<i>Lc. lactis var. Diacetylactis</i>
<i>Lb. parakefir</i>	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	<i>L. cremoris</i>
<i>Lb. casei ssp. lactis</i>	<i>L. mesenteroides ssp. dextranicum</i>
<i>Lb. kefirpranum</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Lb. helveticus ssp. lactis</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	<i>Acetobacter</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Maya</i>	<i>A. raseris</i>
<i>Candida kefir</i>	
<i>C. pseudotropicalis</i>	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	
<i>K. fragilis / marxianus</i>	
<i>Saccharomyces ssp.</i>	
<i>Torulopsis holmii</i>	

Kefir danesi yapısında ve mikrobiyal profilinde bölgesel farklılıklar göstermektedir (Oliveira vd., 2013). Danelerin içindeki mikrofloranın düzeni hala belirsizliğini korumaktadır. Bazı durumlarda, taramalı elektron mikroskopisi (SEM), kefir tanesinin dış kısmına yakın olan laktobasilleri ve esas olarak merkeze doğru olan mayaları göstermektedir. Mayaların baskın olduğu bölgelerde, az sayıda bakteri vardır; laktobasillerin baskın olduğu yerlerde az miktarda maya gözlemlenmiştir (Oliveira vd., 2013). Yapılan başka bir çalışmada, SEM, içte daha az toplam organizma olmasına rağmen, danenin dış ve iç kısımları arasında benzer oranlarda laktobasil ve maya ortaya çıkarmıştır (Tomar, 2017). Başka bir araştırma grubu da, üç Brezilya kefir tanesinin hem iç hem de dış tanecik bölümlerinde, dış kısımda en sık maya bulunan çubuk şeklindeki bakteriler tespit edilmiştir (Bensmira, 2019).

Kefir daneleri kullanıldığı sürece çoğalmaktadır ve daneler her mayalamadan sonra kaynatılıp soğutulmuş su ile yıkanıp, metal olmayan süzgeçte ve metal ile temas

ettirilmeden süzülerek +4 derecede 11 gün saklanabilmektedir. Ayrıca daha uzun süreli dane saklanması için kurutma işlemi uygulanabilir ve aktifleştirileceği zaman pastörize süt kullanılabilir (Otlas vd., 2003).

2.3. Kefir Üretimi ve Bileşimi

Kefir üretimi iki şekilde yapılmaktadır. Bunlar endüstriyel ve geleneksel yöntemlerdir. Geleneksel yöntemde probiyotik bakterileri, mayalar ve laktik asit bakterileri de ihtiva eden kefir danesinin süte eklenip mayalanması ile gerçekleştirilirken endüstriyel üretimde sınırlı miktarda starter kültürün süte ilavesi ile gerçekleştirilmektedir (Chifiriuc, 2011).

Endüstriyel yöntem ile kefir üretilmesi ise dondurulmuş olan kefir starter kültürü veya geleneksel kefir danesi kullanılmasıyla veya kefir danesiyle üretilmiş olan kefirin süte aşılama yöntemi ile elde edilmektedir. Dondurulmuş suretiyle kurutulan starter kültür kullanılmasıyla üretilmiş olan kefirlerin mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri çoğunlukla benzer olsa da her kefir danesinin mikrobiyal yükü farklı sayı ve oranlardadır (Bottazzi, 1980).

İyi bir kefirin içeriğinde %0.6-0.9 aralığında laktik asit, %0.6-0.8 aralığında alkol, %0.6-0.8 aralığında etil alkol, %50 aralığında CO₂ ile farklı aldehitler ve aseton bulunmalıdır (Koçak vd., 1981; Yılmaz vd., 2006). Kefirin kimyasal bileşimi Çizelge 2.4'de bulunmaktadır.

Çizelge 2.2. Kefirin kimyasal bileşimi ve besinsel değeri (Yalçın vd., 2017)

İçerik	100 g	İçerik	100g
Enerji	65kcal	Mineral (g)	
Yağ(%)	3,5	Kalsiyum	0,12
Protein	3,3	Fosfor	0,1
Laktöz(%)	4	Magnezyum	12
Su	87,5	Potasyum	0,15
Süt Asidi (g)	0,8	Sodyum	0,05
Etil Alkol (g)	0,9	Klorit	0,1
Laktik Asit (g)	1		
Kolesterol (mg)	13	İz Elementler	
Fosfatidler (mg)	40	Demir(µg)	0,05
		Bakır (µg)	12
Esansiyel amino asitler (g)		Molibden (µg)	5,5
Triptofan	0,05	Manganez (µg)	5
Fenilalanin+Tirozin	0,35	Çinko (µg)	0,36
Lösin	0,34		
İsolösin	0,21	Aromatik Bileşenler	
Treonin	0,17	Asetaldehit	
Metionin+sistin	0,12	Diastil	
Lisin	0,27	Aseton	
Valin	0,22		
Vitaminler (mg)			
A	0,06	B ₁₂	0,5
Karoten	0,02	Niasin	0,09
B ₁	0,04	C	1
B ₂	0,17	D	0,08
B ₆	0,05	E	0,11

Kefir üretiminde kullanılmış olan süt çeşidi, kefir kültüründeki mikroorganizmaların çeşidi, kefir üretim tekniği, kefirin mayalanma süresi ve sıcaklığı, yapılmasından içilmesine kadar geçen zaman kefirin bileşimine etki eden faktörlerdir. Duyusal özellikler açısından iyi bir kefirin yapısının akıcı olması, parlak ve homojen bir görüntüsünün olması ve topaklı bir yapıda olması arzu edilir. İçilme esnasında hafif mayamsı tat ile aromanın hissedilmesi ve serinleten bir etkisinin olması gereklidir. Kefir kültürünün bünyesinde olan asetik asit ve laktik asit bakterileri ile mayalar inkübasyon esnasında sütte bir takım değişimlerin oluşmasını sağlar. Homofermantatif laktik asit bakterileri laktaz (β -galaktosidaz) enzimi salgılayarak laktozu önce glikoz ve galaktoza parçaladıktan sonra 1 molekül laktozdan 4 mol laktik asit oluştururlar. Heterofermantatif bakteri olan *Leuconostoc* ise, enzimler ile laktozu önce glikoz ve galaktoza parçalar; sonra glikoz ve galaktozdan laktik asit, CO₂ ile aroma maddeleri asetoin, diasetil, asetaldehit ve aseton meydana getirirler.

Beshkova vd. (2003) yaptığı bir çalışmaya göre asetaldehitin *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, diasetilin *S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lc. lactis*, asetonun *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Lb. helveticus*, etanolün ise *S. cerevisiae* tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir.

Starter kültür çeşitinin kefirin mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, tam yağlı ve yağsız sütlere % 1 oranında ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi inoküle edilmiş, elde edilmiş olan kefir örnekleri 28 gün boyunca 4°C’de depoda bekletilmiş ve çalışma sonucunda, kefirin mikrobiyal canlılığı üzerine üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin ve depolama süresinin önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Kefir danesi kullanılarak üretilmiş olan kefir örneklerinin depolama süresi boyunca pH değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Buna karşılık ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilmiş olan kefir örneklerinin pH değerlerinin ise depolama boyunca ilk günlerde düştüğü daha sonra tekrar yükseldiği belirlenmiş ve depolamanın 28. gününde kefir danesi kullanılarak üretilmiş olan kefir örneklerinin pH’sının, ticari kefir starter kültürü kullanılmasıyla üretilmiş olan kefir örnekleri ile kıyaslandığında daha düşük, titrasyon asitliği değerlerinin ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ticari kefir starter kültürü kullanılmasıyla üretilmiş olan kefir örneklerinin laktoz miktarı ile serum ayrılması değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine kıyasla daha düşük olduğu ve buna karşın sertlik değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Depolama boyunca örneklerin laktoz miktarında azalış, serum ayrılması ve sertlik değerlerinde ise genel olarak artış olduğu tespit edilmiştir (Montanuci vd., 2012).

Yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde laktozun bakterilerce parçalanması ve asit ortam oluşması neticesinde depolanma süresince pH değerinin düştüğü, buna karşın kefirde ise mayaların bulunmadığından dolayı depolama süresinde pH değerinde önemli bir değişiklik ortaya çıkmadığı görülmüştür (Oliveria, 2013).

Süt, süzme peynir, peynir altı suyu, peynir ve tereyağı; kasların çalışmasını ve midenin hızlı boşalma fonksiyonunu inhibe edecek bir etkiye sahipken, taze kefir mide sindirimini destekleyen etkiye sahiptir (Tomar, 2017).

Sürekli tüketim ile beraber kefirin içeriğinde bulunan yararlı bakterilerden olan laktobasiller bağırsaklara yerleşip, bağırsaklardaki mikroflorayı düzeltir ve ürettiği asit, antibiyotik bileşiklerle hastalığa sebep olan bakterilerin yok olmasını sağlamaktadır.

2.3.1. Geleneksel Kefir Üretimi

Bu yöntemle yapılan kefir üretiminde çiğ süt kaynatılıp oda sıcaklığına soğutulmaktadır. Oda sıcaklığındaki bu süte %2-7 arası kefir danesi ilave edilerek karanlık bir ortamda 18 ile 24 saat arasında bekletilmektedir. Mayalanma neticesinde kefir metal olmayan süzgeçte süzülerek daneden ayrılmaktadır. Dane kaynatılıp soğutulmuş su ile yıkanarak +4°C'de saklanmaktadır.

2.3.2. Endüstriyel Kefir Üretimi

Bu yöntemle yapılan kefir üretiminde, istenilen şartlarda kefirde kurumadde, yağ standardizasyonu ve homojenizasyon yapılabilir. Yüksek vizkozite için homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmekte olup süt 5 dakika boyunca 95°C de pastörize edilmektedir. Pastörize süt 22-25°C'ye soğutulup, %2-7 arası kültür ilavesi ile 16 ile 20 saat arasında inkübasyona bırakılmaktadır. Inkübasyon işlemi pH 4.5-4.6 aralığına geldiğinde sona erdirilmekte ve 4-6°C'ye soğutulularak olgunlaştırma tanklarına alınarak, denatüre olan serum proteinleri su absorblamasıyla kefirin akışkanlığını arttırmaktadır (Soltani, 2010).

2.3.3. Yardımcı Kültür İlaveli Kefir Üretimi

Yapılan birçok çalışmada fermente süt ürünlerinin insan sağlığına olan yararlarının artırılması amacı ile ilave starter kültürler kullanılarak üretilmektedir.

Fermente gıdaların mikroflorasının temel üyesi laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterileri, süt ürünlerinde (peynir, yoğurt, tereyağ, kefir, kımız v.b) ürettikleri metabolitler ile ürünlerin kendine has koku, aroma ve yapısının oluşmasını ve bazı patojenlerin inhibisyonunu sağlamaktadırlar. Mayaların ve laktik asit bakterilerinin (LAB) sütü fermente etmiş olmaları ile CO₂, laktik asit, az miktarda alkol ve aroma maddeleri (aseton, diasetilden, asetaldehit) meydana gelir ve bu maddelerin tamamı kefirin duyusal özelliklerini ve fonksiyonel yapısının ortaya çıkmasını sağlar. Homofermantatif süt asidi bakterileri, laktozu laktaz enzimi ile önce glikoz ve galaktoza parçalamaktadır. Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise özellikle *Leuconostoc*, süt şekerini önce glikoz ve galaktoza parçalayarak süt asidi, karbondioksit, aroma maddeleri, diasetil, aseton, ve asetaldehit oluşmasını sağlar. Mayalar ise glikoz ve galaktozdan etil alkol ve karbondioksit oluşturmaktadırlar. Yağ ve protein hidrolizi sonucu oluşan metabolitlerden farklı olarak, laktozun hidrolizi

esnasında değişik aroma maddeleri ile patojen ve bozulmaya sebep olan mikroorganizmalara karşı nisin gibi antibiyotik benzeri antimikrobiyal maddeler meydana gelmektedir (Nielsen, 2014).

Kefir fermantasyonunda laktik asit bakterileri laktat oluşmasına sebep olarak ortamın asitliğini yükseltirler ve mayaların gelişimi adına daha uygun olabilecek bir ortam meydana getirirler. Mayaların laktatı kullanarak aşırı laktat birikimini engellemeleri bakterilerin gelişmesine pozitif etki yapmaktadır (Montanuci vd., 2012).

Fermente sütün üretilmesinde starter kültürlerin önemini arttıran temel parametrelerden bir tanesi de aroma bileşenlerini üretebiliyor olmasıdır. Kefirde aroma ve tat standart bir yapıda değildir. Her farklı üretim yerinde üretmiş olan kefirin ihtiva ettiği etil alkol, laktik asit ve aroma bileşenlerinin oranı değişik olabilmektedir. Geleneksel kefirin üniform aroması kefir danesinden gelen birçok bakteri ve maya türlerinin simbiyotik aktivitelerinin bir neticesidir. Kefir üretiminde starter kültürün kullanılması, kontrol edilebilir standardize ürünlerin oluşturulmasına izin verir (Wszolek vd., 2001).

S. thermophilus ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ilaveli yoğurt ile ilgili yürütölen çalışmada ilave kültürün fermantasyon süresini kısalttığı, yoğurt yapısını, tekstürünü ve fonksiyonelliği arttırdığı tespit edilmiştir (ayır, 2007).

Yardımcı kültür ilaveli bufolo sütlerinden yapılan yoğurtlardaki bir çalışmada *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* laktik asit bakterileri kullanılarak antioksidan ve antimikrobiyal aktivite tespiti yapılmıştır. 1. gün, 7. ve 15. günlerde ölçümler yapılmış ve en yüksek antimikrobiyal aktivitenin 15. günde *Lb. helveticus* da olduğu tespit edilmiştir (Beshkova, 2003). *Lb. helveticus*, süt ürünleri üretimi, çoğunlukla peynir ve fermente süt üretimi için geniş kullanımı nedeniyle en çok çalışılan bakteri olarak belirtilmiştir (Tomar, 2017).

2.4. Kefirin Beslenme ve Sağlık Üzerine Faydaları

Fermente süt ürünü olan kefir, insan beslenmesi açısından önemlidir. Süt grubunda olan besinler kalsiyum, protein, B2 ve B12 vitaminin de dahil olduğu birçok besin maddesinin önemli bir kaynağını oluşturmaktadır. Süt ayrıca önemli bir kalsiyum ve protein kaynağıdır. Sütte bulunan protein, biyolojik değeri olan bitkisel proteinlere göre daha yüksek seviyededir. Süt ve ürünleri potasyum, fosfor, çinko,

magnezyum, A ve B12 vitamininin de önemli kaynağı durumundadır (Ebringer vd., 2008).

Kefir sütte bulunan bütün besin öğelerini ve bunun yanında insan vücudu için gerekli olan ve besin yoluyla alınması zaruri olan amino asitler ile bazı yağ asitlerini bileşiminde bulundurmaktadır (Köroğlu vd., 2015). Kefir, B₁, B₂, B₆, B₁₂ vitaminlerinin yanı sıra, folik asit, K vitamini ve biyotin (vit. H) kaynağı ve makro minerallerden olan potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, mikro minerallerden de manganez, çinko, demir, bakır ve kobalt içermektedir (Ahmed vd., 2013; Esmek vd., 2015; Otles vd., 2003). İnsan vücudunun fosfor ve kalsiyum gereksiniminin yaklaşık %20'si, B₁₂ vitaminininin %14'ü, magnezyumun %5'i, B₂ vitaminininin %19'u 175 ml kefir tüketilmesi ile sağlanabilmektedir (Felix, 2016). Kefir, antibakteriyal, immunolojik, antitümöral ve hipokolesterolemik etkisinden dolayı ideal bir içecek olarak kabul edilmektedir (Zacconi vd., 1995; Furukawa vd., 1990; Furukawa vd., 1991; Tamai vd., 1996). Bazı ülkelerde tüberküloz, kanser ve gastrointestinal gibi sağlık sorunlarının tedavisinde ilaçların yanı sıra kefirin tedavi amaçlı kullanılması tavsiye edilmektedir (Çevikbaş vd., 1994). Koroleva (1988), yaptığı araştırmada Sovyetler Birliği'nde kefirin alerjik hastalıklar, metabolik bozukluklar ve arterosklerozis gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanıldığını belirtmiştir. Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda kefirin insan sağlığı üzerine etkisini araştırmış bunun sonucunda kefirin bileşenlerinin çeşitli rahatsızlıklara (sinirsel rahatsızlıklar, iştah sorunu, mide rahatsızlığı, uykusuzluk) iyi geldiği rapor edilmiştir (Hosono vd., 1990; Osada vd., 1994; Zacconi vd., 1995). Sinir sistemi üzerinde etkin rol oynayan esansiyel aminoasitlerden olan triptofanın yanı sıra Ca ve Mg minerallerinide bünyesinde bulundurmaktadır. Düzenli bir şekilde kefir tüketiminin dolaşım ve boşaltım sistemlerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Hosono vd., 1990; Osada vd., 1994; Zacconi vd., 1995). Kefirde mevcut olan organik asitler özellikle kolesterolün kontrol altına alınmasında, karaciğeri korumada ve nükleik asitlerin sentezinde önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir.

Yapılan araştırmalarda kefirin antikarsinojenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kefirin immun sistemi üzerinde uyarıcı bir etkisi bulunmaktadır (Furukawa vd., 1991). Kefir bazı bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, özellikle *Salmonella kedougou*'ya karşı engelleyici bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Zacconi vd., 1995). Kefir içerisinde bulunan mikroorganizmalar

salgıladıkları enzimler sayesinde patojen mikroorganizmaların gelişiminin engellediği tespit edilmiştir (Anonim, 2018a).

Fareler üzerinde yapılan iki farklı çalışmada kefir kullanımının etanol kaynaklı gastrit ülserini önlediği, oksitatif stresin düşürülmesi ile böbrek hasarının engellediği tespit edilmiştir (Punaro vd., 2014). Antibakteriyel ve anti-flamatuar yapıya sahip olan kefir doğal bir probiyotiktir ve bu özelliklerinden faydalanılarak kefir taneleri jel kıvamına getirilerek yanık tedavisinde kullanılmış, başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Huseini vd., 2012). Kim vd. (2017), yaptıkları çalışmalarda kefirin içinde bulunan mikroorganizmaların obezite ve karaciğer yağlanmasının azalmasına yardımcı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kefir içeceğinin kan şekerini düzenleyici etkisi üzerinde birçok çalışma mevcuttur. Kefirin suda çözünen kısmının vücudumuzdaki kas hücrelerinde glikoz geçirgenliğini arttırdığını ve Tip 2 diyabet tedavisi için önemli olabileceğini belirtilmiştir. Yapılan çalışmada tedavide etkili olan maddenin küçük moleküler yapıda olup sıcaklık değişimleri ve pH değişimlerinden etkilenmediği bildirilmiştir. Bunun anlamı kefirin suda çözünen kısmının ağızdan alındıktan sonra midede bozulmayacağı ve yapısının küçük olmasından dolayı barsakta kolay bir şekilde emilebileceğidir (Teruya vd., 2002).

Kefirin içerdiği bazı proteinler ve peptitlerin kanser tedavisinde rolü olduğu tahmin edilmiştir. Kanser başlangıcının minimum hızda olmasını sağlayan mekanizmalarından biri de bağışıklık sistemini aktive etmeleri olduğu belirtilmiştir. Kefirin ve kefir danesinin antikanser etkileri birçok çalışmaya konu olmuştur (Rizk vd., 2009; Grishina vd., 2011; Ghoneum vd., 2014; Khoury vd., 2014). Bir ekzopolisakkarit olan ve kefir danesi ya da *Lb. kefiranoformis* tarafından üretilen kefiranın doza bağlı olarak tümör karşıtı aktivite özelliği tespit edilmiştir.

2.5. Kefirin Muhafazası

Kefir danelerin sayısının artması için 20 saat gibi bir süre gerekmektedir. Böylece taze kalmakta ve süte rahatlıkla aktarma yapılabilmektedir (Halle vd., 1994). Kefir daneleri her zaman başka sütlere aktararak veya kurutularak taze bırakılmaktadır, fakat kurutulmuş kefirin gelişme yeteneğinin azaldığı bildirilmiştir (La Riviere vd., 1967).

Garrote vd. (1997), kefirin muhafazası üzerine yaptıkları araştırmada kefir danelerin düşük sıcaklıkta (-80, -120 °C) kalmasına karşın ozeliklerinde herhangi bir değişim olmadığı tespit edilmiştir.

2.6. Kefirdeki Laktik Asit Bakterileri

Fermantasyon işlemi sırasında laktik asit bakterileri süt proteinlerini, gelişimleri için gerekli olan azotu karşılamak için kullandıkları peptit ve amino asitlere hidrolize etmektedir. Böylece fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan starter kültürde yer alan ya da almayan bakteriler tarafından biyoaktif peptidler üretilmektedir. Söz konusu peptitlerin serbest hale geçmelerini etkileyen en önemli faktör suş seçimi olduğu bilinmektedir.

Laktik asit bakterileri doğada yaygın şekilde bulunmaktadır. Bazı türlerinin besinlerde çoğunlukla rastlanan bozulmalara neden olmaları, bazı türlerinin ise gıdaların üretilmesinde ve olgunlaştırılması esnasında önemli rol almasından dolayı gıda teknolojisinde önemli yeri bulunmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin fermente süt ürünlerinde oluşturduğu biyoaktif peptitlerin de, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) gibi ilginç biyolojik işlevler gösterdiği tespit edilmiştir. ACE inhibisyonu, mineral bağlanması, antidiyabetik, doyurucu, immüno-modüle edici, opioid, antioksidan veya antimikrobiyal aktivite etkisi göstermektedirler. Anjiyotensin dönüştürücü enzimi inhibe etme kabiliyetine sahip bileşikler, hipertansiyon tedavilerinde tıbbi ilaç olarak kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada genellikle süt ürünlerinde kullanılan türler de dahil olmak üzere Laktik asit bakterileri ve yeni başlangıç kültürler ile ACE inhibe edici peptit üretebilmek amaçlanmıştır (Tomar, 2017).

Laktik asit bakterileri ile ilgili yapılan bir çalışmada, gıda katkı maddesi olarak kullanılan peynir yan ürünü olan peynir altı suyu, dünya çapında yılda 40.7 milyon ton üretilmektedir. Ana peynir altı suyu proteini olan β -Lactoglobulin (BLG) zayıf bir şekilde sindirilir ve oldukça alerjen olduğu bilinmektedir. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454'ten BLG sindirimine ve bu proteinin ana alerjenik dizilerini bozma yeteneğini analiz etmek için yapılan bir çalışma da BLG'nin ön hidrolizi, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454, in vitro simüle edilmiş bir gastrointestinal sistem tarafından test edilen BLG sindirimini arttırmıştır. Ayrıca, BLG bu suş tarafından hidrolize edildiğinde, alerjenik dizilimler V41-K60, Y102-R124,

C121-L140 ve L149-I162'nin hidrolizinden elde edilen peptitler bulunmuştur. İlginç şekilde, antioksidan, ACE inhibe edici, antimikrobiyal ve immüno-modüle edici özelliklere sahip peptitler, hem *Lactobacillus* suşu hem de sindirim enzimleri tarafından bozulmuş BLG'de bulunmuştur. Sonuç olarak, BLG'nin *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454, BLG sindiriminde olumlu bir etkiye sahip olduğu ve alerjenik reaksiyonları azaltabildiği bildirilmiştir (Pescuma, 2015).

Farklı *Lactobacillus* türleri karşılaştırılırken proteolitik aktiviteler ve protein hidroliz düzenlerindeki farklılıklar daha da belirgin olduğu görülmüştür. *Lactobacillus*'un kazeolitik özellikleri *Lb. helveticus* suşları ve *Lc. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL581 suşu farklılık göstermektedir. Bu çalışmada ise 14 *Lb.* suşu karşılaştırılırken benzer bir durum gözlemlenmiştir (Raveschot, 2018). Yine aynı çalışma da antibakteriyel, antihipertansif, opioid ve antioksidan fonksiyonlar dâhil olmak üzere tanımlanmış 29 fonksiyonel peptitin 26'sı, 1, as2, b- ve k-kazeinden elde edilen kefir numunelerinde mevcut olduğu gözlemlenmiştir. Kefir, mikroorganizmalarının ürün işlevselliğini artıracak fonksiyonel peptitleri salgıladığını ve bu peptitlerin muhtemelen *Lb. acidophilus* ve *Lb. helveticus*'ta bulunan hücre dışı serin proteazların sonucu olduğu belirlenmiştir (Raveschot, 2018).

Farklı bir çalışma da ise; *Lactobacillus helveticus* CPN4 (18) 37 °C'de 100 ml %9 (ağırlık / hacim) içinde pastörize sulandırılmış yağsız süt besiyerine ilave edilip gerçekleştirilen fermentasyonda pH 4.3'e ulaştığında durdurulmuş ve peynir altı suyu tozu eklenen örnekler incelenmiştir. *Lactobacillus helveticus* CPN4 tarafından fermente edilmiş yoğurt benzeri bir üründeki peynir altı suyu peptitleri, iki aşamalı ters faz HPLC ile ayrıştırılmış ve antihipertansif aktivite, her fraksiyonun oral yoldan alınmasından sonra kendiliğinden hipertansif sıçanlarda sistolik kan basıncı ile ölçülmüştür. Nihai fraksiyondaki beş ana peptitten güçlü antihipertansif aktivite gösteren tek peptit, γ s- kazein (CN), β -CN ve κ -CN'de bulunan bir Tyr-Pro dizisine sahip olup; antihipertansif peptit, anjiyotensin I-dönüştüren enzime karşı düşük bir inhibitör aktivite göstermiştir. Anjiyotensin I-dönüştürücü enzimin (IC₅₀) %50'sinin inhibisyonu 720 mM olarak bulunmuş ve ACE 'nin antihipertansif etkinliği önemini korumuştur (Yamamoto, 1999).

Farklı bir çalışmada ise; yağsız süt ve soyadan seçilen sekiz laktik asit bakterisinin gelişmesi, asitliği ve proteolizi araştırılmış, anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibisyonu ve laktik asit bakterileri tarafından fermente edilen sütün

antimikrobiyal profilleri belirlenmiştir. Sekiz laktik kültür arasında (*S. thermophilus* MD2, *Lb. helveticus* V3, *Lb. rhamnosus* NS6, *Lb. rhamnosus* NS4, *Lb. bulgaricus* NCDC 09, *Lb. acidophilus* NCDC 15, *Lb. acidophilus* NCDC 298 ve *Lb. helveticus* NCDC 292) seçilmiş ve bunlar içerisinde *Lb. bulgaricus* NCDC 09 ve *S. thermophilus* MD2 yağsız ve soya pH'ını düşürdüğü tespit edilmiştir. *Lb. bulgaricus* NCDC 09 ve *Lb. helveticus* V3 daha yüksek asit üretimi (yani titre edilebilir asitlik), *S. thermophilus* MD2 ve *Lb. helveticus* V3 'de daha yüksek proteoliz tespit edilmiştir. Ayrıca *S. thermophilus* MD2 ve *Lb. helveticus* V3 antimikrobiyal aktiviteleri daha yüksek bulunmuştur (Hati, 2018).

Laktik asit bakterileri (LAB), yüzyıllarca yem ve gıda fermantasyonu için sebzelerin, meyvelerin, balıkların, etlerin ve sütlerin fermantasyonunda, gıda bozulmalarını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmıştır. *Lb. plantarum* yararlı özelliklere sahip ve çok sayıda mayalanmış gıda ürününde bulunan çok yönlü tür olarak kabul edilip, endüstriyel fermantasyonda ve çiğ gıdaların işlenmesinde yaygın olarak kullanılır ve “generally recognized as safe” (GRAS) genel olarak güvenli kabul edilip ve nitelikli güvenlik (QPS) statüsüne sahip olduğu bildirilmektedir (Behera, 2018).

Muhammad vd. (2019) yaptığı bir çalışmada kullanılan laktobasiller arasında *Lb. plantarum* KLDS 1.0344'ün önemli bir antimikrobiyale sahip olduğu tespit edilmiştir. İn vitro olarak hem Gram negatif hem de Gram pozitif tipleri dahil olmak üzere çeşitli patojenik bakteri suşlarına karşı önemli bir antimikrobiyal kabiliyete sahip olduğunu ortaya koymuştur.

2.7. Kefirdeki Biyoaktif Peptitler

Biyoaktif peptitlerden ilk kez 1950 yılında Mellander'in raşitik bebeklerde vitamin D'den bağımsız kemik kalsifikasyonunu artıran kazeinden türemiş fosforlanmış peptitler olarak bahsedildiği bildirilmiştir. Biyoaktif peptitlerle ilgili bilgilerin 1979'dan bu yana arttığı ve günümüzde opioid, antitrombotik, antipertansif, mineral bağlayıcı ve immün düzenleme gibi aktivitelere sahip çok sayıda peptit olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, bu peptitlerin sergilediği aktivite, amino asit içeriğine ve dizilimine bağlı olduğu gösterilmiştir. Biyoaktif peptitler 64 amino asit içeren kazeinomakropeptit (CMP) dışında genellikle 3 ila 20 amino asit rezidüsünden oluşmaktadır. Bitkisel ve hayvansal proteinler potansiyel biyoaktif

diziler içermesine rağmen, süt proteinleri biyolojik aktif peptitler için temel kaynaktır (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Biyoaktif peptitler ayrıca vücut fonksiyonları ve sağlık açısından pozitif etkisi olan proteinlerin spesifik parçalanma ürünleridir (Korhonen, 2006). Biyoaktif peptitler temel protein molekülü diziliminde inaktif durumdur ve kaynağı gıda olan proteinlerin in vivo ya da in vitro koşullarda hidrolize uğraması ile ortaya çıkmaktadırlar (Smacchi vd., 2000; Şanlıdere vd., 2006; Haque vd., 2009; Beermann ve Hartung, 2013).

