

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI KARBON KAYNAKLARINDA GELİŞTİRİLEN KEFİR  
DANESİNDEN ELDE EDİLEN KEFİRAN YAPILARIN BELİRLENMESİ**

**Ömer Çağdaş KOÇAK**

**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2014**

© 2014 [Ömer Çağdaş KOÇAK]

## TEZ ONAYI

**Ömer Çağdaş KOÇAK** tarafından hazırlanan "**Farklı Karbon Kaynaklarında Geliştirilen Kefir Danesinden Elde Edilen Kefiran Yapıların Belirlenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

|                   |   |       |
|-------------------|---|-------|
| <b>Danışman</b>   | <b>Yrd. Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ</b><br>Süleyman Demirel Üniversitesi   | ..... |
| <b>Jüri Üyesi</b> | <b>Prof. Dr. Zeynep BANU SEYDİM</b><br>Süleyman Demirel Üniversitesi  | ..... |
| <b>Jüri Üyesi</b> | <b>Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY</b><br>Süleyman Demirel Üniversitesi | ..... |

**Enstitü Müdürü**      **Prof. Dr. Ahmet ŞAHİNER** .....

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Ömer Çağdaş KOÇAK**

## İÇİNDEKİLER

|  | Sayfa |
|--|-------|
| İÇİNDEKİLER.....   | i     |
| ÖZET .....   | ii    |
| ABSTRACT .....   | iii   |
| TEŞEKKÜR.....  | iv    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....  | v     |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....  | vi    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....  | vii   |
| 1. GİRİŞ.....  | 1     |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ.....  | 4     |
| 2.1. Fermente Süt Ürünleri .....   | 4     |
| 2.2. Kefirin Tarihçesi.....  | 5     |
| 2.3. Kefir Danesinin Mikroflorası .....  | 6     |
| 2.4. Kefir Üretimi .....   | 9     |
| 2.5. Kefirin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....   | 10    |
| 2.6. Kefir Danesi.....   | 11    |
| 2.7. EPS ve Kefiran.....   | 12    |
| 2.7.1. EPS üretimi.....  | 12    |
| 2.7.2. EPS çeşitleri.....  | 16    |
| 2.7.3. EPS biyosentezi.....  | 18    |
| 2.7.4. EPS üretimini etkileyen faktörler .....   | 21    |
| 2.7.5. EPS akış davranışları .....   | 24    |
| 2.7.6. EPS yapıların nükleer manyetik rezonans analizi ile<br>belirlenmesi.....                    | 29    |
| 2.7.7. Kefiran.....  | 33    |
| 2.7.8. Kefiranın sağlık üzerine etkileri.....  | 38    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....  | 42    |
| 3.1. Materyal.....   | 42    |
| 3.2. Yöntem .....  | 42    |
| 3.2.1. Kefir danesinin farklı karbon kaynakları ile.....<br>zenginleştirilmesi.....                | 42    |
| 3.2.2. Kefir danesinde biyokütle artışının belirlenmesi.....                                       | 43    |
| 3.2.3. Kefir danesinde bulunan polisakkarit yapının ekstraksiyonu.....                             | 44    |
| 3.2.4. Kefiranın miktar olarak belirlenmesi.....   | 44    |
| 3.2.5. Reolojik özelliklerin belirlenmesi.....   | 45    |
| 3.2.6. Nükleer manyetik rezonans analizi ile kefiran yapının<br>belirlenmesi .....                 | 46    |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....  | 48    |
| 4.1. Farklı Karbon Kaynaklarında Geliştirilen Kefir Danelerinin<br>Biyokütle Artış Sonuçları ..... | 48    |
| 4.2. Kefiran Miktarının Değerlendirilmesi .....  | 49    |
| 4.3. Kefiran Örneklerinin Akış Davranışlarının Belirlenmesi.....                                   | 52    |
| 4.4. NMR Analiz Sonuçları .....  | 54    |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....  | 59    |
| KAYNAKLAR .....  | 60    |
| ÖZGEÇMİŞ.....  | 74    |

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### FARKLI KARBON KAYNAKLARINDA GELİŞTİRİLEN KEFİR DANESİNDEN ELDE EDİLEN KEFİRAN YAPILARIN BELİRLENMESİ

Ömer Çağdaş KOÇAK

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ

Kefir danesinden elde edilen bakteriyel polisakkarit yapı kefiran olarak tanımlanmaktadır. Kefir danesinde bulunan kefiranın bazı fonksiyonel özellikleri olduğu belirtilmektedir.

Bu tez çalışmasında farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir danelerinde bulunan bakteriyel polisakkarit yapıların ekstraksiyonları yapılarak, elde edilen kefiran yapının miktarlarındaki değişimin, reolojik özelliklerinin ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ile kimyasal yapılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kefir danelerinin geliştirilmesinde ortam karbon kaynağı olarak glukoz (GLKG), galaktoz (GAKG) ve laktoz (LKG) ile zenginleştirilmiştir. Kontrol grubuna (CKG) ise zenginleştirme uygulanmamıştır. Tüm kefir danelerinden alınarak kefiran ekstrete edilmiştir.

Farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir dane biyokütlelerinde en fazla artış GAKG örneğinde tespit edilmiştir. GAKG örneğinden elde edilen kefiran miktarı en yüksek  $610,96 \text{ mgL}^{-1}$  laktoz eşdeğeri tespit edilmiştir. CKG, GAKG, LKG ve GLKG örneklerinde viskozite değerleri sırasıyla 17,9; 18,5; 14,6 ve 29,2 olarak belirlenmiştir (66 1/s kayma hızı). Liyofilize edilmiş kefiranların yapılarını belirlemek için numuneler NMR tekniği ile analiz edilmiştir. Ölçümler trifloroasetik asit (TFA) çözeltisi kullanılarak 24 ve 65 °C' de yapılmış ve  $^{13}\text{C}$  ve  $^1\text{H}$  spektrumları elde edilmiştir. Farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran NMR spektrumları arasında önemli bir farklılık belirlenmemiştir.

Bu çalışma doğal biyopolimer bir yapı olan kefiran yapısının belirlenmesiyle ve gıda sektöründe özellikle fermente süt ürünleri alanında tekstürel özellikleri geliştiren kıvam arttırıcı bir ajan olarak kullanılması yönünde literatüre katkı sağlamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kefir danesi, kefiran, biyopolimer, viskozite, nükleer manyetik rezonans

2014, 74 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### DETERMINATION OF PHYSICAL PROPERTIES OF KEFIRAN PRODUCED BY KEFIR GRAINS USING DIFFERENT CARBON SOURCES

Ömer Çağdaş KOÇAK

Süleyman Demirel University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Tuğba KÖK TAŞ

Bacterial polysaccharide structure obtained from kefir grain is described as kefiran. Kefiran structure found in kefir grain is stated to have a lot of functional properties.

In this thesis study, kefir grains were grown in different carbon sources. Extractions of bacterial polysaccharide in kefir grains was carried out. It was aimed that determining rheological properties, the change in their mass and the chemical structure of obtained kefiran with nuclear magnetic resonance. In the development process of kefir grains, milk was enriched with glucose, galactose and lactose as source of carbon. This enrichment was not implemented to the control group. Kefiran of all kefir grains were extracted.

The significant increase in kefir grain biomass as determined in GAKG sample. The amount of kefiran obtained from GAKG sample is determined the highest 610,96 mg L<sup>-1</sup> (Lactose equivalent). Viscosity rates in CKG, GAKG, LKG and GLK samples are determined respectively as 17,9; 18,5; 14,6 and 29,2 (66/1 shear rate). In order to determine the structures of lyophilised kefirans, samples were analysed by means of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique. Measurements are carried out with trifloroasetik asit (TFA) solvent in 24 and 65 centigrade degrees and <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H spectrums are obtained. Kefiran structure from kefir grains developed in different carbon sources were not determined as significant.

This study will contribute to the literature by determination of kefiran structure which is a natural biopolymer structure and use of it in the food sector especially in the area of fermented dairy products developing texturized properties as a stabilizer agent.

**Keywords:** Kefir grain, kefiran, biopolymer, viscosity, nuclear magnetic resonance

**2014, 74 pages**

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, ilham veren ve karşılaştığım zorluklarda gerek bilgi gerek tecrübesi ile yardımcı ve destek olan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı gerçekleştirmem için her konuda imkan sunan değerli hocalarım Prof. Dr. Zeynep Banu SEYDİM, Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM'e ve literatür araştırmalarımnda yardımcı olan değerli hocam Araş. Gör. Dr. Bilge ERTEKİN ve Araş. Gör. Ece ÇAĞDAŞ'a, laboratuvar çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Gıda Mühendisi Fatih Selim ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Araştırmanın yürütülmesinde yardımlarını gördüğüm Gıda Mühendisi Gözde TOPBAŞ'a, Gıda Mühendisi Özge YÜCEER'e, doktora çalışmalarımı sürdüren Seda KURTULMUŞ ve Hasan Alptuğ AKGÜN'e teşekkür ederim.

3709-YL2-13 No'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı' na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ömer Çağdaş KOÇAK  
ISPARTA, 2014

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Geleneksel kefir üretiminin akım şeması.....   | 10           |
| Şekil 2.2. Kefir danelerinin görünüşü .....   | 11           |
| Şekil 2.3. Laktoz, galaktoz ve glukozun EPS' ye çevrimi.....  | 19           |
| Şekil 2.4. Kefiranın NMR analizi ile kimyasal yapısı .....  | 33           |
| Şekil 2.5. Kefiranın kimyasal yapısı.....   | 34           |
| Şekil 2.6. <i>S. thermophilus</i> EU20' den izole edilen EPS' nin NMR spektrumu   | 37           |
| Şekil 3.1. Deneme planı .....   | 43           |
| Şekil 3.2. Farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir daneleri.....   | 44           |
| Şekil 4.1. Dokuz gün süresince farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir danelerindeki % ağırlık değişimi .....                        | 48           |
| Şekil 4.2. Glukoz için kalibrasyon doğrusu .....  | 50           |
| Şekil 4.3. Galaktoz için kalibrasyon doğrusu .....  | 50           |
| Şekil 4.4. Laktoz için kalibrasyon doğrusu .....  | 50           |
| Şekil 4.5. Farklı karbon kaynaklarından elde edilen kefiran ekstraksiyon miktarları .....   | 51           |
| Şekil 4.6. Farklı karbon kaynakları kullanılarak kefir danelerinden elde edilen EPS yapılarının kayma hızı ve viskozite reogramı.....       | 52           |
| Şekil 4.7. Farklı karbon kaynakları kullanılarak kefir danelerinden elde edilen EPS yapılarının kesme gerilimi ve kayma hızı reogramı ..... | 53           |
| Şekil 4.8. Kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (GKG) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....   | 54           |
| Şekil 4.9. Glikoz ile geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (GLKG) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....                      | 55           |
| Şekil 4.10. Galaktoz ile geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (GLKG) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....                   | 56           |
| Şekil 4.11. Laktoz ile geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (LKG) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....                      | 57           |
| Şekil 4.12. Tüm örneklerden elde edilen kefiran yapıların TFA ortamında alınan <sup>13</sup> C-NMR spektrumları .....                       | 58           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. Dünyada üretilen bazı fermente süt ürünleri .....                                   | 4            |
| Çizelge 2.2. Kefir danesinin mikroflorasını oluşturan mikroorganizmalar..                        | 8            |
| Çizelge 2.3. Kefirin bileşimi .....  | 9            |
| Çizelge 2.4. EPS üretim yeteneğine sahip LAB'leri .....  | 16           |
| Çizelge 2.5. LAB'leri tarafından üretilen HoPS'ler .....   | 17           |
| Çizelge 2.6. Kefir danesinden izole edilen kefiranın <sup>13</sup> C NMR kimyasal kaymaları..... | 32           |
| Çizelge 2.7. Bazı LAB'lerinin ürettikleri EPS miktarları .....                                   | 35           |
| Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynakları kullanılarak elde edilen kefiran miktarları .....          | 50           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|          |   |
|----------|---|
| CKG      | Kontrol grubu kefir danesi  |
| CPS      | Kapsül polisakkarit   |
| DMTA     | Dinamik mekanik termal analiz                                     |
| DSÖ      | Dünya Sağlık Örgütü   |
| EPS      | Ekzopolisakkarit yapı   |
| GAKG     | Galaktozla zenginleştirilmiş sütte geliştirilmiş kefir danesi     |
| GLKG     | Glukozlu zenginleştirilmiş sütte geliştirilmiş kefir danesi       |
| GRAS     | Generally recognized as safe= Genel olarak güvenilir kabul edilen |
| GTÖ      | Gıda ve Tarım Örgütü  |
| HePS     | Heteropolisakkarit  |
| HoPS     | Homopolisakkarit  |
| J        | Jirasyon (Eşleşme) katsayısı                                      |
| L        | Lactobacillus   |
| LAB      | Laktik asit bakterileri   |
| LKG      | Laktozla zenginleştirilmiş sütte geliştirilmiş kefir danesi       |
| LPS      | Lipopolisakkarit  |
| MRS      | De Man, Rogosa and Sharpe   |
| NMR      | Nükleer manyetik rezonans   |
| PAS      | Peynir altı suyu  |
| RF       | Radyo frekansı  |
| SEM      | Scanning Electron Mikroskop=Taramalı elektron mikroskobu          |
| UV       | Ultraviyole   |
| T        | Torulaspore   |
| TGK      | Türk Gıda Kodeksi   |
| $\beta$  | Beta  |
| $\alpha$ | Alfa  |

## 1. GİRİŞ

Geçmişte sütün çabuk bozulabilen bir gıda olduğunu anlayan insanoğlu sütün daha uzun süre bozulmadan kalması amacıyla çeşitli geleneksel fermente süt ürünleri geliştirilmeye çalışmıştır (Farnworth, 2005). Bunun sonucunda bugün tükettiğimiz fermente süt ürünleri olan yoğurt, ayran, dahi, leban, busa, tarag, kefir vb. ürünler elde edilmiştir (Tamime ve Robinson, 1999).

Kefir yüzyıllar öncesine dayanan tarihi ile fermente bir süt ürünüdür. Kefir, diğer fermente süt ürünlerinden farklı olarak kefir danesi kullanılarak üretilen bir üründür. Kefir danesi kefiran olarak isimlendirilen polisakkarit bir yapı içinde laktik asit bakterilerini (LAB), asetik asit bakterilerini, mayaları içeren kompleks bir yapıdır. Süte kefir danelerinin ilavesiyle laktik-maya fermantasyonu sonucunda kefir oluşmaktadır (Güzel-Seydim vd., 2000a). Kefirin sağlık üzerine etkisini inceleyen pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu kompleks yapının içeriği sağlık açısından probiyotik ve prebiyotik özelliği, kolesterol düşürücü, antikanserojenik ve antimutajenik özelliği, bağışıklık ve sindirim sistemi üzerinde destekleyici etkileri olduğu uluslar arası düzeyde yapılan birçok araştırma makalelerinde belirtilmektedir (Thoreux ve Schmucker, 2001; Furukawa vd., 1992; Furukawa vd., 1996; Santos vd., 2003; Vinderola vd., 2005; Liu vd., 2006; Shiomi vd., 1982; Murofushi vd., 1983; Furukawa vd., 1993; Furukawa vd., 2000; Çevikbaş vd., 1994; Liu vd., 2002; Guzel-Seydim vd., 2006; Hertzler ve Clancy, 2003; Rodrigues, 2005; Guzel-Seydim vd., 2011)

Ayrıca bu mikroflorayı birarada tutan polisakkarit yapı üzerine de pek çok çalışma bulunmaktadır. Son yıllarda bakteriyel polisakkarit yapılara endüstriyel uygulamada talep artmaktadır. Dolayısıyla mikroorganizmaların ürettiği ekzopolisakkarit (EPS) üretimine olan ilgi de artmıştır. EPS'ler gıda endüstrisinde kıvam artırıcı, pıhtı azaltıcı olarak kullanılmaktadır ve tıp/ biyokimya alanında ise tümör oluşumunu engelleyici, bağışıklık sistemini destekleyici, makrofaj ve lenfosit aktive edici, kan kolesterolünü düşürücü özellikleri de bulunmaktadır (Karaca vd., 2010; Lin ve Chien 2007). Pek çok

mikroorganizma ekstraselüler polisakkarit sentezleme yeteneğine sahiptir. Bakteriler tarafından üretilen EPS'ler eşsiz fiziksel özelliklere sahip suda çözünebilir gamlar olarak bilinmektedir. Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS gıda, ilaç ve diğer endüstriyel alanlarda geniş kapsamlı uygulamalarda kullanılmaktadır (Mıdık, 2011).

Kefir danesi doğal bir bakteriyel polisakkarit yapıdan oluşan doğal bir biyopolimerdir. Kefir danesine özgü başlıca bakteriyel polisakkarite "kefiran" denir. Kefiran D-glukoz ve D-galaktoz içerir. Kefiran, suda çözünebilir glukogalaktan yapıdadır. Yapılan çeşitli araştırmalara göre antibakteriyel ve antitümör aktivitesinin olduğu, bağırsak bağışıklık sistemini teşvik ettiği ve *Bacillus cereus*'a karşı epitel hücreleri koruduğu tespit edilmiştir (Yokoi vd., 1991; Murifushi vd., 1983; Maeda vd., 2004; Rodrigues vd., 2005; Vinderola vd., 2006; Medrano vd., 2008). Kefir danesinde bulunan ve özellikle EPS üretme yeteneğinde olan başlıca mikroorganizmalar *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. kefir*, *L. kefirgranum* ve *L. parakefir* bakteri türleridir (Kooiman, 1968; Kandler, 1983; Fujisawa, 1988; Yokoi vd., 1991; Takizawa vd., 1994; Cheirsilp vd., 2003; Wang vd., 2008).

Bakteriyel polisakkarit oluşumları sıcaklık, pH, uygun karbon kaynakları, fermentasyon zamanı ve birbirleri arasındaki sinerjik ilişkilerden etkilenmektedir (De Vuyst ve Degeest, 1999; Petry vd., 2000; Mozzi vd., 2001), pek çok bakteri türü veya suşu gibi *Lactobacillus casei* CRL 87'nin polimer üretimi için, EPS sentezini düzenleyen biosentetik enzim aktivitesinin arttığını ve EPS üretimini farklı şeker kaynaklarının (glukoz ve galaktoz) etkilediğini belirtmektedir.

Kefir danesi mikroflorasında EPS üretimi gerçekleştiren pek çok mikroorganizma bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar farklı karbon kaynaklarını kullanma yeteneğindedirler. Mikroorganizmalar kullandıkları karbon kaynaklarına göre farklı yapıda EPS üretirler.

Tezin amacı farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir danelerinin üretmiş olduğu toplam polisakkarit yapıdaki değişimin belirlenmesidir.

Bu tezde kefir danesinde bulunan bakteriyel polisakkarit yapının üretimini teşvik etmek amacıyla farklı karbon kaynakları kullanılmış ve değişimler tespit edilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Fermente Süt Ürünleri

Süt, insanlar ve hayvanlar için önemli bir gıda ve mükemmel bir besin kaynağıdır. Eski zamanlarda soğutma teknolojisi gelişmediği için çabuk bozulan sütün daha uzun süre muhafaza edilebilmesi amacıyla fermente süt ürünleri üretilmiştir (Guzel-Seydim vd., 2010a).

Fermente süt ürünleri çoğunlukla Orta Asya kökenli olup zaman içerisinde Avrupa'ya ve tüm dünyaya yayılmışlardır. Avrupa ve İskandinav ülkeleri de fermente süt ürünleri tüketiminde önemli bir geçmişe sahiptir (Farnworth, 2005).

Fermentasyon sonucu üretilen metabolik ürünler ve aroma bileşenleri süt çeşidine ve baskın mikroorganizma grubuna bağlı değişmektedir (Robinson ve Tamime, 1990). Sütte bulunan besin maddelerini kullanan mikroorganizmalar, temel metabolik faaliyetleri sonucunda çeşitli metabolitler oluşturmaktadır. Böylece farklı mikrobiyolojik, kimyasal, duyuşsal ve tekstürel özelliklere sahip fermente süt ürünleri elde edilmektedir.