Bir peptitin fonksiyonunu o peptitin amino asit dizilimi belirlemektedir (Haque vd., 2009). Yine süt kaynaklı olan biyoaktif peptitlerin fonksiyonu da doğal protein yapısında bulunan alan aminoasitlerce belirlemektedir (Beermann ve Hartung, 2013). Enzimatik hidrolizle ya da mikrobiyal kaynaklı proteolizle kazeinlerden ve serum proteinlerinden oluşan ve aktif hale gelmiş olan peptitler, yaşamsal sistemlerin düzenli hale gelmesinde potansiyel ayarlayıcı ve/veya düzenleyici bir görevleri bulunmaktadır (Meisel, 1998).

İn vivo olarak parazitler de dahil bakteriler, küfler ve virüslere karşı antimikrobiyal aktivite gösteren peptitler çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin peptit büyüklüğü, aminoasit bileşimi, hidrofobisite ve ikincil yapı gibi özelliklere olduğu kadar mikroorganizmaya göre de değiştiği bildirilmiştir. Antimikrobiyal peptitlerin bazı ortak özellikleri 50'den daha az aminoasit içermeleri ve bu aminoasitlerin yaklaşık %50'sinin hidrofobik olmasıdır. Fermente gıdalarda laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen antimikrobiyal özelliğe sahip biyoaktif peptitler gıda katkısı olarak kullanılmaya potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Antimikrobiyal peptitler, kimyasal koruyuculara göre daha az yan etkilerinin olması, düşük yoğunlukta ısıl işlem gerektirmeleri ve gıdanın duyuşal ve besin değerlerinin korunması gibi avantajlara sahiptir (Kannan vd., 2012).

Nedjar-Arroume vd. (2008) pepsin enzimi kullanmak suretiyle sığır hemoglobininin antimikrobiyal aktivite gösteren otuz yeni peptit elde etmişler, elde edilen peptitlerin yirmi dördünün α zinciri içerisinde, altısının ise β zinciri içerisinde yer aldığını bildirmişlerdir. Jang vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada farklı ticari enzimler (termolizin+proteinaz A, tripsin, proteinaz K, tirozinaz, pepsin, papain ve proteaz) kullanılarak, sığır sarkoplazmik proteinlerinden elde edilmiş olan peptitlerden Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln peptidinin *Salmonella Typhimurium*,

Bacillus cereus, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* üzerine, GlyPhe-His-Ile peptitinin *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine, Phe-His-Gly peptitinin *P. aeruginosa* üzerine ve Asp-Phe-His-Ile-Asn-Gly peptitinin *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada sığır ve insan laktoferrini pepsin ile enzimatik hidrolize tabi tutulmuş ve hidroliz sonrası elde edilen peptitlerin bakterisidal aktivitesinin, hidrolize uğramamış laktoferrinden 100-1000 kat daha etkili olduğu belirlenmiştir (Semen vd., 2015). Singh vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, soya sütünün *Lactobacillus plantarum* C2 suşu ile fermantasyonu sonucu elde edilen biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Biyoaktif peptit fraksiyonlarının antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyonu yöntemi ile kontrol edilmiş, 5 kDa büyüklüğündeki peptitlerin, *E. coli* (12 ± 0.57), *S. dysenteriae* (11 ± 0.57), *L. monocytogenes* (10 ± 0.57) ve *B. cereus* (10 ± 0.57 mm) patojenlerine karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Pepsin kullanılarak sığır hemoglobininin hidroliz yolu ile antimikrobiyal peptitlerin elde edildiği çalışmada, elde edilen peptitin α -hemoglobin içerisinde bulunan 107-136 (107ValThr – Leu – Ala – Ser – His – Leu – Pro – Ser – Asp – Phe – ThrPro – Ala -Val – His – Ala – Ser – Leu - Asp-Lys-Phe-LeuAla-Asn-Val-Ser-Thr-Val-Leu136) aralığındaki aminoasit dizisine karşılık geldiği bildirilmiştir. Bu peptit zincirinin belirlenmiş olan bütün bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve *M. luteus* A270, *Listeria innocua*, *E. coli* ve *S. enteritidis* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin daha güçlü olduğu belirlenmiştir (Şimşek vd., 2016). *Spirulina platensis*'ten, alkalın proteaz ve papain enzimleri kullanılarak enzimatik hidroliz yoluyla antibakteriyel peptit elde edilmiştir. Elde edilen bu peptitin minimum inhibe edici konsantrasyonunun, *Escherichia coli* için 8 mg/mL ve *Staphylococcus aureus* için 16 mg/mL olduğu bulunmuştur (Yüçetepe vd., 2016).

Pei vd. (2017)'nin yaptığı bir çalışmada, pepsin hidroliziyle elde edilen atık Tibet öküzü süt protein hidrolizatlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Arg – Val – Met – PheLys – Trp - Ala ve Lys – Val – Ile – Ser – Met - Ile olmak üzere iki adet antimikrobiyal peptit elde edilmiş ve aminoasit dizinleri belirlenmiştir. Arg-Val-MetPhe-Lys-Trp-Ala'nın, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* ve *Salmonella*

Paratyphi'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, Lys – Val – Ile – SerMet - Ile'nin ise sadece bakterilerin değil mantarların da gelişmesini inhibe ettiği belirlenmiştir.

Rusya'daki çocuk hastalıkları uzmanları tarafından fermente sütü özellikle kefiri, sadece besleyici olmasından değil, bu özelliğinin yanı sıra ishale karşı faydalı olması sebebiyle, hastalıklı çocuklarla birlikte sağlıklı çocuklarda tercih edildiği belirlenmiştir (Sarkar, 2007).

Kefirin iştah ve uyku problemlerinde, karaciğer ve böbrek tedavilerinde, safra bozukluklarında, hepatit A, bir çok enfeksiyon ve cilt hastalığı tedavilerinde iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Karatepe, 2012).

Kefir, Kafkasya'da su yerine tüketilmekte ve gençlik iksiri olarak bilinmektedir. Kafkasya'da tüberküloz, kanser ve sindirim bozukluğu gibi hastalıkların az görülüyor olması ve ortalama insan ömrünün 110-130 yıla kadar uzamış olması kefirin insan vücuduna pozitif etkisi bakımından dikkat çekicidir. Bu konuda yapılmış olan çalışmalarda kefirin önemli etkisinin olduğu ve birçok hastalığın tedavisinde destekleyici olduğu ve takviye gıda olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Kefirin pozitif etkisinin olduğu hastalıklar arasında mide enfeksiyonları, hepatit, dış ve iç tümör, kronik barsak enfeksiyonları, yüksek tansiyon, ekzama, diyare, kabızlık sayılanılır (Elkhtab, 2017; Behera, 2018).

İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yürütülen çalışmalarda *Lb. bulgaricus* ve *Lactobacillus acidophilus* ihtiva eden fermente süt ürünlerinin alınması ile midede yaşayan koliform grubu organizmaların azaldığı, laktobasil sayısında ise artış görüldüğü belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre fermente süt ürünleri alımıyla birlikte barsak florasının yenilenmiş olduğu ve barsak rahatsızlıklarının azaldığı belirtilmektedir (Sarkar, 2007).

Brezilya kefiri üzerinde yapılan bir çalışmada 52 adet laktobasil izole edilip antimikrobiyal aktivitesi gözlemlenmiş ve dirençli genlerin tespit edilip diğer bakterilere aktarılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışma doğrultusunda indikatör suşları takip edilmiş: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC tarafından 29213, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25723 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. Tetrasiklin, ampisilin, gentamisin, amikasin, eritromisin, kloramfenikol, oksasilin, penisilin, amoksisilin ve antibiyotik duyarlılık

testinde vankomisin; Silva vd. tarafından belirlenmiştir. Laktobasil suşlarından tespit edilen genler diğer mikroorganizmalara transfer edilmiştir (Clare, 2000).

Süt ürünlerinde starter olarak kullanılmakta olan laktik asit bakterilerinin farklı bir özelliği de, ortamda bulunan, kaynağı gıda olan patojen ve kontaminant mikroorganizmaların (*S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli* gibi) gelişmesine engel olarak bu gelişimin son bulmasına sebep olmasıdır. Starter seçimi ürünün depolama zamanını uzatması ile ürün kalitesi açısından önemlidir. *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un antibakteriyal aktivitesi insan sağlığı bakımından da önem taşımaktadır (Gambelli, 1999; Bonczar, 1997).

Laktik asit bakterilerinin asidik ortamlarda daha iyi inhibisyon etki gösterdiği bilinmektedir. İlave edilen starter kültür miktarı ve aktifliği fermantasyonun başlangıç aşaması ve patojen mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi için önem arz etmektedir (Clare, 2000).

Yapılan birçok çalışmada hidrojen peroksit, diasetil, organik asitler (laktik asit, formik asit, asetik asit) yalnız başlarına veya beraber, gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Kamau, 2010; Felix, 2016).

2.8. Kefirin Antimikrobiyal Etkisi

Kefir içerisindeki laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal bileşikleri üretmeleri ve fermantasyon esnasında mikrofloranın meydana getirdiği metabolit bileşiklerle antimikrobiyal etki sağlamaktadır. Birincil ve ikincil metabolitler arasında küçük peptitler, diasetiller ve organik asitler bulunmaktadır (Golowczyc vd., 2008). Kefirin, Gram pozitif bakteriler üzerinde bakterisitik, Gram negatif bakteriler üzerinde ise bakteriyostatik etkisine daha sık rastlandığı bildirilmiştir (Czamanski vd., 2004).

Kefir ve kefir mayasının antimikrobiyal etkisini inceleyen Çevikbaş vd. (1994) yaptıkları çalışma sonucunda ise kefirin antimikrobiyal etkisinin daha çok gram negatif bakteriler ve mayalar üzerinde olduğunu bulmuşlardır.

Diyareye neden olan *Salmonella* ve *E.coli* gibi hastalığa sebep olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal bir etkisi olan kefir, onların gelişimini önler ve ishali önlemeye iyi gelir. Ayrıca kefirde bulunan mikroflora tarafından üretilmiş olan asetik asit, laktik asit ve antimikrobiyal maddeler, ince bağırsaklarda çürükçül bakterilerce oluşturulan çürüme ve bozulmaları önlemektedir (Oliveria, 2013).

Yapılan bir çalışmaya göre kefir tüketimi ile laktik asit bakterileri barsağa kolonize olarak *E. coli O:157* enfeksiyonlarının oluşumunu engellemektedir. Ayrıca kefirin mide suyunda bir saatte *S. typhimurium*'u inhibe ediyor olduğu, kefir tanesinden izole edilmiş olan *Lactococcus lactis* türlerinin de yüksek düşük pH ve ısılarla dayanıklı bakteriyosin üretmekte olduğu bildirilmiştir (Beshkova, 2003).

Kefir danesinde bulunan mikroflora tarafından üretilen laktik asit, H₂O₂ ve bakteriyosinler antimikrobiyal etki meydana getirmektedir. Bu etkinin meydana gelmesinde laktik asit ortamın pH'sını düşürürken diğer bakterilerin gelişimini engeller, asetik asit ve H₂O₂ ise antibakteriyel etki göstererek, bazı gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile mantarlara karşı etkili olmaktadır. Kefirde bulunan asetik asit bakterileri ise barsakta protein parçalanmasına sebep olarak, serbest aminoasitlerin birikimine yardım ederek B grubu vitaminlerin oluşmasını sağlamaktadır (Bensmira, 2010).

Kefirdeki laktoz oranı süte göre daha azdır. Kefirin tüketilmiş olması ile beta galaktosidaz aktivitesi artar ve bunun neticesinde de laktozun sindirimi ve bağırsakta absorpsiyonu artmaktadır. Bu özelliği sebebiyle kefir, laktoz intoleransı olan bireyler için etkin bir diyet kaynağı olmaktadır. Bunun yanında kefir pankreas, mide gibi organların daha sağlıklı olmasını da sağlamaktadır. Asetik asit bakterileri bağırsaktaki bakterilere karşı antibakteriyel etki doğurmaktadır. Bu sebeple kefir bazı hastalıkları iyileştirici etki göstermiştir (Oliveria, 2013).

Kefirde bulunan laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması konusunda 6 farklı ülkeden kefir daneleri toplayarak bunlardan izole edilmiş olan 58 *Lactobacillus* spp. suşlarının probiyotik özelliklerini, pH 2.5 ve safra tuzlarına dayanma sürelerini, Caco-2 hücrelerine tutunmalarını ve antimikrobiyal profillerini analizlerle test etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda en iyi probiyotik özellikler yalnızca *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* ve *Lb. kefiranofaciens*'de belirlenmiştir. *Lb. kefiranofaciens* çoğunlukla bütün kefir tanelerinden izole edilmiş olmasına karşın, *Lb. acidophilus*'un kefir danelerinde her zaman izole edilmediğini gösteren bilimsel çalışmalar mevcuttur (Güngör, 2007).

2.9. Kefirin Antihipertansif Etkisi

Hipertansiyon, dünya nüfusunun yaklaşık ¼'ünü etkileyen kardiyovasküler hastalıktır. İlgili komplikasyonlarda rol oynayan ve felç, kalp hastalığı, kalp yetmezliği gibi birçok hastalık için kontrol edilebilir bir risk faktörüdür. Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) bir dipeptitil karboksipeptitazdır ve anjiyotensin I'i, damar büzücü etkisi olan anjiyotensin II'ye dönüştürür. Memelilerde kan basıncı ve sıvı ve tuz dengesini düzenlemede önemli fizyolojik rol oynar (Hartmann vd., 2007; Hayes vd., 2016).

Yapılan bir çalışmada gözlenen antihipertansif aktivite nedeniyle kefiran'ın ACE aktivitesini inhibe etme kabiliyetini gözlemlemişlerdir. ACE inhibe edici peptitler, anjiyotensin I 'i anjiyotensin II'ye dönüşmesine neden olan ACE enzimini inhibe etmektedir. Ek olarak, ACE inhibe edici peptitler, damar genişletme etkisine sahip bir hormon olan bradikinin parçalanmasını da engellemekte; kan basıncındaki azalmaya katkıda bulunmaktadır (Hernández-Ledesma, 2011).

ACE enzimini, inhibe eden peptitler potansiyel olarak tansiyon düşürücü ajanlardır (Kannan vd., 2012). Bu nedenle, süt, peynir, et, balık ve çok çeşitli bitki ve alglerden antihipertansif aktivite gösteren peptit eldesi üzerinde çok sayıda araştırma yürütülmüştür. Ancak, in vivo antihipertansif etkilerle ACE enziminin inhibisyonunun araştırıldığı in vitro çalışmaların sonuçları arasında korelasyonun olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle, in vitro olarak elde edilen ACE inhibisyonu sonuçlarının in vivo olarak aynı etkiyi göstereceğinin garantisi verilmemiştir (Miralles vd., 2018).

Süt endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin yüksek proteolitik aktiviteleri nedeniyle, fermente süt ürünlerinin üretimi sırasında da biyoaktif peptitler oluşmaktadır. Söz konusu peptitlerin serbest hale geçmelerini etkileyen en önemli faktör suş seçimidir. Laktik asit bakterileri arasında *Lactobacillus helveticus*'un süt bazlı ortamlarda güçlü proteolitik aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Pihlanto, 2013).

Lactobacillus helveticus'un dışında *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* SS1, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* FT4, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactic* spp. *lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* ve

Enterococcus faecalis gibi laktik asit bakterilerinin de ACE inhibitörü peptitleri üretebildikleri bildirilmektedir (Phelan vd., 2011).

Süt proteinlerinden mikrobiyal proteoliz sonucu oluşan farklı biyoaktif peptitler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Fitzgerald vd., 2006; Corrons vd., 2017). *Lb. helveticus* ve *Saccharomyces cerevisiae* ile fermente edilen ekşi süttten izole edilmiş olan Ile-ProPro ve Val-Pro-Pro tripeptitlerinin ACE enzimini inhibe ettiği ve uzun süreli kullanımının sıçanlarda hipertansiyon gelişimini önlediği belirlenmiştir (Moller vd., 2008).

Lin vd. (2018) Tibet sığırı sütünden elde edilen Qula kazeinini iki farklı enzim kombinasyonu ile hidrolize etmişler ve elde ettikleri hidrolizatların ACE enzimini inhibe etme özelliğini araştırmışlardır. Alkalaz + termolizin ve termolizin + proteinaz K enzim kombinasyonları ile elde edilen hidrolizatların (< 3 kDa) en yüksek ACE inhibe edici aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.

ACE inhibe etme aktivitesi için yapılan farklı bir çalışmada, peynir altı suyundan üretilen kefir örneklerinin özelliklerini ve anjiyotensin dönüştürücü enzimi (ACE) inhibe etme aktiviteleri araştırılmıştır. Araştırmada kefir üretimi için kullanılan peynir altı suyunun türlerinin ürünlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Toplam laktik asit bakterileri ve ürünlerin maya populasyonu peynir altı suyu tipleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Gouda peyniri peynir altı suyu bazlı kefirin, peptit konsantrasyonu ve ACE inhibe edici aktivitesi, kontrol ve ticari peynir altı suyu tozu bazlı kefirin anlamlı olarak daha yüksek; IC₅₀ değeri ise, anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu araştırma, peynir altı suyu kefirinin, antihipertansiyon ajanı için potansiyel bir biyoaktif peptit kaynağı olduğunu göstermiştir (Febrisiantosa vd., 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Süt

Üretimde sabah sağımı taze inek sütü kullanılmış ve sütler üretim anına kadar 4 °C’de depolanmıştır.

3.1.2. Starter Bakteriler

Kefir üretiminde kültür olarak *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, proteolitik karakterli üç kültür kullanılmıştır. Kùltürler İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

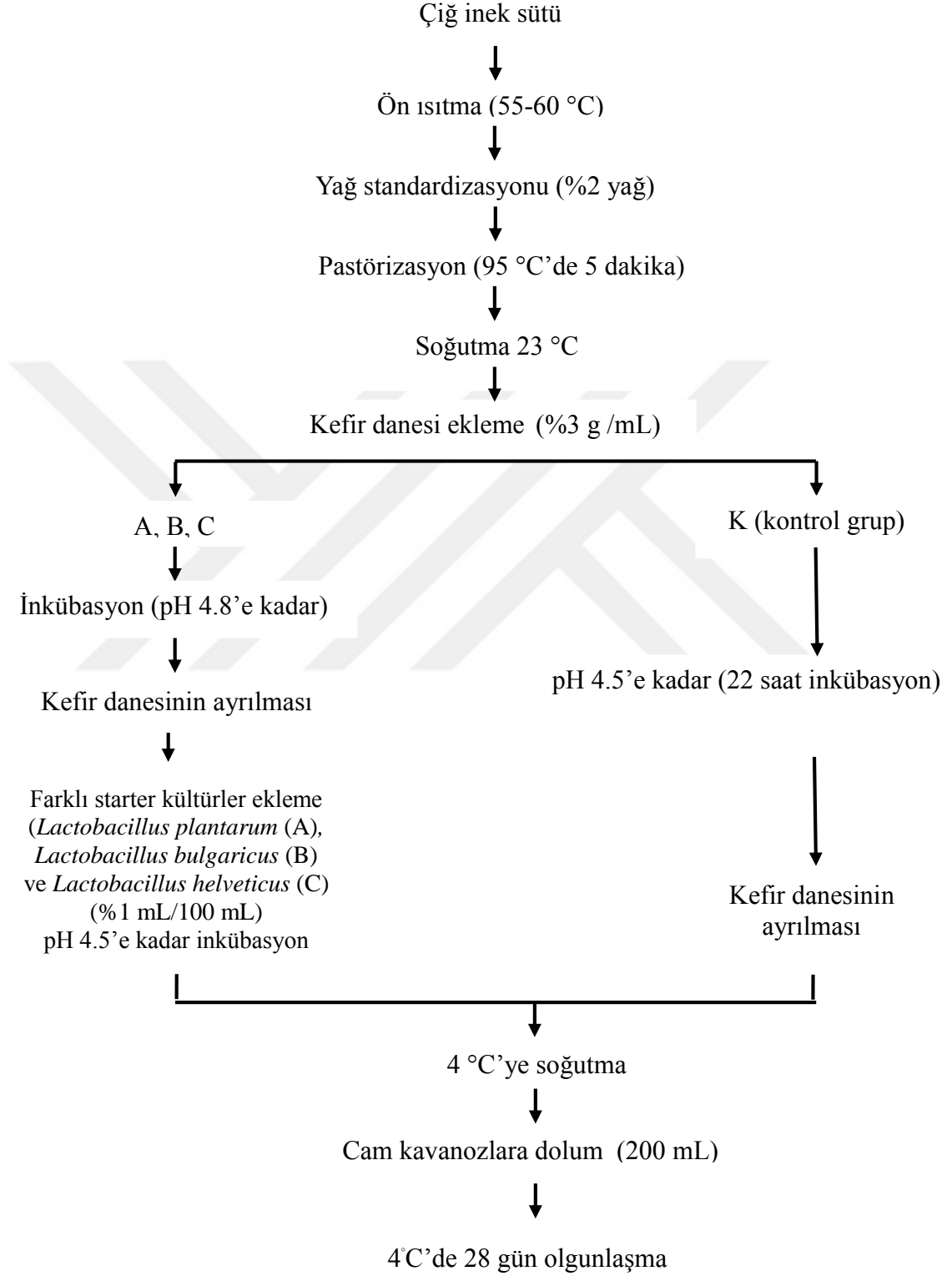
3.2.1. Kefir Üretiminde Kullanılacak Kùltürlerin Hazırlanması

Kefir daneleri ve yardımcı kùltürler İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir. Yardımcı kùltürler, bir gece önceden yağsız steril sütte 37°C’de inkübasyona bırakılarak aktive olmaları sağlanmıştır. Aktif hale gelen yardımcı kùltürler %1/100 (v/v) oranında kefir örneklerine ilave edilmiştir.

3.2.2. Kefir Üretimi

Geleneksel yöntem uygulanarak İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakùltesi Gıda Mühendisliği Araştırma laboratuvarında kefir üretimi (dane ile üretilmiş) gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle; gerekli ön testlerden (asitlik gelişimi vb.) geçirilen yaklaşık 20 litre sabah sağımı taze inek sütü (pH 6.6 ± 0.05) 4 eşit bölüme ayrılmıştır (Şekil 3.1’de gösterilen üretim akışı benimsenmiştir).



Şekil 3.1. Kefir örneklerinin üretim akış şeması

Buna göre;

1. A kefir: *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC 11842
2. B kefir: *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009
3. C kefir: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 starter kültürü ilave edilerek üretilen kefir örneğini,
4. K kefir: Sadece dane ile fermente edilerek üretimi gerçekleştirilen kefir örneğini ifade etmektedir.

Kefir üretiminde kullanılmak üzere taze olarak laboratuvara gelen süt, %2 yağ olacak şekilde standardize edilmiştir. Süte 95°C’de 5 dakika sıcaklık uygulanmış olup, 25°C’ye soğutulduktan sonra iki kısma ayrılmıştır. 1. kısım süte aseptik koşullarda %3 oranında kefir daneleri inoküle edilerek, 20-25°C’de yaklaşık 22-24 saat fermantasyon işlemi devam ettirilmiş, pıhtı asitliği pH 4.5 olduğunda inkübasyon işlemine son verilmiştir (kefir K). 2. kısım süte %3 oranında kefir danelerini inoküle edilerek, 20-25°C yaklaşık 22-24 saat inkübasyon devam ettirilmiş olup, pıhtı asitliği pH 4.8’e ulaştığında kefir daneleri uzaklaştırılmış ve fermente edilen süt 3 kısma ayrılmıştır. Her bir kısım farklı yardımcı starter kültür ile (kefir A: *Lb. bulgaricus*, kefir B: *Lb. helveticus*, kefir C: *Lb. plantarum*) inkübe edilmiş olup, 28°C’de pH 4.5’e ulaşıncaya kadar inkübasyon işlemine devam edilmiştir. Kefir üretimi 2 kez tekrarlanmıştır. Kefir örnekleri 200 ml cam kaplarda 4°C’de 28 gün depolanmıştır. Kefir örnekleri, üretimi takip eden 1, 7, 14, 21, 28. günlerde analize tabi tutulmuştur.

3.2.3. Kimyasal Analizler

Titrasyon asitliği (AOAC, 1990), pH (Hayaloğlu, 2003), kuru madde (IDF, 1982), kuru maddede yağ oranı (Ardö vd., 1999), protein miktarı (IDF, 1993)’e göre tespit edilmiştir.

3.2.3.1. Titrasyon Asitliği

Kefir örneklerinin asitliği, Alkali titrasyon yöntemi ile yapılmış ve sonuç % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (Anonim, 1995). Kefir örneklerinden 10 mL alınarak üzerine 1 mL fenolftalein çözeltisi ve 0.1 N Sodyum Hidroksit (NaOH) çözeltisi damla damla eklenerek 30 saniye süreyle pembe renk sabit kalıncaya kadar

titre edilmiştir. Harcanan NaOH çözeltisinin miktarı belirlenerek aşağıdaki formül ile laktik asit cinsinden titre edilebilir asitlik hesaplanmıştır. Denklem;

$$A = \frac{S \times 100}{m} \quad (3.1)$$

A= Titre edilebilir asitlik

S= Titrasyonda harcanan 0.1 N NaOH çözeltisi miktarı

m= Numune miktarı

3.2.3.2. pH Değeri

Kefir örneklerinin pH'sı, örneklerin homejen karıştırılmasından sonra (Thermo ORION 4 STAR) pH metre ile ölçülerek belirlenmiştir (Hayaloğlu, 2003).

3.2.3.3. Kuru Madde Oranı

Kefir örneklerinin kurumadde oranları, kurutma dolabında kurutulup, desikatörde soğutulan ve ağırlığı kaydedilen kurutma kapları içerisine yaklaşık 3 g örnek konulmuş ve kurutma dolabında $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulması ile belirlenmiştir. Kurutulan örnekler desikatör içine yerleştirilerek oda sıcaklığına getirilmiş, tartımlar hassas terazi (Mettler Toledo, AB204, İsviçre) kullanılarak yapılmış ve sonuçlar yüzde olarak hesaplanmıştır (IDF, 1982).

Denklem;

$$\% \text{ KM} = \frac{M1 - M}{M2 - M} \times 100 \quad (3.2)$$

M=Kurutma kabı ağırlığı (g)

M1=Kurutma kabı ve kurutulmuş örnek ağırlığı (g)

M2=Numune ve kurutma kabı ağırlığı (g)

3.2.3.4. Yağ ve Kuru Maddede Yağ Oranları

Kefir örneklerinin yağ oranları, süt bütirometreleri ile Gerber yöntemine göre yapılmıştır. Bütirometreye önce yoğunluğu 1.820 olan Sülfürik Asitten (10 ml, sonra 11 ml kefir ve 1 ml Amil alkol konulmuştur. Bütirometrenin ağzı lastik tıpa ile kapatılmış, çalkalanarak santrifüje konulmuştur. 1100 devir/dakika hızla çalışan santrifüjde 5 dakika döndürüldükten sonra çıkarılıp bütirometre üzerindeki değer okunmuştur. Okunan değer 100 g kefirdeki yağın g olarak miktarıdır (Ardö vd., 1999).

Kuru maddede yağ;

$$\% \text{ Kuru maddede yağ} = \% \text{ yağ} \times 100 \div \% \text{ kuru madde} \quad (3.3)$$

eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3.5. Protein Oranlarının Belirlenmesi

Protein oranları, yağ yakmaya tabi tutulan örneklerin Mikro Kjeldahl yöntemi ile Azot miktarlarının belirlenmesi ile tespit edilmiştir. Bunun için, iyice karıştırılmış kefir örneğinden protein tüpüne 0.5-1 g tartılıp üzerine % 93-98'lik H₂ SO₄ 'ten 10 ml ilave edilmiş ve 2.2 g karışık katalizör (2 g K₂ SO₄ + 0.2 g Cu₂ SO₄) eklenmiş ve yakma düzeneğine yerleştirilmiştir. Yakma işlemi 400 °C'de açık yeşil renk elde edildikten sonra 30 dakika daha bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Soğutulmuş tüpler otomatik destilasyon düzeneğine yerleştirilmiştir. Tüplere otomatik olarak 40 mL saf su ve 70 mL %30'luk NaOH, destilat toplama bölümündeki erlen içeriğine ise 25 mL %3'lük H₃ BO₃ alınarak destilasyon tamamlanmıştır. Elde edilen destilat 1-2 damla 1:1 oranında hazırlanmış metilen mavisi-metil kırmızısı karışık indikatörü eşliğinde 0.1 N HCl ile titre edilmiştir. Örnekteki toplam azot miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. % protein miktarı ise, toplam azot miktarının, süt ve süt ürünleri için geçerli olan 6.38 protein faktörü ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır (IDF, 1993).

Denklem;

$$\% \text{ Toplam Azot} = \frac{\text{Harcan 0.1 N HCl (mL)} \times \text{Faktör} \times 0.0014}{\text{Örnek miktarı (g)} \times 100} \quad (3.4)$$

3.2.3.6. Kefirdeki Azotlu Madde Fraksiyonlarının Ayrılması

3.2.3.6.1. Suda Çözünen Azot Oranı ve Olgunlaşma Derecesi

Kefir örnekleri Hayaloğlu vd. (2004)'e göre fraksiyonlarına ayrılmış ve suda çözünen azot analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, 250 ml kefir örneği 50 ml su ile karıştırılıp vorteks kullanılarak 2 dakika homojenize edilmiştir. Karışım 40 °C'deki su banyosunda 1 saat tutulmuş ve ardından 3000 x g'de ve +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısmındaki yağ tabakası bir spatül ile uzaklaştırıldıktan sonra, sıvı kısım filtre kağıdından (Watman No: 113) süzülmüştür. Filtrattan 10 ml alınarak, standart Mikro-Kjeldahl metodu ile suda çözünen azot oranı saptanmış ve kalan filtrat diğer

analizler için kullanılmak üzere ayrılmıştır. Sonuçlar da aşağıdaki eşitliğe göre bulunmuştur (IDF, 1993).

$$\% \text{ Suda çözünen azot (w / w)} = [1.4 \times (V1 - V0) \times M \times F] \div m \quad (3.5)$$

V1: Örnek için harcanan HCl, ml

V0: Kör denemede harcanan HCl, ml

M: HCl'nin standart volumetrik çözeltisinin molaritesi,

MF: HCl çözeltisinin faktörü

m: Örnek miktarı, g

Suda çözünen azot oranının toplam azota oranı olarak ifade edilebilen olgunlaşma derecesi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır (Hayaloğlu, 2003).

$$\text{Olgunlaşma Derecesi} = \% \text{ Suda çözünen azot} \div \% \text{ Toplam Azot} \times 100 \quad (3.6)$$

3.2.3.6.2. % 12 Trikloroasetik Asitte (TCA) Çözünen Azot Oranı

Suda çözünen azot analizinde hazırlanan filtrattan 25 ml alınmış ve eşit hacimde %24'lük (w/v) TCA çözeltisi karıştırılarak (son TCA konsantrasyonu %12 olacak şekilde) oda sıcaklığında 2 saat tutulmuştur. Daha sonra, karışım filtre kağıdından (Schleicher & Schuell 589/2 beyaz bant) süzülmüş ve filtrattan 25 ml alınarak, standart Mikro-Kjeldahl metodu ile (IDF, 1993) TCA'da çözünür kısmın azot içeriği saptanmıştır (Ardö ve Polychroniadou, 1999). Sonuçlar aşağıdaki eşitliğe göre bulunmuştur.

$$\% 12 \text{ TCA'da çözünen azot (w/w)} = [1.4 \times (V1 - V0) \times M \times F] \div m \quad (3.7)$$

V1: Örnek için harcanan HCl, ml

V0: Kör denemede harcanan HCl, ml

M: HCl'nin standart volumetrik çözeltisinin molaritesi,

F: HCl çözeltisinin faktörü

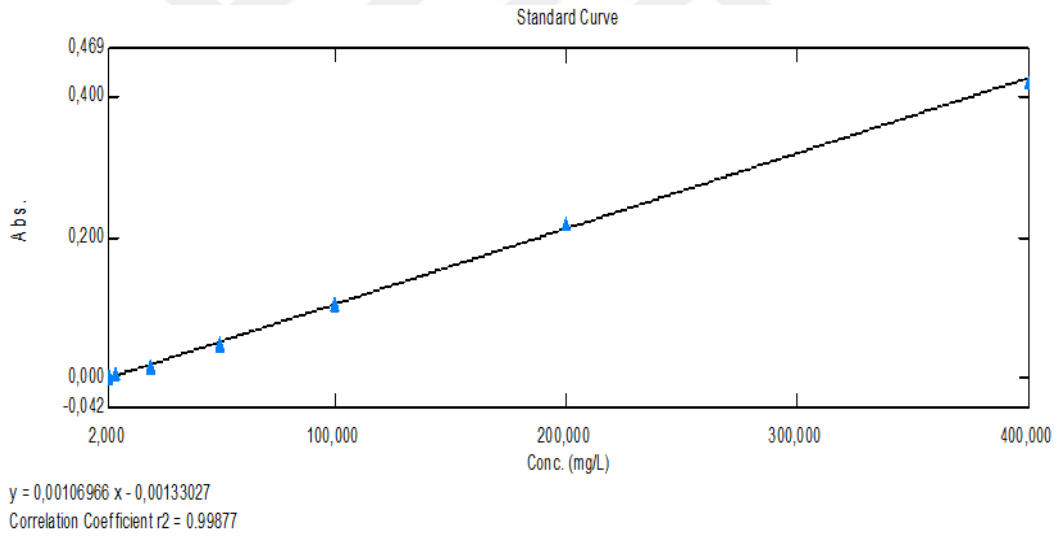
m: Örnek miktarı, g

% 12 TCA'da çözünen azot cinsinden olgunlaşma derecesi ise, yukarıda elde edilen değer in toplam azota oranlanması ile hesaplanmıştır.

$$\text{Olgunlaşma Derecesi: } \% 12 \text{ TCA'da çözünen azot} \times \% \text{ Toplam Azot} \times 100 \quad (3.8)$$

3.2.3.6.3. Toplam Serbest Amino Asit Miktarı

Analiz, Hayaloğlu (2007)'nin uyguladığı şekilde kısmi modifikasyonla yapılmış olup, Cd-ninhidrin reaktifi ile hazırlanan örneklerin 507 nm'de absorbansları okunmuştur. Reaktifler: Cadmium Ninhydrin reaktifi: 0.8 g ninhydrin, 80 mL ethanol ve 10 mL asetik asit karışımında çözündürülecek ve elde edilen karışıma 1 mL suda çözündürülerek CdCl₂ ilave edilmiştir. Yöntem: Sulu ekstraktan (20 g kefir örneği 20 ml su ile karıştırılıp Ultra Turax blender (Janke & Kunkel, KG, IKA, WERK) kullanılarak 13 000 rpm'de 1 dakika homojenize edilmiştir ve homojenat 14 000 x g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj (Hettich model 320R; Germany) edilmiş ve sıvı kısım filtre kağıdında (Whatman No. 113) süzümüştür). 100 µL (beklenen serbest aminoasit miktarına göre) alınmış ve 1 mL suda çözündürülüp üzerine 2 mL Cd-ninhydrin reaktifi eklenmiş, karışım 84 °C'ye ısıtılıp 5 dakika tutulduktan sonra soğutulmuş ve 507 nm'deki absorbansı UV- spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800, Kyoto, Japan) okunmuştur.



Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlarda Leu standardına karşı elde edilen absorbans değerleri

Örneklerin toplam serbest amino asit içerikleri, Şekil 3.2'deki denklemde gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda (x) hazırlanan Leu standardına karşılık 507 nm'de okunan absorbans değerleri (y) grafiğe geçirilmiştir. Buradan elde edilen standart eğriye göre kefirlerde bulunan toplam serbest amino asit miktarları mg Leu/L kefir cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.3.6.4. RP-HPLC Peptit Profillerinin Belirlenmesi

20 g kefir örneği 20 ml su ile karıştırılıp Ultra Turax blender (Janke & Kunkel, KG, IKA, WERK) kullanılarak 13 000 rpm'de 1 dakika homojenize edilmiş olup homojenat 3 000 x g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj (Hettich model 320R; Germany) edilecek ve sıvı kısım filtre kağıdında (Whatman No. 113) süzülmüştür. Suda çözünen fraksiyonları Shimadzu LC 20 AD Prominence HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) kullanılarak RP-HPLC ile belirlenmiş ve ayırma işlemi için 250x4.6x5 µm, 300 Å gözenek boyutlu Jupiter C18 kolon (Phenomenex Co, Torrance, CA, USA) kullanılmıştır.

RP-HPLC'de kullanılacak hareketli fazlar: A; Hacimce %0,1 trifloroasetik asit (TFA, Sigma, St Louis, USA) HPLC kalitesindeki deiyonize suda (Milli-Q system, Waters Corp., Molshem, France), B; hacimce %0,1 TFA, asetonitrilde (Fluka ≥ 99,5, Sigma-Aldrich Chemie, CH-9471 Buchs, USA) hazırlanmış ve çözeltinin akış hızı 0,75 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin analizi: Dondurarak kurutulmuş fraksiyonlardan 10 mg tartılarak 1 mL (A) çözücüsünde çözündürülmüş olup, 0.45µm selüloz asetat filtreden (Sterlitech Corp. WA, USA) geçirilmiş ve bu filtrattan 60 µL örnek sisteme enjekte edilmiştir. Kromatografik tanımlama 214 nm'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. RP-HPLC Serbest Amino Asit Miktarı

Kefir örneklerinden 10 g alınarak 25 mL santrifüj tüpü içerisine konulmuş ve üzerine 10 mL 0.4 mM metionin sülfon (içstandart) içeren HCl ilave edilmiştir. Karışım homojenize edilerek Ultrasonik banyoda oda sıcaklığında 20 dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda 3000 g x 10 dk 4±1 °C santrifüj yapılmıştır. Süpernetant ependorf tüpü içerisine konularak ayrılmış, daha sonra buradan 1mL süpernetant başka bir tüp içerisine alınarak üzerine 1 mL %40 (w/v)'lık trikloroasetikasit (TCA) çözeltisinden ilave edilmiştir. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4±1 °C'de buzlu suda bekletilip, süspansiyon Hettich 320R santrifüj ile 20 000 g x 10 dk 4±1 °C'de santrifüj yapılmıştır. 25 µL deproteinize edilmiş süpernetant ependorf tüpü içerisine konularak vakum altında kurutulmuştur. Kurutulmuş örnek üzerine 20 µL eşleme tamponu: Metanol: 1 M sodyum asetat: TEA (2:2:1) ilave edilerek tekrar vakum altında kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutulmuş örnek üzerine 20 µL türevlendirme çözeltisi: Metanol: TEA: Deiyonize su: PITC (7:1:1:1)

ilave edilmiştir. İyice karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dk. inkübe edilmiş ve vakum altında kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutulmuş örnek üzerine 1 mL örnek seyreltme tamponu ilave edilmiş ve örnek 0.20 µm (CROMAFIL Xtra PVDF-20/25) filtreden geçirilerek 20 µL seyreltilmiş örnek HPLC kolonuna verilerek analiz edilmiştir. Fenil izotiyosiyonat (PITC) ve trietilamin ve diğer solventler HPLC derecesinde kullanılmış, çalışılacak amino asit standardı (100 mM) asidik ve nötral amino asit standardı ve bazik amino asit standardı 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Metionin sülfon solüsyonu 0.4 mM son konsantrasyon olacak şekilde 0.1 M HCl ilave edilmiş olup, derivatization reaksiyonu için kullanılan çözelti (metanol, TEA, H₂O, PITC, 7:1:1.1, v/v/v oranında) günlük hazırlanmıştır. Çalışmada amino asit standartlarına örneklerle aynı uygulama yapılmış ve oda sıcaklığında reaksiyon süresi 20 dk olarak tutulmuştur. Örnek ve standartlar HPLC de uygulanana kadar dondurucuda bekletilmiştir. Derivatize örnekler %5 asetonytril içeren (pH'sı asetik asitle 6.4 'e ayarlanmıştır) 10 mM sodyum asetat tamponu ile çözdürülmüştür. Amino asit separasyonu Inertsil ODS-3 3µm 4.6 x 150 mm kolonu (150 mm x 4.6 mm x 5µm) kullanılarak, Shimadzu LC-20AD HPLC' de ters faz metod ile gerçekleştirilmiştir. Buffer A, 70 mM sodyum asetat (pH'sı asetik asitle 6.55'e ayarlanmış) %2.5 asetonytril içerecek şekilde hazırlanmıştır, Buffer B, asetonytril: deiyonize su: metanol (9:8:3, v/v/v) oranında karıştırılarak ve her iki solvante 10 mg/L olacak şekilde disodyum etilendiamintetra asetik asit (Na₂EDTA) ilave edilerek hazırlanmıştır. 254 nm de 45 °C'de 1 mL/dk akış oranı ile 20 µl kolona enjekte edilip, amino asit analizi Sahingil vd. (2014)'e göre yapılmıştır. Sonuçlar µg/g kefir olarak hesaplanmıştır.

3.2.5. Kefir Örneklerinin ve SÇA Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kefirlerin ve peptitlerin dondurarak kurutulmuş (suda çözünen ekstrakt) ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi ve minimum inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Kefir örnekleri antimikrobiyal aktivite için 3000 g x 10 dakikada santrifüj edilmiş ve süpernetant 0.45 µm'lik gözenekli bir şırınga filtresi kullanılarak filtreleme yoluyla sterilize edilmiştir. Çalışmada, *Staphylococcus epidermidis* RSKK 0802, *Staphylococcus aureus* 1021/06008, *Staphylococcus warneri* 95052, *Staphylococcus xylosus*, *Shigella flexneri* RSKK 184, *Bacillus cereus* RS 863, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida. albicans* ATCC 04055, *Streptococcus mutans*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas putida*

mikroorganizmaları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bütün bakteriler - 80°C’de %20 gliserol içeren uygun besiyerlerinde muhafaza edilmiş, kefirlerin ve peptit fraksiyonlarının antimikrobiyal aktiviteleri agar-sandviç yöntemiyle ve 5 farklı konsantrasyonda (50-200 mg / mL 50-75-100-150-200 mg / mL) minimum inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. MRS Broth besiyerinde aktifleştirilen LAB izolatlarından, 1 µL MRS agara ekim yapıp 24 saat inküasyona bırakılmıştır. Gıdalarda bozunmaya neden olan mikroorganizmalar ise 10 mL yumuşak agarlı BHI Broth içeren tüplere 0.1 mL konmuş ve 24 saat inkübasyon sonrası LAB petri yüzeyine yavaşça dökülmüştür. Gıdalarda bozunma yapan mikroorganizmaların gelişme sıcaklığına göre 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inhibisyon zon çapı belirlenmiştir. Kefirlerin ve peptit fraksiyonlarının inhibisyon zon çapı mm (IZ) ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçları karşılaştırmak için antibiyotik standart olarak (Sigma-Oxytetracycline) kullanılmıştır. (10 mg / ml antibiyotik 50 µL enjekte); 100 mg / mL-kuru ekstrakt 50 µL. Denemeler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.6. ACE-İnhibitör Aktivitesinin Belirlenmesi

Dondurularak kurutulmuş pH 4.5 suda çözünen ekstraktların ACE-inhibitör aktivitesi Shimadzu LC 20 AD Prominence HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) kullanılarak RP-HPLC ile belirlenmiştir (Jue-Liang vd. 2014). Metod, temelde Hippuryl-histidyl-leucine’in (HHL, Sigma-Aldrich) ACE tarafından hidrolizi sonucu oluşan hippurik asidin miktarını belirlemesi ile bulunmuştur.

Deney karışımı 250 µL çözelti (5 mmol HHL, 0.01 mol/L sodyum fosfat tamponu, 400 mmol/L NaCl, pH: 8.9) ile 25 µL örnek çözeltisi (1 mL sodyum fosfat tamponu 15 mg dondurularak kurutulmuş suda çözünen ekstrakt) karıştırılarak hazırlanmıştır. Takiben 37 °C sıcaklıkta 5 dakika ön inkübasyon gerçekleştirilmiş olup, 200 mUN (miliunit) ACE (tavşan akciğeri ekstraktı, Sigma-Aldrich, Germany) ilave edilip 37 °C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda 30 dakika inkübe edilerek, inkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak için 1 M 25 µL HCl ilave edilmiştir. Ekstarakt selüloz asetat 0.45 µm gözenek çaplı şırınga filtreden geçirilerek 10 µL HPLC kolona enjekte edilmiştir.

İnhibisyon oranı (%) aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$\text{ACE inhibasyon oranı} = \frac{A-B}{B} \times 100 \quad (3.9)$$

A = ACE ve HHL varlığında ve ACE-inhibitör yokluğundaki absorbans

B = ACE, HHL ve ACE-inhibitörü varlığındaki absorbans

ACE-inhibisyon aktivitesi ayrıca IC₅₀ oranı ACE'nin en az %50'sini inhibe edebilecek biyo-aktif peptit düzeyi ile de ifade edilmiştir. IC₅₀ değeri, farklı protein konsantrasyonlarına karşı ACE-inhibisyon değerlerinin grafik üzerinde ekstrapolasyonu ile hesaplanmıştır. ACE-inhibisyonu ile protein konsantrasyonu arasındaki korelasyonu saptamak için her bir örnek en az 3 protein konsantrasyon seviyesine ayarlanıp, örneklerin protein içerikleri Folin-Lowry metoduna göre belirlenmiştir (Lowry vd., 1951). Ardından, IC₅₀ değerleri ACE aktivitesinin %50'sinin inhibe olduğu protein konsantrasyonundaki lineer regresyon kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Mikrobiyolojik Analizler

Kefir örneklerinde; maya, laktik asit bakterileri, toplam mezofilik starter bakteri (*Lactococcus* spp.) sayıları dökme plaka yöntemine göre iki paralelli olarak belirlenmiştir. Seyreltme amacıyla ¼ kuvvetinde Ringer çözeltilisinden yararlanılmıştır.

3.2.7.1. Seri Dilüsyonların Hazırlanması

Kefir örneklerinde mikrobiyolojik ekimler yapılmadan önce ¼ kuvvetinde ringer çözeltilisi kullanılarak aseptik şartlar altında uygun seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

3.2.7.2. Koliform Bakteri Sayımı

Bujalance vd. (2006) koliform grubu bakterilerin sayımında Violet Red Bile (VRB) Agar besi yeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları anaerobik ortamda 37°C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir.

3.2.7.3. Maya Sayımı

Maya sayımında Potato Dextrose Agar (PDA) besi yeri olarak kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları aerobik ortamda 25°C’de 3-5 gün süreyle inkübe edilmiştir (Bujalance vd., 2006).

3.2.7.4. Laktobasil Sayımı

De Man Rogasa Sharp (MRS) Agar besi ortamından yararlanılarak Iriyogen vd. (2005)’in kullandığı yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir. Analiz dökme plak kültürel sayım yöntemi ile yapılmış olup, inkübasyon anaerobik jar ortamında 37°C’de 3 gün süreyle gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.5. Laktokok Sayımı

M17 Agar besi yeri Iriyogen vd. (2005)’in kullandığı yöntem modifiye edilerek sayım yapılmıştır. Analiz dökme plak kültürel sayım yöntemi ile yapılmış olup, inkübasyon aerobik ortamda 37°C’de 2 gün süreyle gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Duyusal Analiz

Bu araştırmada Açıklayıcı Analiz Yöntemi ve Hedonik Test olmak üzere iki farklı duyusal analiz yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde, renk, köpük, normal görünüm, normal kefir kokusu, yabancı koku, homojen yapı, viskozite, ağzı kaplama, normal kefir tadı, ekşilik, tatlılık, yabancı tat, normal kefir aroması, yabancı aroma, ferahlatıcı aroma gibi belirteçler araştırmanın amacına bağlı kalınarak tanımlayıcı kelimeler olarak tespit edilmiştir. Hedonik test genellikle ürünlerin karşılaştırılması ve beğeniyi ön plana çıkarmıştır. Hedonik testte örneklerin 1-7 arası puanlarla eşleştirilmesi istenmiş ve bu test ile en kabul edilebilir uygulamanın bulunması amaçlanmıştır. Duyusal analizde kullanılan Tanımlayıcı Duyusal Analiz ve Hedonik test formları aşağıda verilmiştir.

Duyusal analiz panelistleri İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü lisansüstü öğrencileri ve akademik personelden seçilmiştir. Uygulamada kullanılan materyalleri ve duyusal analiz formunu tanıtmak amacıyla 8 paneliste eğitim verilmiş ve üretilen 4 kefir örneği 4 °C’de 6-8 paneliste, form bisküvi ve su ile birlikte sunulmuştur.

Deney Adı:.....

Tarih:

Panelist

Adı:

Tanımlar

1. Aşağıda değişik içerikli kefirler hazırlanmıştır.
2. Örnekler soldan sağa şekilde duyuşal analize tabii tutulacaktır.
3. Lütfen örnekler arasında su---kraker----su şeklinde ağızınızı çalkalamayı unutmayınız.
4. İki farklı test sunulmuştur:
 - a. 1. testimiz, sayılabilir derecelendirme testidir. Örnekleri tattıktan sonra 10 cm'lik skalada size en uygun olan yere çizgi ile belirtiniz.
 - b. 2. testimiz, hedonik derecelendirme testidir. Örneklerimizi tattıktan sonra hoşlanma derecenize göre uygun boşluklara kefir kodlarını yazınız.

Sayılabilir

Derecelendirme testi

GÖRÜNÜM:

Renk

Zayıf Güçlü

Köpük (CO2) varlığı

Zayıf Güçlü

Normal Görünüm (yağ partikülleri, pıhtı parçaları olmamalı)

Zayıf Güçlü

KOKU

Normal Kefir Kokusu

Zayıf Güçlü

Yabancı koku

Zayıf Güçlü

TEKSTÜR

Homojen yapı

Zayıf Güçlü

KONSİSTENS

Ağız kaplama

Zayıf Güçlü

Viskozite

Zayıf Güçlü

TAT

Normal kefir tadı

Zayıf Güçlü

Ekşilik

Zayıf Güçlü

Tatlılık

Zayıf Güçlü

Yabancı tat

Zayıf Güçlü

AROMA

Normal Kefir Aroması

Zayıf Güçlü

Yabancı Aroma

Zayıf Güçlü

Ferahlatıcı Aroma

Zayıf Güçlü

Genel Değerlendirme

Zayıf Güçlü

- | | | |
|------------------------------|-------|-----|
| Çok fazla beğendim | | (7) |
| Çok beğendim | | (6) |
| Orta derece beğendim | | (5) |
| Ne beğendim ne de beğenmedim | | (4) |
| Orta derecede beğenmedim | | (3) |
| Çok beğenmedim | | (2) |
| Hiç beğenmedim | | (1) |

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Çalışmada A, B, C ve K ile gösterilen üretim sonrasında tüm analizler her tekrar için iki paralel olarak çalışılmıştır. Örneklere uygulanan farklı işlemlerin (ilave kültür kullanımı, depolama süresi) etkisinin birlikte görülmesi ve sonuçların yorumlanması amacıyla tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) uygulanmış ve bu amaçla SPSS version 9.0 for Windows paket programı kullanılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bileşim Analizleri

Çiğ süt analizinde Milkana Superior Milk Analyzer with Data Memory System cihazı kullanılarak, sütteki pH 6.60; yağ oranı %4.20; protein oranı %3.42 olarak tespit edilmiştir.

Yardımcı kültür kullanılarak üretilen kefirlerin, ortalama pH değerleri ve depolama sürecindeki fizikokimyasal özellikleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Belirlenen pH değerlerinin seyri yardımcı kültür ilavesine bağlı olarak değişim göstermektedir. Kefir üretimi için kullanılan sütte standardize işlem uygulandığından dolayı olgunlaştırma süresince yağ oranında farklılık gözlenmemektedir. Örnekler arasında kuru madde değerlerinde de istatistiksel açıdan önemli farklılıklar saptanmamıştır.

Çizelge 4.1. Kefir örneklerinin kimyasal özellikleri

Özellikler	Gün	A	B	C	K
Ph	1	4.48±0.01a,B	4.48±0.01d,B	4.47±0.01d,AB	4.44±0.01c,A
	7	4.35±0.00b,A	4.34±0.0c,A	4.41±0.01c,B	4.39±0.01b,B
	14	4.31±0.00b, A	4.33±0.01c,AB	4.34±0.01b,B	4.36±0.01a,C
	21	4.33±0.02b, A	4.28±0.0b,A	4.31±0.01a,A	4.37±0.0a,B
	28	4.34±0.01b,C	4.2±0.0a,A	4.29±0.01a,B	4.35±0.0a,C
Titrasyon Asitliği (% La)	1	0.71±0.00a,A	0.85±0.0a, B	0.99±0.0a,C	0.71±0.0a,A
	7	0.71±0.00a,A	0.85±0.0a,AB	1.13±0.0a,B	0.78±0.0a,AB
	14	1.13±0.00b,A	1.27±0.0b,B	1.41±0.0b,C	1.27±0.0c,B
	21	1.13±0.00b,A	1.42±0.0c,C	1.12±0.0b,C	1.28±0.0c,B
	28	1.13±0.00b,B	1.42±0.0c,C	1.56±0.0b,C	0.99±0.0b,A
*Kuru Madde	1	14.25±0.20b,A	14.51±0.23a,A	14.3±0.08a,A	14.26±0.06a,A
	7	13.68±0.06a,A	13.63±0.15a,A	13.81±0.08a,A	13.85±0.03a,A
	14	13.71±0.01a,A	13.72±0.02a,A	13.75±0.01a,A	13.85±0.03a,A
	21	14.10±0.01a,A	14.13±0.02a,A	14.21±0a,A	14.06±0.01a,A
	28	14.30±0.02a,A	14±0.01a,A	13.86±0.01a,A	13.98±0.05a,A
*Nem	1	85.75±0.2b,A	85.49±0.23a,A	85.7±0.08a,A	85.74±0.06a,A
	7	86.32±0.06a,A	86.38±0.15a,A	86.19±0.08a,A	86.15±0.03a,A
	14	86.29±0.01a,A	86.29±0.02a,A	86.26±0.01a,A	86.15±0.03a,A
	21	85.9±0.01a,A	85.88±0.02a,A	85.79±0a,A	85.95±0.01a,A
	28	85.71±0.02a,A	86.1±0.01a,A	86.14±0.01a,A	86.03±0.05a,A
*Yağ(%)	1	2.1±0a,A	2.1±0a,A	2.11±0a,A	2.1±0a,A
	7	2.09±0.01a,A	2.11±0.01a,A	2.11±0.01a,A	2.1±0a,A
	14	2.1±0a,A	2.1±0.01a,A	2.11±0a,A	2.11±0.01a,A
	21	2.09±0.02a,A	2.09±0.01a,A	2.1±0.01a,A	2.1±0a,A
	28	2.1±0.01a,A	2.1±0.01a,A	2.11±0a,A	2.1±0a,A
*Kuru Maddede Yağ (%)	1	14.74±0.2a,A	14.48±0.23a,A	14.76±0.09a,A	14.73±0.06a,A
	7	15.28±0.17b,A	15.45±0.22a,A	15.24±0.04a,A	15.16±0.03a,A
	14	15.32±0.02b,A	15.28±0.08a,A	15.35±0.01a,A	15.2±0.02a,A
	21	14.79±0.17a,A	14.8±0.12a,A	14.78±0.1a,A	14.94±0.01a,A
	28	14.66±0.07a,A	14.97±0.06a,A	15.22±0.02a,A	15.03±0.05a,A

Yardımcı starter kültürü ilavesi ile depolama günleri arasında * ile işaretli parametreler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. A, B ve C büyük harfleri, kefir örnekleri arasındaki $P < 0.05$ 'te önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir. Küçük harf a, b, c, depolama günleri içinde $P < 0.05$ 'te önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir. K, kefir danesi içeren; A: kefir danesi + *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi + *Lb. helveticus*; C: kefir danesi + *Lb. plantarum*. * kurumadde, nem, yağ ve kurumadde yağ parametrelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığını belirtmektedir.

Kefir örneklerinin pH ve titrasyon asitliğinde, 28 günlük depolama süresi boyunca depolama günleri ve örnekler arasında istatistiksel olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Kefir örneklerinin pH değerleri, üretimin ilk günü 4.44 ile 4.48; son günü de 4.20 ile 4.35 arasında değişmektedir. Çalışmamızda depolama sonunda, en düşük pH değerine ve 1. gün ile 28. gün arası en fazla pH değişimine B örneğinin sahip olduğu (*Lb. helveticus*) belirlenmiştir. Depolama günleri ve örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ortaya konmuştur. Kefirlerin pH değerlerinin depolama süresinin ilk 14 gününde azaldığı, depolama boyunca 14. gününden itibaren tekrar az miktarda arttığı ve 28. günde yeniden azaldığı tespit edilmiştir. Kefirlerin pH değerlerinin depolama süresinin ilk 14 gününde azalmasının laktozun, starter kültürde bulunan laktik asit bakterileri tarafından parçalanması sonucunda artan laktik asit miktarı, depolamanın 14. gününden sonraki pH artışının ise ortamda bulunan maya sayısının artması ve dolayısı ile laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asitin mayalar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın bulgularına benzer şekilde, kültür ilavesi ve laktozun bakteriler tarafından parçalanmasıyla, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin pH değerlerinde bir düşüş gözlenmiştir (Ertekin, 2010; Dinç, 2008; Er, 2014; Dinkci vd. 2015). Güzel-Seydim vd. (2000), depolama süresinin kefirin pH'sı üzerindeki etkisine ilişkin çalışmalarında, 21 günlük depolama süresinin kefirin pH'sı üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır ve kefir örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. ($P > 0.05$). Kök-Taş vd. (2013) yaptıkları çalışmada üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefirin pH değeri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Anton vd. (2016) Estonya, Letonya ve Litvanya'da üretilen kefirlerin kimyasal özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada kefir örneklerinin çalışmamıza benzer şekilde pH'ı 4.28 – 4.48 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Aytekin vd. (2019) yaptıkları çalışmada kefirin in vitro bağırsak sindiriminin simülasyonu sonucu oluşan biyoaktif peptitleri incelemişlerdir. Bu çalışma doğrultusunda pH değerini 4.59 olarak bildirmişlerdir.