Her fermente süt ürünü için ürüne ait spesifik mikroorganizmaların gelişebilmesi için uygun koşullar gerekmektedir. Dünyada üretilen bazı fermente süt ürünleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Dünyada üretilen bazı fermente süt ürünleri (Tamime ve Robinson, 1999)

| Geleneksel İsim | Ülke           |
|-----------------|----------------|
| Yoğurt, Ayran   | Türkiye        |
| Busa            | Türkistan      |
| Leban/Laban     | Balkan Dağları |
| Zabayd/ Zabade  | Mısır ve Sudan |
| Mast/Dough      | Irak           |
| Dahi/Dahee      | Hindistan      |
| Mazun/Matsoon   | Ermenistan     |

Çizelge 2.1. Dünyada üretilen bazı fermente süt ürünleri (Devamı)

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| Tarag                              | Moğolistan      |
| Shosim/ Sho                        | Nepal           |
| Gruzovina                          | Yugoslavya      |
| Viili                              | Finlandiya      |
| Mezzoradu                          | Sicilya         |
| Cieddu                             | İtalya          |
| Katyk                              | Kafkasya        |
| Donskaya                           | Rusya           |
| Yoghurt/yourt/yogur/yaort/yaghourt | Farklı bölgeler |

Fermente süt ürünleri üç farklı tipte sınıflandırılmıştır (Tamime ve Robinson, 1999):

1- Laktik asit fermantasyonu ile elde edilen süt ürünleri: Buttermilk, tafil, filmjök (mezofilikler), yoğurt, zabadi, labneh, ayran, chakka (termofilikler), bioyoğurt, yakult, asidofilus sütü, biogarde, dahi (terapotik).

2- Alkol-laktik asit fermantasyonu ile elde edilen süt ürünleri: Kefir, kımız, asidofilus, maya sütü.

3- Küf-laktik asit fermantasyonu ile elde edilen süt ürünleri: Villi.

## 2.2.Kefir Tarihi

Doğanın mucizesi olan Kefir ve yoğurdun doğuş noktası Kafkasya-Kuzey Kafkasya bölgesinde bulunan Elburz Dağıdır. Türkçe dilinden türetilen kefir, ilk olarak “keyif veren, memnun eden” anlamında olan “kef”; yoğurt ise ilk olarak “yogurut” olarak kullanılmaktaydı (Tamime, 1995).

Kafkasya; coğrafi olarak Kuzey Kafkasya halkları ve Güney Kafkasya halkları olarak adlandırılır. Etnik açıdan, özellikle dil açısından da Kafkasya yerlileri, Hint-Avrupa kökenliler ve Türk asıllı halklar biçiminde üç öbeğe ayrılırlar., Kafkasya'da yaşayan Türk halkları; Ahıska Türkleri (Osmanlı Türkleri), Azeriler, Balkarlar, Karaçaylar, Kumuklar, Nogaylar, Gürcistan Kıpçakları olarak belirtilmektedir. Karaçay-Malkar Türkleri ise; kafkas dağlarının en yüksek

zirvesi Elbruz (Mingi Tav) ve çevresindeki yüksek dağlık arazide yaşayan Karaçay-Malkarlılar, tarih boyunca Kafkasya'da hâkimiyet kuran Kimmer, İskit, Hun, Bulgar, Alan, Hazar, Kıpçak gibi proto-Türk ve eski Türk kavimleri ile çeşitli Kafkas halklarının etnik ve sosyo-kültürel bütünleşmesinden ortaya çıkmış bir Kafkasya halkıdır (Tavkul, 2002).

Kefir, 21. yüzyılın yoğurdu olarak tanımlanır (Frengova vd., 2002). Ancak kefir danesi ya da kefirin ilk olarak ne zaman bulunduğu bilinmemektedir. Kefir, kefir daneleri kullanılarak üretilen bir fermente üründür. Bu fermente ürünün farklılığı danelerin süzülerek tekrar kullanılmasıdır. Kefir danelerinin oluşumu ile ilgili çeşitli görüşler bulunmaktadır. Kefir daneleri ilk olarak keçi tulumu içinde inek sütünün şirden ile pıhtılaştırılarak tulumun iç yüzeyinde birkaç hafta içinde süngerimsi bir yapının oluşması, bu yapının o bölgeden alınarak kullanıldığı ve daha sonra inkübasyon için bu yapının kullanılması ile kefir elde edildiği bildirilmiştir (Stepaniak ve Fetlinski, 2002).

Kefir danelerinin süte ilavesiyle fermantasyon sonucu kefir üretilir. Asidik, CO<sub>2</sub> içeren, hafif alkollü bir tada sahiptir. Kefir danelerindeki bakteri ve mayaların farklı türlerinin metabolik aktiviteleriyle oluşur. Diğer fermente süt ürünlerinde yalnızca LAB'nin metabolik aktiviteleri söz konusudur. Bu yönüyle diğer fermente süt ürünlerinden farklılık göstermektedir. Gerçek kefir organoleptik özelliklerini laktik asit ve alkol fermantasyonuna borçludur ve hissedilir düzeyde CO<sub>2</sub> içererek ferahlatıcı özelliği bulunan bir içecektir (Güzel-Seydim vd., 2000a).

### **2.3. Kefir Danesinin Mikroflorası**

Kefir daneleri; mezofilik laktokoklar ile homofermentatif ve heterofermantatif termofilik laktobasilleri kapsayan LAB, asetik asit bakterilerini ve mayaları içeren kompleks bir mikrofloraya sahiptir (Tamime ve Marshall, 1997; Wouters vd., 2002). Asetik asit bakterileri İspanyol kefirlerinde bir kontaminant olarak kabul edilirken, başka bir araştırmada *Acetobacter aceti* ve *A. rasens*'in kefirin

tat, aroma ve konsistansi üzerine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (Tamime ve Marshall, 1997).

Kefir danelerinin dış yüzeylerinde laktobasillerin hakim florayı oluşturduğu, dane merkezine doğru ise mikrofloranın büyük bölümünü mayaların oluşturduğu bildirilmiştir (Wouters vd., 2002). Türk kefir danelerindeki LAB/maya oranı  $10^6/10^9$  olarak belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelendiğinde, maya kolonizasyonu kefir danelerinin yüzeyinde ve orta kısımlarında gözlemlenmiştir. Mayaların aerobik olmalarından dolayı dane yüzeylerinde yoğunlaşmaları beklenen bir sonuçtur. Kısa, uzun ve kıvrık laktobasiller danede hakim mikroflora olarak gözlenmiştir. Laktokoklar mikrobiyal sayımlarda tespit edilmesine karşın SEM de gözlenememiştir; bunun nedeninin SEM öncesi uygulanan işlemler esnasındaki kayıplar olduğu düşünülmüştür (Güzel-Seydim vd., 2005a).

Simova vd. (2002), kefir danelerindeki mikrofloranın %83-90'nı LAB'ın oluşturduğunu, laktobasiller içerisinde ise termofilik homofermantatif türler *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus helveticus*'un hakim olduğunu bildirmişlerdir. Kefir danelerindeki hakim maya türleri *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces delbrueckii*'dir. Mayalar mikroorganizmalar arasındaki simbiyoz ilişkisinin sağlanmasında, CO<sub>2</sub> üretiminde ve karakteristik tat ve aroma gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Wouters vd., 2002). Çizelge 2.2'de kefir danesinin mikroflorasını oluşturan bakteri ve mayalar sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Kefir danesinin mikroflorasını oluşturan mikroorganizmalar  
(Simova vd., 2002; Wouters vd.,2002)

| Laktobasiller<br>(10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> )  | Koklar<br>10 <sup>6</sup>   | Asetik asit bakterileri<br>10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>           |
|---|---|---|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Lactobacillus delbrueckii</i><br>subsp. <i>bulgaricus</i><br><i>Lactobacillus helveticus</i><br><i>Lactobacillus lactis</i><br><i>Lactobacillus casei</i><br><i>Lactobacillus brevis</i><br><i>Lactobacillus buchneri</i><br><i>Lactobacillus kefiranofaciens</i><br><i>Lactobacillus fermentum</i><br><i>Lactobacillus parakefiri</i> | <i>Streptococcus lactis</i><br><br><i>Streptococcus lactis</i><br>subsp. <i>cremoris</i><br><br><i>Streptococcus lactis</i><br>subsp. <i>diacerylactis</i><br><br><i>Streptococcus durans</i> | <br><br><br><i>Acetobacter aceti</i><br><br><i>Acetobacter rasens</i> |
| Mayalar<br>10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>   | Leukonostoklar  |   |
| <i>Candida kefir</i><br><i>Candida pseudotropicalis</i><br><i>Kluyveromyces marxianus</i><br><i>Kluyveromyces bulgaricus</i><br><i>Saccharomyces unisporus</i><br><i>Saccharomyces exiguus</i><br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><i>Candida tenuis</i><br><i>Candida kefir</i><br><i>Issatchenkia orientalis</i><br><i>Torulaspota delbrueckii</i><br><i>T. kefiri</i>    | <br><br><br><i>Leuconostoc kefir</i><br><br><i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.<br><i>dextranicum</i>   |   |

Garrote vd. (1998), 1, 10, 20, 50 ve 100 g/L<sup>-1</sup> oranlarında kefir danesi kullanarak ve 20 °C'de 48 saat inkübasyon koşullarıyla yapılan araştırmada 100 g/L oranında inokülasyonla asitliğin en hızlı geliştiğini ve laktokok içeriğinin en yüksek düzeyde olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca 1, 10, 20, 50 ve 100 g/ L<sup>-1</sup> kefir danesi ile üretilen kefirlerin viskozite değerleri sırasıyla; 9,5; 29,4; 24,0; 27,0 ve 12,7 mPas olarak tespit edilmiştir.

Irigoyen vd. (2005) %1 ve %5 kefir dane inokülasyon oranları kullanarak 25 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası iki üründe de mikrobiyal içeriklerinin LAB haricinde önemli seviyede değişmediğini bulmuştur. Vizkozite değerleri %1

kefir dane ile üretilen kefirde 425-188 mPas, %5 kefir dane ile üretilen kefirde ise 501-327 mPas olarak tespit edilmiştir.

## 2.4. Kefir Üretimi

Kefirin ticari üretimi genellikle inek sütünden yapılmakla birlikte keçi, koyun ve deve sütleri de kullanılabilen; bunun yanında hindistan cevizi, pirinç ve soya sütünden de kefir üretilmektedir (Mann, 1985; Ötles ve Çağındı, 2003; Powell, 2006).

Yoğurt, ayran, labneh ve yakult gibi fermente sütü ürünleri prokaryotik mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilirken; kefir, kıymız gibi fermente süt ürünleri ökaryotik ve prokaryotik mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (Seydim, 2001).

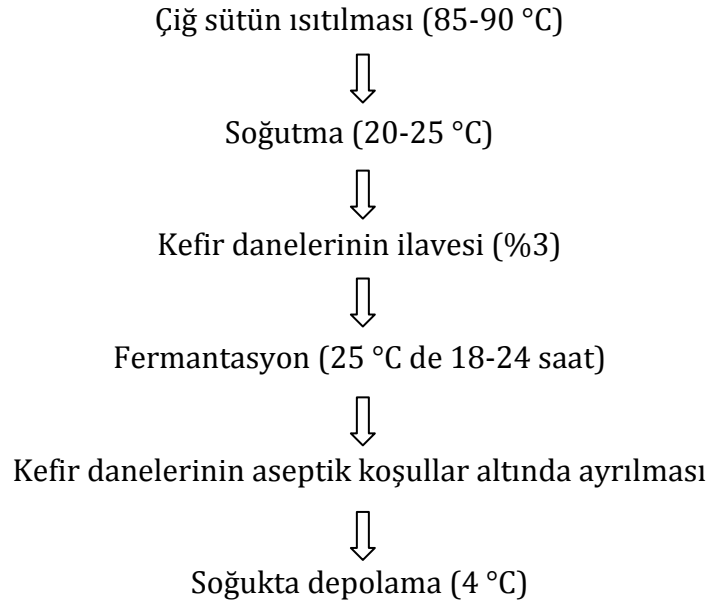
Gıda Tarım Örgütü (GTÖ) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından oluşturulan Codex Alimentarius'da kefir daneleri, *Lactobacillus kefiri* ve *Leuconostoc, Lactococcus* ve *Acetobacter* cinsinin türlerinden oluşan güçlü, özel bir ilişkide gelişerek hazırlanan starter kültür olarak tanımlanmıştır. Codex Alimentarius'a göre kefirin bileşimi Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kefirin Bileşimi (<http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>)

| BİLEŞEN                                | MİKTAR (minimum)    |
|--|---------------------|
| Süt proteini (%w/w)                    | 2,7                 |
| Süt yağı (%m/m)                        | <10                 |
| Titrasyon asitliği (%laktik asit,%m/m) | 0.6                 |
| İçerdiği toplam bakteri (kob/ml)       | Min 10 <sup>7</sup> |
| Maya (kob/ml)                          | 10 <sup>4</sup>     |

Kefir üretimi geleneksel olarak evlerde yaygın olarak yapılmaktadır. Evde geleneksel olarak kefir yapımında süt kaynatıldıktan sonra yaklaşık 25°C'ye soğutulan süte yaklaşık %3 kadar kefir danesi ilave edilmektedir. Oda sıcaklığında fermentasyon sonrası süt 18-24 saat sonra pıhtılaşarak kefir oluşur.

Steril şartlar altında sütün daneler ayrılır. Kefirin geleneksel üretim akım şeması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Geleneksel kefir üretiminin akım şeması

## 2.5. Kefirin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kefir danelerinin coğrafik dağılımı, farklı ülkelerde hatta aynı ülkede farklı bölgelerde üretilen kefirde çeşitli farklılıklara neden olabilmektedir. Dolayısıyla kefir danelerinden üretilen kefirlerin duyuşal özellikleri, kefir danelerinin elde edildiği kaynağa, üretim yöntemlerine, içerdiği mikrobiyal çeşitliliğe, süt bileşenlerine ve benzeri faktörlere bağımlı olarak farklılık göstermektedir (Güzel-Seydim vd., 2000a).

Fermantasyon süresince homofermantatif laktik streptokoklar hızla gelişerek laktik asit oluşur ve asitlik azalır. Streptokok cinsi bakteri sayılarının azalmasına sebep olur. Heterofermantatif LAB aroma oluşumunu teşvik eder. Fermantasyon süresince aroma maddelerinin oluşumunda LAB gelişiminin etkisi maya ve asetik asit bakterilerine oranla daha fazladır (Koroleva, 1982). Fermantasyonun en önemli son ürünleri laktik asit, asetaldehit, asetoin, diasetil, etanol ve karbondioksittir. Kefirin bileşiminde %1 kadar laktik asit (Marshall ve Cole, 1985; Karagözlü, 1990) ve %0.5-2.0 düzeyinde etil alkol bulunmaktadır

(Marshall ve Cole, 1985; Duitschaever vd., 1987, Wszolek vd., 2001). İçerdiği CO<sub>2</sub> nedeniyle köpüren bir yapıya sahip olan kefirin (Marshall ve Cole, 1985; Duitschaever vd., 1987; Karagözlü, 1990) pH'sı yaklaşık 4 civarındadır (Duitschaever vd., 1987). Karbondioksit kefirin eşsiz ferahlatıcı özelliğine katkıda bulunmaktadır. Laktik asit hafif ekşimsi tadı oluşturur, onun etanol ve diğer lezzet ürünleri ile karışımı kefirin egzotik, farklı tat ve aromasını meydana getirir (Marshall, 1984; Güzel-Seydim vd., 2000a).

## 2.6. Kefir Danesi

Kefir daneleri minyatür karnabahara veya patlamış mısıra benzeyen küçük, 3-20 mm çapında, düzensiz şekilli, sarımsı beyaz renktedirler (şekil 2.2). Kefir danesi, LAB'ni, asetik asit bakterilerini mayaları ve kefiran polisakkaritini içeren ađ yapısıyla oluşmaktadır (Güzel-Seydim vd., 2000a).



şekil 2.2. Kefir danelerinin görünüşü  
(Ömer ağdaş KOÇAK tarafından fotoğraflanmıştır.)

Kefir danelerinin mikrobiyal içeriğiyle ilgili ilk çalışmalarda ışık mikroskopundan faydalanılmış, ilerleyen teknolojiyle yapılan araştırmalarda elektron mikroskobu kullanılmıştır (Bottazzi ve Bianchi, 1980; Molska vd., 1980; Marshall vd., 1984; Duitschaever vd., 1988b; Toba vd., 1990; Neve, 1992; Bottazzi vd., 1994; Rea vd., 1996; Guzel-Seydim vd., 2005).

Kefir daneleri, elastiki olmalı, yapışkan ve yumuşak olmamalıdır. Kefir danesi, bakteri ve mayaların içine yerleştiği kefiran olarak isimlendirilen polisakkarit

matriksten meydana gelir. Kefiranın LAB ve mayalarla olan simbiyotik ilişkileri kefire eşsiz özellik kazandırır. *Lactobacillus kefir*'in kefiran üretiminden sorumlu olduğu bildirilirken diğer araştırmacılar bu bakterilerin kefiran üretmediğini bildirmişler. Diğer yazarlar ise başlıca kefiran üreticisinin *Lactobacillus kefiranifaciens* olduğunu bildirmişlerdir. Böylelikle kefir danesindeki kefiran üretiminden sorumlu mikroorganizma hakkında kesin karara varılamamakla beraber kefirin danesinin karakteristik mikroorganizması olan *L. kefiranofaciens* başlıca üreticisi olarak düşünülmektedir (Frengova vd., 2002; Guzel-Seydim, 2000a).

## **2.7. EPS ve Kefiran**

### **2.7.1. EPS üretimi**

Mikrobiyal polisakkaritler, ilk kez 19. Yüzyıl ortalarında Louis Pasteur tarafından ortaya konulmuş, şarapta bulunan dekstran, mikrobiyal bir ürün olarak keşfedilmiştir. Van Tiegham tarafından, dekstran oluşumunda *Leuconostoc mesenteroides* bakterisinin sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bu keşfi, 1886 yılında, bakteri tarafından selüloz üretildiğinin bulunması takip etmiştir. Bu EPS'lerin keşfinden çok kısa bir zaman sonra, ilk intraselüler depo polimer keşfedilmiştir. İntraselüler depo polimerlere siyanobakterlerin ürettiği siyanofisin ve kırk yıl sonra da *Bacillus megaterium* tarafından üretilen polihidroksibutirat örnek olarak verilmektedir. Yirminci yüzyıl başından ortasına kadar endüstriyel ve medikal olarak önde gelen alginat, ksantan ve polifosfat gibi diğer bakteriyel polimerler bulunmuştur. Bu çeşitli biyopolimerlerin keşfinden kısa süre sonra, biyosentez enzimlerinin aktiviteleri tanımlanmış ve öncü maddeler kullanılarak, biyopolimer oluşumu için metabolik yollar hakkında bazı bilgiler açığa kavuşturulmuştur (Rehm, 2010).

Polisakkarit üretim yeteneği, özellikle prokaryotlar olmak üzere, mikrobiyal türler arasında yaygın olarak bulunmaktadır. Çok sayıda bakteriyel polisakkarit bu potansiyele sahiptir, fakat bakteriyel polisakkaritlerin oldukça az bir kısmı ticari ürün olarak benimsenmiştir. Bu durumun nedenleri; bakterilerin

patojenik olabilmesi, EPS üretim masraflarının çok yüksek olması, üretim verimliliğinin düşük olması, muhafazasının zor olması ya da ruhsatlandırılması konusundaki sorunlardır. Tüm bu nedenlerle birlikte, en yaygın neden hala yeterli piyasa talebinin olmamasıdır. EPS üretimi için *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes* cinslerinin üyesi suşlar kullanılmaktadır (Sutherland, 2001; Bejar vd., 1998).

1878 yılında, şeker pancarında ve şeker kamışı şurubunda kıvamlaşma ve jelleşmeden sorumlu olan *Leuconostoc mesenteroides* bulunmuştur. Gıda ürünlerinde kullanımına izin verilen ilk mikrobiyal polisakkarit ise *Xanthomonas campestris* tarafından üretilen ksantandır. Ksantan, 1969 yılında US Food and Drug Administration tarafından onaylanmıştır. *Saccharomyces elodea* tarafından üretilen gellan da son zamanlarda ticarileşmiştir. Genel olarak güvenilir kabul edilen (GRAS) bakterilerden olan LAB'de yeni nesil biyokıvamlaştırıcıları oluşturmaktadır (De Vuyst ve Deegest, 1999).

Endüstriyel olarak önemli mikrobiyal EPS'lere örnek olarak; dekstran, ksantan, gellan, pullulan ve alginat örnek verilebilir. Bakteriyel polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemelerde ortaya konulmuştur. Ancak, EPS'lerin varlığı sadece virulent karakterli bakterilere özgü değildir. LAB'leri gıdalarda güvenilir olarak kullanılabilen mikroorganizmalardır ve tüm dünyada süt, et ve sebze gibi pek çok çeşit ürünün korunması, duyuşal özellikleri ve beslenme değerini geliştirmek için kullanılmaktadır. LAB'leri hücrelerin tutunması ve korunması için çok çeşitli EPS yapılar üretmektedir. Endüstride, bugüne kadar EPS'lerin fizikokimyasal özellikleri ile ilgilenilirken, bugünlerde beslenme ve sağlık uygulamalarındaki potansiyelleri üzerine ilgi artmaktadır (Mıdık, 2011).

Mikroorganizmaların hücre duvarının dışına salgılanan polisakkarit yapıya "EPS" adı verilir. Ökaryotlar ve prokaryotlar tarafından üretilen EPS'lerin kompozisyonlarındaki farklılık pentoz şekerlerinin varlığıdır. Ökaryotik polisakkaritler D-riboz veya D-ksiloz gibi pentozları içerebilirler, fakat prokaryotlar tarafından üretilen ekstraselüler polisakkaritlerde bu pentozların oluşumu yaygın değildir (Badel vd., 2011).

Biyolojik kıvamlılaştırıcılara alternatif bir grup da mikrobiyal EPS'lerdir (De Vuyst ve Deegest 1999). Mikrobiyal polisakkaritler suda çözünebilen, iyonik veya iyonik olmayan biyopolimerlerdir. Tekrarlanan üniteleri glikozit bağları ile birleştirilmiş, düzenli, dallanmış veya dallanmamış yapıdadırlar (Kumar vd., 2007).

Mikrobiyal polisakkaritler, akışkan özelliğe sahiptirler. Mikrobiyal polisakkaritler genel olarak çoğunlukla monosakkaritlerden; D-glukoz, D-galaktoz, D-mannoz, L-fruktoz ve L-ramnoz ve genellikle, N-asetil hekzozamin, N-asetil-D-glikozamin ve N-asetil-D-galaktoz içermektedir. Bu polisakkaritler, diğer bileşenler ile beraber hücre duvarında (LPS), kapsül halinde hücrelere bağlanmış (CPS) veya hücre dışına salgılanmış (EPS) halde bulunurlar. Mikrobiyal polisakkaritlerde bunların dışında birçok şeker bulunduğu yapılan yeni çalışmalarla belirlenmektedir (Demir, 2007).

Mikrobiyal polisakkaritlerin gıda katkı maddesi olarak kullanılması için izin verilmesi gıdanın nerede üretildiğine ve nerede satıldığına bağlıdır. Ksantan gam, jellan gam, kurdlan ve pullulan Birleşik Devletler'de GRAS olarak belirlenmiştir. Belirtilen gıda katkıları, Kore Gıda Katkıları Kodu ve Codex Alimentarius Genel Standartları'nda da izin verilenler listesinde yer almaktadır. Avrupa Birliği'nde ksantan, gellan ve pullulan gamlarına izin verilmekteyken, Kanada, Avusturalya ve Yeni Zellanda yürürlükteki gıda yönetmeliklerinde sadece ksantan ve gellan gamlarına izin verilmektedir. Japonya gıda yönetmeliklerinde, Birleşik Devletler'de izin verilmiş bu dört mikrobiyal polisakkaritin yanında agrobakteri suksinoglikan, levan ve basillus natto, makrofomopsis, rhamsan, sklero ve welan gamlarının kullanımlarına da izin verilmektedir (Auld, 2010).

Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi (TGK) Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde ksantan gam E415, jellan gam E418, Pullulan E1204 kodu ile isimlendirilmiştir. Gıdalarda kullanılabilecek maksimum miktarı (qantum satis) belirlenmemiştir. Ancak jelatinli mini küplerde ve yenilmesi sırasında tekrar sulandırılacak olan

suyu alınmış gıdaların üretiminde kullanılmadığı belirtilmiştir. TKG Kodeksi “Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği”nde tanımlanan reçel, jöle, marmelat ve tatlandırılmış kestane püresinde ksantan gam ve jellan gam maksimum miktarı 10.000 mgL<sup>-1</sup> (veya mg/kg)'dır. TKG “Bal Tebliği”nde ise ksantan gam ve jellan gam maksimum miktarı belirlenmemiştir. Enzim preparatlarındaki maksimum miktarları, son üründe maksimum miktarları (içecekler hariç), içeceklerde maksimum miktarları için bir sınır belirlenmemiştir.

Son yıllarda, GRAS LAB tarafından üretilen EPS olan ilgi artmaktadır (De Vuyst ve Marshall, 2001). EPS genel terimi Sutherland (1972) tarafından önerilmiş olup, hücre duvarı dışında bulunan bütün bakteriyel polisakkarit yapıları için kullanılmaktadır. EPS, tekrar eden şeker ve şeker türevi ünitelerinin dallanmış, uzun zincirli polisakkaritlerden oluşmaktadır. Bu şeker birimleri farklı oranlarda bulunan, çoğunlukla glukoz olmak üzere galaktoz ve ramnozdur (Welman ve Maddox, 2003). Bunun yanında az miktarda fruktoz, mannoz ve galaktozaminden oluşmaktadır (Yang, 2000).

EPS'ler dallanmış tekrarlı şeker birimlerini ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Çeşitli mikroorganizmalardan EPS elde edilmektedir ve büyük çoğunluğunu LAB'leri grubu oluşturmaktadır. Farklı LAB'lerinden üretilen EPS'lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlikleri, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunlukları, şeker içerikleri, polimer dallanmaları, proteinlerle ilişkileri de birbirinden farklıdır (Badel vd., 2011, Welman vd., 2003). Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen EPS'ler homopolisakkaritler (HoPS) ve heteropolisakkaritler (HePS) olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadırlar. HoPS bir tip monosakkaritin tekrarlanan birimlerini içermekte olup glukoz ve fruktoz olmak üzere 2 büyük gruba ayrılmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides* gibi bazı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. HePS ise oligosakkaritlerin çoklu kopyalarından yapılmış olup her bir tekrarlı birimde iki ya da daha farklı monosakkarit içermekte ve *L. lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*,

*Streptococcus thermophilus* gibi birçok LAB tarafından üretilmektedirler (Karaca vd., 2010).

### 2.7.2. EPS çeşitleri

EPS, salgılanan iki tür polisakkarit türünü tanımlamak için kullanılmaktadır. Birinci tür mikroskobik olarak tanımlanmış hücre duvarına kovalent bağlarla (genelde fosfodiester veya lipit bağlı) kapsül halinde iken (kapsüller polisakkaritler, CPS, K-antigenleri), ikinci tür ise gevşek serbest bir materyal şeklinde olup, sırasıyla, kapsüller ve yapışkan (slime) EPS olarak adlandırılmaktadırlar. Bunlara ek olarak, hücre duvarı bileşeni olan polisakkaritler de mevcuttur. Hücre duvarı bileşeni polisakkaritleri ve kapsüller polisakkaritler, genellikle, üretici bakterilerin patojenitesini belirlemektedir. EPS' lerin gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Ancak LAB gibi GRAS mikroorganizmalardaki kapsüller ve yapışkan EPS' ler, üretiminde rol aldıkları gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadır. Bazı türler iki EPS çeşidini de üretirken, bazıları sadece tek çeşit EPS üretmektedir (De Vuyst ve Deegest 1999; Deegest vd. 2001; Tok, 2007). EPS üreten LAB' den *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* cinsleri Çizelge 2.4 ' de verilmiştir.

Çizelge 2.4. EPS üretim yeteneğine sahip LAB' leri (Hayaloğlu ve Erginkaya, 2001)

| <b>Lactobacillus cinsi</b>   | <b>Streptococcus Cinsi</b>                        |
|--|---|
| <i>Lactobacillus hilgardii</i>   | <i>Streptococcus mutans</i>                       |
| <i>Lactobacillus casei</i>   | <i>Streptococcus sobrimus</i>                     |
| <i>Lactobacillus helveticus</i>  | <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> |
| <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i><br><i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | -   |
| <b>Lactococcus Cinsi</b>   | <b>Leuconostoc Cinsi</b>                          |
| <i>Lactococcus lactis ssp. Lactis</i>  | <i>Leuconostoc mesenteriodes ssp. cremoris</i>    |

LAB tarafından üretilen EPS, HoPS ve HePS olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır. HoPS tek tip monosakkaritlerden (D-glukopiranoz ve D-

fruktofuranoz) oluşmaktadır. HoPS'e selüloz, dekstran, pullulan, levan ve kurdan polisakkaritleri örnek olarak verilebilir (Sutherland 1972). Genellikle HoPS moleküler ağırlıkları  $4.0 \times 10^4$  ile  $6.0 \times 10^6$  Da aralığındadır. *Lactobacillus* suşları tarafından salgılanan monosakkarit olarak glukoz ve fruktoz içeren HoPS, sırasıyla, glukanlar ve fruktanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.5). Bu 2 alt familya spesifik bağlanma tipleri, moleküler ağırlık, uzunluk ve kimyasal yapısına göre çok çeşitli polisakkaritler içermektedir (Badel vd., 2011).

Çizelge 2.5. LAB' leri tarafından üretilen HoPS 'ler (Ruas-Madeido vd., 2002)

| EPS                     | LAB  |
|-------------------------|--|
| <b>alfa-D-glukanlar</b> |  |
| Dekstran                | <i>Leuconostoc mesenteriodes</i> ssp. <i>mesenteriodes</i><br><i>Leuconostoc mesenteriodes</i> ssp. <i>dextranicum</i> |
| Mutan                   | <i>Streptococcus mutans</i><br><i>Streptococcus sobrimus</i>   |
| Alternan                | <i>Leuconostoc mesenteriodes</i>   |
| <b>Beta-D-glukanlar</b> | <i>Pediococcus</i> spp.<br><i>Streptococcus</i> spp.   |
| <b>Fruktanlar</b>       |  |
| Levanlar                | <i>Streptococcus salivarius</i>  |
| İnülin benzerleri       | <i>Streptococcus mutans</i>  |
| <b>Poligalaktanlar</b>  | <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> H414  |

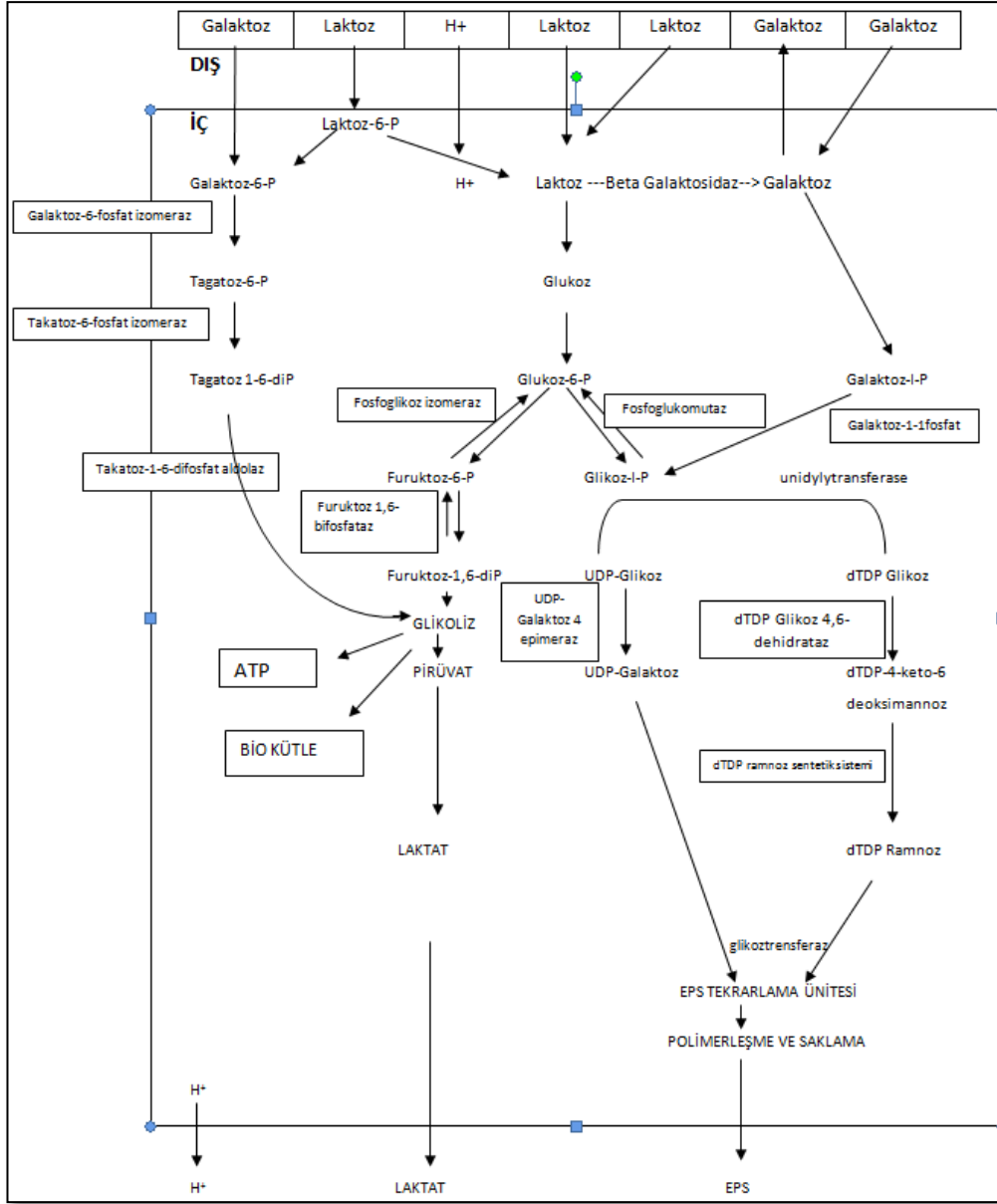
HePS tekrar eden alt birimleri temelde, dallanmış (C2, C3, C4 veya C6 pozisyonlarından) veya dallanmamış, üç-sekiz monosakkarit, monosakkarit türevleri veya monosakkarit ikamelerinden meydana gelmektedir. Doco vd., *Streptococcus thermophilus* tarafından üretilen, HePS' in tekrar eden ünite yapısı ilk kez 1990 yılında belirlemişlerdir (De Vuyst vd., 2001). HoPS ile kıyaslandığında LAB HePS' leri çok daha az miktarlarda (60 ile  $400 \text{ mgL}^{-1}$ ) üretilmektedir (Yang, 2000). HePS' e gellan ve ksantan polisakkaritleri örnek olarak verilebilir. HePS' ler bir oligosakkaritin çok sayıda kopyasından oluşmaktadır. Oligosakkaritler, üç ile yedi birimden oluşmakta olup iki veya daha fazla farklı monosakkarit çeşitlerine sahiptir ve çoğunlukla farklı bağlanma modelleri göstermektedir (Laws vd., 2001).

### 2.7.3. EPS biyosentezi

Bakteriyel EPS biyosentezi komplekstir ve çok sayıda gen yapısının birlikte hareket etmesini içermektedir. EPS sentezi için gerekli enzimler ve düzenleyici proteinler *Lactococcus* gibi mezofilik LAB suşlarının plazmid kaynaklı genleri ve *Streptococcus*, *Lactobacillus* gibi termofilik suşların kromozoma dayalı genleri tarafından kodlanmaktadır. LAB suşlarının EPS üretebilme yeteneği kararsız olarak kabul edilmiştir. Mezofilik LAB suşları için, EPS sentezinin kararsız yapısı bağlı plazmitte olan EPS sentezi genleri ile bağıntılıdır. Termofilik LAB suşlarının EPS üretim karakterinin kaybolmasının, genetik değişkenliklerden kaynaklı kopmalar ve yeniden düzenlemelerden dolayı oluştuğu ileri sürülmektedir. EPS özel gen ürünlerine ilaveten, biyosentetik izyolu şeker nükleotidlerinin hazırlanmasında olduğu gibi gerekli birtakım referans enzimlerine dayanmaktadır (Laws vd., 2001). Şekil 2.3' te laktoz, galaktoz ve glukozun EPS' ye çevrimi gösterilmiştir.

Biyosentetik izyol 4 ayrı reaksiyon bölümüne ayrılabilir. Bunlar; (Laws vd., 2001)

- 1- Sitoplazma içinde şeker transferi ile ilgili reaksiyonları,
- 2- Şeker-1-fosfatların sentezini,
- 3- Şekerlerin aktifleştirilmesi ve eşleştirilmesini,
- 4- EPS molekülünün dışarı aktarılması işlemini içermektedir.



Şekil 2.3. Laktoz, galaktoz ve glukozun EPS' ye çevrimi (Welman ve Maddox, 2003)

Hücre dışı veya hücre duvarına bağlı glikansukrazlar substrat olarak sakaroz kullanarak HoPS sentezler. Glikoziltransferazlar D-glikozilpironozil birimlerinin sakkarozlardan alıcı moleküllere transferini katalizlerler. HoPS senteziyle kıyaslandığında HePS biyosentez mekanizması daha komplekstir. HePS oluşturan tekrarlanan birimler, sitoplazma içinde şeker nükleotidlerinin öncü moleküller gibi kullanılmasıyla sentezlenir. Bunlar glikoziltransferazlar tarafından lipid taşıyıcı üzerinde sabitlenen uzayan zincirlere şeker nükleotidlerinin ardışık dizilimiyle polimerizasyonun meydana geldiği hücre

zarının diğer tarafına yer değişimini sağlar ve en sonunda EPS ortama serbest bırakılır (Patel vd., 2011).

Dekstran, alternan, mutan ve levan gibi çok az sayıdaki HoPS'lerde, özel şeker olarak sakkaroz gerektiren ekstraselüler (hücre dışı) biyosentez prosesi görölmektedir. Özel glikozil transferaz enzimleri (dekstran ve levan biyosentezi için dekstran ve levan sukraz enzimleri) polimerizasyon reaksiyonlarında yer alır. Polimerizasyon için gerekli enerji sakkarozun hidrolizinden gelmektedir. HePS' ler, sitoplazma içinde tekrarlanan polimerize olmuş öncü madde birimlerinden oluşturulmaktadır. Özellikle EPS oluşumuna özgü olmayan çok sayıda enzim ve/veya protein, heterotip EPS üretimi ve salgılanmasına katılmaktadır. Şeker-1-fosfatlardan elde edilen şeker nükleotidleri, monosakkarit polimerizasyonunda gerekli şeker ara çevrimlerinde (epimerizasyon, dekarboksilasyon, dehidrojenasyon) olduğu gibi şeker aktivasyonundaki rolleriyle HePS' lerin biyosentezinde elzem bir role sahiptirler. Şeker aktifleştirilmesi ve modifikasyon enzimleri birlikte, temel yapıların oluşumunda ve bu sayede son EPS oluşumunda kritik bir rol oynamaktadırlar (De vuyst ve Deegest, 1999).

Kefir danesinde bakterilerin yanısıra mayalar da bulunmaktadır. Başlıca maya çeşidi olarak *S.cerevisia* ve *K. marxianus* belirtilmektedir (Simova vd., 2002; Wouters vd.,2002). Kefir içerisinde bulunan mikroorganizmalar öncelikle laktozu LAB' nin içerdiği galaktosidaz enzimi ile glukoz ve galaktoz monosakkaritlerine parçalamaktadır (Welman ve Maddox, 2003).

Mayaların etanol ve asetik asit oluşumunda ksiloz ve riboz yolunu kullandığı belirtilmektedir. Ortamda glukoz bulunduğunda asetik asit üretimi *S. cerevisia* tarafından etanol fermantasyonu ve asetik asit üretimi gözlenmektedir (Vanzyl vd., 1993). D-glukozdan D-riboz üretiminin gerçekleşmesinde pentoz fosfat yolu kullanıldığı belirtilmektedir (Wulf ve Vandamme, 1997).

#### 2.7.4. EPS üretimini etkileyen faktörler

EPS üretimini etkileyen faktörlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bakteriler tarafından üretilen EPS' lerin teknolojik olarak olumsuz olan yönü düşük miktarlarda üretilmesidir. Bu araştırmalarda EPS üretimini artırmak amacıyla EPS üretimini etkileyen faktörler değiştirilerek optimize edilmesi amaçlanmıştır. EPS üretimi bakteri suşuna bağlı olduğu kadar gelişim koşullarından da etkilenmektedir. EPS üretimi üzerine etki eden en önemli faktörler inkübasyon sıcaklığı ve süresidir. Ortam pH' sı, mineral maddelerinin (fosfatlar, CaCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>) çeşit ve miktarı, oksijen, karıştırma hızı, karbonhidrat kaynağı, azot kaynağı, C/N oranı ve bazı bileşenler (tuzlar, vitaminler) ise diğer etkili faktörlerdir (Gamar vd., 1998; Gorret vd., 2001; Duboc ve Mollet, 2001; Deegest, 2002; Hoa vd., 2003; Aslım vd., 2005a; Velasco vd., 2006; Yılmaz, 2006; Wu vd. 2008; Kuntiya vd., 2010).

Zajsek vd. (2013); kefir danesinde bulunan LAB ile yaptıkları bir seri deney çalışmasında fermantasyondaki sıcaklık, çalkalama hızı, eklenmiş olan C ve N kaynakları, vitaminler ve minerallere bağlı olarak kefiran üretimini etkilediği sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmanın ana amacı, özelleştirilmiş süt kullanılan fermantasyon ortamında EPS üretimini artırma hedefi ile bu kültürün koşulları kontrol edilerek ve fermantasyon ortamı koşulları (Örn: C, N, mineral vitamin kaynağı) modifiye edilerek önemli ölçüde EPS miktarını artırabileceği bulunmuştur. Kefiran üretiminde, dane gelişimi 24 saatlik yetiştirme koşullarındaki sıcaklık ve karıştırma hızı belirlenerek en iyi şekildeki koşullar sırasıyla 25 °C ve 80 rpm de olmuştur. Ayrıca ek besinlerin etkisiyle optimize edildiğinde, %5 laktoz, %0,1 tiamin ve %0,1 FeCl<sub>3</sub> eklenmesiyle maksimum EPS üretimine sebep olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar besinlerin EPS miktarını artırmada faydalı hale getirebileceğinin belirtisidir. Ancak kefir danelerinin artması, yüksek EPS ürün veriminde bir belirleme faktörü olarak belirtilmemiştir.