Keçi sütünden yapılan ve %2, %4 ve %6 oranında kefir daneleri ile fermente edilen kefirlerde yapılan fizikokimyasal analizlerde optimum değerleri sağlayan kefir örneğinin %2 dane ilave edilmiş kefir örneğinin pH değeri 5.40 olarak; %4 dane ilaveli

örneğin pH değeri 4.96; %6 dane ilaveli örneğin 4.76 olarak tespit edilmiştir (Sulmiyati, 2019).

Yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde laktozun starter kültür bakterileri tarafından parçalanması ile birlikte pH değeri azalmaktadır (Abrahamsen ve Holmen 1981; Katsiari vd. 2002). Fakat birçok araştırmada kefirde depolama süresi boyunca pH değerinde önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir (Irigoyen vd. 2005; Tratnik vd. 2006; Ender, 2009). Yapılan diğer çalışmalarda ise kefir örneklerinin pH değerlerinin depolama süresinin ilk haftasında azaldığı, daha sonra depolama süresince değişmediği belirlenmiştir (Grønnevik vd. 2011; Magra vd. 2012). Kefir pH'sının depolama süresince değişmemesinin kefirdeki maya mevcudiyetinden dolayı kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Collar (1996) kefir pH'sının depolama süresince değişmemesinin laktik asit bakterilerinin mayalarla beraber olduğunda saf kültürde bulunduğundan daha pasif olarak çoğalması ve daha az miktarda laktik asit ve asetik asit üretmesi ile ilgili olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Kefir örneklerinin titrasyon asitliği değerleri % laktik asit cinsinden belirlenmiş olup, 28 günlük depolama süresince, kefirlerin titre edilebilir asitlik değerleri % 0.71 ile % 1.28 arasında tespit edilmiştir. Yardımcı kültür ilave edilen kefir örneklerinin pH değerlerine benzer şekilde, titrasyon asitliği değerlerinin de depolama süresince düzensiz değişimler gösterdiği belirlenmiştir. Genel olarak; depolamanın 14. gününe kadar kefir örneklerinin titrasyon değerlerinin arttığı, depolamanın 28. gününde ise tekrar azaldığı veya değişmediği belirlenmiştir. Titrasyon asitliği A (*Lb. bulgaricus*) ve B (*Lb. helveticus*) örneğinde depolamanın 1. ve 7. gününde değişmediği C (*Lb. plantarum*) ve K örneklerinin asitliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Depolama boyunca asitlik artmıştır fakat C örneğinde depolamanın son günü bir azalma görülmüştür. Bu azalmanın laktik asit miktarının azalması veya simbiyotik ilişkiye bağlı olarak gerçekleşmiş olabilecek bir etki olacağı tahmin edilmektedir.

Bütün örneklerde depolama süresince titrasyon asitliğinde meydana gelen değişiklikler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Saidi vd. (2003), Çayır (2007), Tarakçı vd., (2016) tarafından yapılan araştırmalarda titrasyon asitliği değerlerinin depolama süresince genel olarak arttığını bildirilmişlerdir.

Aytekin vd. (2019) yaptıkları çalışmada kefirin in vitro bağırsak sindiriminin simülasyonu sonucu oluşan biyoaktif peptitleri incelemişlerdir. Bu çalışma

doğrultusunda titrasyon asitliği değerini %0.71 olarak bildirmişlerdir.

Keçi sütünden yapılan ve %2, %4 ve %6 oranında kefir daneleri ile fermente edilen kefirlerde yapılan fizikokimyasal analizlerde titrasyon asitliği % laktik asit cinsinden; %2 dane ilaveli örneğin 0.14; %4 dane ilaveli örneğin 0.26; %6 dane ilaveli örneğin 0.41 olarak tespit edilmiştir (Sulmiyati, 2019).

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde kefir için belirlenen laktik asit cinsinden % titrasyon asitliği değerinin en az %0.6 olması gerektiği belirtilmiştir (Anonim, 2009). Kefir örneklerinin 28 günlük depolama süresince titrasyon asitliği değerlerinin Tebliğ'de belirtilen değerler ile uyumlu bulunmuştur.

Kuru madde, sütün veya süt ürününün doğal yapısında bulunan suyun haricinde kalan yağ, protein, laktoz, mineraller ve vitaminlerin toplamı olarak bilinmektedir. Kefir örneklerinin kuru madde içeriği depolama sonunda %13.85 ile %14.26 arasında bulunmuştur. Kefir örnekleri arasında yapılan istatistiksel analiz sonucunda kuru madde içeriği bakımından örnekler ve depolama günleri arasında farklılık gözlenmemiştir. Kefir örneklerinin kuru madde içerikleri, Irigoyen vd. (2005) tarafından bulunan %11.3-11.7 ve %9.35-13.69 verilerine benzerlik göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada, kefir danesi ilave edilerek üretilen kefirde kuru madde miktarını ortalama %8.08; starter kültür kullanılarak üretilen kefirde ortalama %8.25 olarak belirlenmiş ve bu durum kefir üretiminde kefir danesi ve starter kültür kullanımına bağlı olarak kefirin bileşiminde farklılık olabileceğini göstermektedir (Ersoy vd., 2003).

Irigoyen vd. (2005) çalışmamıza benzer şekilde, depolama süresi boyunca depolama süresinin 28 günlük depoda kefir üzerindeki etkisini araştırdıklarında, toplam kuru madde oranının değişmesi önemli bulunmamıştır. Depolama süresinin ve farklı kültür ilavesinin toplam kuru madde, protein ve yağ üzerindeki etkisinde istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır.

Anton vd. (2016) Estonya, Letonya ve Litvanya'da üretilen kefirlerin kimyasal özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada kefir örneklerinin kuru madde içeriği %9.21 ve %12.46 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Aytekin vd. (2019) yaptıkları çalışmada kefirin in vitro bağırsak sindiriminin simülasyonu sonucu oluşan biyoaktif peptitleri incelemişlerdir. Bu çalışma doğrultusunda kuru madde miktarını %11.1 olarak saptamışlardır.

Çalışmamızda, depolama süresi boyunca yağ değerlerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Birçok çalışmada, yağ içeriğinin depolama süresine bağlı olarak önemli ölçüde değişmediği belirtilmiştir (Alm 1982; Gambelli vd., 1999; Bonczar vd., 2004). İnek sütünden yapılan bir çalışmada kefirlerde yağ miktarını 3.08 g/100 ml olarak tespit edilmiştir (Wszolek vd. 2001). Süte %1 ve %5 oranında kefir danesi ilave ederek yapılan farklı bir araştırmada ise; yağ miktarı sırasıyla 3.51 g/100 ml ve 3.60 g/100 ml olarak bildirilmiştir (Irigoyen vd., 2005).

Kurumaddede yağ oranı da kefir örneklerindeki kurumadde miktarına bağlı olarak değişim göstermiştir. A örneğinde azalma meydana gelirken diğerlerinde az miktarda da olsa artış meydana gelmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aytekin vd. (2019) kefirin in vitro bağırsak sindirimini simülasyonu sonucu oluşan biyoaktif peptitleri inceledikleri çalışmada yağ miktarını %2.5 olarak bildirmişlerdir. Yağ miktarı arasındaki farklılıkların izlenen üretim metoduna bağlı olarak kullanılan sütün standardizasyon farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2. Proteoliz Oranları

Kefir örneklerinde olgunlaşma sürecinde meydana gelen proteoliz, kefirlerin suda çözünen azot fraksiyonları, toplam serbest amino asit miktarları, RP-HPLC peptit profilleri ve RP-HPLC serbest amino asit profilleri olarak ayrı ayrı incelenmiştir. Suda çözünen azot oranı kefir proteinlerinin parçalanma ürünlerinin belirlenmesi için önemlidir. Çünkü bu ürünlerin miktar ve niteliği kefire özgü tat, aroma ve tekstür oluşumunda etkili olmaktadır.

Çizelge 4.2. Kefirde olgunlaşma boyunca belirlenen suda çözünen azot miktarı

Özellikler	Gün	A	B	C	K
*% TP	1	3.99±0.07a,A	3.47±0.13a,A	3.92±0.02b,A	3.84±0.01a,A
	7	3.82±0.11a,A	3.84±0.03a,A	3.58±0.11a,A	3.69±0.03a,A
	14	3.84±0.14a,A	4.09±0.04a,A	3.58±0.11a,A	3.72±0.01a,A
	21	3.71±0.06a,A	3.77±0.07a,A	3.93±0.07b,A	3.85±0.11a,A
	28	3.72±0.09a,A	3.79±0.09a,A	3.64±0.03a,A	3.86±0.04a,A
SÇA/TN	1	4.84±0.1a,A	5.79±0.55ab,B	5.21±0.17a,AB	5.12±0.14a,AB
	7	4.62±0.02a,A	4.67±0.19a,A	4.74±0.04a,A	5.17±0.23a,B
	14	5.78±0.16b,A	5.14±0.33a,A	5.46±0.12b,A	6.73±0.3b,B
	21	7.14±0.02c,B	6.71±0.31b,B	5.66±0.18b,A	7.35±0.32b,B
	28	8.28±0.04d,BA	7.74±0.1c,A	8.12±0.1c,AB	8.56±0.36c,B
%12 TCA/TN	1	1.32±0.02a,A	1.81±0.02b,A	1.96±0.02A	1.66±0.02d,A
	7	1.49±0.04a,B	2.02±0.03b,B	2.15±0.02c,B	1.86±0.04c,B
	14	1.88±0.05a,C	2.31±0.04b,C	2.36±0.02b,C	2.4±0.04b,C
	21	1.98±0.03a,C	2.58±0.04cb,D	2.43±0.03b,C	2.65±0.04c,D
	28	2.34±0.04a,D	2.65±0.04b,D	2.60±0.03b,D	2.86±0.02c,E

Yardımcı kültürü ilavesi ile depolama günleri arasında * ile işaretli parametreler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir. A, B ve C büyük harfleri, kefir örnekleri, küçük harf a, b, c, depolama günleri arasındaki $P < 0.05$ 'te önemli ölçüde farklıdır. K, kefir danesi içeren; A: kefir danesi + *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi + *Lb. helveticus*; C: kefir danesi + *Lb. plantarum*

Kefir içerisindeki proteinin yaklaşık %3.5'i mikroorganizmaların etkisi ile değişerek daha kolay sindirilebilir bir forma dönüşmektedir. Protein miktarı, toplam kurumaddenin yaklaşık %33'ü olan toplam kütlenin en önemli besinsel değerine sahiptir (Sarkar, 2007). Çizelge 4.2'de kefir örneklerinin azot içeriği verilmektedir. Kefir örneklerinin protein değerlerinde örneklere ve depolama günlerine bağlı önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Kefir örneklerinin protein değerleri %3.47-4.09 arasında değişiklik göstermiştir. Örneklerin protein miktarı, Yıldız-Akgül vd. (2018)'nin rapor ettiği değerlere benzer olarak bulunmuştur.

Wszolek vd. (2001); farklı süt türlerinden ve farklı starter kültürlerle ve dane ile ürettikleri kefir örneklerindeki protein miktarları %2.85-% 6.45 olarak; Garrote vd. (2001) ise Arjantin'in 4 farklı bölgesinden temin ettikleri kefir daneleriyle ürettikleri kefir içeceklerindeki protein değerlerinin % 4.7-6.6 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Aytekin vd. (2019) yaptıkları çalışmada kefirin in vitro bağırsak sindiriminin simülasyonu sonucu oluşan biyoaktif peptitleri incelemişlerdir. Bu çalışma doğrultusunda protein miktarını %3.19 olarak tespit etmişlerdir.

Ersoy vd. (2003) çalışmalarında; dane ile üretilen kefirde protein miktarının ortalama 2.34 g/100 ml; starter kültür ile üretilen kefirlerde ise ortalama 2.26 g/100 ml olarak belirlemişlerdir. Çalışma sonuçları doğrultusunda kefir danesi veya starter kültür kullanımı sonucunda protein miktarında oluşan farklılığın istatistiksel açıdan önemli olmadığını belirtmişlerdir. Kefir kuru maddesini oluşturan bileşenler arasında yağdan sonra en büyük oranı protein oluşturmakta olup, süt ürünlerinin en önemli ve değerli besin ögesidir

Suda çözünen azot oranı kefir proteinlerinin parçalanma ürünlerinin belirlenmesi için önemlidir. Çünkü bu ürünlerin miktar ve niteliği kefir çeşidine özgü tat, aroma ve tekstür oluşumunda etkili olmaktadır. Yardımcı kültür farklılığı suda çözünen azot değerlerini önemli düzeyde etkilediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda; olgunlaşma süresinde depolama günlerine bağlı olarak en büyük artış K (kontrol) kefirinde saptanırken, A (*Lb. bulgaricus*) ve C (*Lb. plantarum*) ilaveli kefirlerde benzerlik göstermektedir. Kefir örneklerindeki suda çözünen azot değerleri ve suda çözünmeyen azot miktarı olgunlaşma sürecinde sürekli bir artış göstermektedir.

% 12 TCA'da çözünen veya diğer bir deyişle protein olmayan azot oranları orta ve kısa zincirli peptitler ile amino asitlerden oluşmaktadır (Hayaloğlu, 2003). Kefir

örneklerindeki suda çözünen azot değerleri olgunlaşma sürecinde artış göstermektedir. Suda çözünen azot değerlerinin yardımcı kültür farklılığı ve depolama günlerine bağlı değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2). %12 TCA'da çözünen azot oranları incelendiğinde depolamanın 28. günü K (kontrol) örneği 2.86 ile en yüksek değere sahip ve 2.65 ile B (*Lb. helveticus*) ve 2.40 ile C (*Lb. plantarum*) yardımcı kültür ilaveli kefirlerin izlediği görülmüştür. %12 TCA'da çözünen azot oranları üzerine yardımcı kültür kullanımının önemli etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Trakya bölgesinde farklı bölgelerden alınan yoğurtlardan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bu bakteriler kullanılarak ayran üretimine uygun kültürler seçilmesi için yapılan çalışmada ayran örneklerinin protein miktarlarında diğer örneklere göre en dikkat çekici farklılık *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile üretilmiş ayran örneğinde tespit edilmiştir. Bu durum proteine etki eden olası enzim varlığından kaynaklanabileceği tahmin edilmiştir (Bölükbaşı, 2007).

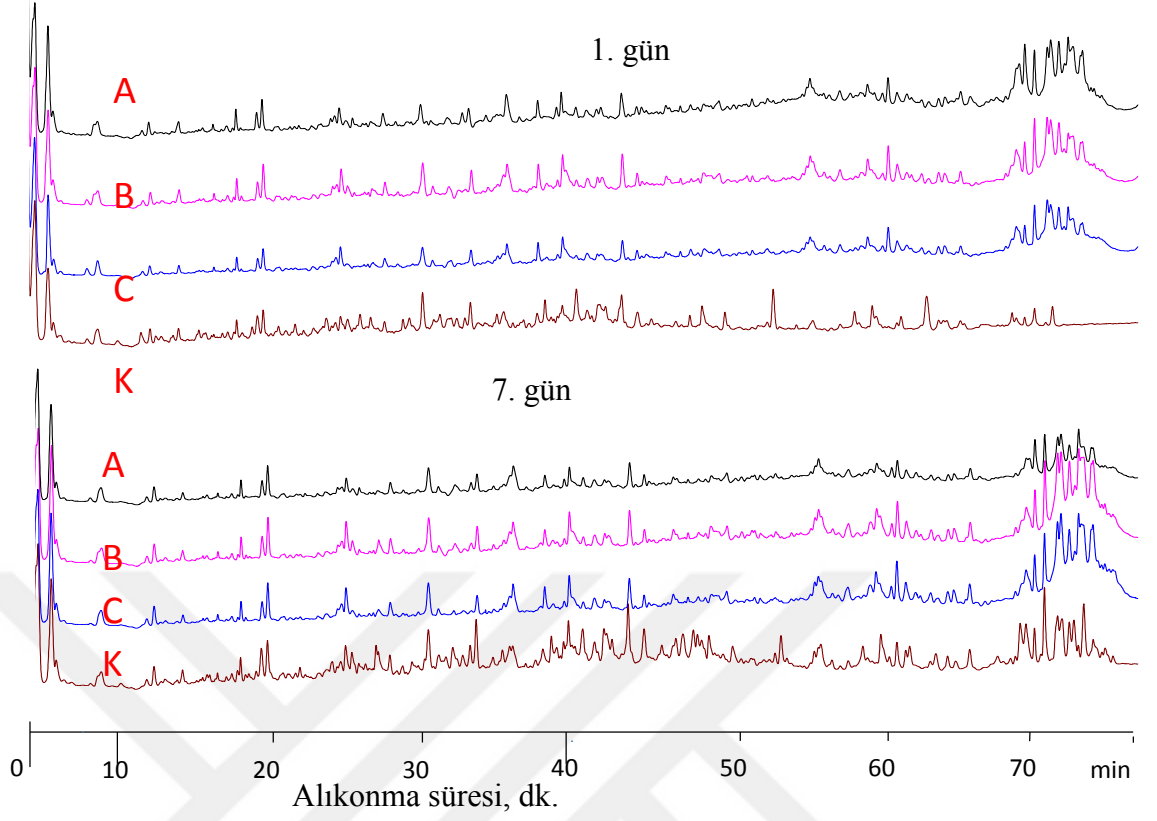
Tonguç (2006)'un yaptığı çalışmada, ayran ve normal ayran kültürünün yanında farklı probiyotik kültürler ilave edilerek üretilen örneklerin 10 günlük depolama süresi ve 15 farklı kültür içerikleri açısından oluşan farklılıklar karşılaştırılmıştır. Probiyotik ayranların üretiminde ilave farklı probiyotik kültürlerin, depolamanın 1. ve 10. günlerinde ayranların toplam azot miktarı arasında oluşturduğu farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu ve protein oranlarında günler arası değişim *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis* ve *Lactobacillus acidophilus* içeren probiyotik ayran ve *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* içeren probiyotik ayranlarda protein oranlarının depolama süresinden etkilendiği bildirilmiştir.

Olgunlaşma derecesinin bir diğer ifadesi olan tirozin değerinin belirlenmesinde Yüksekdağ vd. (2004); Türk kefir örneklerinden laktik asit bakterilerini izole ederek identifikasyon sonucunda *Streptococcus thermophilus* Z5S ve Z12S, *Streptococcus durans* Z7S ve Z8S, *Lactococcus lactis* Z2S ve Z3S, *Lactococcus cremoris* Z14S ve Z16S'nin hiçbir proteolitik aktivite göstermezken *Lactococcus cremoris* Z20S suşunun 0.09 mg/ml ile en yüksek proteolitik aktiviteyi gösterdiğini bildirmişlerdir.

4.2.1. Kefirlerde Ters Faz Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile Belirlenen Peptit Profilleri

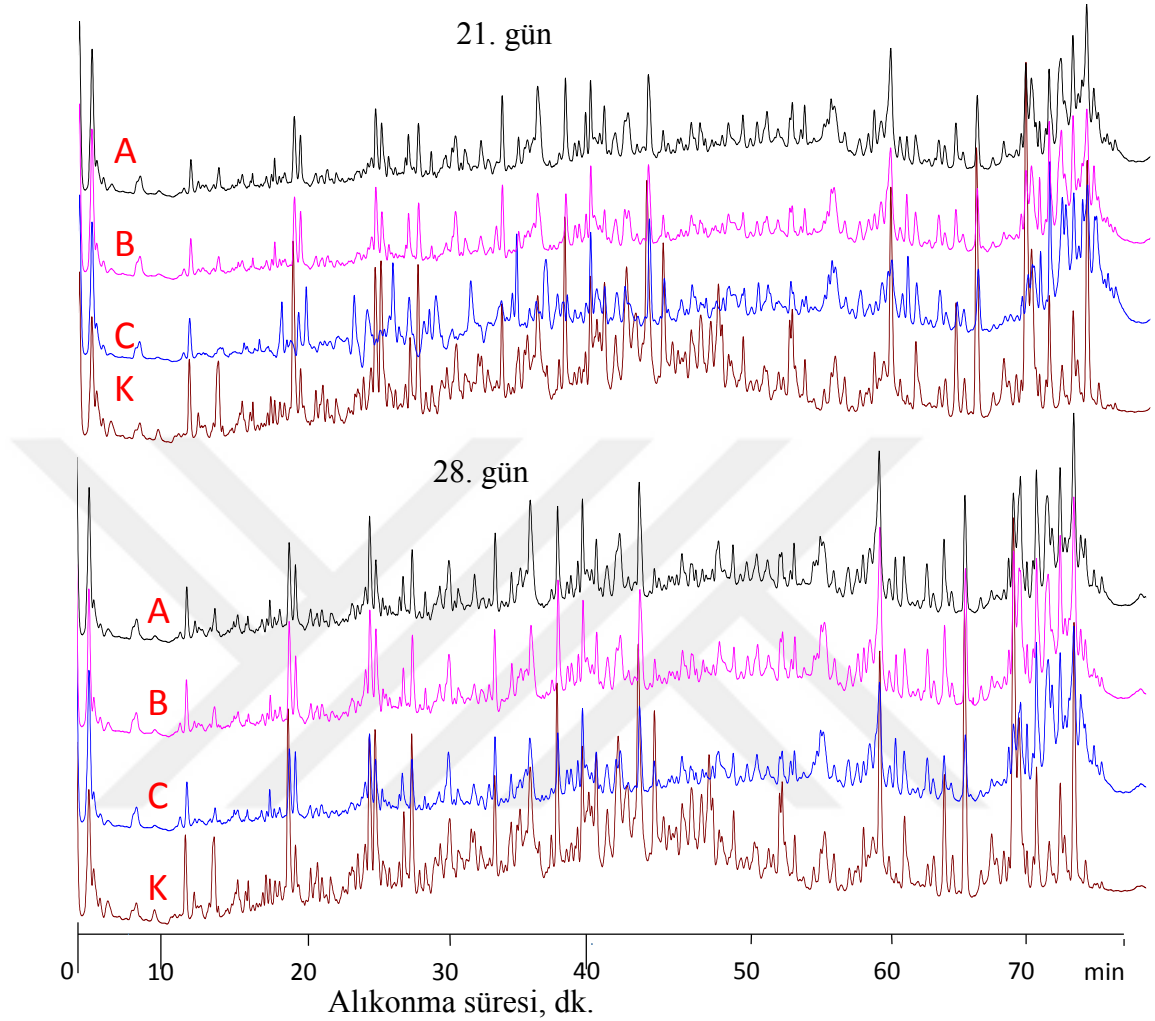
RP-HPLC tekniği, ürünlerdeki olgunlaşma sürecinde meydana gelen proteolizi belirlemede başvurulan yöntemlerden biridir. Peptitler inaktif olarak bulunduğu protein dizisi içinden çeşitli yollarla açığa çıkmaktadırlar. Proteinlerin enzimlerle hidrolizi ve proteolitik starter kültürlerin sütü fermente etmeleri ile peptitler oluşmaktadır. Kefirdeki peptitlerin RP-HPLC tekniği ile ayırma mekanizması, çözülmüş moleküllerin ters adsorbsiyon/desorbsiyon prensibine dayanmakta olup, sabit fazın hidrofobiklik derecesine göre değiştirdiğinden, daha az hidrofobik olan moleküller (hidrofilik peptitler) ilk önce pik verecek, bunları hidrofobik özellikleri artan peptitler izleyecektir (Pripp vd., 1999).

Depolama süresi boyunca RP-HPLC peptit profilleri Şekil 4.1-4.2'de günlere göre verilmiştir. 1. ve 7. gününe ait kromatograma bakıldığında yardımcı kültür ilaveli kefir örneklerinin peptit profillerinin birbirine benzediği, kontrol kefir örneğinin pik sayısı ve konsantrasyonunun daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu durumun 21. ve 28. günde de devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Olgunlaşmanın 1. ve 7. günündeki (a) HPLC peptit profili

K: kefir danesi içeren; A: kefir danesi + *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi + *Lb. helveticus*; C: kefir danesi + *Lb. plantarum*.



Şekil 4.2. Olgunlaşmanın 21. ve 28. günündeki (b) HPLC peptit profili

K: kefir danesi içeren; A: kefir danesi + *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi + *Lb. helveticus*; C: kefir danesi + *Lb. plantarum*.

Yardımcı kültür ilaveli kefir örneklerinin 21.ve 28. gün peptit profilinde 15, 45 ve 52. dakikada gözlemlenen pikin, sadece K örneklerinde yüksek konsantrasyonda olduğu görülmektedir. 28. gün kromatogramın 64. dakikasına bakıldığında ise meydana gelen peptidin sırası ile en yüksek K, B ve A örneklerinde olduğu görülmektedir (Şekil 4.2).

Olgunlaşma sürelerinde yardımcı kültür kullanımının sadece kefir danesi ile üretilen diğer örneklere göre daha zayıf ve daha düşük peptit konsantrasyonuna

sahip olması oluşan peptitlerin parçalanarak daha küçük peptitlerin oluşumuna katkı sağlaması ve amino asitlere kadar parçalanması ile açıklanabilir. Bu durum toplam serbest amino asit ve HPLC- FAA değerleri ile de ortaya konmuştur.

Dallas vd. (2016)'nin yaptıkları çalışmada kefirdeki proteolitik aktivite ve peptidomik analizler araştırılmıştır. Kefir örnekleri ile yapılan çalışmada %4.15 dane ilaveli çiğ süt, kapağı açık şekilde kavanozda 24 saat inkübasyon ve aynı şartlarda kapağı kapalı şekilde kavanozda inkübasyon gerçekleştirmişlerdir. Yapılan karşılaştırmada kontrol ve kapağı açık kefirdeki peptit miktarı kapağı kapalı örneğe göre daha fazla miktarda peptit içerdiği bildirilmiştir.

4.2.2. Kefirlerde RP-HPLC Serbest Amino Asit Miktarı

Kefir örneklerindeki depolamanın 1. ve 28. günündeki amino asit değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Gln, Glu, Gly, Thr, Asp ve Ser gibi serbest amino asitlerin seviyesi kontrol örneğinde diğer kefir örneklerine göre daha yüksektir. Bununla birlikte, Arg, Glu ve Pro seviyeleri olgunlaşma süresince artmıştır. Genel olarak, B ve K örneklerinde Trp, Asn, Ala, Gly içeriği depolanma süresince artmıştır. B, C ve K örneklerinde Ile içeriği artarken, olgunlaşma süresi boyunca Val içeriği azalmıştır. Eklenen ilave kültürler, kefirlerin serbest amino asit içeriği üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Farklı kültür tiplerine sahip olan enzim sistemleri, proteolitik aktiviteler, peptitlerin bozulmasına, farklı türlerde ve miktarlarda amino asitlerin oluşumuna sebep olmuştur. Dane ve yardımcı kültür ile üretilen manda sütü kefirinin başlıca amino asitlerinin glutamik asit, alanin, serin, tirozin gibi olduğu tespit edilmiştir (Gul vd., 2015).