Wu vd. (2008), tarafından yapılan bir çalışmada, %2.5 yeast extract içeren besiyeri bileşimine fruktoz, galaktoz, glukoz, laktoz ve sakkaroz gibi karbon

kaynakları farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek *Pleurotus citrinopileatus* üzerinden EPS üretimini artırmak amaçlanmıştır. Monosakkaritler (fruktoz, galaktoz ve glukoz) ve disakkaritler (laktoz ve sakkaroz) olmak üzere farklı karbon kaynaklarının hücre kütlesi ve EPS üretimine etkisi incelenmiş olup, monosakkaritlerin disakkaritlerden daha yüksek hücre oluşum verimi sağladığı belirtilmiştir. Bu denemelerin sonucunda, en yüksek biyokütle ve EPS verimi fruktoz besiyeri ile elde edilmiştir. Fruktozun optimum konsantrasyonu %4 olduğunda en yüksek biyokütle % 45,25±2,00 ve EPS 1,87 gL<sup>-1</sup> olarak belirtilmiştir. Karbon kaynaklarının yüksek EPS verimi için optimum konsantrasyonları sırasıyla, %4 fruktoz, %5 galaktoz, %4 glukoz, %5 laktoz ve %2 sakkaroz şeklindedir. EPS kompozisyonunun ise bakteri suşuna ve karbon kaynaklarına göre değiştiği belirtilmiştir. Aynı zamanda, karbon kaynağının konsantrasyonu da EPS içeriğinde etkili bulunmuştur.

Kefiran üretiminin, farklı kaynaklardan sağlanan kefir danelerinden izole edilen çeşitli bakteriler tarafından üretilebildiği görülmektedir (La Rivie're ve Kooiman, 1967; Toba vd., 1987; Mukai vd., 1990; Hosono vd., 1990; Yokoi vd., 1991; Pintado vd., 1996; Mitsue vd., 1999; Micheli vd., 1999; Santos vd., 2003). Uygun ortam ve şartlarda kefiran üretilerek birçok alanda kullanılmıştır (Toba vd., 1987; Yokoi vd., 1990; Yokoi ve Watanabe, 1992; Micheli vd., 1999; Mitsue vd., 1999). Micheli vd. (1999) çalışmasında modifiye edilmiş MRS besiyeri kullanmış ve 2 g/L kefiran üretimi sağlamıştır. Mitsue vd. (1999), kefiran üreten bakteri *L. kefiranofaciens* ile *Torulasporea delbrueckii* mayasını kombine ederek en iyi kefiran üretimini gerçekleştirmiştir. 50 L' lik bir geri-beslemeli fermentörde bu iki mikroorganizma kullanılarak 7 günde 3740 mgL<sup>-1</sup> kefiran elde edilmiştir. İnek sütünden yapılan kefir ve soya sütünden yapılan kefir arasındaki polisakkarit üretimi değerlendirilmiş ve soya sütünden yapılan kefirin polisakkarit içeriğinin inek sütünden elde edilen kefire göre yaklaşık iki kat olduğu bulunmuştur (Abraham ve De Antoni, 1999).

Rimada ve Abraham (2001), 10 g ve 100 g kefir danesini 1 litre süte inoküle ederek ürettiği kefirlerden, beşinci gün sonunda sırasıyla 57,2 ve 103,4 mgL<sup>-1</sup> EPS tespit etmiştir. Rimada ve Abraham (2003), EPS miktarının belirlenmesinde

farklı yöntemler kullanmıştır. Kefir danelerinin 30 ve 50 gL<sup>-1</sup> laktoz içeren sıvı besiyeri içerisinde geliştirilmesiyle, ilave ettikleri farklı %10 deproteinize peynir altı suyunda (PAS) üretilmiş ve EPS üretimi tespit edilmiştir. Kullanılan 100 g kefir danesinin süt içinde fermentasyon sonrası EPS miktarı 218 mgL<sup>-1</sup>, deproteinize PAS içinde fermentasyonu sonrası EPS miktarı 247 mgL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Soya sütüne ilave edilen kefir danesi ile yapılan kefirde D-glukoz ve D-galaktozdan oluşan EPS kompozisyonunun oranları 1:0,43 ve molekül ağırlığının 1,7x10<sup>6</sup> Da olduğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2002).

Rimada ve Abraham (2001), PAS' nun kefir dane gelişimini teşvik ettiğini yeteneğinde olduğunu tespit etmişlerdir. 1 litre süte 100 g kefir danesi ilave etmişler ve 43 °C' de 120 saat fermentasyon ile 103 g/L kefiran üretiminin olduğunu tespit etmişlerdir.

Cheirsilp vd. (2003b), *L. kefiranofaciens* tarafından üretilen kefiran ile *L. kefiranofaciens* ile *S. cerevisiae* tarafından birlikte üretilen kefiran miktarını karşılaştırmıştır; *S. cerevisiae* ile birlikte anaerobik ortamda geliştirilen kültürün kefiran miktarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *L. kefiranofaciens* kültürünün ve *L. kefiranofaciens* ile *S. cerevisiae* karışım kültürünün ürettiği kefiran miktarları sırasıyla; 25 ve 49 mgL<sup>-1</sup> olarak tespit etmiştir.

Kefir danesinde bulunan maya ve LAB' ler arasındaki olumlu ilişki çeşitli araştırmalara göre, *S. cerevisiae'* nin laktik asit miktarını azalttığı, *L. kefiranofaciens* için inhibitör olan hidrojen peroksitin *S. cerevisiae* katalaz aktivitesiyle parçalandığı ve *L. kefiranofaciens'* nin gelişimini devam ettiren uyarıcıları oluşturduğu belirtilmiştir (Challinor vd., 1954; Essia vd., 1992; Leroi vd., 1993; Cheirsilp vd. 2003b).

Bakteriyel polisakkarit sentezi sıcaklık, pH, uygun karbon kaynakları, fermentasyon zamanı ve birbirleri arasındaki ilişkilerden etkilenmektedir (De Vuyst ve Degeest, 1999; Petry vd., 2000). *Streptococcus thermophilus* tarafından EPS 50-350 mgL<sup>-1</sup> olarak üretilmekte (Cerning, 1995), en yüksek EPS sentezi 42

°C' de, pH 6,2' de gerçekleşmektedir (De Vuyst vd., 1998). *Streptococcus thermophilus'* un karbon kaynağı olarak glukozdan laktozlu ortamı tercih ettiği belirtilmiştir (Degeest ve De Vuyst, 2000).

Looijesteijen vd., (1999) *Lactobacillus lactis* spp. *cremoris* B40 tarafından sentezlenen EPS için substrat olarak glukozu fruktoza göre daha fazla ürettiğini belirtilmiştir.

Mozzi vd., (2001) *Lactobacillus casei* CRL 87' in polimer üretimi için, EPS sentezini düzenleyen biyosentetik enzim aktivitesinin arttığını ve EPS üretimini farklı şeker kaynaklarının (glukoz ve galaktoz) etkilediğini tespit etmişlerdir.

#### **2.7.5. EPS akış davranışları**

Reoloji, maddenin akış ve deformasyon özellikleri üzerine yapılan çalışmalar olarak tanımlanabilir. Deformasyon doğadaki katı maddeler için kullanılırken, akış ise doğadaki akışkan maddeler için kullanılır (Bourne, 1982).

Duyusal tekstür özelliklerinin gıdanın mekanik ve reolojik özellikleri ile ilişkili olduğu çok iyi bilinmektedir. Reolojik özellikler gıdaların tekstürel özelliklerinin bir bileşeni olarak düşünülebilir. Çünkü tekstürün duyusal algısı için reolojik özelliklere ilave faktörler etkilidir (Daubert ve Foegeding, 1998). Gıda teknolojisinde reoloji özellikle görünüş, dokunma ve ağız dolgunluğu açısından çok önemlidir. Görünüş, reolojinin küçük bir tamamlayıcısıdır, çünkü bazı gıdaların mekaniksel ve yapısal özellikleri görünüş tarafından belirlenir.

Lezzet, reoloji ile direkt ilgili değildir. Gıdanın ağızda dağılımı lezzet bileşenlerinin ortaya çıkmasını etkiler (Bourne, 1982). Yeme-içme sırasında gıda matriksinden tat ve koku bileşenlerinin açığa çıkma mekanizması duyusal tat ve koku algısını kontrol eder (Escher vd., 2003).

Gerilim, her zaman kuvvetin bir ölçüsüdür. Alana (m<sup>2</sup>) uygulanan kuvvet (Newton) olarak tanımlanır ve genellikle Paskal (Pa) birimi ile ifade edilir. Etki

edilen yüzeye karşı kuvvetin yönü gerilim tipini belirler. Yüzeye doğrudan dik (düşey) kuvvet uygulandığında normal gerilim meydana gelirken, kayma gerilimi kuvvet yüzeye paralel yönde hareket olduğunda meydana gelmektedir. Hamur yoğurmak ya da sakız çiğnemek normal gerilime örnek oluştururken, ekmeğe tereyağı sürmek ya da kahve karıştırmak kayma gerilmesinin örnekleridir. Gıdaya gerilim uygulandığında gıda şekil değiştirir ya da akmaktadır. Deformasyon (strain) maddenin nispi şekil değiştirmesini ifade eden boyutsuz bir değerdir. Maddeye uygulanan gerilim tipi deformasyon tipini belirler. Madde yüzeyine normal gerilim uygulanıyorsa normal deformasyon meydana gelir. Maddelere baskı uygulandığında ya da çekildiğinde normal deformasyon meydana gelir. Örnek kayma gerilimine uğradığında, örneğin domates salçası pompalandığında, kayma deformasyonu meydana gelecektir (Daubert ve Foegeding, 1998).

Çesitli gıdaların reolojik özellikleri araştırmalarla belirlenmiştir (Rao ve Steffe, 1992; Steffe, 1996; Steffe vd., 1986; Weipert vd., 1993). Reoloji bilimi, gıda işletmelerinde, gıdaların üretiminde ve gıdanın tüm alanları içinde pek çok uygulamada yer almaktadır (Barbosa-Canovas vd., 1996). Gıda reolojisi, gıda endüstrisinde ham madde ile üretim sırasındaki ve son ürünün akışı ve deformasyonu ile ilgilidir (White, 1970).

Gıdalar, maddenin değişik hallerini içerebilen kompleks yapılardan oluşur. Katı ve sıvı karakteristikler gösterebilirler ve reoloji gıdaların bu özelliklerini belirler. Kazein jelleri, süt ürünlerinin jelleşme, kırılma ve sıklık gibi pek çok reolojik özelliğinden sorumludur ve reolojik çalışmalar hem süt işletmelerindeki teknikler için hem de bilimsel çalışmalarda ürün yapısını belirlemek için önemli olmaktadır (Tunick, 2000).

EPS üreten bakteriler buldukları doğal ortama dayanan farklı ekolojik yaşam alanlarında kusursuz bir role sahiptirler. EPS' lerin fonksiyonlarının çoğu kendilerinin koruyucu doğalarına bağlanmaktadır. Mikroorganizmalar kendilerini yüksek derecede hidratlanmış EPS tabakasıyla sararak kuruma ve tek hücreliler tarafından zarar vermelerine karşı korumaktadır. Ayrıca, hücre

etrafındaki jel polisakkarit tabakasının varlığı difüzyon özellikleri üzerinde hem hücre içine hem hücre dışına olacak şekilde üstün etkiler sağlamaktadır. Örnek olarak; polimer matriks içine yerleşmiş hücreler antibiyotikler tarafından ulaşılamazdır. Anyonik EPS toksik metal iyonlarına bağlanarak hücre yüzeyinden geçişine engel olurlar. Bu tip etkileşimler metalik yüzeylerdeki korozyonlar açısından pratikte önemli kabul edilmektedir (Kumar, 2007).

Son yıllarda pek çok çeşit endüstriyel uygulamada doğal polimerlere olan talebin artması mikroorganizmaların EPS üretimine olan ilgiyi de artmıştır. Pek çok mikroorganizma ekstraselüler polisakkarit sentezleme yeteneğine sahip olup, suda çözünebilir veya suda çözünmeyen polimerleri hücre dışına salgılamaktadır. Bakteriler tarafından üretilen EPS eşsiz fiziksel özelliklere sahip suda çözünebilir gıdalar olarak bilinmektedir. Gıda, ilaç ve diğer endüstriyel alanlarda geniş kapsamlı uygulamalarda kullanılmaktadır. Pek çok gram negatif ve gram pozitif bakteri çeşidi, bazı mantarlar ve algler EPS üretebilme yeteneğine sahiptir. Endüstriyel polimerik materyaller olarak, piyasada deniz algleri ve bitkilerden elde edilen doğal gumlar ile bakteriyel polisakkaritler arasında başa baş giden bu mücadelede bakteriyel polisakkaritler her geçen gün daha da önem kazanmaktadır (Mıdık, 2011).

Bakteriyel polisakkaritler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi davranmaktadırlar. Tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri, atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler (Sutherland vd., 1972).

Motedayen vd. (2013), yaptıkları çalışmada parçalanmış kefiran ile mısır nişastasından hazırlanmış yeni kullanılabilir (yenilebilir) karışık film elde etmiştir. Film oluşumunu, farklı oranlardaki kefiran ve mısır nişastası (100/0, 70/30, 50/50, 30/70) solüsyonlarında oda sıcaklığında dökerek oluşturmuşlardır. Nişasta eklenmesinin filmin fiziksel, mekanik ve su buharı geçirgenlik özelliğine etkileri araştırılmıştır. Nişasta içeriğinin artması ile

%0-%50 arasında filmin su buharı geçirgenliği azalmıştır. Bununla beraber daha fazla nişasta arttırma işlemi ile su buharı geçirgenliğini arttırmıştır. Ayrıca nişasta içeriğinin artması karışık filmin çekme direnci ve uzatılabilirliği arttırmıştır. Bununla beraber yüksek nişasta içeriğinde mekaniksel özellikler azalmıştır. Dinamik mekanik termal analiz (DMTA) eğrisi nişastanın eklendiği tüm seviyelerde filmin parlaklığa geçiş sıcaklığını arttırmıştır.

Ghasemlou vd. (2011), yaptıkları çalışmada kefir danesinden elde edilen EPS yapısının yeni film materyali olarak kullanılma elverişliliğini incelemiştir. Çalışmada film matrisi içindeki gliserolün birleşme etkisinin filmdeki fiziksel, mekanik ve termal özellikleri araştırılmıştır. Gliserol konsantrasyonundaki %15-35'lik artışın uzatılabilirliği arttırdığını ancak çekme kuvvetini azalttığını tespit etmişlerdir. Gliserolün etkisi plastikleşme ile polimer zincirinde yüksek hareket sağlamıştır ve plastikleştirici içeriğindeki artma ile film su buharı geçirgenliği arttığı bulunmuştur. Gliserol içeriği artığında plastikleşmenin sonucu olarak camsılığa geçiş sıcaklığı azalmıştır. Filmlerin özelliği elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Böylece filmlerin gıda teknoloji uygulamalarında önemli bir faktör olduğu gözlenmiştir.

Rimada vd. (2006), kefirandan jel oluşturarak reolojik özellikleri ve viskozitesini araştırmışlardır. Kefiran içermeyen jel pseudoplastik tiksotropik davranış göstermiştir. Kefiran içeren jelin viskozitesinde önemli düzeyde artış tespit edilmiştir. Sonuçta, doğal bir polisakkarit olduğundan süt ürünlerinde kullanılabilecek önemli bir alternatif kıvam artırıcıdır. Bakteriyel polisakkaritler yeni fonksiyonel özellikler ile yeni biyopolimer kaynaklarından biri olarak belirtilemektedir. Bakteriyel polisakkaritlerin önemli bir avantajı, kimyasal ve fiziksel özelliklerin, materyal kaynağının düzenli ve tekrarlanabilir olmasıdır. Dezavantajı ise; elde edilmesi, tanımlanması ve üretim için yasal izinlerin alınması şeklinde belirtilebilir.

Yang vd. (1999), yaptığı bir çalışmasında Finlandiya fermente sütü viili' den izole edilen *L. lactis* ssp. *cremoris* suşlarını (ARH55, ARH74, ARH 84, ARH 87 ve B 30) yağsız süt kültüründe EPS üretmek için geliştirmiştir. EPS yapı

trikloroasetik asit (TCA) ile muamele edilerek, etanol çöktürme ve dializ ile ayrılmış ve saflaştırılmıştır. Tüm EPS örneklerinin anyonik ve benzer oranlarda glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluştuğu tespit edilmiştir. Seyreltik sulu çözeltilerinde EPS yapının polielektrolite etki gösterdiği ve viskozitelerinin farklılaştığı gözlenmiştir. EPS yapının viskozitesinin konsantrasyon, sıcaklık, pH ve tuz ile olan ilgisi araştırılmıştır. Yapılan deneyde %1 EPS' nin (w/v) yağsız süte ilavesi ile kayda değer bir viskozite artışı olduğu ve 40 °C' de jel formuna dönüştüğü belirlenmiştir. Kefiran eldesinde yapmış olduğu başka çalışmada yağsız sütteki *L. lactis*'in gelişiminden sonra bu kültüre son konsantrasyonu %4 olana kadar TCA eklenmiş ve elde edilen kefiran dondurularak kurutulmuştur. D<sub>2</sub>O çözeltisi içindeki NMR spektrumları 65°C'de kaydedilmiştir. Kimyasal kaymalar, sodyum 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> propanata göre ppm olarak verilmiş ve EPS yapının reolojik özellikleri 0,01 ile 0,1 g dL<sup>-1</sup> arasında değişen seyreltilmiş çözeltilerde 25 °C' deki termostatik banyoda ölçülmüştür. Sıcaklığın, pH ve tuzun EPS solüsyonlarında reolojik davranışlarını etkilediği belirlenmiştir. Viskozimetrik ölçümler 5, 25, 40 ve 60°C' de 29 adımda 291 s<sup>-1</sup> artış ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçlarında *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* suşlarının (ARH55, ARH74, ARH 84, ARH 87 ve B 30) %4 TCI ilavesi ve diğer işlemler sonucunda 164-263 mgL<sup>-1</sup> EPS ürettikleri, üretilen bu EPS yapıların içerisinde ramnoz, glukoz ve galaktozun benzer molar oranlarda buldukları, <sup>1</sup>H NMR spektrumlarında suşların zincirlerinin başka çalışmalarda belirlenen yapılarla da oldukça benzer oldukları belirtilmiştir. Suşlardan ARH53'den elde edilen EPS ile yapılan deneyde aynı pH derecelerinde (pH: 4, 5, 6.5 ) sıcaklığın 5 °C' den 60 °C'ye çıkarılmasıyla viskozitenin azaldığı belirtilmiştir. 5 °C ile 25 °C arasında pH 6,5 ten 4' e düşürüldüğünde viskozitede açık bir değişim olmadığı tespit edilmiştir Su içindeki EPS viskozitesi yağsız süt içerisindeki EPS viskozitesinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. EPS yapının sulu çözeltilerindeki keskin viskozite azalması ve kayma hızının artması bu yapının Newtonian olmayan akış özelliği gösterdiğini belirtmektedir.

### 2.7.6. EPS yapıların NMR analizi ile belirlenmesi

NMR çalışmalarının temeli, çekirdeğin manyetik özelliğinden faydalanmaya dayanmaktadır (Balci, 2004). Elektrik akımı, çevresinde manyetik bir alan oluşturur. Eksenini etrafında dönen bir atom çekirdeği de, içerisinde elektron bulundurduğu için, çevresinde bir manyetik alan oluşturur. Teknik olarak manyetik rezonans, mıknatıslanma özelliğine sahip olan atomların çekirdeğinin davranışlarını inceler (Sandalcı vd., 2007). NMR, numunenin etrafını saran bobinden verilen radyo frekans (RF) enerjisinin absorbe edilmesiyle bazı kimyasal elementlerin ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) nicel olarak gözlemlendiği bir yöntemdir (Rollas vd., 2005).

NMR spektrometreleri temel olarak dört ana bölüme ayrılır. Bunlar; kutup uçları arasında yüksek derecede homojen manyetik alan içeren mıknatıs, çok kararlı bir radyo frekans vericisi, radyo frekans alıcısı, kaydedici (Monitör)'dür. Bir organik molekül çok sayıda H atomu ve dolayısıyla proton içerir ve bu protonların kendi etrafında dönmeleri sonucunda oluşturdukları bir manyetik alanları vardır. Söz konusu moleküldeki protonlar  $H=14000$  Gauss'luk bir dış alanda farklı iki enerji seviyesinde bulunacak şekilde yönelirler. Moleküller üzerine gönderilecek uygun frekanslı radyo dalgalarının absorplanması ile manyetik alanla aynı yönde yönelmiş protonlar manyetik alanlarını dış alanla zıt olacak şekilde geçirirler. Dış manyetik alanın etkisiyle ortaya çıkan enerji yarılması, moleküle radyo frekansı bölgesindeki elektromanyetik radyasyonu absorplayabilme özelliği kazandırır. Bu da NMR spektroskopisinin temelini oluşturur (Şener vd., 1986).

NMR spektrometresinde kullanılan mıknatıs elektromıknatıs veya sürekli mıknatıslardır. Elektromıknatısın manyetik alan değeri daha kolay değiştirilebildiğinden hem manyetik alan taraması hem de birkaç çekirdeğin aynı spektrometre ile incelenmesi mümkün olmaktadır. Ancak elektromıknatısın açığa çıkan ısı nedeniyle çok iyi soğutulması gerekmektedir. Ayrıca elektromıknatısın kararlılığı kolay sağlanmamaktadır. 220 MHz ve daha büyük değerleri uygulayan aletlerde süper iletken mıknatıslar kullanılmakta ve

bunların sıvı helyum sıcaklığında (4 K) çalıştırılması gerekmektedir. Mıknatısın kutupları arasında 2-3 cm lik bir uzaklık bulunmaktadır. Işık kaynağı olarak bir RF jeneratörü kullanılmaktadır. RF ışını örneğe manyetik alan yönüne dik olacak biçimde uygulanmaktadır. Normal uygulamalarda RF jeneratörünün yaydığı frekansının sabit kalması sağlanmakta ve manyetik alan değeri uygun bir elektronik devre yardımı ile değiştirilmektedir. Çift rezonans yönteminin uygulandığı durumlarda ise manyetik alan değeri sabit tutulmakta ve ana radyo frekans kaynağının yaydığı ışının frekansı taranmaktadır. Bu sırada ikinci radyo frekans kaynağı ise seçilen belli bir çekirdeği ışınlamakta kullanılmaktadır. Spektrometrenin dedektörü olarak bir radyo frekans dedektörü kullanılmaktadır. Rezonans olduğu zaman dedektör bu olayı bir gerilim düşmesi olarak algılamaktadır. NMR spektrometrelerinde ayrıca piklerin altındaki alanları ölçebilmek için pik alanlarını integre edecek elektronik bir devre yerleştirilmiştir (Rollas vd., 2005).

NMR spektrumları genel olarak oda sıcaklığında alınmaktadır. Bir bileşiğin NMR spektrumunu yüksek sıcaklıkta da kaydetmek mümkündür. NMR spektrumu kaydedilecek madde, herhangi bir çözücü içerisinde çözünebilmekte ve sonra spektrum kaydı yapılmaktadır. Bazı numunelerde düşük sıcaklık çözünürlük problemi çıkarabilmektedir. Çözücünün düşük sıcaklıklarda donması da sorun yaratabilmektedir. Numune içerisinde var olan dinamik dengelerin (bağ dönmesi, halka çevrilmesi v.s gibi) statik hale gelmesi ve NMR spektrumlarının görünümünü etkileme gibi problemlere yolaçabilmektedir (Ünal, 2008; Balcı, 2004; Sandalcı vd., 2007).

Valerin ve arkadaşları (2000), *S. thermophilus* EU20 suşunun yağsız sütte geliştirildiğinde yüksek molekül ağırlığında EPS salgıladığını ve polisakkarit yapının 2:3:2 mol oranında glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluştuğunu tespit etmiştir. Kimyasal tekniklerle ve 1D-2D NMR spektroskopisiyle ( $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ ), polisakkaritlerin tekrarlanan heptasakkarit ünitelerine sahip olduklarını belirtmiştir. Bu EPS yapının NMR analizi spektrumlarından ortamda tek polisakkarit olduğunu belirtilmiştir. Çeşitli nitrojen kaynakları ile zenginleştirilmiş et suyu takviyeli yağsız sütte geliştirilen suşların ürettiği EPS

yapı da ekstrakte edilerek monomer analizi yapılmıştır. Polisakkaritlerin glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluştuğu tespit edilmiştir. *L. lactis* subsp. *cremoris* B39<sup>27</sup> suşundan izole edilen EPS yapının monomerleri aynı olmasına rağmen NMR analizlerinde yapılarının çok farklı olduğu belirtilmiştir. Örnek olarak 400 MHz <sup>1</sup>H NMR ile 70 °C de D<sub>2</sub>O ile *S. thermophilus* EU20 suşunun metilasyon analizinde ana ürünlerden birisi 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-rhamnitol ve bağlanma tipi; t-Rhap iken diğer ana ürünlerin 1,2,3,5-tetra-O-acetyl-4-O-methyl-rhamnitol ve bağlanma tiplerinin; 1,2,3-Rhap olduğu belirtilmiştir. Metilasyon analizleri sonucunda <sup>1</sup>H NMR spektrumları, EPS yapı içeriğinin tekrar eden heprasakkarit birimlerinden oluştuğunu ve tekrar eden bu birimlerin dallanmış olduğunu göstermiştir. *L. lactis* subsp. *cremoris* B39 ve *S. thermophilus* 0R901 benzer yapılara sahip olduğu ve bunlar arasındaki farkın dallanma yerinden kaynaklandığı belirtilmektedir ( $\beta$ -D- Galp-(1--->4)-  $\beta$ -D-Glcp ile  $\beta$ -D- Galp-(1 --->6)-  $\beta$ -D-Glcp). <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR kimyasal analizlerinden galaktofuranoz kalıntıları haricinde monosakkaritlerin hepsinin piranoz halka formunda olduğu belirtilmiştir.

Ghasemlou vd. (2012), polisakkaritlerin karakterlerini araştırma amacıyla yaptığı bir çalışmada saflaştırılmış 30 mg kefiranı liyofilizasyon yöntemi ile kurutarak D<sub>2</sub>O içinde çözmüştür. <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C spektrumlarını 27 °C'de NMR spektrometresi ile kaydetmiştir (<sup>1</sup>H NMR için 500,13 MHz; <sup>13</sup>C NMR için 125,75 MHz). HMBC (Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu) deneyi ile titreşimleri kaydetmiştir. Suda çözünen EPS yapı olan kefiranı jel geçirim kromatografisi kullanarak saflaştırmıştır. Saflaştırılmış EPS yapının Brodford metoduna olumsuz tepki verdiğini ve 280-260 nm' de (UV) hiçbir absorpsiyon spektrumu saptanamadığını belirtmiştir. Protein ve nükleik asit bulunmadığını ve kefiranın toplam şeker içeriğinin fenol sülfür metodu ile belirlenerek %97,8 olduğunu tespit etmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde yapının kısa moleküler ağırlık dağılımı gösterdiğini belirtmiştir. Dekstran standartları kurvelerinin kalibrasyonu ile kefiran molekül ağırlığının 1.35x10<sup>6</sup> Da olduğunu bulmuştur. Saflaştırılmış EPS TFA ile hidrolize edilerek tek tek monosakkaritlerine ayrılmış ve GC için ayrıca asitle parçalanmıştır. Sonuçta EPS yapının glukoz ve galaktozdan oluştuğunu (Molar Oranı 1:1,1) göstermiştir.

Kefiranın ( $\sigma$ 4,4-5,5) anomerik bölgesindeki NMR spektrumlarında 6 sinyal bulunmuş ve bunlardan 5 tanesinin büyük, 1 tanesinin küçük olduğu tespit edilmiştir. Bunlar 4,80; 4,69; 4,62 (minör sinyal); 4,53; 4,52; 4,48'dir. Sırasıyla bağların  $\beta$ -D- $G_{lcp}$ -(1->, -->2,6)- $\beta$ -D- $G_{alp}$ -(1 -->, --->6)- $\beta$ -D- $G_{alp}$ -(1 --->, -->4)- $\beta$ -D- $G_{lcp}$ -(1 --->, -->3)- $\beta$ -D- $G_{alp}$ -(1 --->, -->6)- $\beta$ -D- $G_{lcp}$ -(1 ---> olduğu tespit edilmiştir. 5,16 bölgesinin anomerik proton sinyallerinden bağın 4)- $\alpha$ -D- $G_{alp}$ -(1 olduğu bulunmuştur. C NMR spektrumlarında 95-110 anomerik bölgesinde 6 sinyal gözlenmiştir (Çizelge 2.6). Bir sinyalin  $\alpha$ -heksapiranoz kalıntısı ( $\sigma$  99), beş sinyalinde  $\beta$ - heksapiranoz kalıntısı olduğu tespit edilmiştir ( $\sigma$  105.4). C-1 sinyal varlığında belirtilen tüm şekerler piranoz formda olması, furanoz form rezonansı ise 107-109 ppm de olması gerektiği belirtilmiştir.  $\sigma$  82,2 ve C-2' de kaymaların -->2,6)- $\beta$ -D- $G_{alp}$ -(1 ve  $\sigma$  81,3 ve C-3' te kaymaların -->3)- $\beta$ -D- $G_{alp}$ -(1 varlığı gösterilmiştir. Diğer 6 şeker kalıntısının  $^1H$ NMR'da azalan miktardaki kaymaları A-F ' ye alfabetik şekilde tanımlanmıştır. Kefir danelerinden elde edilen kefiranın döndürüm gücü (rotatif güç)  $\alpha$  D + 64° bulunmuştur. Bu değer yayınlanan diğer (Wang, 2008; Yokoi ve Watanable, 1992) sonuçlara benzerdir.

Çizelge 2.6. Kefir danesinden izole edilen kefiranın  $^{13}C$  NMR kimyasal kaymaları (Ghasemlou vd., 2012).

| Şeker Kalıntıları | Bağları                                 | Kimyasal Kaymalar $\sigma$ (ppm) |      |      |      |      |      |
|-------------------|---|----------------------------------|------|------|------|------|------|
|                   |   | C-1                              | C-2  | C-3  | C-4  | C-5  | C-6  |
| A                 | -->4)- $\alpha$ -D- $G_{alp}$ -(1       | 99                               | 71.7 | 74.2 | 82.7 | 73.3 | 63.3 |
| B                 | $\beta$ -D- $G_{lcp}$ -(1 --->          | 105.4                            | 76.3 | 78.7 | 71.8 | 78.9 | 63.7 |
| C                 | -->2,6)- $\beta$ -D- $G_{alp}$ -(1 ---> | 105.4                            | 82.2 | 75.3 | 71.6 | 76.9 | 72.8 |
| D                 | -->4)- $\beta$ -D- $G_{lcp}$ -(1 --->   | 105.4                            | 75.5 | 77.8 | 82.1 | 77.5 | 63.4 |
| E                 | -->3)- $\beta$ -D- $G_{alp}$ -(1 --->   | 105.4                            | 72   | 81.3 | 68   | 77.3 | 63.8 |
| F                 | -->6)- $\beta$ -D- $G_{lcp}$ -(1 --->   | 105.4                            | 75.6 | 78.1 | 71.7 | 77.8 | 71.6 |

HMBC spektrumunda 6 çapraz pik;

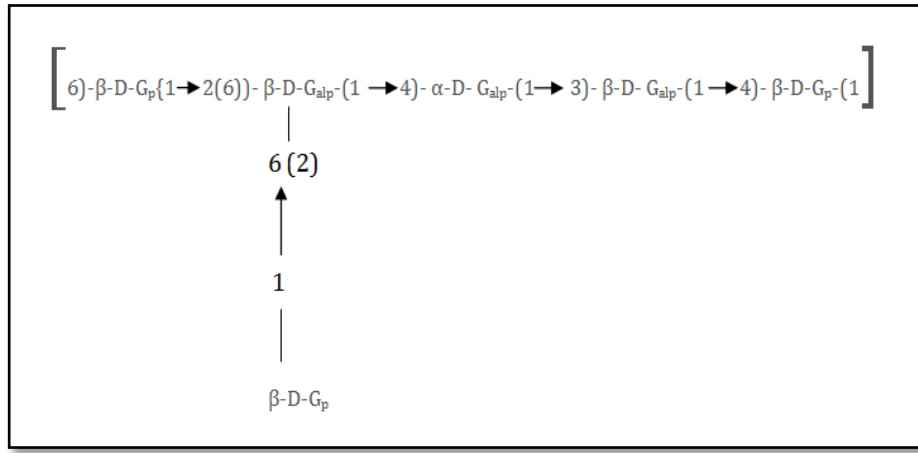
F ve C kalıntıları; H-1-C-6

C ve A kalıntıları; C-1-H-4

B ve C kalıntıları; H-1-C-2



kimyasal yapısı NMR ile belirlenmiştir. Şekil 2.5'teki yapı hekza-heptasakkarit tekrarlanan birimi ile dallanmıştır. Bir ya da iki şeker ünitesi ile penta sakkarit birimi bileşiğiyle rastgele bağlanmıştır (Kooiman, 1968; Micheli vd., 1999). Metilasyon/hidroliz çalışmaları kefiranın kompleks yapısını göstermektedir (Mukai vd., 1988; Mukai vd., 1990). Metilasyon ve NMR analizi, yeni bakteri türleri tarafından üretilen kefiranın doğrulanmasında kullanılmaktadır (Yokoi vd., 1991). Mukai vd. (1990), bu araştırma teknikleri ile aslında birbirine çok benzer kimyasal yapıda olan EPS varlığı olduğunu belirlemiştir. Başka bir çalışmada ise aynı bakteri türünün farklı ortamlarda, farklı EPS'ler ürettiği tespit edilmiştir (Grobbe vd., 1995; Van Geel-Schutten vd., 1999).



Şekil 2.5. Kefiranın kimyasal yapısı (Farnworth, 2005)

Başlıca kefir danesine özgü bakteriler *L. kefiranofaciens*, *L. kefir*, *L. kefirgranum* ve *L. parakefir* bakteri türleri tarafından üretilmektedir (Kooiman, 1968; Kandler, 1983; Fujisawa, 1988; Yokoi, 1991; Takizawa vd., 1994; Cheirsilp vd., 2003; Wang vd., 2008).

Yapılan çalışmalara bakıldığında, kefiran üretiminin, farklı kaynaklardan sağlanan kefir danelerinden izole edilen çeşitli bakteriler tarafından üretilebildiği görülmektedir (La Rivie'ere ve Kooiman, 1967; Toba vd., 1987; Mukai vd., 1990; Hosono vd., 1990; Yokoi vd., 1991; Pintado vd., 1996; Mitsue vd., 1999; Micheli vd., 1999; Santos vd., 2003). Çizelge 2.7'de bazı LAB'ın ürettikleri EPS miktarları verilmiştir. Uygun ortam ve şartlarda kefiran

üretilecek birçok alanda kullanılmıştır (Toba vd., 1987; Yokoi vd., 1990; Yokoi ve Watanabe, 1992; Micheli vd., 1999; Mitsue vd., 1999).

Çizelge 2.7. Bazı LAB' nin ürettikleri EPS miktarları

| Kefir Danesi  | (mgL <sup>-1</sup> ) | Kaynaklar                   |
|---|----------------------|-----------------------------|
| <i>S. thermophilus</i> SY                             | 152                  | Ricciardi vd., 2000         |
| <i>S. thermophilus</i> ChH. YC-380                    | 600                  | Ludbrook vd., 1997          |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LC330        | 25                   | Marshall vd., 1995          |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> B891         | 80                   | Ruas-Madiedo vd., 2002      |
| <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2-11    | 540                  | Frengova vd., 2000          |
| <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNRZ416 | 170                  | Petry vd., 2003             |
| <i>L. rhamnosus</i> R                                 | 495                  | Pham vd., 2000              |
| <i>L. helveticus</i> ATCC15807                        | 549                  | Torino vd., 2001            |
| <i>L. paracasei</i> Type V                            | 85                   | Dupont vd., 2000            |
| <i>L. reuteri</i> LB121                               | 9800                 | Van Geel-Schutten vd., 1999 |
| <i>L. sakei</i> 0-1                                   | 1580                 | Degeest vd., 2001           |
| <i>L.kefirano-faciens</i> ZW3                         | 1215                 | Wang vd., 2008              |

Micheli vd. (1999), araştırmasında modifiye edilmiş MRS besiyeri kullanarak 2 gL<sup>-1</sup> kefiran üretimi sağlamıştır. Mitsue vd. (1999), kefiran üreten bakteri *L. kefirano-faciens* ile *Torulaspora delbrueckii* mayasını kombine ederek en iyi kefiran üretimini gerçekleştirmiştir. Geri-beslemeli 50 litre kapasiteli fermentörde bu iki mikroorganizma kullanılarak 7 günde 3740 mgL<sup>-1</sup> kefiran elde edilmiştir. İnek sütünden yapılan kefir ve soya sütünden yapılan kefir arasındaki polisakkarit üretimi değerlendirilmiş ve soya sütünden yapılan kefirin polisakkarit içeriğinin inek sütünden elde edilen kefire göre yaklaşık iki kat olduğu bulunmuştur (Abraham ve De Antoni, 1999).

Rimada ve Abraham (2001), araştırmalarında 10 g ve 100 g kefir danesini 1 litre süte inoküle ederek ürettikleri kefirlerde, beşinci gün EPS miktarını sırasıyla 57,2 ve 103,4 mgL<sup>-1</sup> olarak tespit etmişlerdir. Rimada ve Abraham (2003), EPS miktarının belirlenmesinde farklı yöntemler kullanmıştır. Kefir danelerinin 30 ve 50 gL<sup>-1</sup> laktoz içeren sıvı besiyeri içerisinde geliştirilmesiyle, ilave ettikleri farklı %10 deproteinize PAS'da üretilmiş ve EPS oluşumu tespit edilmiştir. Kullanılan 100 g kefir danesinin süt içinde fermentasyon sonrası EPS miktarı

218 mgL<sup>-1</sup>, deproteinize PAS içinde fermentasyonu sonrası EPS miktarı 247 mgL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Soya sütüne ilave edilen kefir danesi ile yapılan kefirde D-glukoz ve D-galaktozdan oluşan EPS kompozisyonunun oranlarının 1,00:0,43 ve molekül ağırlığının 1,7x10<sup>6</sup> Da olduğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2002).

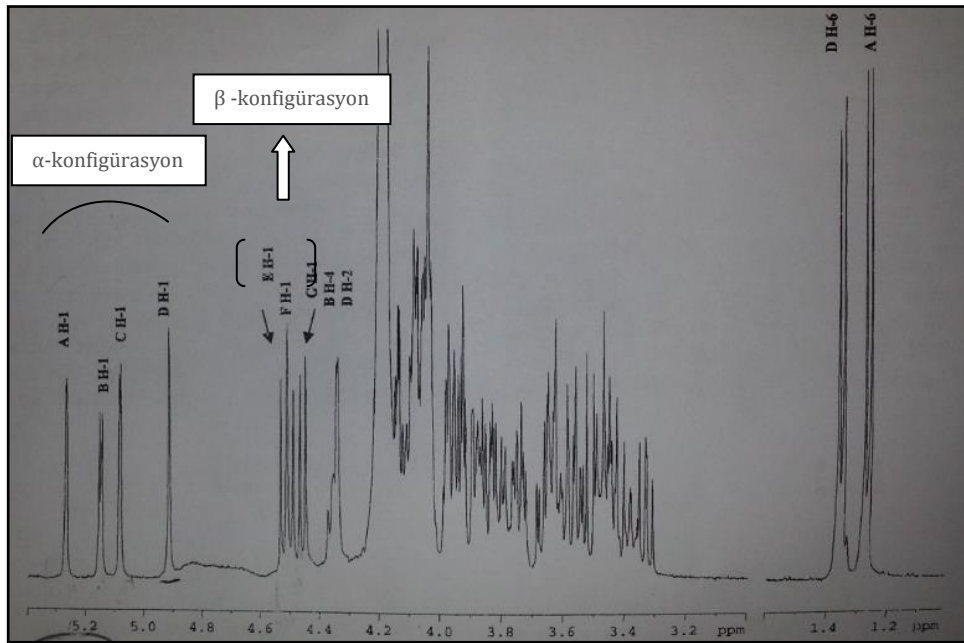
Rimada ve Abraham (2001), PAS'ın kefir danelerini geliştirme yeteneğinde olduğunu tespit etmişlerdir. 1 litre süte 100 g kefir danesi ilave etmişler ve 43 °C'de 120 saat fermentasyon ile 103 gL<sup>-1</sup> kefiran üretiminin olduğunu tespit etmişlerdir. Cheirsilp vd. (2003b), *L. kefiranofaciens* tarafından üretilen kefiran ile *L. kefiranofaciens* ile *S. cerevisiae* tarafından birlikte üretilen kefiran miktarını karşılaştırmıştır; *S. cerevisiae* ile birlikte anaerobik ortamda geliştirilen kültürün kefiran miktarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *L. kefiranofaciens* kültürünün ve *L. kefiranofaciens* ile *S. cerevisiae* karışım kültürünün ürettiği kefiran miktarlarını sırasıyla; 25 ve 49 mgL<sup>-1</sup> olarak tespit etmiştir. Kefir danesinde bulunan maya ve LAB arasındaki olumlu ilişki çeşitli araştırmalara göre, *S. cerevisiae*'nin laktik asit miktarını azalttığı, *L. kefiranofaciens* için inhibitör olan hidrojen peroksitin *S. cerevisiae* katalaz aktivitesiyle parçalandığı ve *L. kefiranofaciens*'nin gelişimini devam ettiren uyarıcıları oluşturduğu belirtilmiştir (Challinor vd., 1954; Essia vd., 1992; Leroi vd., 1993; Cheirsilp vd. 2003b).