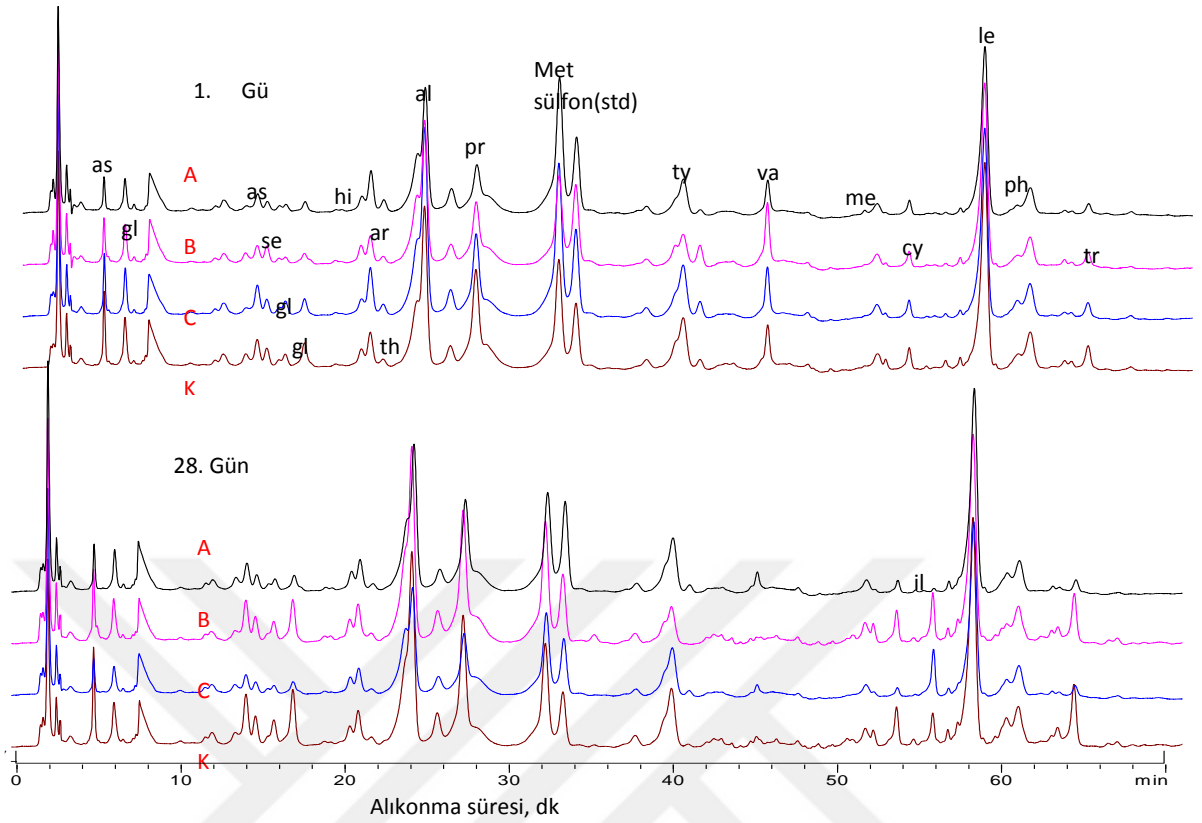
Çizelge 4.3. 1. ve 28. günde 4 °C'de Kefir (mg / 100g kefir) 'deki serbest amino asit miktarları

Amino asit	1. gün				28. gün				İstatistik	
	A	B	C	K	A	B	C	K	P_d	P_s
ASP	1.76	1.65	2.7	1.6	7.04	5.46	5.36	8.35	***	***
GLU	2.65	1.38	2.57	9.65	7.53	7.18	9.15	9.39	***	***
ASN	0.07	0.96	0.6	0.5	0.95	4.01	0.79	0.97	**	***
SER	0.4	0.35	2.69	3.08	3.8	0.33	4.45	5.08	***	***
GLN	0.05	0.19	0.48	0.39	0.87	0.24	0.76	0.96	***	***
GLY	0.24	1.99	2.04	1.84	5.67	6.06	7.14	9.09	***	***
HIS	1.34	6.18	5.62	6.48	5.74	5.18	7.85	6.16	***	***
ARG	1.11	2.41	2.39	2.06	8.54	3.14	11.81	1.46	***	***
THR	3.63	1.67	2.61	1.85	4.37	2.08	2.3	1.89	***	***
ALA	11.67	16.18	12.85	11.8	16.13	16.98	16.31	12.66	***	***
PRO	5.51	2.95	4.75	3.93	7.7	5.58	12.35	4.89	***	***
TYR	3.77	2.18	3.33	2.63	3.02	4.45	5.7	2.22	***	***
VAL	6.35	5.92	6.86	5.46	4.32	2.2	0.62	2.39	***	***
MET	0.65	1.69	0.21	1.84	6.1	4.76	2.15	3.72	***	***
CYS	1.1	1.55	5.61	2.67	3.84	5.93	10.84	7.03	***	***
ILE	0.45	0.4	0.6	0.38	0.57	4.97	2.31	3.32	***	***
LEU	4.46	8.54	7.51	7.27	7.66	9.7	8.22	7.21	***	***
PHE	0.33	5.97	2.76	6.79	7.41	6.14	3.22	7.38	***	***
TRP	2.94	1.16	1.12	1.89	6.41	4.13	1.84	5.15	***	***
LYS	2.41	4.53	5.67	4.01	3.21	8.87	7.07	6.41	***	***
TOTAL	50.88	67.83	72.97	76.11	110.88	107.4	120.24	105.73	***	***

Pd: günler arasındaki istatistik fark; Ps: örnekler arasındaki istatistik fark.

Farklı yardımcı kültür ilave edilerek üretilen kefirlerin depolama boyunca suda çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC aminoasit profilleri belirlenmiş ve bunların olgunlaşma süresindeki değişimleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Kromatogramlarda, alıkonma sürelerinde ve konsantrasyonlarda meydana gelen değişimlerin yardımcı kültür kullanımının aminoasit oluşumu üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Kefir örneklerinden elde edilen RP-HPLC amino asit profili ve PCA diyagramı ve kefir örneklerinin depolanma 1. ve 28. gün sonuçlarından elde edilmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). K örneğinde olgunlaşmanın 28. gününde, belirli peptitler dışında hiçbir yeni

peptitin oluşmadığı tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda, peptit varlığı K örneği kefirde ve 28. olgunlaşma gününde gözlemlenmiştir. 28. gün depolama da Alanin en yüksek B örneğinde görülürken, ikinci en yüksek değer C örneğinde görülmüştür. Serbest amino asitler içerisinde Alaninin yüksek miktarda olması transaminasyon reaksiyonları açısından önemlidir. Bu reaksiyon sonunda pirüvat ve glutamat meydana gelmektedir. Çocuklarda Arginin ve Histidin'in vücutta sentezlenmesini sağlayacak metabolizma sistemleri henüz gelişmediği için yarı elzem aminoasitler olarak kabul edilmektedir. Arginin ve Histidin miktarı 28. gün depolamada C örneğinde artış gösterirken, 28. gün K örneğinde ise azalış göstermiştir. Arginin ve Histidin; pirüvat, α -ketoglutarat ve glukoneojenez yoluyla glukoz dönüşebildiğinden dolayı K örneğindeki azalmanın glukoz artışına neden olabileceği tahmin edilmektedir. Buna bağlı olarak da 28. gün maya miktarı sayısı en fazla K örneğinde tespit edilmiştir. Aspartik asit konsantrasyonu depolama günlerine bağlı olarak artış göstermiş olsada, en fazla konsantrasyon artışında A (*Lb. bulgaricus*) ve K (kontrol) örnekleri öne çıkmaktadır. Amonyak detoksifikasyonunda önemli rol oynayan Glutamik asit miktarı, depolama günlerine göre K örneği 28. depolama gününde azalış gösterirken, diğer örneklerde artmıştır. Kas dokusunda en yoğun olarak bulunan dördüncü amino asit olan lösin azot dengesini korumaya yardımcı olmaktadır ve kefir örneklerinde en yüksek lösin miktarı B (*Lb. helveticus*) örneği kefirde ve 28. gün depolama da tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. 1. ve 28. gün kefir örneklerinin RP-HPLC serbest amino asit kromatogramı

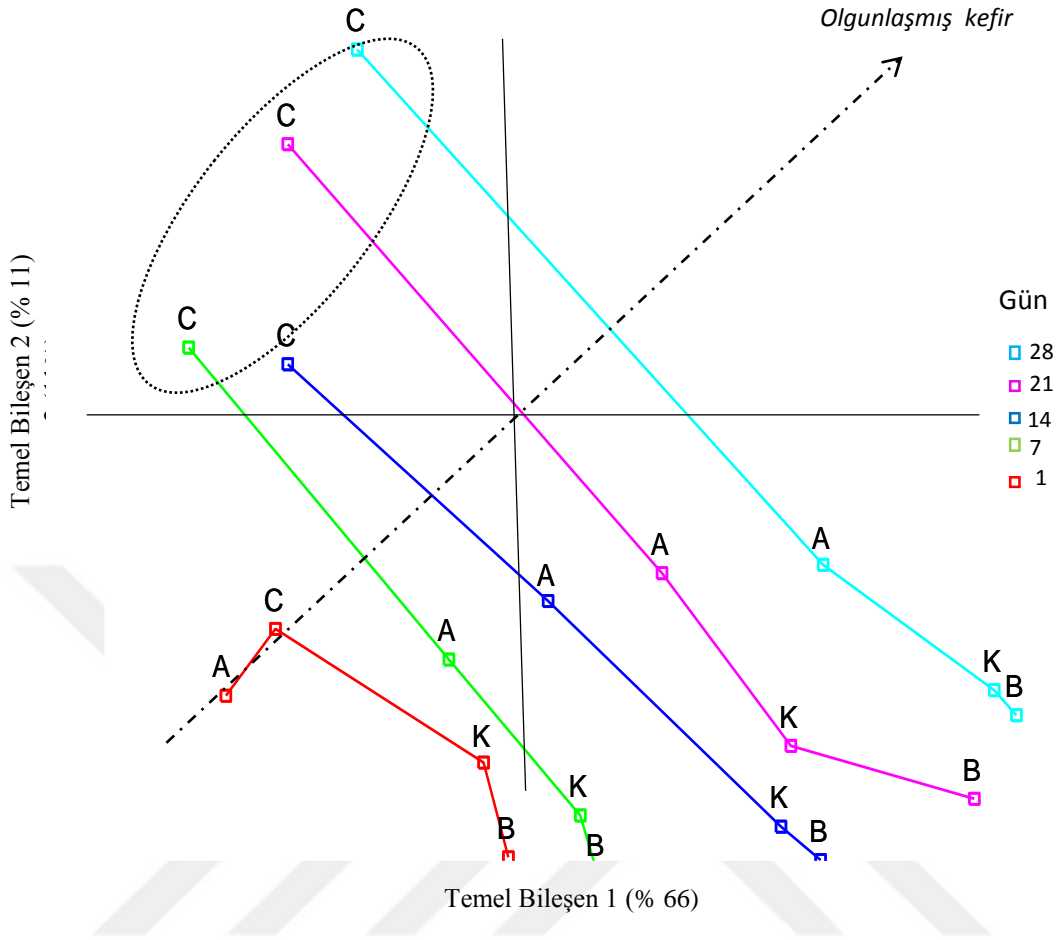
K: kefir danesi içeren; A: kefir danesi + *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi + *Lb. helveticus*; C: kefir danesi + *Lb. plantarum*. Aspartik asit: 8.366; Glutamik asit: 8.886; Serin: 13.826; Glutamin: 14.321; Glisin: 15.200; Histidin: 19.393; Arginin: 21.450; Thr: 2.327; Alanin: 24.590; Prolin: 27.709; Tirozin: 45.714; : 50.061; Cistein: 54.528; Isolösin: 5.730; Lösin: 56.675; Fenilalanin: 61.034; Triptotan: 63.024 dk.

Wang vd. (2016)'nin yaptıkları çalışmada kefir daneleri ve kefir danesinde izole edilen starter kültürleri maya (*Kluyveromyces marxianus strain*, *Pichia kudriavzevii clone*), laktik asit bakterisi (*Lactobacillus kefiri* F4Aa, *Lactobacillus kefiri* NM131-7, *Lactobacillus kefiri* NM132-3, *Lactobacillus kefiri* NM180-3), kapsülasyon işleminden sonra tekrar bu kapsül ile sütü fermente edip oluşan kefirdeki proteolitik etkilerin araştırılması çalışmasında, kapsüllenmiş starter kültür ilaveli kefirlerdeki serbest amino asit miktarının daha fazla olduğu ama dane ile üretilmiş kefirdeki aminoasitlerle benzer olduğu tespit edilmiştir. Aspartik asit ve Tirozin sadece kefir danesi ile yapılan kefirlerde Arginin ise; sadece kapsül ile yapılan kefirde bulunmuştur. Ek olarak, kefirdeki amino asitlerin çoğu kefir daneleri ile yapılanlardan

daha zengin olduğu tespit edilmiştir. Kefir danelerindeki mikrobiyal bileşenler, kapsüllerden daha karmaşık olduğu sonucuna varılmıştır.

Güler vd. (2016)' da geleneksel süt ve organik süte %0.2 ve %0.5 oranında uyguladıkları kefir danesi inokülasyonu sonucu oluşan kefir örneklerinin serbest amino asit kompozisyonunda %0.5 dane içeren örnekte Prolin en fazla miktarda bulunurken, onu Alanin, Asparagin, Lisin, Arginin ve Sistein takip etmektedir. Liutkevicius vd. (2004) ise, fermente kefirde Triptofan, Valin, Lisin, Metiyonin, Fenilalanin, Treonin ve İzolösin varlığını bildirmişlerdir. Grønnevik (2011) 'de Norveç kefirinin kimyasal özelliklerinin araştırıldığı çalışmada serbest amino asitlerden en yüksek değere sahip Glutamik asit olduğu belirtilmiştir. Simova vd. (2002) tarafından kefir danesinden izole edilen *Lactobacillus bulgaricus* HP1 ve *Lactobacillus helveticus* MP12 suşlarının tekrar kefir üretiminde starter kültür olarak kullanıldığı çalışmada, en fazla serbest amino asit miktarına Prolin ve Glutamik asit sahip olurken; Alanin en bol bulunan ikinci amino asit olmuştur.

Kefirlerin serbest amino asit analizi sonuçları, temel bileşen analizine (PCA) tabi tutulmuş ve analiz sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Olgunlaşma sonuçlarını 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerde analiz eden PCA grafiğinde, kefirin depolama süresine bağlı olarak dağılım gösterdiği, *Lactobacillus* ilavesi, kefirlerde farklı miktarlarda amino asit içerdiğini göstermiştir. *Lb. plantarum* diğer kefir örneklerinden ayrılmış olup (Şekil 4.4'te daire içine alınmış) diğerlerinden daha yüksek konsantrasyonda amino asit içermektedir.



Şekil 4.4. Serbest amino asitlerin PCA grafiği

K: kefir danesi içeren; A: kefir danesi + *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi + *Lb. helveticus*; C: kefir danesi + *Lb. plantarum*.

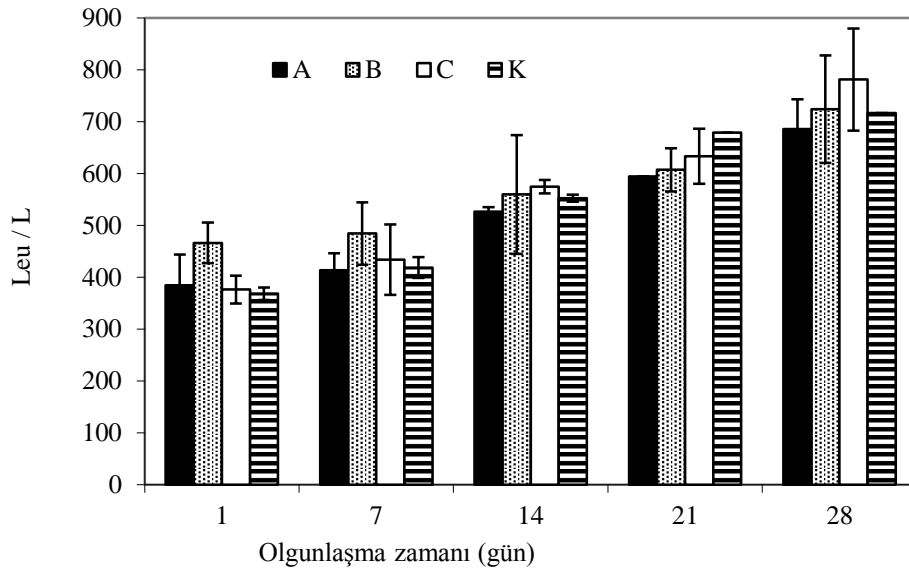
Bakteri tür ve alt tür kompozisyonunun da kefir örneklerinin proteolitik davranışları ve proteolizi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin araştırıldığı bir çalışmada bakterilerin proteolitik aktivitesinin ve laktik asit üretme kabiliyetinin cins, tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Yüksekdağ vd., 2003).

Simova vd. (2006)'da yaptıkları çalışmada, tüm örneklerde süte %1 kültür ile *Lc. lactis* C15 18 saat boyunca 30 °C'de, *Lb. helveticus* MP12 37 °C'de 16 saat, *S. termofilus* T15 + *Lb. bulgaricus* HP1 5,5 saat boyunca 43 °C'de kültür ilave ederek kefir üretimi gerçekleştirmiştir. *Lb. helveticus* MP12 ilaveli kefir örneğinde yoğurttan farklı olarak kendine özgü bir amino asit profili oluşmuş, yoğurda kıyasla Lösin, İzolösin, Valin, Lisin, Fenilalanin ve Metiyonin kefir'de 1.5 kat daha yüksek tespit edilmiştir.

4.3. Kefir Örneklerindeki Toplam Serbest Amino Asit (FAA) Miktarları

Kefirlerdeki toplam serbest amino asit miktarları, amino asitlerin fonksiyonel amino gruplarının kromofor bir madde (CdNr) ile boyandıktan sonra belirlenmiştir (Wallece vd., 1998). Spektrofotometrik olarak 507 nm’de saptanmış ve absorbans değerleri standart eğriye göre mg Leu/L’e dönüştürülmüştür. Bulguların değerlendirilmesi yapılırken mg Leu/L cinsinden sonuçlar dikkate alınmıştır.

Kefir örneklerinde 28 gün süresince saptanan toplam FAA Şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5. Kefir örneklerine ait Toplam serbest amino asit değerleri.

K: kefir kültürü; A: *Lb. bulgaricus*; B: *Lb. helveticus*; C: *Lb. plantarum* ‘ yardımcı kültür içeren kefir örneklerini ifade etmektedir.

Kefir örneklerinde olgunlaşmanın 1. ve 7. depolama gününde en düşük miktarda toplam FAA kontrol kefir örneğinde sırası ile 368 ve 419 Leu/L, en yüksek ise B (*Lb. helveticus*) ilaveli kefir örneğinde sırası ile 466 ve 484 Leu/L olduğu saptanmıştır. Olgunlaşmanın ilerlemesi ile tüm örneklerde toplam FAA artış göstermiş, en hızlı artış ise olgunlaşmanın 14. gününde 575 mg/L ile C (*Lb. plantarum*) örneğinde meydana gelmiştir. Olgunlaşma süresinin sonunda örnekler arasında toplam FAA değerleri açısından farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek serbest amino asit konsantrasyonu sırası ile 781 Leu/L C (*Lb. plantarum*), 724 Leu/L B (*Lb. helveticus*), 716 Leu/L K (kontrol), 686 Leu/L A (*Lb. bulgaricus*) örneklerinde tespit edilmiştir.

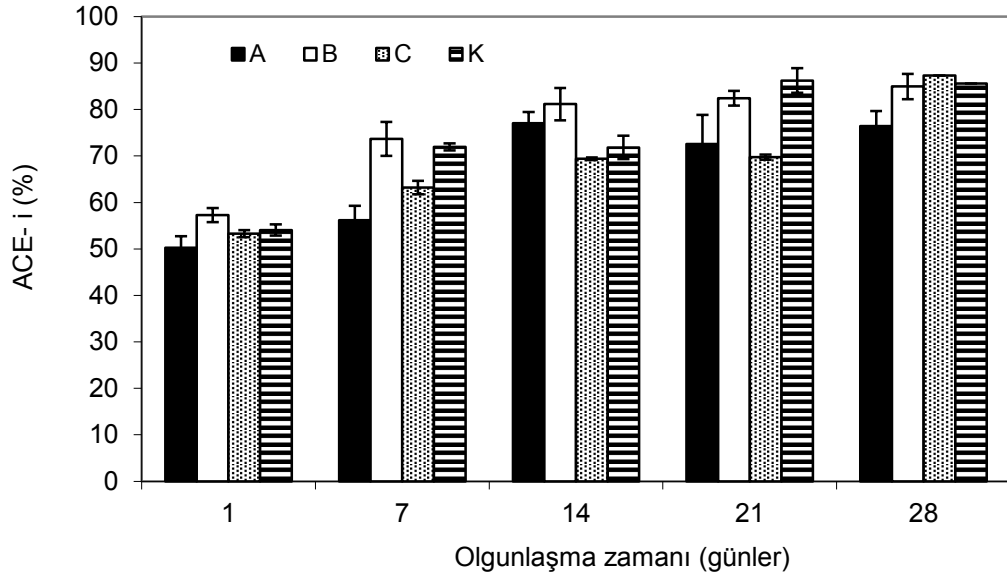
RP-HPLC sonuçlarına göre 1. gün toplam aminoasit miktarı en yüksek K örneğinde görülürken, 28. gün en yüksek C örneğinde görülmüştür. Toplam amino asit miktarında ise, 1. gün en yüksek B örneği olurken, 28. gün en yüksek C örneği olarak belirtilmiştir.

Kefirden izole edilen laktik asit bakterilerinin tekrar starter olarak kefire ilave edilmesi ile elde edilen kefirlerin amino asit profili araştırılan bir çalışmada, serbest aminoasit konsantrasyonu incelenmiştir. Bunun için tüm örnekler %1 kültür ile *Lc.lactis* C15 18 saat boyunca 30 °C'de, *Lb. helveticus* MP12 37 °C'de 16 saat, *S. thermophilus* T15 + *Lb. bulgaricus* HP1 (*S. thermophilus* T15 + *Lb. bulgaricus* karışımının kültürü HP1 = 1: 1) 5,5 saat boyunca 43 ° C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar çalışmamıza benzer şekilde en düşük serbest amino asit konsantrasyonu *Lb. bulgaricus* ilaveli örneklerde görülürken en yüksek konsantrasyon *Lb. helveticus* ilaveli örnekte görülmüştür (Simova, 2006).

Yapılan farklı bir çalışmada feta peynirini normal olarak, peyniraltısuyla ilave edilmiş olarak, kefir danesi ilave edilmiş olarak ve en son kefir danesi-peyniraltısuyla-feta peynir kombinasyonları oluşturulup 70 günlük depolama süresi boyunca aminoasit profilleri incelendiğinde; toplam FAA konsantrasyonları test edilen örneklerde, dondurularak kurutulmuş kefir danesi kültürü ilave edilmiş peynir türünün normal peynir türüne göre olgunlaşma sırasında büyük değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir. Kefir kültürünün proteolitik faaliyetinden dolayı kefir peynirinde toplam FAA içeriği sürekli olarak artmıştır; normal peynirde ise 30 günlük olgunlaşma boyunca artmış ve sonra azalmıştır. Öte yandan, kefir-peynir altı suyu peynirinde, sürekli toplam FAA azalmış ancak peynir altısuyla peynirinde arttığı bildirilmiştir (Dimitrellou vd., 2010).

4.4. Kefirde ACE- İnhibisyon Aktivitesinin Bulguları

Kefir örneklerinin ACE-inhibisyon (ACE-i) aktiviteleri olgunlaşmanın 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerinde belirlenmiş olup sonuçlar Şekil 4.6a'da gösterilmektedir. ACE-i aktivitesi örneklerin suda çözünür fraksiyonları ile ölçülmüştür. Sonuçlar % inhibisyon olarak ifade edilmiştir. Kefir üretiminde *Lactobacillus* cinsi yardımcı kültür kullanımı ile % ACE-i aktivitesinde depolama boyunca önemli oranda artış meydana geldiği, bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0,05$) ve % ACE-i aktivitesini en çok artıran türün *Lactobacillus helveticus* olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6a: Olgunlaşma süresince Kefir örneklerindeki ACE-i değerleri.

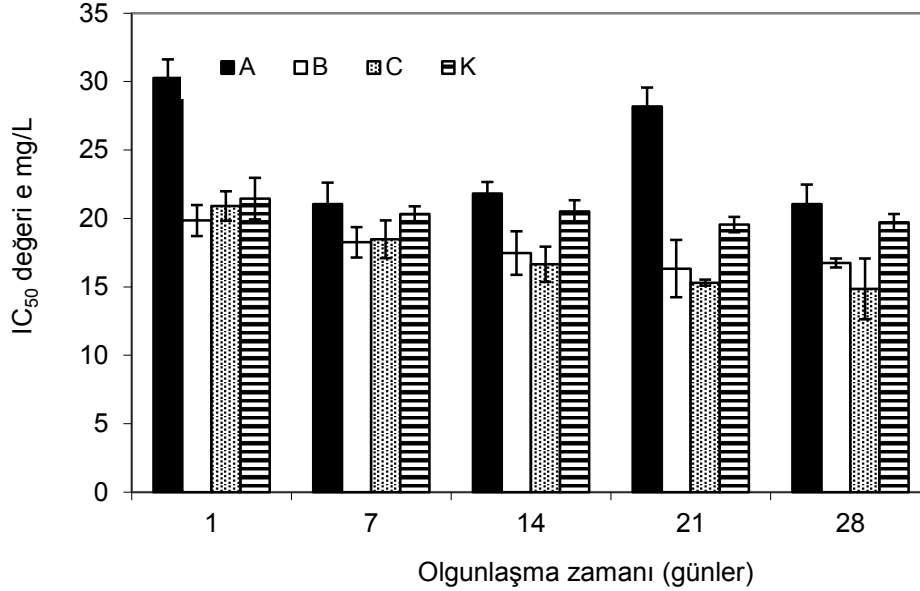
K: Kefir danesi; A: *Lb. bulgaricus*; B: *Lb. helveticus*; C: *Lb. plantarum* ' yardımcı kültür içeren kefir örneklerini ifade etmektedir.

En yüksek ACE aktivitesi ise, 28. günde C örneği olarak bulunmuştur. Diğer örneklerin 28. gündeki ACE inhibitör aktivitelerinin sırasıyla %76.47, %84.95, %87.33 ve %85.57 olduğu tespit edilmiştir.

Fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* (Hernández, 2011), *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. acidophilus*'un (Rasika, 2015; Nielsen, 2009) çeşitli suşlarının süt proteinlerinden ACE-inhibitör peptitlerin oluşumunu sağladığı bildirilmektedir. Bununla birlikte; diğer laktik asit bakterileriyle karşılaştırıldığında *Lb. helveticus* yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğundan daha yüksek ACE-inhibitör aktiviteli ürün elde etmek için tercih edilen mikroorganizma olmaktadır (Nielsen, 2009).

Olgunlaşma süresinin ilerlemesiyle birlikte kefirin ACE-i aktivitelerinde bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). Kefir üretiminde *Lactobacillus* bakterilerinin kullanımı ACE-i aktivitesinde önemli artış sağlayıp, ACE-i aktivitesinde ACE-i aktivitesini maksimize eden bakterinin *Lactobacillus plantarum* olduğu belirlenmiştir. *Lb. plantarum*, son depolama gününde en yüksek ACE inhibitör aktivitesini 87.33 ± 0.67 ($IC_{50} = 19.71 \pm 0.73$ mg / L) göstermiştir.

Kefir örneklerinin ACE-i peptitlerinin %50 ACE inhibisyonunu sağlamak için gereken peptit konsantrasyonunu ifade eden IC₅₀ değerleri, olgunlaşmanın 1, 7, 14, 21 ve 28. günlerinde belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.3b'de gösterilmiştir



Şekil 4.6b: Olgunlaşma süresince Kefir örneklerindeki IC₅₀ değerleri.

K: Kefir danesi; A: *Lb. bulgaricus*; B: *Lb. helveticus*; C: *Lb. plantarum* ' yardımcı kültür içeren kefir örneklerini ifade etmektedir.

Sonuçlar % inhibisyon ve IC₅₀ olarak ifade edilmiştir. IC₅₀ değerleri 1. günde 30.27 ± 1.13 ile 19.86 ± 0.73 mg / L arasındadır. B örneğinin, depolamanın ilk gününde en yüksek inhibisyon aktivitesi (57.28 ± 1.03) ve IC₅₀ değeri 19.86 ± 0.1 mg / L olarak tespit edilmiştir. 1. Gün ACE-i aktivite yüzdesi en düşük A örneği olurken, buna paralel olarak 1. gün IC₅₀ değeri en yüksek örnek A örneği olmuştur. 28. gün ACE inhibisyon aktivitesine sahip C örneği olurken, 28. gün IC₅₀ değeri en düşük C örneği olarak tespit edilmiştir. Ek olarak, bütün kefir örneklerindeki ACE-i aktivitesi depolama boyunca artmıştır ($P < 0.05$). Depolamanın 14. günde *Lb. bulgaricus* diğer örneklere göre en yüksek ACE-inhibisyon artışını gösterip depolama boyunca maksimum ulaşabileceği inhibisyon yüzdesine ulaşmıştır, buna rağmen *Lb. helveticus* 14. günün en yüksek inhibisyon yüzdesine sahiptir (Şekil 4.6a). Funglsang vd. (2003), *Lb. helveticus* türlerinin genel olarak ACE inhibitör peptit üretiminde, çalışmada kullanılan diğer *Lactobasil* türlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Peynir altı suyu bazlı kefir örneklerinin özellikleri ve ACE-i etkisinin değerlendirildiği araştırmada yağsız süt bazlı kefir, Gouda peyniri peynir altı suyu bazlı kefir ve ticari peynir altı suyu bazlı kefir üretilmiştir. IC₅₀ değerleri incelendiğinde Gouda peynir altı suyundan yapılan kefirin 0.83 ± 0.02 mg / mL, kontrol grubundan (1.05 ± 0.01 mg / mL) ve ticari peynir altı suyundan elde edilen kefir örneğinden (0.96 ± 0.01 mg / mL) anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. İnhibisyon etkinliği oranı ise Gouda peynir altı suyu tozundan elde edilen kefirde (mg / mL başına% 47.35 ± 0.09), kontrol grubundan anlamlı olarak farklı bulunmamış (mg / mL başına% 47.19 ± 0.09), fakat ticari peynir altı suyu tozundan üretilen kefirde ($P < 0.05$) anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. (Mg / mL başına% 45.75 ± 0.18) (Febrisiantosa, 2013).

Çalışmamıza benzer şekilde, süt kaynaklı peptitlerin kardiyovasküler hastalığıdaki potansiyel rolünün araştırıldığı bir çalışmada; *Lactobacillus helveticus*'un en yüksek ve bunun dışında *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* SS1, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* FT4, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* ve *Enterococcus faecalis* gibi laktik asit bakterilerinin de ACE inhibitörü peptitleri üretebildikleri bildirilmektedir (Phelan vd., 2011).