Nakajima vd. (1992), *L. lactis* spp. *cremoris* SBT 0495 tarafından üretilen EPS yapının tekrarlanan birimlerinin bileşiminde galaktaz, glukoz, ramnoz ve fosfat olduğunu tespit etmiştir.

*Streptococcus thermophilus* ve *L. bulgaricus* ve mezofilik *L. lactis* spp. *cremoris* süt ürünleri alınında çok yaygın kullanılmaktadır. LAB'ın ürettiği EPS yapılar ürünlere uygun kıvam sağlamaktadır. EPS'nin şeker komponentinin galaktaz, glukoz ve sıklıkla da ramnoz olduğu belirtilmektedir (Cerning, 1990).

Valerin vd. (2000), tarafından *S. thermophilus* EU20'den izole edilen EPS yapının <sup>13</sup>C spektrumu incelenmiştir. 42 ayrı karbon rezonansı tespit edilmiştir. İki

yüksek alan rezonansı, ramnoz metil grupları ve yedi anomerik bölgeyle bağlantılı olduğu ve yapılan çalışmalardan farklı olarak düşük alanda bir franoz şekeri olan C-1 franoz şekeri türediği belirtilmiştir. EPS yapıların  $^1\text{H-NMR}$  analizinde (400-Mhz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $70^\circ\text{C}$ ) anomerik bölgede gözlenen yedi proton rezonansı ile heptasakkarit tekrar birimi tutarlı çıkmıştır. Şeker kalıntılarının kimyasal değişimleri A-G arasındaki harfler olarak tanımlanmıştır. E, F ve G olarak tanımlanan anomerik protonların konfigürasyonları onların eşleşme katsayısıyla ( $^3J_{1,2}$ ) alakalı kaymalar vermiştir. Sırasıyla E şeker kalıntısı 4.53 ppm ( $\beta\text{-D-Glcp}$ ,  $^3J_{1,2}$  8.1 Hz'de), F şeker kalıntısı 4.49 ppm ( $\beta\text{-D-Glcp}$ ,  $^3J_{1,2}$  8.1 Hz'de), G şeker kalıntısı 4.45 ppm ( $\beta\text{-D-Glcp}$ ,  $^3J_{1,2}$  8.1 Hz'de) de sinyal vermiştir ve hepsi beta ( $\beta$ ) konfigürasyonları göstermiştir. A, B, C, D kalıntıları ise alfa ( $\alpha$ ) konfigürasyonları göstermiştir. A kalıntısı 5.27 ppm ( $\alpha\text{-L-Rhap}$ ,  $^3J_{\text{H-C}}$  173 Hz'de), B kalıntısı 5.15 ppm ( $\alpha\text{-D-Ghap}$ ,  $^3J_{1,2}$ , 3.4,  $^1J_{\text{H-C}}$  170 Hz'de) ve C kalıntısı 5.08 ppm ( $\alpha\text{-D-Ghap}$ ,  $^3J_{1,2}$ , 1.8,  $^1J_{\text{H-C}}$  173 Hz'de) de sinyal vermiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *S. thermophilus* EU20' den izole edilen EPS' nin 400 MHz,  $70^\circ\text{C}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

### 2.7.8. Kefiranın sağlık üzerine etkileri

Kefiran, suda çözünebilen glukogalakattan yapıdadır. Yapılan çeşitli araştırmalara göre antibakteriyel ve antitümör aktivitesi olan kefiranın, bağırsak bağışıklık sistemini teşvik eden ve *Bacillus cereus*'a karşı epitel hücreleri koruduğu tespit edilmiştir (Yokoi vd., 1991; Murifushi vd., 1983; Maeda vd., 2004; Rodrigues vd., 2005; Vinderola vd., 2006; Medrano vd., 2008).

Kefir fermente ieeğinin insan sağlığına birçok olumlu etkisi bulunmaktadır. Antimikrobiyal, antikanserojenik, probiyotik ve prebiyotik özelliği, sindirim sistemine olumlu etkisi, kolesterol düşürücü, laktoz intoleransına ve bağışıklık sistemine etkisi bulunmaktadır (Güzel Seydim vd.,2010b).

LAB'lar yararlı mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar ve fonksiyonel EPS üreticisi olarak sınıflandırılırlar (Welman vd., 2003, Meulen vd., 2007). EPS üretiminin gıda endüstrisinde kullanımları; kıvam artırıcı, pıhtı azaltıcı şeklindedir. Tıp biyokimya alanında ise tümör oluşumunu engelleyici, bağışıklık sistemini destekleyici, makrofaj ve lenfosit aktive edici, kan kolesterolünü düşürücü özellikleri de bulunmaktadır (Karaca vd., 2010; Lin ve Chien 2007).

Probiyotik gıdaların günlük hayatımızda kullanımı oldukça fazladır ve bu gıdalara gün geçtikçe talep artmaktadır. Probiyotik gıdalar probiyotik özellikte (sağlığa yararlı) mikroorganizmalar içermektedir. İntestinal sistem araştırmalarında probiyotiklere ilgi büyüktür. Probiyotik özelliğe sahip mikroorganizmaların en yaygın olarak kullanılanı ve bilineni LAB' dir. LAB' leri genellikle süt ve süt ürünlerinde bulunmasına rağmen, çeşitli yiyeceklerde de (hayvansal et ve bitkiler) bulunabilirler. LAB'lar yararlı mikroorganizmalar olarak tanımlanırlar ve fonksiyonel EPS üreticisi olarak sınıflandırılırlar (Welman vd., 2003, Meulen vd., 2007).

LAB'in anti-kanser özelliklerinin olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Rafter, 2002). LAB suşları gastrik, bağırsak patojenleri ve diğer mikroorganizmalara karşı mikrobisidal bazı metabolitler üretir ya da hücre

yüzeyi ve musin (mucin) bağlayıcı bölgelere bağlanmak için rekabet ederler (Ljungh vd., 2006).

Kefirden izole edilen EPS' in,  $5 \times 10^3$  hücre sayısına sahip Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin belirlenmesi için hücreler 24 ve 48 saat EPS ile muamele edilmiştir. 24 saatlik deney sonucunda hücre canlılığında azalma gözlemlenmemiştir. Fakat 48 saatlik deney sonucunda hücre canlılığında doza bağlı olarak düşüş gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, bu maddeleri içeren gıdalar üretilip piyasaya sürülebilir ve insan metabolizmasında 48 saat boyunca duramayacağı için günlük tüketilip gıda takviyesi olarak kullanılabilceği ve kolon kanseri riskini azaltabileceği belirtilmektedir (Altuğ, 2013).

Kitazawa vd. (1998), EPS yapıların probiyotik açıdan önemli bir kriter olabileceğini gündeme getirmişlerdir ve EPS yapıların antitümör aktivitesi, antimutajenik aktivitesi, makrofaj aktivitesi gibi bazı immunolojik etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, LAB' nin hücre duvarında bulunan peptidoglikan ve polisakkaritlerin nitrozamin gibi kansorejen etkili maddelerle kimyasal bağlar oluşturarak onları etkisiz hale getirdiği ileri sürmektedir. EPS yapının bakterinin yüzeye tutunmasında yapıştırıcı özelliğe sahip olması biyofilm oluşturmasında etkili olmaktadır. Bu sayede, EPS üreten bakteri baskın olarak kolonize olur ve bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilir. Ayrıca mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS molekülleri faj ataklarına, organizmadan sitokin salgılanmasına, antibiyotiklere karşı koruyucudur (Aslım vd., 2005a).

Japonya'da Shiomi ve arkadaşları (1982), kefir danesinden izole ettikleri, suda çözünebilir bir polisakkarit olan KGF-C'yi, saflaştırarak ve bunu oral yoldan farelere vermişlerdir. KGF-C deney farelerine içme suyunda %0.02-0.1 oranında ya da intraperitoneal olarak (hastanın karın bölgesine enjekte edilmesi) günde 0.05-2 mg verildiğinde Ehrlich carcinoma hücrelerinin (deneysel maksatla en yaygın olarak kullanılan ascitic tümörler) gelişmesini %40-64 oranında ve Sarcoma 180 kanser hücrelerinin gelişmesini de %20-90 oranında

engellemiştir. Bununla birlikte in vitro (laboratuvar ortamı) testlerde, KGF-C, Ehrlich carcinoma hücrelerine 42 saatlik inkübasyondan sonra orta dereceli sitotoksosite göstermiş ve Sarcoma 180 hücrelerine inkübasyon boyunca 66 saat bir sitotoksosite göstermemiştir. Bu polisakkarit doğrudan kanser hücrelerini etkilememiş ancak canlı vücudunda ise immün sistemi güçlendirerek ve destekleyerek kanserli hücrelerin çoğalmasını önlemiştir.

Başka bir çalışmada suda çözünebilir, kefir danesinden elde edilmiş olan polisakkarit (KGF- C), 5-200 mg/kg oranında gastrik inkübasyon ya da %0.0015 veya %0.03 oranında içme suyu ile birlikte farelere verildiğinde, farelerde %5 picryl chloride duyarlılığın arttığı ve Ehrlich carcinoma hücrelerinin azaldığı görülmüştür. Duyarlılığa cevap ile tümör ağırlığı arasında negatif bir korelasyon olduğu görülmüştür (Murofushi vd., 1983).

KGF-C oral yoldan alındığında tümör büyümesini geciktirici özellik göstermektedir. Bunun yanında KGF-C'nin, oral yoldan alınmasından sonra gecikmiş-tip hiper-duyarlılık (delayed-type hypersensitivity: DTH) üzerine etkisi de farelerde test edilmiştir. KGF-C vücudun DTH tepkisini artırmıştır. Sağlıklı farelerde DTH tepkisi ile anti-tümör aktivitesi arasında önemli bir bağıntı olduğu gözlenmiştir (Zubillaga vd., 2001).

*L. kefiranofaciens* tarafından üretilen EPS' nin bağışıklık sistemini düzenleyici, düşük tansiyon, yüksek kolesterol hastalarında sağlığın gelişmesine katkıda bulunan etkileri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca antijen ile uyarılan mast hücrelerinin aktivasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Kefiranın mast hücrelerin degranülasyonunu bastırdığı, Akt (Protein Kinaz B) ve ERK yollarını inhibe ederek sitokin ürettiğini ve antinflamatuar etki gösterdiği tespit edilmiştir (Furuno ve Nakanishi, 2012).

Yapılan bir çalışmada kefiran farelere oral yollarla verilmiş ve farelerin bağışıklık hücrelerine etkileri incelenmiştir. 6 haftalık BALB/C farelerine 300mgL<sup>-1</sup> kefiran 0,2 ve 7 gün süre ile verilmiştir. Kefiran verilenlerde IgA+ hücre seviyesinin arttığı bulunmuştur. Mezenterik lenf hücrelerinde (2 gün) ve

Peyer Plakalarında (7 gün) B220+/ MHCII hücrelerinin yüzdesi kefiran muamelesine tabi tutulmayan kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Lamina propria ve periton boşluğunda makrofajlarda bir artış gözlenmiştir (2. ve 7. günlerde). Buna karşın Peyer Plakalarında makrofaj popülasyonu 7 gün sonunda azalmıştır. Bu sonuçlar, kefiranın bağırsak mukozasında bağışıklık hücrelerinin dengesini değiştirme yeteneği olduğunu göstermektedir. Bu özellik kefire atfedilen probiyotik etkisinin anlaşılması için önemlidir (Medrano vd., 2011)

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

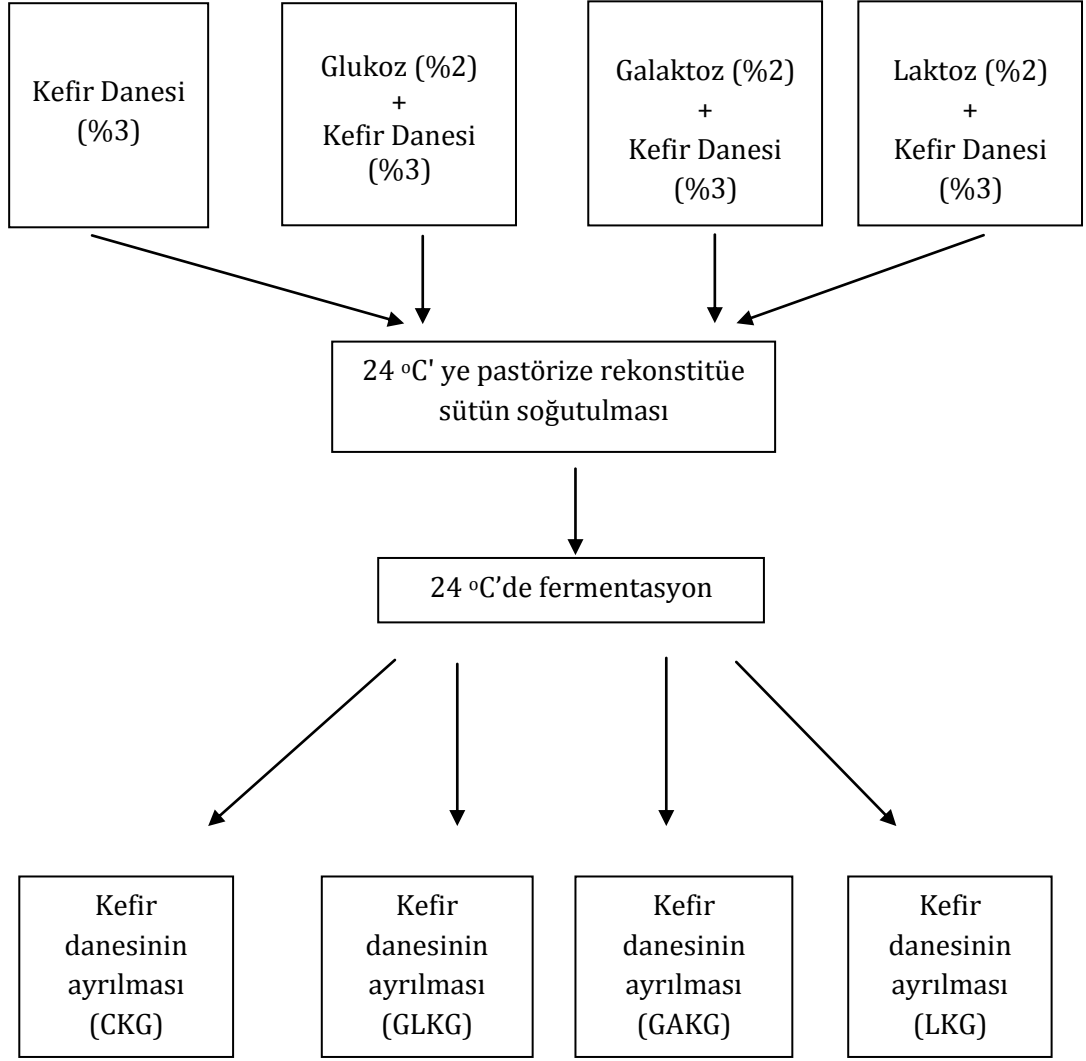
#### **3.1. Materyal**

Kefir üretiminde rekonsitüte süt üretimi için yağsız süt tozu Pınar A.Ş. (İzmir, Türkiye) den, kefir daneleri Danem Süt ve Süt Ürünleri Ambalaj Gıda Eğitim Danışmanlık Sanayi ve Tic. Ltd. Şti. (Isparta, Türkiye) den temin edilmiştir. Bu tez çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Kefir danesinin farklı karbon kaynakları ile zenginleştirilmesi**

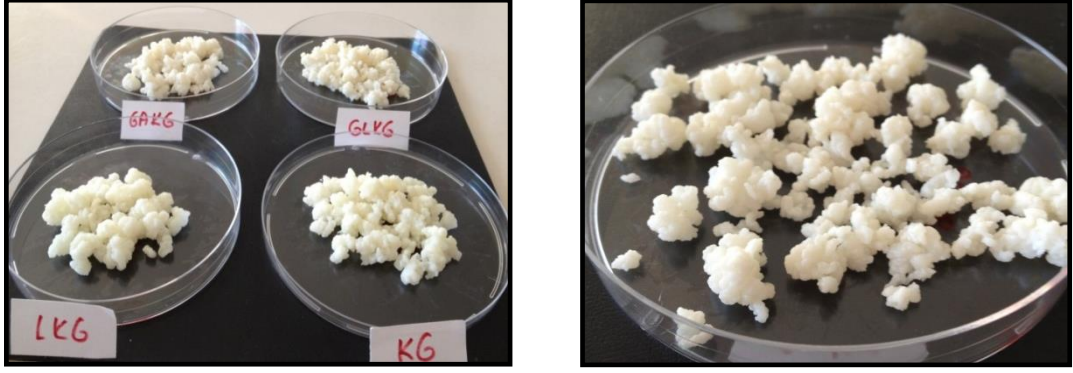
Kefir danesinin farklı karbon kaynaklarıyla (Glukoz, Galaktoz, Laktoz; Sigma, Almanya) zenginleştirilmesi işlemi için öncelikle danelerin konulacağı ortam olan rekonstitüe süt (%12) hazırlanmıştır. Rekonstitüe süt hazırlanırken CKG örneği için 12 g süt tozu (Pınar A.Ş.) tartılarak 100 ml' ye tamamlanmıştır. Kontrol grubunda (CKG) süte zenginleştirme yapılmamıştır. GLKG, GAKG ve LKG örneklerinin herbiri için 10'ar g süt tozu tartılmış ve üzerlerine sırasıyla glukoz, galaktoz ve laktozdan 2'şer g eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan rekonstitüe sütlere, 85 °C'de 20 dakika pastörize işlemi uygulanmıştır. Pastörize sütler 24 °C'ye soğutulularak, aseptik koşullar altında %3 oranında kefir danesi ilave edilerek, 24 °C'de 22 saat fermente edilmiştir (Şekil 3.1). Tüm örneklerde fermantasyon pH 4,6'da sonlandırılmıştır. Fermantasyon sonucunda daneler aseptik olarak steril kabinde ayrılmış ve steril su ile yıkanmıştır. Bir sonraki inokülasyona kadar 4 °C' de muhafaza edilmiştir. Üretim dokuz gün boyunca devam etmiştir. Bu üretim üç kere tekrarlanmış ve analizler için örnekler alınmıştır.



Şekil 3.1. Deneme planı

### 3.2.2. Kefir danelerinde biyokütle artışının belirlenmesi

Kefir daneleri glukoz, laktoz ve galaktoz karbon kaynakları içeren süt içerisinde dokuz gün süresince geliştirilmiştir. Her üç günde bir dane biyokütle ağırlıklarının artışı (g) hassas terazide (And, A&D Company Ltd., Japonya) belirlenmiştir. Her karbon kaynağında geliştirilen daneler fermentasyon süreleri sonunda steril süzgeçle alınmış, steril pedler üzerinde belli bir süre bekletilmiş ve ağırlıkları ölçülmüştür (Şekil 3.2). Kefir örneklerinin pH değerleri pH metre (Schotlab, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir daneleri  
(Ömer Çağdaş KOÇAK tarafından fotoğraflanmıştır)

### 3.2.3. Kefir danesinde bulunan polisakkarit yapının (kefiran) ekstraksiyonu

Zisu ve Shah (2003)'ün EPS ekstraksiyonu modifiye edilerek uygulanmıştır. Örneklerden birer gram kefir danesi tartılıp falcon tüplerine konularak, üzerine 9 mL kaynamış su ilave edilmiş ve 30 dakika sürekli karıştırılmıştır. Örnekler, bakteri hücreleri ve proteinlerin çöktürülmesi amacıyla 20 °C 20 dakika 10.000xg de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernetantlar 25 ml falcon tüplerine alınarak üzerine %96 (v/v)'lık soğuk etanolden 2'şer mL ilave edilmiş ve -20°C de 1 gün bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler çözündürülüp EPS yapıların çöktürülmesi amacıyla 10.000 x g' de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletler sıcak su ile 3 kez yıkanmıştır. Çözelti daha sonra sıcak su içerisinde çözündürüp, liyofilize (Xianou-12N Freeze Dryer, Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd., China) edilerek kurutulmuştur. Liyofilizasyon -55 °C'de (0,987 atm) 24 saat süre boyunca uygulanmıştır.