Aytekin vd. (2019) yaptıkları çalışmada kefirin in vitro bağırsak sindirimini sonucu oluşan biyoaktif peptitleri incelemiştir. Bu çalışma doğrultusunda kefir örneklerindeki ACE inhibisyon aktivitesinin sindirimden önceki değerleri %3.90-9.91 arasında tespit etmişlerdir. İn vitro sindirim sonrası ise bulunan değerler %21.16 ve 98.88 olarak saptanmıştır.

Birçok araştırma probiyotik bakteri veya fermente ürünlerin deneysel ve klinik çalışmalarla kan basıncının kontrolünde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. (Friques, 2015).

Yapılan bir çalışmada sığır, koyun, keçi, domuz, manda veya insan sütünden hazırlanan sodyum kazeinatlar, *Lactobacillus helveticus* PR4'ün kısmen saflaştırılmış proteinaz ile hidrolize edilmiş ve her hidrolizattaki peptitler, RP-HPLC ile incelenmiştir. En yüksek anjiyotensin I-dönüştürücü-enzim (ACE) inhibe edici ve

antibakteriyal aktivite gösteren fraksiyonlar, kütle spektrumu analizleri ile dizilmiştir. Belirlenen dizilerin birçoğu, literatürde bildirilen diğer ACE inhibe edici peptitlerle ortak özelliklere sahip olup, bazı ham peptit fraksiyonlarının %50 inhibe edici konsantrasyonu (IC₅₀) çok düşük bulunmuştur (16 ila 100 ug / ml). Tanımlanan bazı peptitler kimyasal olarak sentezlenmiş ve ACE önleyici aktivite ve IC₅₀ değerleri doğrulanmıştır (Minervini, 2003).

Chen vd. (2018) çalışmasında *Lactobacillus bulgaricus* LB6 tarafından fermente edilmiş keçi sütünün inkübasyon koşulları, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibe edici aktivitesini arttırmak için optimize edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığı, peyniraltı suyu tozu ve kalsiyum laktatın ACE inhibisyon oranı ve canlı kalan mikroorganizma sayısı üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Quirós vd. (2005) kaprin sütünden yapılan ticari bir kefirde güçlü bir anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibe edici aktivite tespit etmişlerdir. Fermantasyon sırasında kazeinlerden salınan düşük moleküler kütleyle sahip on altı peptit, HPLC-tandem kütle spektrometrisi ile tanımlanmış ve bu biyoaktif peptitlerin etkisiyle anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aktivitesini inhibe edebildiğini belirtmişlerdir.

Keçi sütü tozu ve peyniraltı suyu tozunun *Lb. plantarum* LP69 tarafından fermente edilmesiyle elde edilen fermente ürünün inkübasyon süresinin, sıcaklık ve pastörizasyon süresinin ACE aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada çalışmamıza benzer ACE aktivite etkisi tespit edilmiştir (Shu, 2015).

Chaves vd. (2014)'nin konu ile ilgili yaptığı çalışmada seçilmiş mikroorganizma türlerinin tek ya da birlikte kullanımı ile ACE inhibitör peptitlerce zenginleştirilmiş fermente süt üretimi potansiyeli belirlenmiştir. Seçilmiş mayalar *Torulasporea delbruekii* KL66A, *Galactomyces geotrichum* KL20B, *Pichia kudriavzevii* KL84A, *Kluyveromyces marxianus* KL26A ve laktik asit bakterisi suşları *Lactobacillus plantarum* LAT03, *Lb. plantarum* KLAT01 ve *Enterococcus faecalis* KE06 yalnız başlarına ürettikleri ACE inhibisyon peptit üretme aktiviteleri; maya, *Lb. plantarum* ve *E. Faecalis* üçlü kültür grubunun ACE inhibisyon peptit üretme kabiliyetleri karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre, *Pichia kudriavzevii* KL84A, *Lactobacillus plantarum* LAT03 ve *Enterococcus faecalis* KE06 üçlü kültürü ile

üretilen sütün $30.63 \pm 1.11 \mu\text{g/ml}$ IC_{50} değeri ile en yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir.

Kanbak vd. (2014) 'de yaptıkları çalışmada, anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörü olarak rol oynayan kefirin, böbrek fonksiyon hasarını azalttığını tespit etmişlerdir. Ancak, düşük dozda aspirin ile birlikte kefir, sıçan böbrek fonksiyonlarında hasara yol açmış olup, sonuç olarak, kefir ve düşük doz aspirin, bağımsız olarak kullanılan böbrek fonksiyonlarını ve böbrek hasarını koruduğunu bildirmişlerdir.

4.5. Kefirde Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek amacıyla gram pozitif ve gram negatif patojen mikroorganizmalar seçilerek liyofilize kefir ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için agar-sandviç model kullanılmıştır. Silva vd. (2009), kefirlerin antimikrobiyal aktivitelerinin genellikle uzun süreli fermantasyon süresi boyunca arttığını bildirmiştir. Peptit üretimi proteoliz ile ilişkili olduğundan kefir gibi fermente süt ürünlerinde depolama süresinin sonuna doğru proteoliz düzeyinin artması nedeniyle peptit kaynaklı antimikrobiyal aktiviteninde bu süre sonunda bakılması uygun görülmüştür. Kefir örneklerinin ve kefirde elde edilen protein ekstraktlarının (peptit fraksiyonları) bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi ve inhibisyon zon (mm) varlığı Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5' te verilmektedir. Buna göre kefir fermantasyonu sırasında meydana gelen antimikrobiyal peptitlerin etki spektrumlarının geniş olmadığı hatta K örneğinde dane ile üretilen kefir ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin saptanamadığı belirlenmiştir. *Lactobacillus* ilavesiyle üretilen kefir örneklerinin peptit fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri* 95052 ve *Staphylococcus hominis* üzerinde antimikrobiyal bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda kefir örnekleri ve ekstraktları *Candida albicans* ATCC 04055'i inhibe edici etki göstermemiştir.

Kefir örneklerinin suda çözünen azot fraksiyonlarının inhibisyon zon çapları Çizelge 4.4'de verilmiştir. A ve B kefirlerinin suda çözünen azot ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 6 ve 4 mm olarak tespit edilmiştir. B ve C örneklerinin ekstraktlarında *Staphylococcus warneri* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 8 ve 5 mm, yalnızca C örneği ekstraktının *Staphylococcus hominis* inhibisyon bölgesi çapı 10 mm olarak bulunmuştur.

Aytekin vd. (2019) yaptıkları çalışmada kefirin in vitro bağırsak sindirimini sonucu oluşan biyoaktif peptitleri incelemiştir. Bu çalışma doğrultusunda kefir örneklerindeki *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* ve *E. Coli*'ye karşı inhibisyon çapları ölçülmüştür. *S. aureus* ve *E. coli*'ye (21.1 – 24.1 mm) karşı dikkat çekici inhibisyon varlığı tespit edilmiştir.

Lima vd. (2018) koyun sütü ile fermente edilmiş brezilya kefirinin antimikrobiyal etkisinin araştırdığı çalışmada öncelikle pastörize süttten ekstrakte edilen peptitlerin, *Bacillus cereus* ATCC 33019, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633'e karşı antimikrobiyal aktivitesi gözlenmiş ve *B. cereus* için yüksek oranda (87.80 ± 0.03) inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir. Koyun sütüne kefir daneleri ilave edilerek üretilen kefir örneğinin, depolamanın 28. gününde incelenen kefir örneğinin *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 33019, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 karşı % 100 inhibisyon sunduğu bildirilmiştir.

Çizelge 4.4. Kefir ekstraktlarının (SÇA, 28.gün) antibakteriyel aktivitesi mm cinsinden inhibisyon bölgesi (IZ) cinsinden

Bacteria	A	B	C	K	Oksitetrasiklin
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-	++
<i>Staphylococcus warneri</i> 95052	-	+	+	-	+
<i>Staphylococcus xylosus</i>	-	-	-	-	+++
<i>Shigella flexneri</i> RSKK 184	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i> RS 863	-	-	-	-	+++
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	++
<i>C. albicans</i> ATCC 04055	-	-	-	-	TE
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	+++
<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	+++
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	+++
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	++	-	+++

K, kefir danesi içeren; A: kefir danesi+ *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi+ *Lb. helveticus*; C: kefir danesi+ *Lb. plantarum*. (+) inhibisyon pozitif; (+) inhibisyon çapı 4-10 mm; (++) inhibisyon çapı 11-19 mm; (+++) inhibisyon çapı 20 mm den büyük; (-)İnhibisyon negatif, TE: Tespit edilmedi.

Kefir örneklerinin inhibisyon varlığı Çizelge 4.5'te verilmiştir. A, B,C ve K örneklerinin *Staphylococcus aureus* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 12; 14; 13; 9 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 17,7 mm olarak tespit edilmiştir.

A, B ve C örneklerinin *Staphylococcus warneri* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 4; 11; 8 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 8 mm olarak tespit edilmiştir. A, B ve C örneklerinin *Staphylococcus xylosus* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 16; 20,1; 13 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 22 mm olarak tespit edilmiştir. A ve B örneklerinin *Bacillus cereus* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 10; 7 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 28,5 mm olarak tespit edilmiştir. A, B, C ve K örneklerinin *Escherichia coli* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 17; 12; 18,8; 10 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 17,8 mm olarak tespit edilmiştir. A, B, C ve K örneklerinin *Enterococcus faecalis* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 13; 12; 16; 19 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 16 mm olarak tespit edilmiştir. A ve B örneklerinin *Enterobacter* inhibisyon bölgesi çapı sırası ile 8; 8 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 21 mm olarak tespit edilmiştir. B örneğinin *Salmonella enteritidis* inhibisyon bölgesi çapı 6 mm; Oksitetrasiklinin inhibisyon çapı ise 22 mm olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Kefirin (28.gün) antibakteriyel aktivitesi, inhibisyon zonu (IZ) cinsinden mm cinsinden

Bacteria	A	B	C	K	Oksitetrasiklin
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++	+	++
<i>Staphylococcus warneri 95052</i>	+	++	+	-	+
<i>Staphylococcus xylosus</i>	++	+++	++	-	+++
<i>Shigella flexneri RSKK 184</i>	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus RS 863</i>	+	+	-	-	+++
<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	+	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	++	++	++
<i>C. albicans ATCC 04055</i>	-	-	-	-	TE
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	+++
<i>Enterobacter</i>	+	+	-	-	+++
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	+	-	-	+++
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	-	-	+++

K: kefir danesi içeren; A: kefir danesi+ *Lb. bulgaricus*; B: kefir danesi+ *Lb. helveticus*; C: kefir danesi+ *Lb. plantarum*. (+) inhibisyon pozitif; (++) inhibisyon çapı 4-10 mm; (+++) inhibisyon çapı 11-19 mm; (++++) inhibisyon çapı 20 mm den büyük; (-)İnhibisyon negatif, TE: Tespit edilmedi.

Ek olarak kefir A, B ve C, *Staphylococcus warneri* 95052 ve *Staphylococcus xylosum*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Kefir A ve B, *Bacillus cereus* RS 863, *Enterobacter* ve *Salmonella enteritidis* gelişmesini engelleyen daha geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Sonuçlar kefir örneklerinin farklı antimikrobiyal spektrumlara sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamıza benzer bir çalışmada kefirin *Bacillus subtilis*, *S. aureus* ve *E. feacalis* ve *S. enteritidis*'i inhibe ettiği ancak *Candida albicans*'ı inhibe etmediği bildirilmiştir (Chifiriuc vd., 2011).

Anselmo (2001), Arjantin'in Lugar nehrinden izole ederek elde ettikleri *Salmonella enteritis* suşunun kefir içeceğiindeki canlılığını araştırmışlardır. Bu amaçla *Salmonella enteritis* 4°C'de 24 saat ve 22°C'de 18 saat inkübasyondan sonra kefirde *Salmonella enteritis* suşuna rastlanmadığı bildirilmiştir.

Yine benzer şekilde kefirin çeşitli gıda patojenlerine ve gıdalarda erken bozulmalara yol açan bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite araştırmasında da ilk 24 saat içerisinde *B. cereus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* ve *C. sakazakii*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Buna karşılık, 36, 48 ve 72 saat içerisinde alınan kefir örnekleri, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* ve *C. sakazakii* büyümesini engelleyen daha geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Kim vd., 2016).

Hindistan'da yapılan lor fermente ürününde laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırıldığı çalışmada; *E. coli*, *S. Typhimurium*, *V. cholerae* ve *S. flexneri*'ye karşı antimikrobiyal aktivite BHI yumuşak agar plakalarında disk difüzyonla belirlenmiş ve inhibisyon bölgeleri ölçülmüştür. Bu ölçümlerde çalışmamıza benzer şekilde sonuçlar bildirilmiştir (Balamurugan vd., 2014).

Toz bebek mamalarına ilave edilen kefirlerin *Cronobacter sakazakii*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. 100 ml kefir süpernatantınının 1 ml mama sıvısına eklenmesi, spektrofotometre ile değerlendirildiğinde *C. sakazakii*'nin büyümesini tamamen inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca yardımcı kültür olarak *Lactobacillus kefiri* ve *Candida kefyri* ilave edilip, *Cronobacter sakazakii*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi de araştırılmıştır. *Lactobacillus kefiri*'nin tamamen inhibe ettiği *Candida kefyri* ilaveli mamalarda ise bunun kısmen olduğu belirtilmiştir (Kim vd., 2015).

Jeong vd. (2018), yaptığı çalışmada kefirde izole edilen *Lb. kefiranofaciens*'in potansiyel bir oral probiyotik olarak uygulanabilirliğini araştırmış ve diş çürüklerine neden olan patojenik oral bakterilere karşı inhibe edici etkileri ticari LAB suşlarınınkilerle karşılaştırmıştır. Aerobik ve anaerobik koşullar altında toparlanma oranlarına ve yapay oral ortamda hayatta kalma durumlarına dayanarak aday oral probiyotikler taranmış ve antimikrobiyal ve anti-biyofilm oluşturma aktivitelerini iki ana karyojenik (diş çürüklerine sebep olan) patojene (*S. mutans* ve *S. sobrinus*) karşı bulmuşlardır.

Enfeksiyon hastalıkları ve ameliyat sonrası enfeksiyonlar için kullanılan antibiyotik miktarını azaltmaya yönelik yapılan araştırmada kefirin *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus salivarius* ATCC 39562, *Streptococcus pyogenes* ATCC 17568, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10232, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 4957 ve *E. coli* ATCC 8739'a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde *C. Albicans* hariç 7 bakteri üzerinde inhibe edici etki gözlemlenmiştir (Rodrigues vd., 2005).

Bütün bu çalışmalar, kefir antimikrobiyal aktivitesinin organik asitlerin, peptitlerin (bakteriyosinler), karbon dioksit, hidrojen peroksit, etanol ve diasetil üretimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu bileşikler, yalnızca yiyecek kaynaklı patojenlerin azaltılmasında ve içecek üretimi ve depolanması sırasında bozulan bakterilerin azaltılmasında değil, aynı zamanda gastroenterit ve vajinal enfeksiyonların tedavisinde ve önlenmesinde de faydalı etkilere sahip olabileceğini bildirmişlerdir (Farnworth, 2005; Sarkar, 2007).

Ulusoy vd. (2007), kefir örneklerinin gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı in vitro çalışmada disk difüzyon metodunu kullanmışlardır. Bu amaçla 24 ve 48 saat fermentasyona bırakılan kefir örneklerinin *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) ve *Escherichia coli*'ye (ATCC 8739) karşı gösterdikleri antimikrobiyal spektrum incelenmiştir. 24 ve 48 saatlik kefir örneklerinin gösterdiği en kuvvetli antimikrobiyal etkinin 21.4 ve 21.1 mm'lik zon alanı yarıçaplarıyla *Staphylococcus aureus*'a karşı olduğu gözlemlenmiş olup + 4 °C'de muhafaza süresi boyunca 1, 4, ve 7. günlerde de

benzer sonuçlar elde edilmiştir. Depolama boyunca, antimikrobiyal etki değişmezken ya da azalırken sadece *Salmonella enteritidis*'te artış tespit edilmiştir.

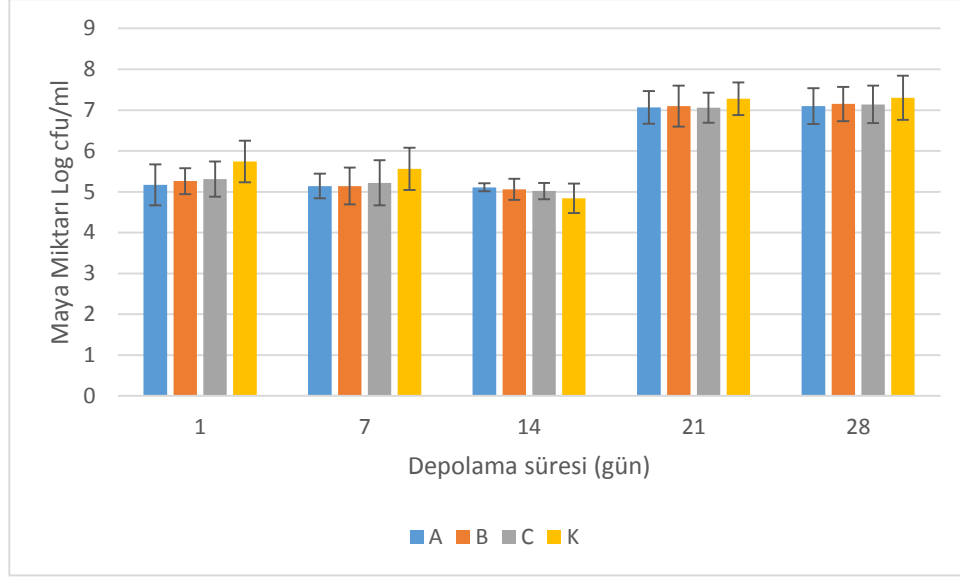
Wank vd. (2016)'nin yaptıkları çalışmada kefir daneleri ve kefir danesinde izole edilen starter kültürleri maya (*Kluyveromyces marxianus strain*, *Pichia kudriavzevii clone*), laktik asit bakterisi (*Lactobacillus kefir* F4Aa, *Lactobacillus kefir* NM131-7, *Lactobacillus kefir* NM132-3, *Lactobacillus kefir* NM180-3), kapsülasyon işleminden sonra tekrar bu kapsül ile sütü fermente edip oluşan kefirdeki antimikrobiyal etkilerin araştırılmasında, *Staphylococcus* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite kefir daneleri ile üretilen kefir örneğinin daha yüksek sonuç verdiği belirlenmiştir. İnhibisyon alanları kapsüller ile yapılan kefirde 0.5 cm daha fazla bulunmuştur. Bazı farklılıklar olmasına rağmen, antimikrobiyal aktiviteleri çok yakın ve bu göstermektedir ki gibi antimikrobiyal özellikler açısından benzer kültürlerle kefir üretmek uygun olabileceği düşünülmektedir.

4.6. Mikrobiyolojik Analizler

Üretilen kefir örneklerinde depolama boyunca koliform bakteri, laktokok, laktobasil ve maya sayımları yapılmıştır. Kefir üretiminde, kefir danelerinde veya üretim esnasında oluşabilecek kontaminasyon ihtimalini belirlemek için VRB Agarda yapılan mikrobiyolojik ekimlerinde herhangi bir koliform grubu bakteri kolonisine rastlanılmamıştır.

4.6.1. Maya Sayısı

Kültür ilaveli kefirlerin maya sayısına ait ortalama değerler ve depolama boyunca değişimi Şekil 4.7'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 28 günlük depolama boyunca beş farklı zamanda yapılan maya sayımlarında yardımcı kültür ilaveli kefir örneklerinin maya sayısına ait değerlerin 1. günün sonunda 5.74-5.17 log-cfu/ml, 28. gün sonunda 7.10-7.30 log-cfu/mL arasında değiştiği saptanmıştır.



Şekil 4.7. İnek sütü ile üretilen kefir örneklerindeki Maya değişimi

K: Kefir danesi , A: Kefir danesi+ *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842,B: Kefir danesi + *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009,C: Kefir danesi+ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

Öner vd. (2010), yaptıkları çalışmada farklı süt çeşitleri ve kültür çeşitlerinin, kefirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Gerçekleştirilen çalışmada maya sayısına ait değerlerin inek sütünde yardımcı kültür kullanılarak üretilen kefirlerde depolama süresince 6.37-6.65 log-kob/g, dane kullanılarak üretilen kefirlerde ise, 4.69-5.34 log-kob/g arasında değer aldığı tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada ise, yardımcı kültür ilave edilerek üretilen kefir örneklerinde maya sayısına ait değerlerin depolama boyunca 5.17-7.30 kob/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde kefirin maya sayısının en az 10^4 kob/mL seviyesinde değer aldığı bildirilmektedir (Anonim 2009). Araştırmamızda 28 günlük depolama süresince kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerindeki maya sayım sonuçlarının Tebliğ'de belirtilen değerler ile uyumlu olduğu tespit edilmiş ve çalışmamızda üretilen kefir örneklerinde belirlenen maya sayılarının, Ender, (2009); Irigoyen vd. (2005); Yıldız, (2009); Ertekin vd. (2010); Grønnevik vd. (2011) ve Kök-Taş vd. (2013) tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen değerlerden yüksek, Montanuci vd. (2012) elde ettiği değerlerle benzer olduğu tespit edilmiştir.

Ender (2009), kefir üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin örneklerde belirlenen laktokok bakterisi, asetik asit bakterisi ve maya sayıları üzerine etkisinin

önemli olduğunu, laktobasil ve lökonostok sayıları üzerine ise herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemiştir. Wszolek vd. (2001), kefir üretiminde kullanılan başlangıç kültür çeşidinin mikrobiyolojik sayımlar üzerinde önemli etkiye olduğu tespit edilmiş ve bu durumu her bir kültürün farklı bakteri tür ve alt tür kompozisyonlarına sahip olmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Bununla birlikte Kesenkaş vd. (2011), Montanuci vd. (2012) ve KökTaş vd. (2013) kefir üretiminde kullanılan starter kültür çeşidinin kefirin bakteri ve maya sayıları üzerine önemli bir etkisinin olmadığını belirlemiştir. Çalışmamızda ise, üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde belirlenen laktobasil, laktokok ve maya sayıları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

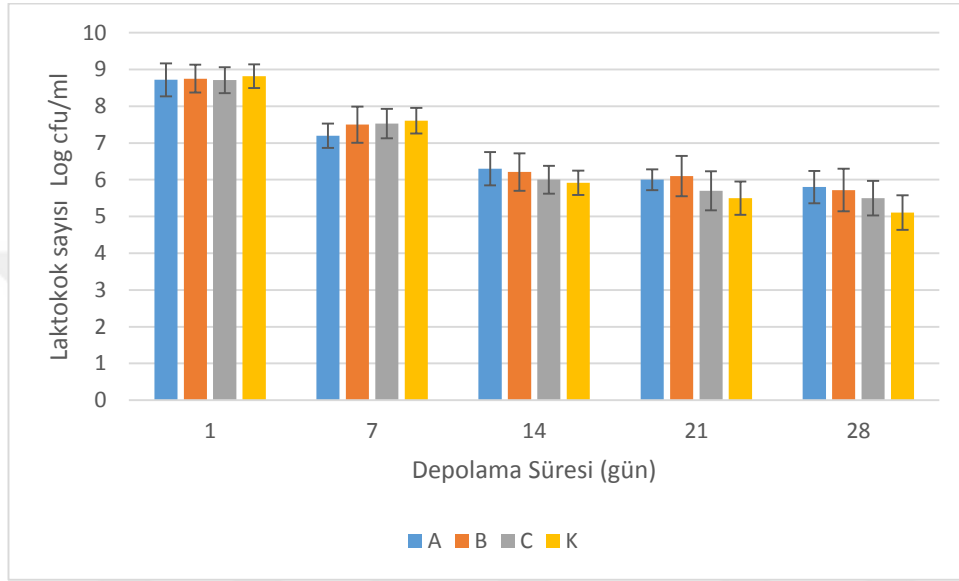
Anton vd. (2016) Estonya, Letonya ve Litvanya'da üretilen kefirlerin mikrobiyolojik özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada kefir örneklerinin maya miktarını 3.5×10^4 - 4.6×10^6 cfu/g arasında bulmuşlardır. En yüksek maya miktarı Estonya kefirinde gözlemlenmiştir.

Wszolek vd. (2001), yaptıkları çalışmada inek, koyun ve keçi sütleri dane ve iki farklı starter kültür kullanarak kefir üretmişlerdir. Bu dane ve starter kültürler ile üretilen kefir örneklerinde tespit edilen maya miktarları sırası ile 3.64; 3.68; 3.61; 3.68 \log_{10} cfu/g olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda depolama boyunca kefir örneklerinde belirlenen maya sayılarının arttığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı çalışmamız, kefir örneklerinin maya içeriklerinin depolama süresince arttığını belirleyen araştırmacılar tarafından (Guzel-Seydim vd. (2005); Ender, (2009); Grønnevik vd. (2011); Magra vd. (2012) desteklenmektedir. Laktik asit bakterilerinin optimum gelişme pH'sının 5.0 ile 9.0 arasında değiştiği ve 4.5'in altındaki pH değerlerinde laktik asit bakteri gelişimi olumsuz etkilendiği belirtilmiştir (Montanuci vd. 2012). Bununla birlikte Guzel-Seydim vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada depolamanın 14. gününde kefirde pH'nın düşmesi ile birlikte laktik asit bakteri ve laktokok sayılarının azaldığı, depolamanın 14. gününden itibaren ise pH'nın artmaya başladığını tespit edilmiştir. Araştırmacılar depolamanın 14. gününden sonraki pH artışının hücre proteolizi ile ilgili olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda depolamanın ilk 14 gününde kefir örneklerindeki pH düşüşü ile birlikte bakteri sayısının azalması muhtemel görülmüştür.

4.6.2. Laktokok Sayısı

Kültür ilaveli kefirlerin laktokok sayısına ait ortalama değerler ve depolama boyunca değişimi Şekil 4.8’de verilmiştir. Şekilde grldği gibi 28 günlük depolama boyunca beş farklı zamanda yapılan laktokok sayımlarında yardımcı kültür ilaveli kefir örneklerinin laktokok sayısına ait değerlerin 1. günün sonunda 8.82-8.71 log-cfu/mL, 28. gün sonunda 8.18-7.99 log-cfu/mL arasında değiştiği saptanmıştır.



Şekil 4.8. Inek sütü ile üretilen kefir örneklerindeki Laktokok değişimi

K: Kefir danesi, A: Kefir danesi+*Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC 11842,B: Kefir danesi + *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009,C: Kefir danesi+ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

ner vd. (2010), yaptıkları çalışmada farklı süt eşitleri ve kültür çeşitlerinin, kefirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Gerçekleştirilen çalışmada laktokok sayısına ait değerlerin inek sütünde DV1 kültür kullanılarak üretilen kefirlerde depolama süresince 7.267-8.059 log-kob/g, dane kullanılarak üretilen kefirlerde ise, 7.255-8.230 log-kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Kök-Taş vd. (2013), tarafından farklı fermantasyon değişkenlerinin kefir kalitesi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada, normal atmosfer koşullarında ve modifiye atmosfer koşullarında daneden üretilen kefirlerin 21 günlük depolama boyunca laktokok sayısına ait değerler araştırılmıştır. Normal atmosfer koşullarında daneden üretilen kefirlerin laktokok sayısına ait değerler 21 günlük depolama boyunca 9.23-8.04 log-kob/g olarak değişim göstermiştir. Yapılan bu tez

çalışmasında 21 günlük depolama boyunca laktokok sayısında azalma gözlemlenmiştir.

Wszolek vd. (2001), yaptıkları çalışmada inek, koyun ve keçi sütleri dane ve iki farklı starter kültür kullanarak kefir üretmişlerdir. Bu kefir örneklerinde tespit edilen dane ve starter kültürler için laktokok sayısı sırası ile 9.13; 8.51; 8.68 \log_{10} cfu/g olarak bildirilmiştir.

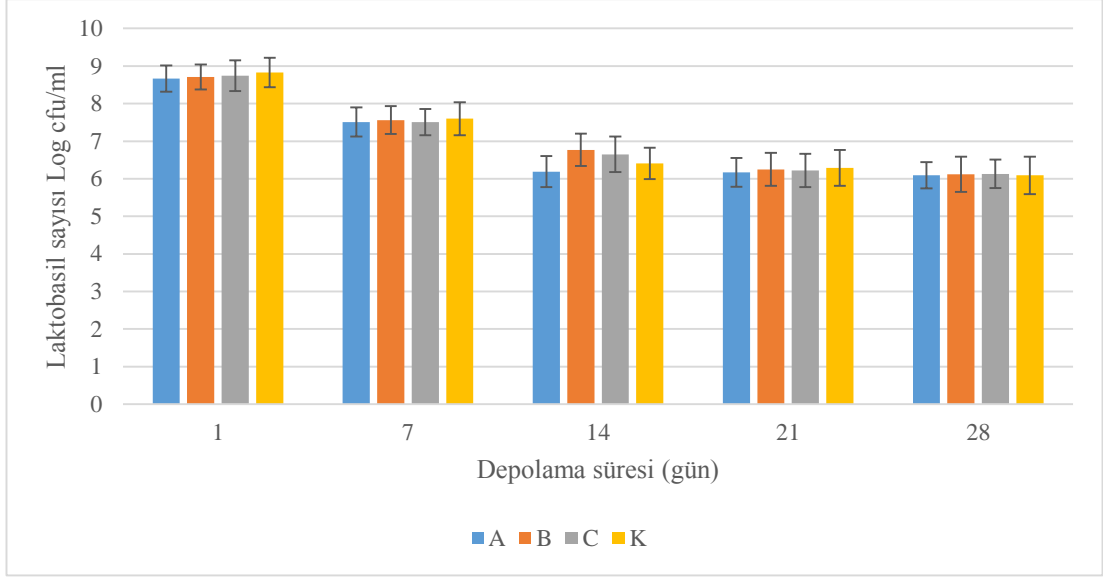
Beshkova vd. (2002), yaptıkları çalışmada fermentasyon ve olgunlaşma süresince, saf kültürle üretilen kefirlerde laktokok sayıları 10^8 kob/mL olarak tespit etmişlerdir.

Irigoyen vd. (2005), kefir danelerini %1 ve %5 oranında süte ilave etmişler ve üretimin 2. günde laktokoklar 10^8 kob/ mL'e ulaştığı bildirilmiştir.

Garrote vd. (1998), süte %1, %10, %20, %50, %100 oranında dane ilave edilerek gerçekleştirdikleri kefir üretiminde laktokok sayılarını ilave edilen % dane ilave oranına göre sırasıyla 22.9×10^8 kob/mL, 19.6×10^8 kob/mL, 15.8×10^8 kob/mL, 4.0×10^8 kob/mL, 0.2×10^8 kob/mL olarak bulmuşlardır.

4.6.3. Laktobasil Sayısı

Kültür ilaveli kefir örneklerinin laktobasil sayısına ait ortalama değerler ve bunların depolama süresi boyunca değişimi Şekil 4.9'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 28 günlük depolama boyunca beş farklı zamanda yapılan laktobasil sayımlarında yardımcı kültür ilaveli kefir örneklerinin laktobasil sayısına ait değerlerin 1. günün sonunda 8.83-8.67 log-cfu/mL, 28. gün sonunda 8.29-7.99 log-cfu/mL arasında değiştiği saptanmıştır



Şekil 4.9. İnek sütü ile üretilen kefir örneklerindeki Laktobasil değişimi.

K: Kefir danesi, A: Kefir danesi+ *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842, B: Kefir danesi + *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, C: Kefir danesi+ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

Öner vd. (2010), yaptıkları çalışmada farklı süt çeşitleri ve kültür çeşitlerinin, kefirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Gerçekleştirilen çalışmada laktobasil sayısına ait değerlerin inek sütünde DV1 kültür kullanılarak üretilen kefirlerde depolama süresince 7.406-7.622 log-kob/g, dane kullanılarak üretilen kefirlerde ise, 8.146-8.568 log-kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Kök-Taş vd. (2013), kefirin kalite karakteristikleri üzerine fermantasyon parametrelerinin etkisini inceledikleri çalışmaları sonucunda, 21 günlük depolama süresince kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerindeki laktobasil, laktokok ve maya sayılarının sırasıyla 8.0-9.2 log kob/mL, 8.0-9.2 log kob/mL ve 5.1-5.3 log kob/mL; ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerindeki laktobasil, laktokok ve maya sayılarının ise sırasıyla 8.9-9.3 log kob/mL, 8.9-9.3 log kob/mL, 4.8- 5.0 log kob/mL arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

Wszolek vd. (2001), yaptıkları çalışmada inek, koyun ve keçi sütleri dane ve iki farklı starter kültür kullanarak kefir üretmişlerdir. Bu kefir örneklerinde tespit edilen dane ve starter kültürler için laktokok sayısı sırası ile 8.85; 7.06; 8.56 log₁₀ cfu/g olarak bildirilmiştir.

Garrote vd. (1998), süte %1, %10, %20, %50, %100 oranlarında dane ilave ederek gerçekleştirdikleri kefir üretiminde laktobasil sayılarını katılan % tane oranına göre sırasıyla 3.0×10^8 kob/mL, 3.2×10^8 kob/mL, 3.5×10^8 kob/mL, 6.3×10^8 kob/mL, 3.6×10^8 kob/mL olarak tespit etmişlerdir.

Kefirin depolama süresince mikrobiyal, fizikokimyasal ve duyuşsal özelliklerini araştırmak için yapılan çalışmada süte dane ilavesinden sonraki 24 saatlik fermantasyonun ardından Laktobasil ve Laktokok seviyesinin 10^8 kob/g olduğu, mayalar ile asetik asit bakterilerinin 10^5 - 10^6 kob/g olduğu görülmüştür. Laktik asit bakterileri 7-14 günleri arasında 1.5 log civarında azalmış ve ilerleyen depolama günlerinde ise sabit kalmıştır. Maya ve asetik asit bakteri miktarı, laktoz ve pH, 28 günlük muhafaza süresince değişmemiştir (Irigoyen vd., 2005). Yapılan bu tez çalışmasında yardımcı kültür ilave edilerek üretilen kefir örneklerinde depolama boyunca laktobasil sayısının azaldığı tespit edilmiştir.

Yağ ikame maddelerinin kefirin kalite özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise; kefir örneklerinde belirlenen laktobasil ve maya sayılarının depolamanın başlangıcında sırasıyla 9.1-9.4 log kob/mL ve 5.3-5.6 log kob/mL arasında değiştii, 7 günlük depolamanın sonunda aynı örneklerdeki laktobasil ve maya sayılarının sırasıyla 9.7-9.9 log kob/mL ve 5.2-5.5 log kob/mL arasında değiştii gözlemlenmiştir (Ertekin vd., 2010).

Norveç kefirinin 8 haftalık depolama süresince mikrobiyolojik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, depolamanın başlangıcında 8.0 log kob/mL olan laktobasil ve laktokok sayılarının depolamanın ilk 4 haftalık periyodunda sırasıyla 2 ve 3 logaritmik birim azaldığı ve devam eden depolama süresince sabit kaldığı ve kefir örneklerinde depolamanın başlangıcında 3.3 log kob/mL olan maya sayısının depolama süresince arttığı ve depolama sonunda 5 log kob/mL olduğu tespit edilmiştir (Grønnevik vd., 2011).

Anton vd. (2016) Estonya, Letonya ve Litvanya'da üretilen kefirlerin mikrobiyolojik özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada kefir örneklerinin toplam laktik asit bakterilerinin sayısı 4×10^6 - 9.9×10^8 cfu/g olarak saptamışlardır.

Keçi sütünden yapılan ve %2, %4 ve %6 oranında kefir daneleri ile fermente edilen kefirlerde yapılan mikrobiyolojik analizlerde Toplam laktik asit bakteri miktarı

kefir danesinin %2,%4 ve%6 seviyelerinde sırası ile 1.64×10^7 , 1.71×10^7 ve 1.76×10^7 cfu / mL'dir (Sulmiyati, 2019).

Çalışmamızda üretilen kefir örneklerine ait laktobasil ve laktokok sayılarının Montanuci vd. (2012) ve Kök-Taş vd. (2013) bulduğu değerlerle benzer olduğu tespit edilmiştir. Kefir örneklerinde belirlenen bakteri sayılarındaki farklılıkların yardımcı kültürlerin içerdiği mikroorganizma farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.7. Duyusal Değerlendirme

Yardımcı kültür ilaveli kefir örneklerinde görünüm, koku, tekstür, yapı, tat, aroma, genel değerlendirme ve hedonik test puanlarına ait ortalama değerler Çizelge 4.6'da verilmiştir. Duyusal analiz puanlarına ait değerlendirmeler 10 toplam puan üzerinden yapılmıştır.

Örneklere ve depolama günlerine göre yapılan istatistik değerlendirme sonucunda; Irigoyen vd. (2005)'in bulduğu sonuçlar ile benzerlik göstermekte 21. ve 28. depolama günlerinde tat, tekstür, koku ve aromada azalmalar tespit edilirken görünümdeki değişim diğerlerine göre daha az etkilenmiştir. Örnekler arasındaki değişim ise, mikroorganizma cinsine, bu mikroorganizmaların gerçekleştirdiği proteoliz etkisine bağlı olarak, tat ve aromada diğer duyuşsal özelliklerine kıyasla farklılıklar gözlemlenmiştir.

Duyusal değerlendirmede görünüm özelliğinde 1. depolama gününde normal görünüm puanlarında en beğenilen C, en düşük puanı alan B örneği olmuş ve tüm örneklerde depolama boyunca beğeni azalmıştır. 28. depolama gününde ise, normal görünüm puanlarında en fazla C ve K örneği, en düşük puanı ise B örneği almıştır.

Normal kefir kokusunun değerlendirildiği 1. gün puanlamalarında K örneği en yüksek puana sahipken, A örneği en düşük puana sahiptir. 28. gün değerlendirmesinde ise; yine K örneği diğer örneklerle göre en yüksek normal kefir kokusuna sahip örnek olmuştur ve en düşük puanı A örneği almıştır.

Kefir örneklerinin tat özelliklerinin karşılaştırılması için yapılan 1. gün değerlendirmelerinde A (*Lb. bulgaricus*) ve K (Kontrol) örnekleri en beğenilen örnekler olurken, B örneği daha az beğenilmiştir. Örneklerin tat puanları depolama süresince azalmış olup, söz konusu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Bu durumun depolama süresi uzadıkça ortamda bulunan maya

sayısının artması ve bundan dolayı kefir örneklerinde oluşan keskin maya tadının hissedilmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 28. gün değerlendirmelerinde ise, C örneği tadı en beğenilen tat seçilirken, B örneği daha az beğenilen örnek olmuştur.

Kefir örneklerine verilen tekstür puanları incelendiğinde ise 1. depolama gününde en yüksek puanları K ve C (*Lb. plantarum*) örnekleri en düşük puanı ise B örneği almıştır. Değerlendirme puanlarının depolama boyunca azaldığı ve meydana gelen bu azalma istatistiksel açıdan önemli olduğu değerlendirilmiştir. 28. depolama gününde ise en düşük puanı A kefir örneği alırken diğer örnekler aynı puanı almıştır. En fazla kıvam yoğunluğu azalmasının A (*Lb. bulgaricus*) örneğinde olduğu tespit edilmiştir.

Vizkozite değerlendirilmesinin yapıldığı 1. günde en fazla puan alan A örneği en düşük puanı alan B örneği olurken, 28. gün değerlendirmesinde en yüksek puan alan C örneği en düşük puanı alan A ve B örnekleri olmuştur.

Kefir örneklerinin aroma değerlendirmesinde normal kefir aroması puanlamasında en yüksek puan alan örnek K örneği olurken, 28. gün değerlendirmesinde en yüksek puanı C örneği en düşük puanı ise A örneği almıştır.

Kefir örneklerimize panelist grup tarafından verilmiş olan toplam duyusal puanların istatistiki olarak değerlendirilmesi sonucunda ise örneklere panelistler tarafından verilen toplam duyusal puanlar depolama süresince azalmış olup, söz konusu azalmaların istatistiksel değerlendirmede önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. Genel değerlendirmede en yüksek duyusal puanlar, depolamanın 1. gününde yapılan duyusal analizlerde; en düşük puanlar ise depolamanın 28. gününde belirlenmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında K ve C (*Lb. plantarum*) örnekleri genel değerlendirmede depolama günlerine bağlı olarak genel beğeni almış ve lezzetli bulunmuştur.

Kaynatılmış, pastörize ve sterilize inek sütlerine ayrı ayrı kefir danesi ve kefir kültürü ilave edilerek üretilen kefirlerin depolamanın 1, 6 ve 9. günlerinde duyusal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada; kefir kültürü ile üretilenler hafif bir tada sahip bulunmuşken, kaynatılmış süt ve dane ile üretilenlerde viskozite daha yüksek bulunmuştur. En yüksek puanlar depolamanın ilk gününde almıştır. Kefirlerin kabuledilebilirlik duyusal özellikleri için 10 günlük depolama ideal kabul edilmiştir (Oktar, 1992).

Süttozu, peyniraltı suyu tozu ve yayıkaltı karışımları ile üretilen kefirlerin fiziksel ve duyuşal özellikleri üzerine yapılan bir araştırmada dane kullanılmasıyla yapılmış olan kefirlerin depolama süresince görünümlerine ilişkin puanların ortalama değerleri incelendiğinde en yüksek puan kontrol örneğinde, en düşük puanlar ise süttozu-peynir suyu tozu-yayıkaltı karışımlarından hazırlanmış olan kefirde görölmüştür. Buna karşılık kültür kullanılmasıyla üretilmiş olan örneklerin depolanma süresince ortalama görünüm değerleri incelendiğinde en yüksek puanları süttozu kefiri, en düşük puanları ise peyniraltı suyu tozu kefirinin aldığı tespit edilmiştir. Kültür ile elde edilen örnekler, tane ile üretilenlere nazaran daha yüksek puanlar almışlar ve tercih edilmişlerdir (Ersoy vd., 2003).

Tonguç (2006), araştırdığı insan kaynaklı probiyotik bakteri ilaveli ayranlarda yapılan duyuşal değerlendirmelerde ise panelistler, probiyotik ayran örneklerinin normal ayrana kıyasla tat, aroma ve kıvamının daha iyi olduklarını ve depolama süresi boyunca bu özelliklerini koruyabildiklerini belirtmişlerdir.

Sulmiyati vd. (2019), yaptıkları ęalıřmada keçi sütünden yapılan ve %2, %4 ve %6 oranında kefir daneleri ile fermente edilen kefirlerde yapılan duyuşal analizlerde panelistler, %4 oranında dane ilave edilmiş kefirlerin tadları kabul edilebilir seviye olarak değerlendirilmiş fakat en uygun tadın %2 dane ilaveli kefir olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 4.6: Depolama boyunca belirlenen duyuusal özellikler

Ürün Çeşidi	Depolama süresi (gün)	Görünüm		Koku		Tekstür	Konsistens		Tat				Aroma				GEN.DE	HED.T
		Renk	Köpük	Norm. Gör.	N.K.K		Yab.K	Homoj.Y	Ağ.K	Visk.	N.K.T	Eks.	Tatl.	Yab.T	N.K.A	Y.ab.A		
A	1	8.6±0.04 ^{bE}	5.7±0.02 ^{aB}	7.9±0.03 ^{AB}	8.2±0.04 ^{AE}	0.5±0.02 ^{EA}	8.2±0.04 ^{AD}	6.9±0.04 ^{AD}	8.1±0.04 ^{DE}	9.2±0.05 ^{DE}	6.1±0.04 ^{BC}	0.9±0.01 ^{EA}	7.1±0.03 ^{DE}	1.1±0.03 ^{EA}	6.1±0.02 ^{EC}	7.2±0.05 ^{AC}	4.8±0.02 ^{AD}	
	7	8.3±0.05 ^{bC}	5.9±0.03 ^A	7.6±0.04 ^{BC}	7.5±0.05 ^{BC}	1.0±0.04 ^{AB}	8.1±0.05 ^{AB}	7.0±0.05 ^{AA}	6.5±0.05 ^{AD}	7.2±0.03 ^{AC}	6.4±0.04 ^{BE}	1.0±0.04 ^{BC}	6.6±0.04 ^{AD}	1.9±0.02 ^{EB}	7.8±0.02 ^{BE}	7.5±0.05 ^{BD}	5.3±0.05 ^{AE}	
	14	8.3±0.01 ^{AD}	6.2±0.04 ^D	7.4±0.04 ^{DE}	7.9±0.05 ^{CD}	1.1±0.03 ^{AB}	8.0±0.04 ^{BD}	7.1±0.04 ^{AE}	5.5±0.03 ^{AB}	7.8±0.04 ^{AD}	6.9±0.05 ^{BE}	1.9±0.02 ^{DB}	6.1±0.05 ^{AC}	2.0±0.02 ^{EC}	7.4±0.04 ^{CD}	7.2±0.04 ^{BC}	4.5±0.05 ^{AC}	
	21	7.3±0.04 ^{AA}	6.8±0.02 ^C	7.1±0.03 ^{CD}	7.1±0.04 ^{BB}	2.4±0.03 ^{BD}	7.6±0.01 ^{EC}	5.9±0.03 ^{BC}	4.5±0.02 ^{AA}	6.9±0.04 ^{AD}	6.2±0.02 ^{DB}	2.2±0.02 ^{BD}	5.5±0.02 ^{AB}	2.9±0.02 ^{ED}	6.8±0.02 ^{AB}	6.7±0.04 ^{BA}	4±0.03 ^{BB}	
	28	7.9±0.01 ^{ABB}	7.1±0.03 ^{AD}	6.8±0.05 ^{AA}	6.6±0.05 ^{BA}	2.8±0.04 ^{BE}	6.2±0.02 ^{AA}	5.7±0.04 ^{ABB}	4.1±0.01 ^{AC}	6.2±0.01 ^{AA}	6.0±0.04 ^{BA}	2.7±0.03 ^{BE}	4.3±0.01 ^{BA}	3.1±0.01 ^{EE}	6.2±0.04 ^{EA}	6.3±0.03 ^{ABB}	3.8±0.02 ^{BA}	
	1	8.1±0.03 ^{AD}	5.35±0.0 ^{4AD}	7.4±0.02 ^{AC}	8.6±0.04 ^{EE}	0.5±0.02 ^{EA}	8.1±0.04 ^{EC}	5.9±0.04 ^{BB}	7.2±0.04 ^{BE}	8.1±0.05 ^{AE}	6.2±0.05 ^{ED}	0.6±0.02 ^{BA}	7.9±0.05 ^{BE}	0.7±0.02 ^{AA}	5.4±0.05 ^{AA}	7.4±0.04 ^{ED}	4.8±0.02 ^{AB}	
	7	7.9±0.05 ^{AC}	5.6±0.04 ^A	6.9±0.04 ^{BA}	7.9±0.04 ^{CC}	1.0±0.03 ^{AB}	7.9±0.05 ^{AB}	6.6±0.05 ^{BC}	6.6±0.05 ^{BC}	7.2±0.04 ^{AD}	6.7±0.02 ^{EE}	1.0±0.04 ^{BC}	7.7±0.04 ^C	1.6±0.03 ^{AB}	6.4±0.04 ^{AC}	7.2±0.05 ^{BE}	5.1±0.05 ^{AC}	
	14	8.0±0.02 ^{AE}	6.5±0.04 ^B	7.2±0.03 ^{BD}	7.6±0.01 ^{CD}	1.5±0.04 ^{BC}	7.6±0.02 ^{BC}	7.0±0.02 ^{BC}	5.1±0.03 ^{AA}	6.9±0.04 ^{AD}	6.9±0.02 ^{AA}	1.8±0.03 ^{CB}	7.3±0.04 ^{BD}	2.0±0.05 ^{EC}	7.2±0.05 ^{AD}	7.1±0.04 ^{AC}	4.8±0.05 ^{BB}	
21	7.8±0.04 ^B	6.8±0.05 ^E	7.0±0.04 ^{BB}	7.1±0.01 ^{DA}	1.6±0.02 ^{AD}	7.1±0.03 ^{AA}	6.8±0.02 ^{AA}	4.6±0.04 ^{BB}	5.7±0.03 ^{AA}	6.3±0.05 ^{BC}	2.0±0.02 ^{CD}	7.0±0.03 ^{BB}	2.9±0.04 ^{BD}	6.3±0.03 ^{BB}	6.1±0.05 ^{AB}	4.3±0.03 ^{AA}		
28	7.1±0.03 ^C	7.0±0.04 ^B	6.5±0.01 ^{AC}	7.0±0.02 ^{ABB}	1.9±0.03 ^{DE}	7.0±0.04 ^{AC}	6.1±0.03 ^{BD}	4.1±0.03 ^{BD}	5.0±0.05 ^{ABB}	6.1±0.05 ^{AC}	2.5±0.03 ^{AE}	6.8±0.02 ^{DA}	3.1±0.02 ^{BE}	6.0±0.02 ^{DA}	5.8±0.04 ^{BA}	4.0±0.03 ^{DA}		
C	1	8.7±0.01 ^{BE}	6.1±0.01 ^D	8.6±0.04 ^{DE}	8.4±0.05 ^{AD}	0.5±0.02 ^{EA}	8.5±0.04 ^{BE}	6.3±0.01 ^{DA}	7.8±0.04 ^{DB}	8.3±0.01 ^{ED}	6.4±0.05 ^{AB}	0.7±0.02 ^{EA}	8.5±0.04 ^{DE}	0.8±0.02 ^{BA}	5.6±0.04 ^{DB}	8.2±0.04 ^{AE}	5.3±0.05 ^{BB}	
	7	8.6±0.04 ^C	6.9±0.03 ^B	7.7±0.04 ^{DD}	7.6±0.04 ^{BB}	1.5±0.04 ^{AB}	7.6±0.03 ^{BC}	7.1±0.03 ^{ED}	7.4±0.03 ^{ED}	8.0±0.02 ^{BC}	7.2±0.04 ^{AE}	1.5±0.05 ^{BC}	8.4±0.05 ^{BD}	1.5±0.05 ^{BB}	6.3±0.04 ^{BE}	7.9±0.02 ^{EB}	5.6±0.04 ^{BC}	
	14	8.5±0.05 ^{BD}	7.1±0.04 ^B	7.3±0.05 ^{AB}	7.3±0.05 ^{AC}	1.7±0.04 ^{AC}	7.5±0.02 ^{AD}	7.3±0.04 ^{AD}	7.1±0.05 ^{BC}	7.7±0.01 ^{BC}	6.9±0.04 ^{CD}	1.7±0.01 ^{BB}	8.0±0.04 ^{CC}	1.8±0.01 ^{AD}	7.2±0.05 ^{DD}	7.8±0.02 ^{AC}	5.7±0.03 ^{DB}	
	21	7.9±0.04 ^{BB}	7.3±0.03 ^A	7.1±0.04 ^{AC}	7.0±0.03 ^{BB}	1.9±0.03 ^{BC}	7.3±0.03 ^{AD}	7.2±0.03 ^{BB}	7.0±0.02 ^{AC}	7.6±0.05 ^{AC}	6.6±0.03 ^{BC}	2.2±0.04 ^{BD}	7.7±0.03 ^{EB}	2.2±0.04 ^{AC}	7.5±0.03 ^{AD}	7.2±0.02 ^{AC}	5.3±0.03 ^{AB}	
28	7.4±0.03 ^{BA}	7.5±0.05 ^B	7.0±0.03 ^{BE}	6.8±0.04 ^{EA}	2.4±0.04 ^{AE}	7.0±0.01 ^{BA}	7.0±0.02 ^{SC}	6.8±0.01 ^{EA}	7.3±0.05 ^{BA}	6.3±0.02 ^{ABB}	2.7±0.01 ^{EE}	7.5±0.02 ^{EA}	2.4±0.05 ^{AD}	7.3±0.04 ^{BA}	7.0±0.01 ^{EA}	5.1±0.02 ^{EA}		
K	1	8.2±0.03 ^{BD}	6.3±0.05 ^B	7.6±0.04 ^{DE}	8.8±0.03 ^{AE}	0.5±0.02 ^{EA}	8.7±0.01 ^{BD}	5.1±0.01 ^{EA}	7.5±0.02 ^{EB}	8.9±0.03 ^{BB}	6.3±0.02 ^{ABB}	0.6±0.02 ^{BA}	8.6±0.05 ^{EE}	0.8±0.01 ^{EA}	7.4±0.05 ^{EB}	8.9±0.02 ^{BE}	5.8±0.02 ^{BC}	
	7	8.0±0.05 ^{AC}	6.7±0.05 ^A	7.4±0.03 ^{CD}	8.2±0.04 ^{ABB}	1.4±0.05 ^{AB}	8.3±0.04 ^{CB}	5.4±0.05 ^{EA}	7.2±0.03 ^{AC}	7.7±0.05 ^{SC}	6.6±0.02 ^{AE}	1.4±0.03 ^{BC}	8.2±0.03 ^{CD}	1.4±0.01 ^{BB}	8.1±0.04 ^{BE}	8.4±0.05 ^{EC}	6.1±0.05 ^{BD}	
	14	7.7±0.05 ^{BE}	6.9±0.03 ^E	7.1±0.04 ^{AB}	7.7±0.04 ^{BB}	1.7±0.03 ^{CB}	8.1±0.03 ^{CC}	6.2±0.04 ^{BE}	7.0±0.03 ^{DE}	7.6±0.05 ^{BB}	6.8±0.04 ^{BC}	1.5±0.02 ^{AB}	7.8±0.03 ^{AC}	1.9±0.04 ^{BB}	7.3±0.03 ^{BD}	8.1±0.02 ^{DD}	5.6±0.03 ^{DE}	
	21	7.5±0.03 ^B	7.3±0.03 ^B	7.0±0.04 ^{AC}	7.3±0.03 ^{CC}	1.9±0.01 ^{AC}	7.5±0.04 ^{EA}	6.5±0.03 ^{EB}	6.8±0.01 ^{EA}	7.3±0.05 ^{AD}	6.5±0.04 ^{AD}	2.0±0.03 ^{AC}	7.0±0.03 ^{ABB}	2.2±0.04 ^{AC}	6.9±0.04 ^{CC}	7.6±0.05 ^{EB}	4.8±0.02 ^{EB}	
	28	7.3±0.05 ^{AA}	7.5±0.03 ^D	6.8±0.05 ^{EA}	7.0±0.03 ^{BA}	2.3±0.01 ^{DD}	7.0±0.01 ^{EB}	6.1±0.02 ^{BC}	6.5±0.03 ^{DD}	7.1±0.02 ^{CA}	6.3±0.05 ^{EA}	2.4±0.04 ^{DD}	6.4±0.02 ^{BA}	2.5±0.05 ^{DD}	6.7±0.04 ^{AA}	7.1±0.03 ^{AA}	4.6±0.03 ^{AA}	

5. SONUÇ

Bu araştırmanın amacı, farklı yardımcı kültür ilave edilerek deneysel kefir üretimi yapmak, bazı fizikokimyasal, antimikrobiyal, antihipertansif, mikrobiyolojik ve duyuusal parametrelerinin incelenmesidir.

Kefir üretiminde kullanılmış olan farklı yardımcı kültürlerin kefirin pH, asitlik, protein, yağ analizlerinde ve maya, laktobasil ve laktokok sayılarındaki, antimikrobiyal ve antihipertansif etkinlikteki farklılıkların temel sebebidir.

Bu araştırma sonuçlarına göre; en yüksek antimikrobiyal aktivite *Lactobacillus helveticus* ilaveli kefir, en yüksek antihipertansif etki gösteren kefir *Lactobacillus plantarum* ilaveli kefir olarak belirlenmiştir ve yüksek kalitede kefir üretimi gerçekleştirmiştir.

Kefir, enteral enfeksiyonlarda tedaviye destek amaçlı kullanılmaktadır. Fakat farklı yardımcı kültür ilavesi ile yapılmış olan kefirin mikroorganizmalar üzerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada farklı yardımcı kültürler ile yapılmış olan kefirlerin bazı gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerine antimikrobiyal etkinliği tespit edilmiştir ve sonuçların gıdalarla bulaşan enteral patojenlerin tedavisine destek olarak kefirin kullanılmasında yol göstereceği düşünülmektedir.