### 3.2.4. Kefiran miktarının belirlenmesi

Dubois vd. (1956)'nin fenol-sülfirik metoduna göre farklı standartlar kullanılarak (laktoz, glukoz ve galaktoz) toplam EPS miktarı belirlenmiştir. EPS miktarı belirleme araştırmalarında farklı standartlar kullanılmıştır (De Vuyst ve Degeest, 1999; Petry vd., 2000; Cerning, 1995; De Vuyst vd., 1998, Looijesteijen

vd.,1999). Bu projede karşılaştırılmak amacıyla standart olarak üç farklı şeker kullanılmıştır. Glukoz, galaktoz ve laktoz standartları kullanılarak standart kalibrasyon doğruları çizilmiştir.

Laktozdan 100 mg hassas terazide tartılarak içine 100 ml su ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Her bir konsantrasyon için hazırlanan deney tüplerine farklı konsantrasyonda her standart çözeltileri konup, üzerine önce 500 µ fenol ve 4 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir. 10 dakika beklenip tüpler vortekslenmiştir. 35 °C 'lik etüvde 15 dakika bekletilip, hazırlanan tüplerin absorbanları spektrofotometrede (UV 1700, Shimadzu, Japonya) 492 nm'de okunmuştur. Kalibrasyon doğrusu çizilip eğimleri belirlenmiştir. Galaktoz ve glukoz çözeltileri içinde aynı işlemler tekrarlarak standart kalibrasyon doğruları çizilmiştir.

### **3.2.5. Reolojik özelliklerin belirlenmesi**

Farklı karbon kaynakları ile dokuz gün aktiveleştirilen kefir danelerinden elde edilen kefiranlar cam tüplere 2 g tartılmıştır. Üzerine 7 mL saf su eklenmiştir. Cam tüpler beher içerisindeki sıcak su içerisinde bekletilerek ve vortekslenerek kefiran örnekleri çözündürülmesi sağlanmıştır.

Kefiranların reolojik özellikleri bakımından karşılaştırılması amacıyla Brookfield Rotational Rheometer (Brookfield Engineering Laboratories, model DV-II Pro LV, USA) viskozimetre cihazı kullanılmıştır. Viskozite, kayma gerilmesi ve deformasyon hızları spindle SC4-18 (small sample adapter) ile ölçülmüştür. Ölçümlerin bilgisayara kaydedilmesi grafiklerin çizilebilmesi için yazılım (Rheocalc Application Software V3.2 Build 47-0; Brookfield Engineering Laboratories) kullanılmıştır.

Bu çalışmada kefiran örneklerinde (7±0,5 mL) viskozite, kayma gerilmesi ve deformasyon hızları spindle SC4-18 (small sample adapter) daldırılarak belirlenmiştir. Reolojik ölçümler 25 °C sıcaklıkta örneğin RPM'de kademeli hız artırılarak hazırlanan programlarda gerçekleştirilmiştir. Kefiran örneklerinde

(7±0,5 mL) viskozite, kayma gerilmesi ve deformasyon hızları spindle daldırılarak belirlenmiştir (Kok-Taş ve Guzel-Seydim, 2010; Ertekin ve Guzel-Seydim, 2010). Ölçümlerin bilgisayara kaydedilmesi grafiklerin çizilebilmesi için yazılım kullanılarak değerlendirilmiş ve reogramları hazırlanmıştır. Reolojik ölçümler örneğin viskozitesine uygun RPM' de hızın belirlenerek hızın kademeli olarak artırılması şeklinde hazırlanan programlarda gerçekleştirilmiştir.

Dokuz gün farklı karbon kaynakları ile aktifleştirilen kefir danelerinden elde edilen kefiranlar cam tüplere 2 g tartılarak üzerlerine 7 mL saf su eklenmiştir. Cam tüpler beher içerisindeki sıcak su da bekletilerek ve vorteksenerek kefiran örnekleri çözündürülmüştür. Çözünen örnekler viskozimetre cihazının tüpüne konulmuştur. Örneklerin sıcaklıkları ölçüldükten sonra ölçümler yapılmıştır. Ölçümler yapılmadan önce belirtilen değerler sistemde seçilmiştir. SSN: 50 RPM hız (devir sayısı), LSC: 10 (ölçme sayısı), SSI: 10 (aralık değeri-10'ar artırarak), WTI: 5 (5 saniyede 1 ölçüm).

### **3.2.6. Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi ile kefiran yapının belirlenmesi**

NMR spektrumlarının kaydedilmesinde numune hazırlanması önemlidir. Numunenin hazırlanmasında gösterilecek özen, iyi bir spektrum alabilmek için aranan şartlardan birisidir. Numunelerimiz TFA çözücünde çözülmüştür. Bruker marka 400 MHz cihazda <sup>1</sup>H NMR için 10-20 mg, <sup>13</sup>C NMR için 40 mg numune yeterlidir ve 1 mL d-çözücü içerisinde hazırlanmalıdır. Ölçüm süresi çözeltilere göre değişkenlik gösterebilmektedir. NMR tüpü 18 cm boyunda 0,5 cm çapında özel bir camdan imal edilmiştir. Ölçülecek numunenin çözeltisi hazırlandıktan sonra özel cam krozeden süzülür. Ortamda herhangi bir yabancı maddenin olmaması önemlidir. Özellikle çözelti içerisinde yüzen, çıplak gözle zor görülen çok küçük parçacıklar (örneğin; filtre kâğıdının tüyleri) manyetik alanın homojenliğini bozar ve pikler genişlemektedir.

Seçilecek olan çözücünde aranacak bazı özelliklerin olması gerekir. Çözücü pikleri, numune pikleri ile çakışacak ve spektrum yorumu yapmasını

engeleyecek şekilde olmamalıdır. Çözücü ya proton içermemeli (karbontetraklorür, tetrakloretilen, karbondisülfür gibi), ya da çözücü protonları döteryum (D) ile değiştirilmelidir.

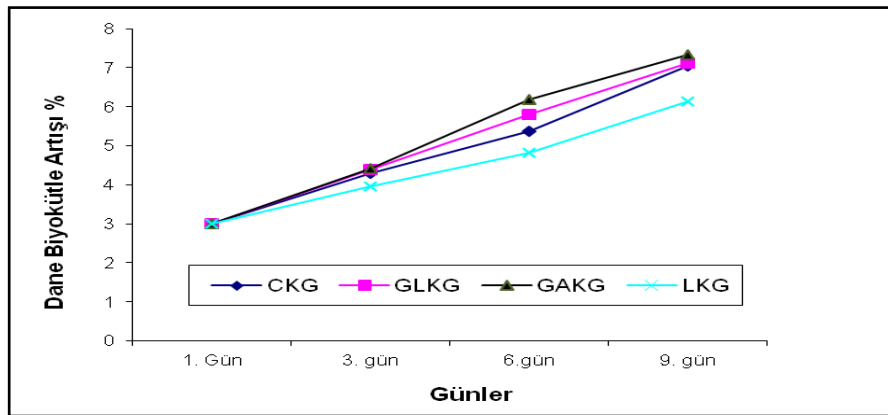
Bu çalışmada NMR analizi ODTÜ Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda (Ankara, Türkiye) ve Hacettepe Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda (Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Örneklerin analizinde çözücü olarak TFA çözücü (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Analiz oda sıcaklığında ve 65 °C'de uygulanmıştır. Her iki sıcaklıkta da aynı pikler gözlemlenmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Farklı Karbon Kaynaklarında Geliştirilen Kefir Danelerinin Biyokütle Artışı Sonuçları

Kefir danelerinin farklı karbon kaynakları içeren süt içerisinde dokuz gün süresince geliştirilmesi ile biyokütle artışları Şekil 4.1'de belirtilmiştir. Tüm kefir daneleri 3 gr olarak tartımı alınarak başlanmış ve dokuzuncu gün sonunda CKG, GAKG, GLKG, ve LKG örnekleri sırasıyla; 7,04; 7,33; 7,11 ve 6,14 gram olarak belirlenmiştir. Üçer gün periyotlarla ağırlıkları belirtilen danelerin dokuz gün sonundaki ağırlık artışları karşılaştırıldığında GAKG (galaktozda geliştirilen kefir danesi) örneğinde en fazla artış belirlenmiştir. Bu ağırlıkları sırasıyla GLKG (glukozda geliştirilen kefir danesi), CKG (karbon kaynağı kullanılmayan kefir danesi) ve LKG (laktozda geliştirilen kefir danesi) izlemektedir. Karbon kaynakları ile zenginleştirilmiş kefir dane artışları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak fazla olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Ancak diğer uygulama örneklerindeki artış oranları da GAKG'nun ağırlık artışına benzerlik göstermiştir.

Bakteriyel polisakkarit sentezi sıcaklık, pH, uygun karbon kaynakları, fermentasyon zamanı ve birbirleri arasındaki ilişkilerden etkilenmektedir (De Vuyst ve Degeest, 1999; Petry vd., 2000).



Şekil 4.1. Dokuz gün süresince farklı karbon kaynaklarında geliştirilen kefir danelerindeki % ağırlık değişimi

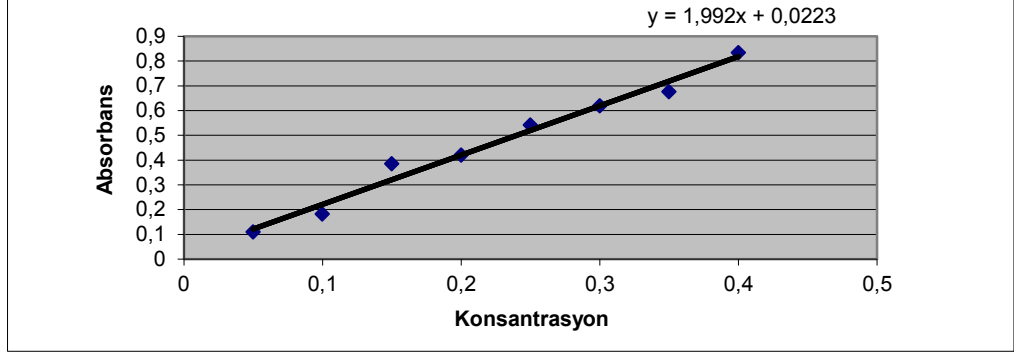
Güzel-Seydim ve arkadaşları (2011) kefir danelerinin biyokütle artışına etkilerini araştırmak için süte PAS protein izolatu , modifiye peynir altı suyu proteini ve inolin ilavesi (İNU) ve ortam koşullarını değiştirerek kefir danelerindeki biyokütle artışlarını gözlemişlerdir. Atmosfersiz koşullarda yaptıkları deneyde en fazla biyokütle artışının WPI içeren besiyerinde olduğunu tespit etmişler. WPI içeren koşullarda danelerin başlangıç miktarına göre %392, MPİ içerenlerde %223, INU içerenlerde %129,5 ve kontrol grubu atmosferde %98.5 artış gerçekleşmiştir. %6 CO<sub>2</sub> uygulamasının biyokütle artışına herhangi bir etki etmediği belirlenmiştir.

Schoevers ve Britz (2003) çalışmada düşük yağlı süte triptoz aminoasit ilavesinin (25 °C de 130 rpm' de çalkalama) yüksek biyokütle artışı meydana getirdiğini belirtmiştir.

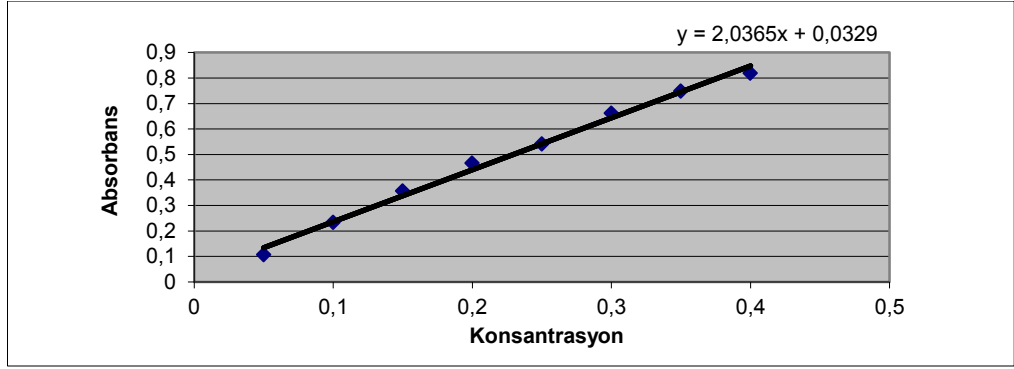
Farklı karbon kaynaklarının dane biyokütle artışı üzerine etkisinin protein kökenli bileşenlerin etkisi kadar olmadığı tespit edilmiştir.

#### **4.2. Kefiran Miktarlarının Değerlendirilmesi**

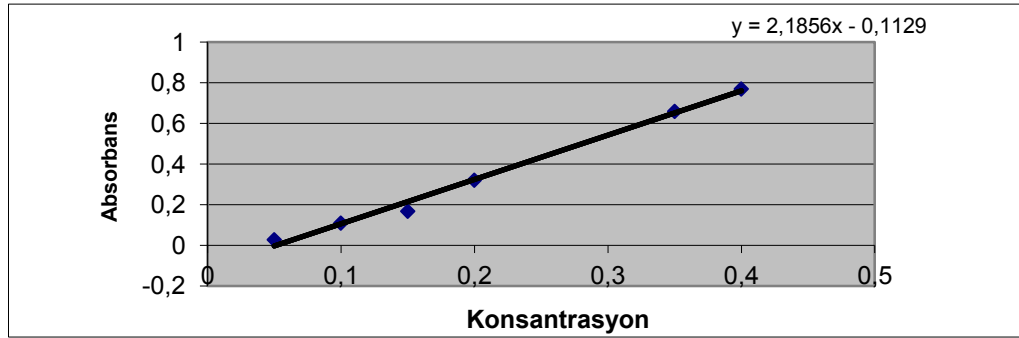
Kefir danelerinden ekstrakte edilen kefiran örneklerinin miktarı farklı standartlar kullanılarak (laktoz, glukoz ve galaktoz) UV-sektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Farklı standartlar kullanma amacımız mikroorganizmaların karbon kaynaklarından farklı şekillerde yararlanmaları ve buna bağlı olarak değişik miktarlarda ve çeşitli metabolit üretmeleridir. Bunun için öncelikle kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Laktoz, galaktoz ve glukoz standartları ile ayrı ayrı karşılaştırılmıştır (Şekil 4.2; 4.3; 4.4).



Şekil 4.2. Glukoz için kalibrasyon doğrusu

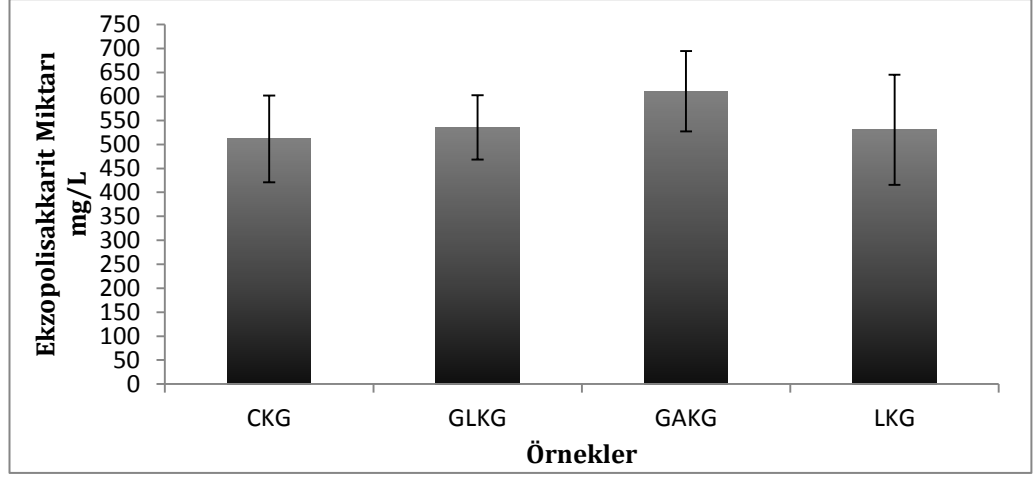


Şekil 4.3. Galaktoz için kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.4. Laktoz için kalibrasyon doğrusu

Laktoz standardı ile belirlenen kefiran örnekleri arasında galaktoz kullanılarak geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran (GAKG) 610,96 mgL<sup>-1</sup> olarak, kontrol kefir danesi (CKG) örneğine göre 99,52 mgL<sup>-1</sup> daha fazla polisakkarit yapının arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.5). Tüm standartlara göre belirlenen EPS miktarları (mgL<sup>-1</sup>) Çizelge 4.1' de laktoz, glukoz, galaktoz eşdeğeri cinsinden verilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı karbon kaynaklarından elde edilen kefiran ekstraksiyon miktarları

Glukoz standardı ile belirlenen kefiran örnekleri arasında galaktoz kullanılarak geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran (GAKG) 561,74 mgL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Galaktoz standardı ile belirlenen kefiran örnekleri arasında GAKG 541,14 mgL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Tüm standartlarda da diğer örneklerle GAKG örneği arasında önemli farklılık belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ).

Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynakları kullanarak elde edilen kefiran miktarları

| Standartlar | Uygulama | OD <sub>480</sub> | EPS (mgL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|----------|-------------------|--------------------------|
| Laktoz      | CKG      | 0,3197            | 511,44 <sup>a</sup>      |
|             | GLKG     | 0,3348            | 535,69 <sup>a</sup>      |
|             | GAKG     | 0,3818            | 610,96 <sup>b</sup>      |
|             | LKG      | 0,3317            | 530,78 <sup>a</sup>      |
| Glukoz      | CKG      | 0,2828            | 452,55 <sup>a</sup>      |
|             | GLKG     | 0,2995            | 479,16 <sup>a</sup>      |
|             | GAKG     | 0,3511            | 561,74 <sup>b</sup>      |
|             | LKG      | 0,2961            | 473,77 <sup>a</sup>      |
| Galaktoz    | CKG      | 0,2715            | 434,34 <sup>a</sup>      |
|             | GLKG     | 0,2877            | 460,36 <sup>a</sup>      |
|             | GAKG     | 0,3382            | 541,14 <sup>b</sup>      |
|             | LKG      | 0,2844            | 455,09 <sup>a</sup>      |

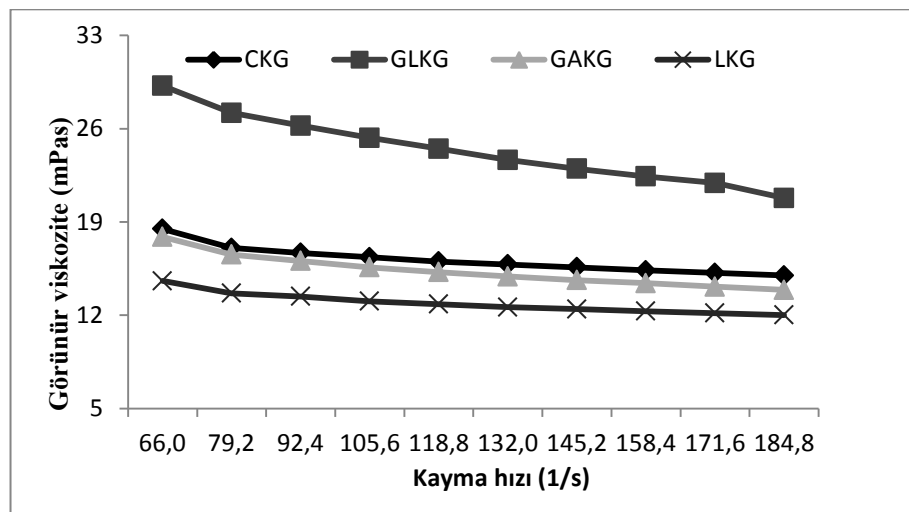
<sup>ab</sup> Örnekler arasında belirtilen a,b değeri istatistiksel olarak önem derecesini belirtmektedir ( $P < 0,05$ .)

Micheli vd. (1999), modifiye edilmiş MRS besiyeri kullanmış ve 2 g/L kefiran üretimi sağlamıştır. Mitsue vd. (1999), kefiran üreten bakteri *L. kefiranofaciens* ile *Torulasporea delbrueckii* mayasını kombine ederek en iyi kefiran üretimini

gerçekleştirmiştir. 50 L' lik geri-beslemeli fermentörde bu iki mikroorganizma kullanılarak 7 günde 3740 mgL<sup>-1</sup> kefiran elde edilmiştir. Kefir danelerinin 30 ve 50 g/L laktoz içeren sıvı besiyeri içerisinde geliştirilmesiyle, ilave ettikleri farklı %10 deproteinize PAS' da üretilmiş ve EPS oluşumu tespit edilmiştir. Kullanılan 100 g kefir danesinin süt içinde fermentasyon sonrası EPS miktarı 218 mgL<sup>-1</sup>, deproteinize peynir altı suyu içinde fermentasyonu sonrası EPS miktarı 247 mgL<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. *Streptococcus thermophilus* EPS 50-350 mgL<sup>-1</sup> olarak üretmekte (Cerning, 1995), en yüksek EPS sentezi 42 °C'de, pH 6,2' de gerçekleşmektedir (De Vuyst vd., 1998). *S. thermophilus* karbon kaynağı olarak glukozdan laktozlu ortamı tercih ettiği belirtilmiştir (Degeest ve De Vuyst, 2000). Mozzi vd., (2001) *Lactobacillus casei* CRL 87'in polimer üretimi için, EPS sentezini düzenleyen biyosentetik enzim aktivitesinin arttığını ve EPS üretimini farklı şeker kaynaklarının (glukoz ve galaktoz) etkilediğini tespit etmişlerdir.