Daha sonraki çalışmalar için; in vivo sistem kullanılarak bu probiyotik bakterilerin biyoaktivitesinin araştırılması, probiyotik etkilerin mekanizmasının anlaşılması ve bu probiyotik bakterilerin günlük tüketimdeki yararlı etkisini daha da doğrulamak için gerekli ve önemli olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A. (2013). Kefir and health: a contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 422-434.
- Akıllıoğlu, H. G., Karakaya, S. (2009). Effects of heat treatment and in vitro digestion on the Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *Eur Food Res Technol* **229**, 915–921.
- Algaron, F., Miranda, G., Le Bars, D., Monnet, V., (2004). Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic systems to accumulate potentially bio-active peptides. *Lait* **84**, 115–123.
- Alm, L. (1982). Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose-deficient individuals. *J Dairy Sci* **65**, 346–352.
- Altınayar, A., (1994). Geleneksel fermente süt ürünlerimizin raf ömürlerini arttırma yolları. Seminer, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü*, Ankara 25-34.
- Anonim (1995). Beyaz Peynir Standardı (TS 591). TSE, Ankara.
- Anonim (2018a). <https://www.danone.com/stories/articles-list/kefir-drinkable.html> (Erişim tarihi 01.10.2018).
- Anselmo, R. J, Lausada, L. I., Viora, S. S. (2001). Efecto del bacterida Kefir sobre *Salmonella* spp. *Informacion Tecnologica* **5**, 91-95.
- Anton Dea, Raudsepp, Roasto Piret Mati, Meremäe Kadrin, Kuusik Sirje, Toomik Peeter, Elias Priit, Laikoja Katrin, Kaart Tanel, Lepiku Martin, Püssa Tõnu (2016). Comparative study of microbiological, chemical and sensory properties of kefirs produced in Estonia, Latvia and Lithuania. *Journal of Dairy Research*. **83**,89–95.
- Aytekin, Ö. Ü., Şeker, A., Arısoy, S. (2019). The effect of in vitro gastrointestinal simulation on bioactivities of kefir. *Food Science and Technology* **55**, 283-292.
- A.O.A.C. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th Edition, Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- Ardö, Y., Polychroniadou, A. (1999). *Laboratory manual for chemical analysis of cheese*. Luxembourg Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg: Cost 95.
- Balamurugan S., Chandragunasekaran S. A., Chellappan G., Rajaram K., RamamoorthiG., Ramakrishna B.S. (2014). Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India. *Indian Journal Med Res*. **140**, 345–355.
- Beermann, C., Hartung, J. (2013). Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food and Function* **4**, 185-189.
- Behera SS, Ray RC, Zdolec N.(2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties, An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *Biomed Res Int*,1-18

- Bensmira M, Nsabimana C, Jiang B.(2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *LWT - Food Science and Technology* **43**, 1180–4.
- Beshkova, D. M., Simova, E.D., Frengova, G. I., Simov, Z. I., Dimitrov, Zh. P. (2003). Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *Int.Dairy J.* **13**, 529-535.
- Bhat, Z. F., Kumar, S., Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides from egg: a review. *Nutr. Food Sci.* **45**, 190–212.
- Bonczar, T. P., Beck, A. J. (1997). *Lifetime likelihood of going to state or federal prison*. Bureau of Justice Statistics Special Report, Washington, DC.
- Bottazzi, V., Bianchi, F. (1980). A Note on Scanning Electron Microscopy of Microorganisms associated with the Kefir Granule. *Journal of Applied Bacteriology* **48**, 265–8.
- Bölükbaşı, B. (2007). A research on the isolation of lactic acid bacteria from yogurt samples taken from different villages of Trakya region, definition of their EPS (exopolysaccharide) producing ability and choosing their best combination for ayran production. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 119p.
- Bujalance, C., Jimenez-Valera, M., Moreno, E., Reuiz-Bravo, A. (2006). A selective medium for *Lactobacillus plantarum*. *J. Microbiol. Methods* **66**, 572–575.
- Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscell, M., Corsetti, A., Tofalo, R., Suzzi, G. (2014). Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiology* **42**, 117-121.
- Chen, L., Wang, J., Shu, G., Chen, H. (2018). Production of angiotensin-i converting enzyme inhibitory peptide from goat milk casein: optimization conditions of complex protease hydrolysate by response surface methodology and purification. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **30**, 742-749.
- Chianese, L., Caira, S., Ferranti, P., Laezza, P., Malorni, A., Mucchetti, G., Garro, G., Addeo, F. (1997). The oligopeptides of sweet and acid cheese whey. *Lait.* **77**, 699-715.
- Chifiriuc, M. C., Cioaca, A. B., Lazar, V. (2011). In vitro assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe.* **17**, 433-435.
- Clare, D.A., Swaisgood, H.E., (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science* **83**, 1187-1195.
- Contreras, M., Carrón R., Montero, M.J., Ramos, M., Recio, I., (2009). Novel caseinderived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal* **19**, 566–573.
- Corrons, M. A., Liggieri, C. S., Trejo, S. A., Bruno, M. A. (2017). ACE inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera* latex. *Food Res Int.* **93**, 8–15.
- Czamanski, R.T., Greco, D.P., Wiest, J.M. (2004). Evaluation of antibiotic activity in filtrates of traditional kefir. *Higiene Alimentar,* **18**, 75-77.

- Çayır, M.S., (2007). *Probiyotik Kültür Kullanılarak Üretilen Kayısı Katkılı Yoğurtların Bazı Özellikleri*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Çelikel, N., Gürsoy, O., Kavas, G., Kınık, Ö., (2005). Bioactive properties and physiological role of lactoferrin. *Tübitak 1. International Food and Nutrition Congress*. 15-18 June, Istanbul.
- Çevikbaş, A., Yemni, E., Ezzedenn, F.W., Yardımcı, T., Çevikbaş, U., Stohs, S. J. (1994). Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research* **8**, 78-82.
- Dağdemir, E., Özdemir, C., Özdemir, S. (2003). Süt ürünlerinde bulunan antihipertansif peptidler ve etki mekanizmaları. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, 22-23 Mayıs, İzmir.
- Dallas, D. C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V. L. M., Kalanetra, K. M., Frese, S. A., Barile, D. (2016). Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chemistr.* **197**, 273–284.
- Dimitrellou, D., Kandylis, P., Mallouchos, A., Komaitis, M., Koutinas, A. A., Kourkoutas, Y. (2010). Effect of freeze-dried kefir culture on proteolysis in feta-type and whey-cheeses. *Food Chemistry*. **119**, 795–800.
- Dinç, A. (2008). *Kefirin Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Dinkci, N., Kesekas, H., Korel, F., Kinik, Ö. (2015). An innovative approach: cow/goat milk based kefir. *Mljekarstvo* **65**, 177-186.
- Ebringer, L., Ferencík, M., Krajčovič, J. (2008). Beneficial Health Effects of Milk and Fermented Dairy Products Review. *Folia Microbiol.* **53**, 378–394.
- Elkhtab, E., El-Alfy, M., Shenana, M., Mohamed, A., Yousef, A. E. (2017). New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and kombucha cultures. *J Dairy Sci.* **100**, 9508–20.
- Ender, G. (2009). *Oligofruktozla zenginleştirilmiş süttten üretilen kefirlerin kalitesi üzerine tane ve kültür kullanımının etkileri*. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Ersoy, M., Uysal, H. (2003). Süttozu, Peyniraltı Suyu Tozu ve Yayıkaltı Karışımları ile Üretilen Kefirlerin Özellikleri Üzerine Bir Araştırma* II. Bazı Fiziksel ve Duyusal Özellikler. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* **40**, 79-86.
- Ertekin, B., Güzel-Seydim, Z. B. (2010). Effect of fat replacers on kefir quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 543-548.
- Esmek, E.M.; Güzeler, N. (2015). Kefir ve Kefir Kullanılarak Yapılan Bazı Ürünler. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* **19**, 250-258.
- Farnworth, E. (2005). Kefir a complex probiotic. *Food Sci Technol.* **2**, 1–17.
- Febriantosa, A., Purwanto, B. P., Arief, I. I., Widyastuti, Y., (2013). Karakteristik Fısıq, Kimia, Mikrobiologi Whey Kefir Dan Aktivasnya Terhadap Penghambatan Angiotensin Converting Enzyme (ACE). *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* **24**, 147-153.

- Felix, ASH. (2016). A Review About Probiotic Foods: Kefir, Kimchi and Kombucha. *Journal of Food Process Technology* **7**, 635-636.
- Fitzgerald, R. J., Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J Dairy Technol.* **59**, 118-125.
- Frank, J. F., Marth, E. H. (1977). Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk, *J. Food Protect.* **40**, 754-759.
- Frigues, A. G. F., Arpini, C. M., Kalil, I. C., Gava, A. L., Leal, M. A., Porto, M. L. (2015). Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med.* **13**, 390.
- Fuglsang, A., Rattray, F. P., Nilsson, D., Nyborg, C. B. (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin-converting enzyme in vitro and in vivo. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**, 27-34.
- Furukawa, N., Matsuoka, A., Yamanaka, Y. (1990). Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science* **43**, 450-453.
- Furukawa, N., Matsuoka, A., Takahashi, T., Yamanaka, Y. (1991). Effects of fermented milk on the delayed type hypersensitivity response and survival day in mice bearing meth-A. *Animal Science and Technology* **62**, 579-585.
- Gambelli, L., Manzi, P., Panfili, G., Vivanti, V., Pizzoferrato, L. (1999). Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy. *Food Chem.* **66**, 353-8.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *J. of Dairy Research* **65**, 149-154.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G.L. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensmittel wissenschaft und technologie journal* **30**, 77-84.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J. of Dairy Research* **g**, 639-652.
- Ghoneum, M., Gimzewski, J. (2014). Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. *International Journal of Oncology* **44**,830-837.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **42**, 223-239.
- Golowezya, M. A., Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A. G., Semorile, L., De Antonie, G. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic . *Journal of Dairy Research* **75**, 211-217
- Grishina, A., Kulikova, I., Alieva, L., Dodson, A., Rowland, I., Jin, J. (2011). Antigenotoxic effect of kefir and ayran supernatants on fecal water-induced DNA damage in human colon cells. *Nutrition and Cancer* **63**, 73-79.

- Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal* **21**, 601–606.
- Gul, O., Mortas, M., Atalar, I., Dervisoglu, M., & Kahyaoglu T. (2015). Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. *Journal of Dairy Science* **98**, 1517-1525.
- Güler, Z., Tekin, A., Park, W. Y. (2016). Comparison of biochemical changes in kefir produced from organic and conventional milk at different inoculation rates of kefir grains. *Journal Of Food Science and Nutrition Therapy* **2**, 8-14.
- Güngör, Ö. (2007). *Meyve suyu ilaveli kefirin depolama süresince özelliklerinin belirlenmesi*. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Güzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Grene, A. K., Bodine, A. B. (2000). Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis* **13**, 35-43.
- Güzel-Seydim, Z. B., Twyffels, J., Seydim, A., Greene, A. K. (2005). Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology* **58**, 25-29.
- Halle, C.,Leroi, F., Dousset, X., Pidoux, M. (1994). Les Kefirs: Des Associations Bacteries Lactiques-Levures. In: Ötleş, S., Çağındı, Ö. (2003). Kefir: A Probiotic Dairy Composition, Nutritional And Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition* **2**, 54-59.
- Haque, E., Chand, R., Kapila, S. (2009). Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International* **25**, 28-43
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*. Academic Press, San Diego, USA, 532 p.
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E., Klaenhammer, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* **52**, 384- 387.
- Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* **18**, 163– 169.
- Hati, S., Patel, N., Mandal, S. (2018). Comparative Growth Behaviour and Biofunctionality of Lactic Acid Bacteria During Fermentation of Soy Milk and Bovine Milk. *Probiotics Antimicrob Proteins.* **10**, 277-283.
- Hayaloglu, A. A., Güven, M., Fox, P.F., Hannon, J. A., McSweeney, P. L. H. (2004). Proteolysis in Turkish White-brined cheese made with defined Strains of *Lactococcus*. *Int Dairy J.* **14**, 509-610
- Hayaloğlu, A. A. (2007). Comparisons of different single-strain starter cultures for their effects on ripening and grading of Beyaz cheese. *International Journal of Food Science and Technology* **42**, 930-938.
- Hayaloğlu, A. A. (2003). *Starter Olarak Kullanılan Bazı Lactococcus Suşlarının Beyaz peynirlerin Özellikleri Üzerine Etkisi*. Doktora Tezi, Adana, 170 s.
- Hayes, M., Mora, L., Hussey, K., Aluko, R.E. (2016). Boarfish protein recovery using the pHshift process and generation of protein hydrolysates with ACE-I and

- antihypertensive bioactivities in spontaneously hypertensive rats. *Innov Food Sci Emerg Technol.* **37**, 253–260.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., Recio, I. (2011) Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci* **165**, 23–35
- Hosono, A., Tanabe, T., Otani, H. (1990). Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milk Science International* **45**, 647-651.
- Huseini, H. F., Rahimzadeh, G., Fazeli, M. R., Mehrazma, M., Salehi, M. (2012). Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burnsjournal.* **38**, 719-723.
- IDF (1982). *Determination of total solid content*. IDF Standard 4A, Brussels: International Dairy Federation.
- IDF (1993). *Milk Determination of Nitrogen (Kjeldahl Method) And Calculation of The Crude Protein Content*, 20B. Brussels: International Dairy Federation.
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., & Ibanez, F.C. (2005). Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry.* **90**, 613-620.
- Jang, A., Jo, C., Kang, K. S., Lee, M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chem.* **107**, 327-336.
- Jeong, D., Kim D. H., Song K. Y., Seo K. H. (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefirifaciens* DD2 against oral pathogens. *J Oral Microbiol.* **10**, 147-985.
- Jue-Liang, H., Reynetha, D., S. Rawendra, Aisha., Sin-Hong Chen, Chi-I Chang, Wen-Ling Shih, Tzou-Chi Huang, Ming-Huei Liao (2014). Isolation and Characterization of a Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Tripeptide from Enzymatic Hydrolysis of Soft-Shelled Turtle (*Pelodiscus sinensis*) Egg White: In Vitro, In Vivo, and In Silico Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 12178-12185.
- Juven, B. J., Schved, F., Lidner, P. (1992). Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Protect.* **55**, 157-161.
- Kamau, S. M., Cheison, S. C., Chen, W., Liu, X. M., Lu, R. R. (2010). Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Food Science and Food Safety* **9**, 197-212.
- Kanbak, G., Uzuner, K., Kusat, O. K., Oglakci, A., Kartkaya, K., Senturk, H. (2014). Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unihypertensive rats with 4 weeks salt diet. *Clin Exp Hypertens* **36**, 1-8.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Marshall, M. (2012). *Bioactive Food Proteins and Peptides. Applications in Human Health*. Eds: N. S. Hettiarachchy. CRC Press, Taylor And Francis Group, Boca Raton, pp. 1-27.

- Kaptan, N. (1982). Toplum sağlığında kefirin önemi. *TÜBİTAK, Bilim ve Teknik Dergisi* **176**, 33-35.
- Karatepe P., Yalçın H., Patır B., Aydın I. (2012). Kefir ve Kefirin Mikrobiyolojisi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR.* **10**, 1-10.
- Kesenkaş, H. (2011). Antioxidant Properties of Kefir Produced From Different Cow and Soy Milk Mixtures. *Journal of Agricultural Sciences* **17**, 253-259.
- Keser, G. (2013). *İnek ve Keçi Sütü Karışımından Yapılan Kefirlerin Fizikokimyasal, Mikrobiyal ve Duyusal Özellikleri Üzerine Yağ İkame Maddelerinin Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- Khoury, N., El-Hayek, S., Tarras, O., El-Sabban, M., El-Sibai, M., Rizk, S. (2014). Kefir exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *International Journal of Oncology* **45**, 2117-2127.
- Kılıç, S. (1990). Yoğurt kültürünü oluşturan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin antibakteriyal özellikleri üzerine bir araştırma. *Gıda.* **15**, 333-338.
- Kınık, Ö., Gürsoy, O. (2002). Süt kaynaklı biyoaktif peptidler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* **8**, 195-203.
- Kim, D. H., Chon, J. W., Kang, B. (2015). Growth inhibition of *Cronobacter sakazakii* in experimentally contaminated powdered infant formula by kefir supernatant. *J Food Protect.* **78**, 1651–1655.
- Kim, D. H., Jeong, D., Kim, H., Kank, B., Chon, J. W., Song, K. Y., Seo, K. H. (2016). Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **36**, 787–790.
- Kim, D.H., Kim , H., Jeong, D., Kang, I.B., Chon, J.W., Kim, H S., Song, K. Y., Seo, K.H. (2017). Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: Targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **44**, 43-45.
- Koçak, C., Gürsel, A. (1981). Kefir, *Gıda* **6**, 11-14.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and funtionality. *International Dairy Journal* **16**, 945-960.
- Koroleva, N. S. (1988). “Fermented milk: science and technology”, *Bulletin – International Dairy Federation.* **227**, 35-40.
- Kök-Taş, T., Seydim, A. C., Ozer, B., Guzel-Seydim, Z. B. (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science* **96**, 780-789.
- Köroğlu, Ö., Bakır, E., Uludağ, G., Köroğlu, S., Dayısoylu, K. S. (2015). Kefir ve Sağlık. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi* **18**, 26-30.
- Kurman, J. A. (1984). The Poduction of Fermented Milks in World. II. Aspects of The Production of Fermented Milks. *IDF Bulletin* **179**, 16-26.

- La Riviere, J. W. M., Kooiman, P., Schmidt, K. (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie* **59**, 269-278.
- Lee, B. H., Kilcawley, K. N., Hannon, J.A., Park, S.Y., Wilkinson, M. G., Beresford, T. P. (2007). The Use of Viable and Heat-shocked *Lactobacillus helveticus* DPC 4571 in Enzyme Modified Cheese Production. *Food Biotechnology* **21**, 129-143.
- Lima, M. S. F., Silva, R. A., Silva, M. F., Silva, P. A. B., Costa, R. M. P., Teixeira, J. C. A., Porto, A. L. F., Cavalcanti, M. T. H. (2018). Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **10**,446–455.
- Lin, K., Zhang, L., Han, X., Zhaoxu Meng, Z., Zhang, J., Yifan Wu, Y., Chen, D. (2018). Quantitative Structure–Activity Relationship Modeling Coupled with Molecular Docking Analysis in Screening of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Qula Casein Hydrolysates Obtained by TwoEnzyme Combination Hydrolysis. *J Agric Food Chem.* **66**, 3221–3228.
- Liut Kevicius, A., Sarkinas, A. (2004). Studies on the growth conditions and composition of Kefir grains – as a food and forage biomass. *Dairy Science Abstracts* **66**, 903 p.
- López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L., Recio, I. (2007). Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Lait.* **87**, 241–249.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal Biology Chemistry* **193**, 265-275.
- Magra, I. T., Antoniou, D. K., Psomas, I. E. (2011). Effect of Milk Fat, Kefir Grain Inoculum and Storage Time on the Flow Properties and Microbiological Characteristics of Kefir. *Journal of Texture Studies* **43**, 257-337.
- Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J. S., Panahi, S., Kaufman, S., Davidge, S. T., Wu, J. (2015). Egg-derived ACE-inhibitory peptides IQW and LKP reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Funct Foods.* **13**, 50–60.
- Marth, E. H., Steele, J. L. (2001). *Applied Dairy Microbiology*. Second Edition, Marcel, Dekker, Inc., NewYork, USA, 744 p.
- Meisel, H. (1998). Overview on Milk Protein-Derived Peptides. *International Dairy Journal* **8**, 363-373.
- Metin, M. (2003). *Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi*. Ege Üniversitesi Basımevi, Borvova, İzmir, 5. baskı, 802 s.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 5297–5305.
- Miralles, B., Amigo, L., Recio, I. (2018). Critical Review and Perspectives on Food-Derived Antihypertensive Peptides. *J Agric Food Chem.* **66**, 9384–9390.

- Moller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.* **47**, 171–182.
- Montanuci, F. D., Pimentel, T. C., Garcia, S., Prudencio, S. H. (2012). Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk Kefir. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **32**, 850-861.
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Abdelazez, A., Amjad, A., Afzaal, M., Zhang, S., Pan, S. (2019). Assessment of the Antimicrobial Potentiality and Functionality of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from the Conventional Inner Mongolian Fermented Cheese Against Foodborne Pathogens. *Pathogens* **8**, 71.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. *Peptides* **29**, 969-977.
- Nielsen, B., Gürakan, G. C., Unlü, G. (2014). Kefir: a multifaceted fermented dairy product. *Probiotics Antimicrob Proteins* **6**, 123–35.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int Dairy J.* **19**, 155-165.
- Oktar, E., Karagözü, C. (1992). Farklı ısı işlem görmüş inek sütlerinde kefir kültürü ve kefir danesi ile üretilen kefirlerin nitelikleri ve dayanıklılığı üzerine araştırmalar. *Gıda.* **17**, 259-265.
- Oliveira Leite, A. M., Miguel M. A. L., 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**, 341–9.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait.* **87**, 149-165.
- Osada, K., Nagira, K., Teruya, K., Tachibana, H., Shirahata, S., Murakami, H. (1994). Fermented milks. *International Dairy Federation Bulletin* **300**, 98-100.
- Otles, S., Cagındı, O. (2003). Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan J. of Nutrition* **2**, 54–9.
- Öner, Z., Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L. (2010). Effects of different milk types and starter cultures on Kefir. *Gıda*, **35**, 177-182.
- Pei, J., Jiang, H., Li, X., Jin, W., Tao, Y. (2017). Antimicrobial peptides sourced from post-butter processing waste yak milk protein hydrolysates. *AMB Express* **7**, 217.
- Pescuma, M., Hebert, E. M., Haertle, T., Chobert, J. M., Mozzi, F., Font de Valdez, G. (2015). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 cleaves allergenic peptides of beta-lactoglobulin. *Food chemistry* **170**, 407–14.
- Phelan, M., Kerins, D. (2011). The Potential Role Of Milk-Derived Peptides In Cardiovascular Disease. *Food & Function* **2**, 153-167.

- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive Peptides Derived from Bovine Whey Proteins: Opioid and Ace-inhibitory Peptides. *Trends in Food Science and Technology* **11**, 347-356.
- Pihlanto, A. (2013). *Lactic Fermentation And Bioactive Peptides, Lactic Acid Bacteria-R&D For Food, Health And Livestock Purposes*, Intech, Pp. 309-332, Croatia.
- Pripp, A. H., Shakell-Ur –Rehman, McSweeney, P. H. L., Sorhaug, T., Fox, P. F. (1999). Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single strain starters on proteolysis in miniature cheddar –type cheeses. *International Dairy Journal* **9**,473-479.
- Punaro, G. R., Maciel, F. R., Rodrigues, A. M., Rogero, M. M., Bogsan, C. S. B., Oliveira, M. N., Ihara, S. S. M., Araujo, S. R. R., Sanches, T. R. C., Andrade, L. C., Higa, E. M. S. (2014). Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. *Nitric Oxide* **37**, 53-60.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J Dairy Sci* **88**, 3480–3487.
- Rasika, D. M. D., Ueda, T., Jayakody, L. N., Suriyagoda, L. D. B., Silva, K. F. S. T., Ando, S., Vidanarachchi, J. K. (2015). ACE-inhibitory activity of milk fermented with *Saccharomyces cerevisiae* K7 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007. *J Natl Sci Found* **43**, 141-151.
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D. (2018). Production of Bioactive Peptides by Lactobacillus Species: From Gene to Application. *Front Microbiol.* **9**, 2354.
- Renner, E., Saldamlı, I. (1983). Beslenme açısından fermente süt ürünleri. *Gıda.* **8**, 297-311.
- Rizk, S., Maalouf, K., Baydoun, E. (2009). The antiproliferative effect of kefir cell-free fraction on HuT-102 malignant T lymphocytes. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* **9**, 198- 203.
- Rodrigues, K. L., Caputo, L. R., Carvalho, J. C., Evangelista, J., Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents.* **25**, 404–408.
- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prashe., S. O. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of Phaseolus vulgaris bean hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Res Int.* **49**, 739–746.
- Saidi, B., Faid, M., Warthesen, J. J. (2003). Effect of Sorbate on Yogurt Fermentation and Stability of Sorbate. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)* **23**, 5-13.
- Salampessy, J., Reddy, N., Phillips, M., Kailasapathy, K. (2017). Isolation and characterization of nutraceutically potential ACEInhibitory peptides from leatherjacket (*Meuschenia* sp.) protein hydrolysates. *LWT-Food Sci Technol.* **80**, 430-436.
- Sarkar, S. (2007). Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal.* **109**, 280–290.

- Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H., Raith, K. (2007). Peptic digestion of β -casein: Time course and fate of possible bioactive peptides. *Journal of Chromatography A* **166**, 108-115.
- Semen, Z., Altıntaş, A. (2015). Sütte biyoaktif peptitler ve biyolojik önemi. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi* **3**, 3-4.
- Sezginer, A., 1980, Kefirin hikayesi. *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi* **151**, 37-39.
- Shihata, A., Shah, N. P. (2002). Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal* **12**, 765-772.
- Shu, G., Yang, H., Chen, H., Zhang, Q., Tian, Y. (2015). Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ACE inhibitory activity in fermented milk by *L. plantarum* LP69. *Acta. Sci. Pol. Technol. Aliment.* **14**, 107-116.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., Lima, A.S. (2009). Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **152**, 316-325.
- Silva, B. C., Jung, L. R., Sandes, S. H., Alvim, L. B., Bomfim, M. R., Nicoli, J. R., Neumann, E., Nunes, A. C. (2013). In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Benef. Microbes* **4**, 267-275.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**, 1e6.
- Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z., Spasov, Z. (2006). Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 112-123.
- Singh, B. P., Vij, S., Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* **54**, 171-179.
- Smacchi, E., Gobbetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology* **17**, 129-141.
- Soltani M., Saydam İ. B., Güzeler N. (2010). Kefir. *I. Uluslararası Adryatik'ten Kafkaslar'a Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*, 15-17 Nisan, Tekirdağ.
- Soumodip Sarkar and Ana I.A. Costa (2007). Dynamics of open innovation in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* **19**, 574-580.
- Srinivas, S., Prakash, V. (2010). Bioactive peptides from bovine milk α -casein: isolation, characterization and multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **16**, 7-15.
- Sulmiyati, N. S., Fahrodia, D. U., Malaka, R., Maruddin, F. (2019). The Physicochemical, Microbiology, and Sensory Characteristics of Kefir Goat Milk with Different Levels of Kefir Grain. *Tropical Animal Science Journal*, **42**, 152-158.

- Şahingil, D., Hayaloğlu, A. A., Şimşek O., Özer B. (2014). Changes in volatile composition, proteolysis and textural and sensory properties of white-brined cheese: effects of ripening temperature and adjunct culture. *Dairy Science & Technology* **94**, 603-623.
- Şanlıdere, H., Öner, Z. (2006). Süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler ve fonksiyonları. *Gıda* **31**, 311-317.
- Şimşek, A., Kılıç, B. (2016). Et Kaynaklı Biyoaktif Peptitler ve Fonksiyonel Özellikleri. *Gıda* **41**, 267-274.
- Taha, S., El Abd, M., Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E., Hassan, D. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures. *Food Sci Biotechnol.* **26**, 1325-32.
- Tamai, Y., Yoshimitsu, N., Watanabe, Y., Kuwabara, Y., Nagai, S. (1996). Effect of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. *Journal of Fermentation Bioengineering* **81**, 181-182.
- Tarakçı, Z., Demirkol, M. (2016). Yoğurdun Fizikokimyasal Özelliklerine Kurutulmuş Goji Berry Meyvesinin (*Lycium barbarum*) Etkisi. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.* **6**, 136-145.
- Tekinşen, O. C., Atasever, M. (1994). Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür. *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi* **151**, 37-39.
- Teruya, K., Yamashita, M., Tominaga, R., Nagira, T., Shim, S.Y., Katakura, Y., Tokumaru S., Tokumaru, K., Barnes, D., Shirahata, S. (2002). Fermented milk, Kefir-Kefir enhances glucose uptake into insulinresponsive muscle cells. *Cytotechnology* **40**, 107-116.
- Tokatlı, M., Yıldırım, M., Yıldırım, Z. (2005). Kazein türevli biyoaktif peptidler. *4. Gıda Mühendisliği Kongresi*, 29 Eylül-1 Ekim, Ankara.
- Tomar, O., Çağlar, A., Akarca, G. (2017). Kefir and Its Importance For Health. *AKU-J. Sci. Eng.* **17**, 834-53.
- Tratnik, L., Bozanic, R., Herceg, Z., Drgalic, I. (2006). The Quality of Plain and Supplemented Kefir From Goat's and Cow's Milk. *International Journal of Dairy Technology* **59**, 40-46.
- Tonguç, İ. E. (2006). *Probiyotik ayran üzerine bir araştırma*. Ege Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Tunçtürk, Y., (2003). Sütte Bulunan Biyoaktif Proteinler ve Peptidler. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, 335-340 s, 22-23 Mayıs, İzmir.
- Ulusoy, B. H., Çolak, H., Hampikyan, H., Erkan, M. E. (2007). An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. *Turkish Microbiological Society* **37**, 103-107
- Üçüncü, M., (2005). *Süt ve Mamülleri Teknolojisi*, Meta Basım, İzmir, 571 s.
- Wallace, J. M., Fox, P. F. (1998). Rapid spectrophotometric fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and Cheese Fractions. *Food Chemistry* **62**, 217-224.

- Wang, L., Zhong, H., Liu, K., Guo, A., Qi, X., Cai, M. (2016). The evaluation of kefir pure culture starter: Liquid-core capsule entrapping microorganisms isolated from kefir grains. *Food Science and Technology International* **22**, 598–608.
- Wszolek, M., Tamime, A. Y., Muir, D. D., Barclay, M. N. I. (2001). Properties of Kefir made in Scotland and Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with Different Starter Cultures. *Lebensm.-Wiss.u-Technol.* **34**, 251-261.
- Yalçın, N. F., Işık, M. K. (2017). Kefir; Ürün Özellikleri ve İnsan Sağlığına Etkisi. *Adıyaman Sağlık Üniversitesi Bilimleri Dergisi* **3**, 439-452.
- Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T. (1999). Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci.* **82**, 1388–93.
- Yıldız, F. (2009). *Farklı Yağ Oranlarının ve Farklı Starter Kültürlerin Kefir Nitelikleri Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Yıldız-Akgül, F., Yetisemeyen, A., Senel E., Yıldırım, Z. (2018). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir produced by secondary fermentation. *Mljekarstvo* **68**, 201-213.
- Yılmaz, L., Özcan, Y. T., Akpınar, B. A. (2006). The Sensory Characteristics of Berry - Flavoured Kefir. *Czech Journal Food Science* **24**, 26-32.
- Yüce-tepe, A., Özçelik, B. (2016). Bioactive Peptides Isolated from Microalgae *Spirulina platensis* and their Biofunctional Activities. *Academic Food Journal/Akademik Gıda* **14**, 412-417.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., Aslım, B. (2004). Determination of Some Characteristics Coccoid Forms of Lactic Asit Bacteria Isolated from Turkish Kefirs with Natural Probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **37**, 663-667.
- Zacconi, C., Parisi, M. G., Sarra, P. G., Dallavalle, P., Bottazzi, V. (1995). Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiology Aliments Nutrition* **12**, 387-390.
- Zambrowicz, A., Żelazko, M., Trziszka, T. (2011). Hen egg proteins: precursors of bioactive peptides. *Medycyna Weterynaryjna* **67**, 157-161.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Merve Atalay

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya / 26.12.1988

Adres: Malatya

E-Posta: merveatalayy44@gmail.com

Lisans: Atatürk Üniversitesi / Gıda Mühendisliği

Yüksek Lisans (Varsa): İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü (2016-2019)

Yayın Listesi: -