#### 4.3. Kefiran Örneklerinin Akış Davranışlarının Belirlenmesi

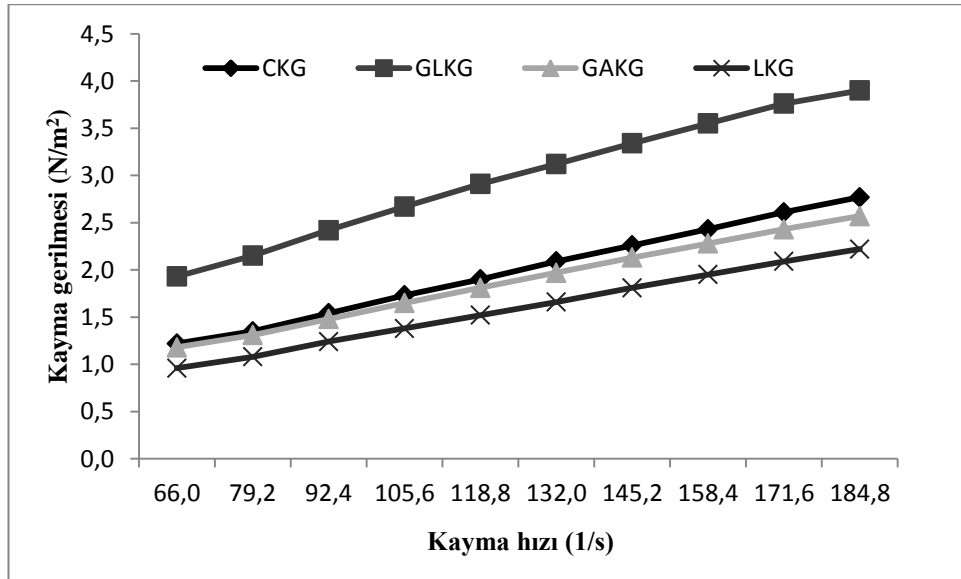
Farklı karbon kaynaklarından elde edilen EPS viskozite-kayma hızı reogramı Şekil 4.6'da verilmiştir. GLKG örneği viskozite değeri 29,2 mPas en yüksek olarak belirlenmiştir. GAKG, CKG ve LKG örneklerinde 66 birim kayma hızında viskozite değerleri sırasıyla 17,9; 18,5 ve 14,6 birim olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Farklı karbon kaynakları kullanılarak kefir danelerinden elde edilen EPS yapılarının kayma hızı ve viskozite reogramı

Bakteriler buldukları ortamda kullandığı karbon içeriğine göre çoğalma gösterirler. EPS içeriğindeki azalmanın bazı bakterilere ait enzimlerin EPS yapısını daha küçük parçalara ayırarak viskoziteyi azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kefir danesi kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Glukoz kullanımı ile elde edilen EPS viskozitesinin yüksek olması içerdiği mikroorganizmaların uygun karbon kaynağını kullanmaması ya da EPS yapıya etki eden enzimleri içermemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı karbon kaynaklarından elde edilen EPS kayma gerilmesi-kayma hızı reogramı Şekil 4.7' de verilmiştir. Örneklerin EPS kayma hızı arttıkça viskozite değerinin düşmesi değerlendirmesi ile tüm örneklerin pseudoplastik akış davranışı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Farklı karbon kaynakları kullanılarak kefir danelerinden elde edilen EPS yapılarının kesme gerilimi ve kayma hızı reogramı

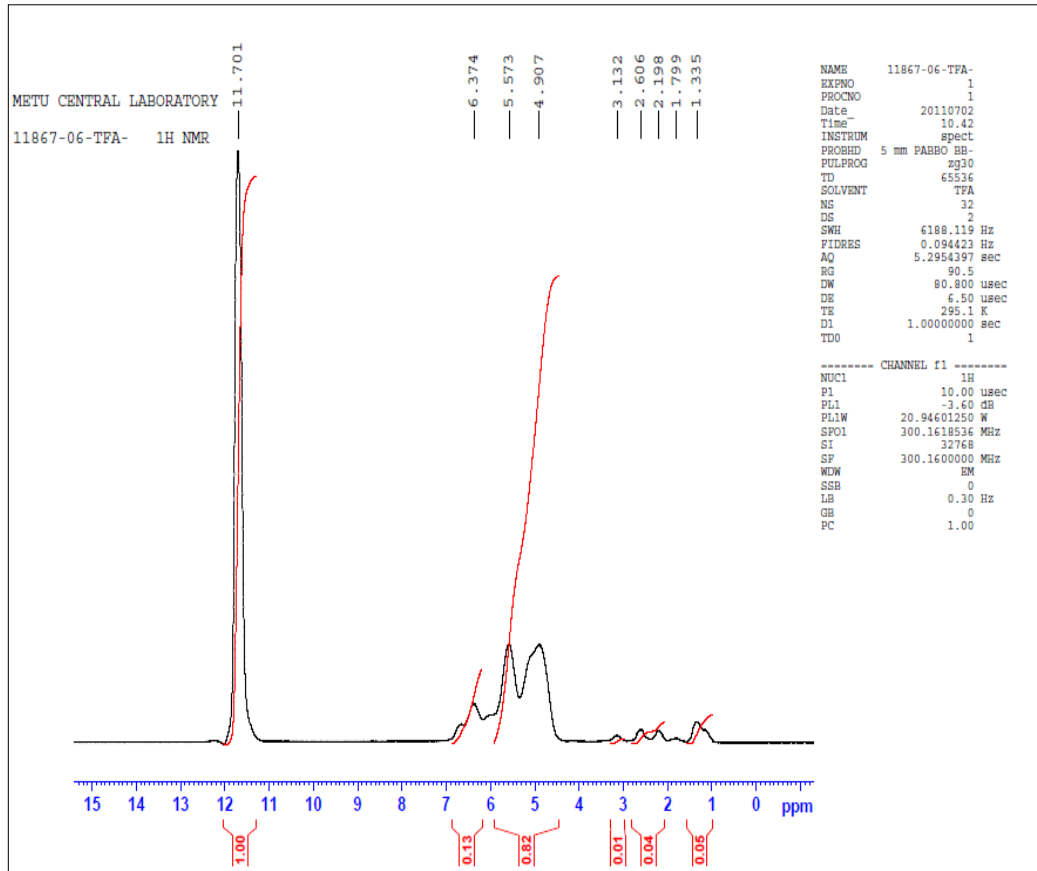
Rimada vd. (2006), kefirandan jel oluşturarak reolojik özellikleri ve viskozitesini araştırmışlardır. Kefiran içermeyen jel pseudoplastik tiksotropik davranış göstermiştir. Kefiran içeren jelin viskozitesinde önemli düzeyde artış tespit edilmiştir. Sonuçta, doğal bir polisakkarit olduğundan süt ürünlerinde kullanılabilecek önemli bir alternatif kıvam artırıcıdır.

Glukoz ve galaktoz içeren kefiran yapı, sütün jel oluşumunda viskoelastik özellikleri ve viskoziteyi iyileştirebilir (Piermaria vd., 2009).

#### 4.4. NMR Analizi Sonuçları

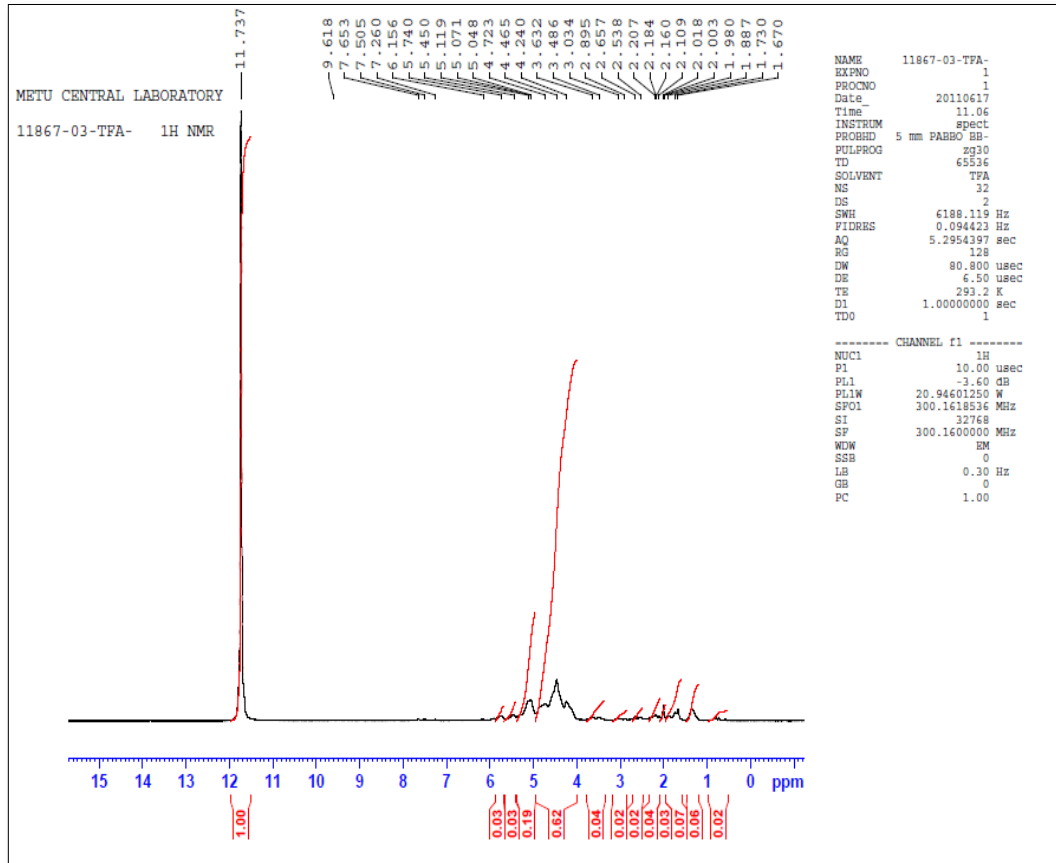
TFA çözeltisi kullanılarak oda sıcaklığında  $^{13}\text{C}$  ve  $^1\text{H}$  spektrumları elde edilmiştir. Bu tezin devamı olan Tübitak-1120872 nolu projede elde edilen kefiran yapıların monosakkarit içeriği belirlenmiştir.

CKG örneğinden elde edilen kefiranın TFA ortamında alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.8) incelendiğinde; spektrum da 5.57 ve 4.9 ppm'de üst üste çakışmış olarak görülen pik değerlerinin glukoz ve sükroza, 3.13 ppm'de görülen pikin galaktoza, 2.6, 2.19 ve 1.33 ppm'de gözlenen pik değerlerinin riboza ait olduğu düşünülmektedir.



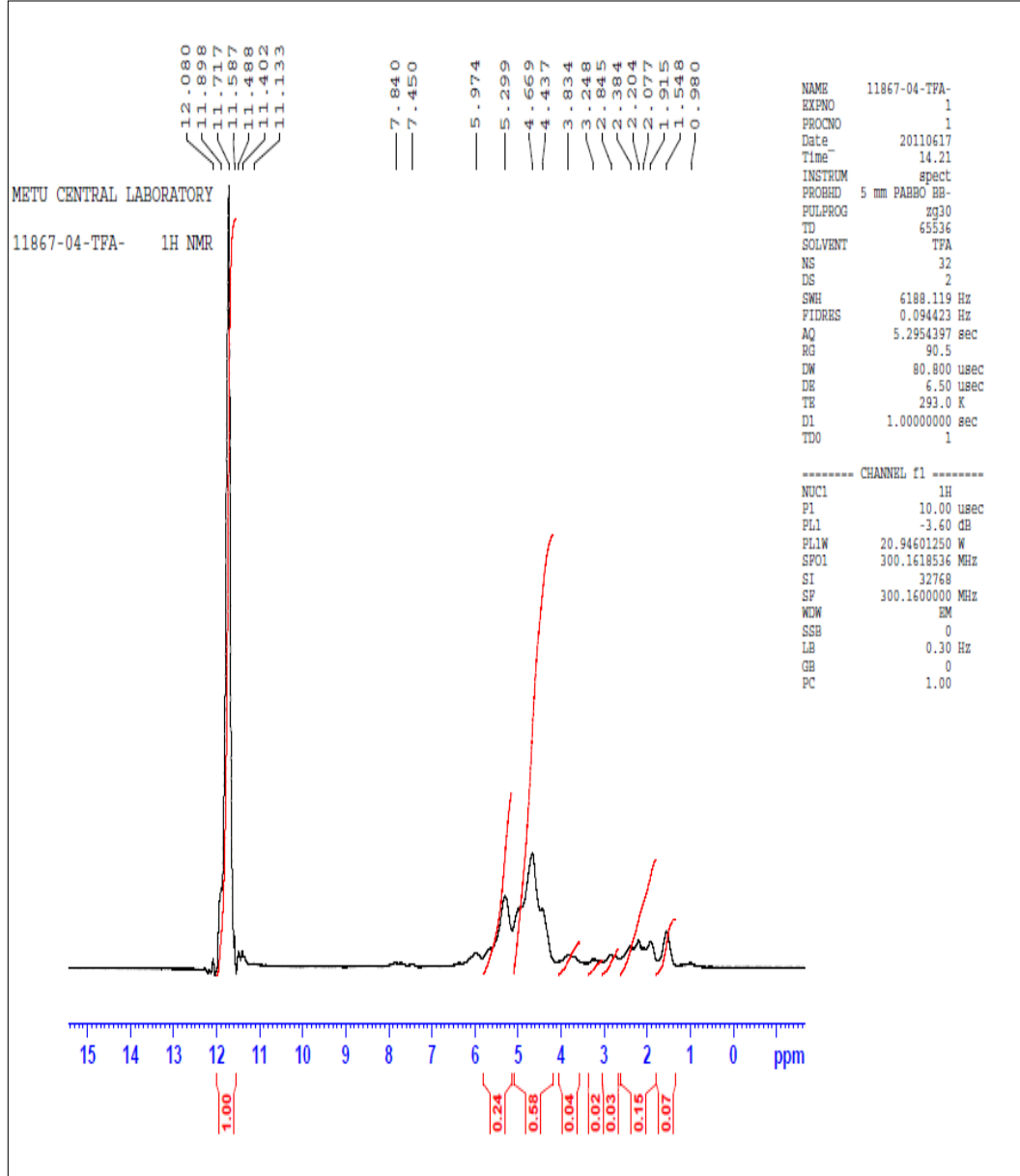
Şekil 4.8. Kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (CKG)  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

Kefiran yapıda tespit edilen glukoz, galaktoz, riboz, ksiloz, arabinoz ve sükroz sakkaritlerinin genel olarak rezonansa gelme aralığı 5,6-1,24 ppm değerleri arasındadır. Bu durum ise spektrumları yorumlamayı güçleştirmektedir. GLKG örneğinden elde edilen kefiranın TFA ortamında alınan  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu değerlendirildiğinde; monosakkaritlerin farklı konfigürasyonlara sahip olmaları, hemen hemen aynı bölgelerde rezonansa gelmeleri ve saflaştırma işleminde karşılaşılan zorluklardan dolayı spektrumda piklerin üst üste çakıştığı veya dublete-triplete yarıldığı görülmüştür. Diğer taraftan 5,11-5,07 ve 5,04 ppm'de gözlenen piklerin yapıdaki monosakkaritleri nanomerik protonlarına ait olduğu düşünülmektedir. 4,72-4,46 ve 4,24 ppm'de üst üste çakışmış olarak gözlenen piklerin; glukoz ve sükroza; 2,01-1,98 pmm'deki piklerin riboza; 3,63-3,48 pmm'de gözlenen piklerin ise galaktoza ait olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Glukoz ile geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (GLKG)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

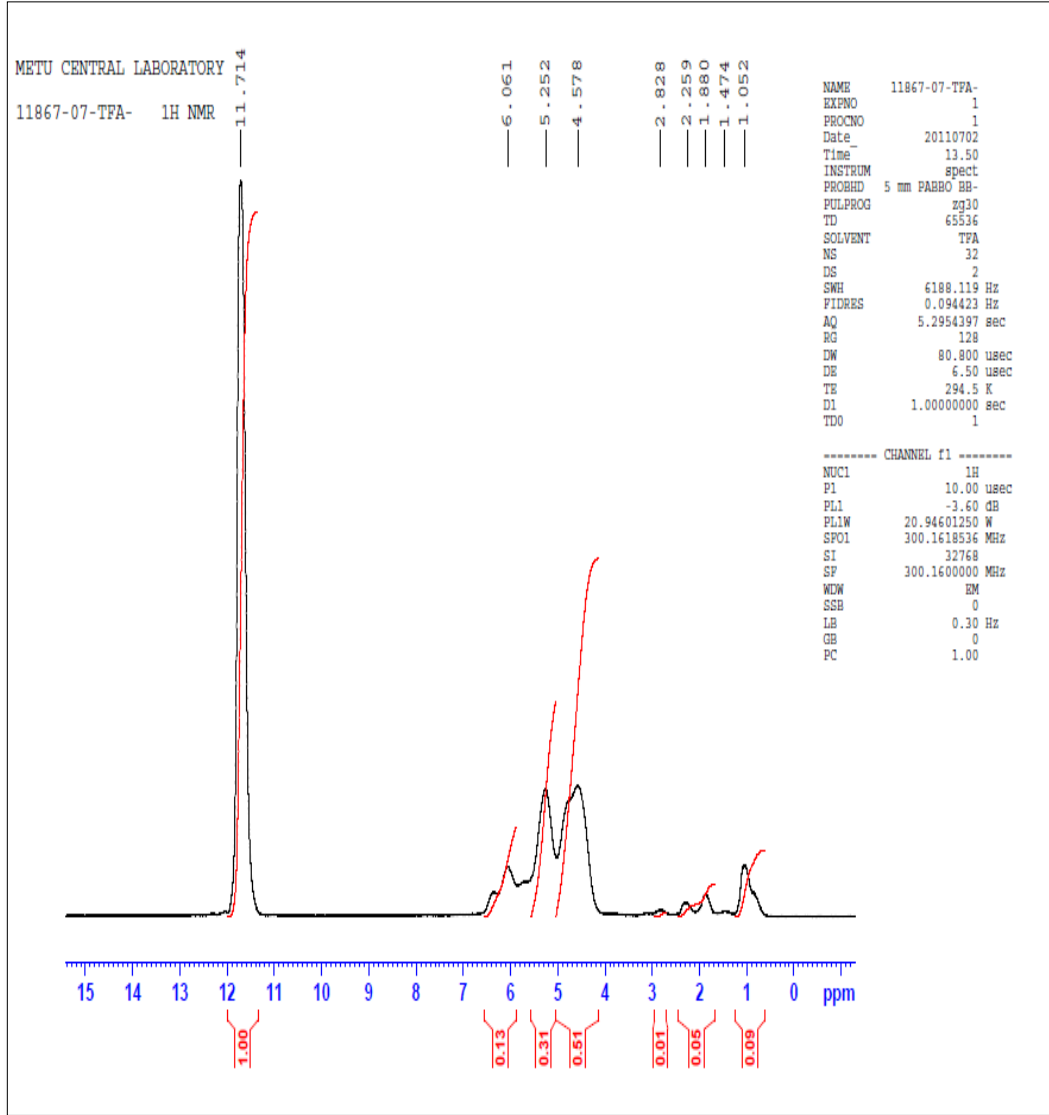
GAKG örneğinden elde edilen kefiranın TFA ortamında alınan  $^1\text{H-NMR}$  spektrumuna göre, GLKG için geçerli olan durumlar GAKG için de geçerlidir. Spektrumda 5,29-4,66-4,43-3,83-3,24-2,84 ve 1,54 ppm'de gözlenen pik değerlerden 3,83-3,24 pmm'de gözlenen piklerin galaktoza ait olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Galaktoz ile geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (GAKG)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

LKG örneğinden elde edilen kefiranın TFA ortamında alınan  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (Şekil 4.11) incelendiğinde; spektrum da 5.25 ve 4.57'de üst üste çakışmış

olarak görülen pik değerlerinin glukoz ve sükroza, 2.82, 2.25, 1.88 ve 1,47 pmm'de gözlenen pik değerlerinin riboza ait olduğu düşünülmektedir.

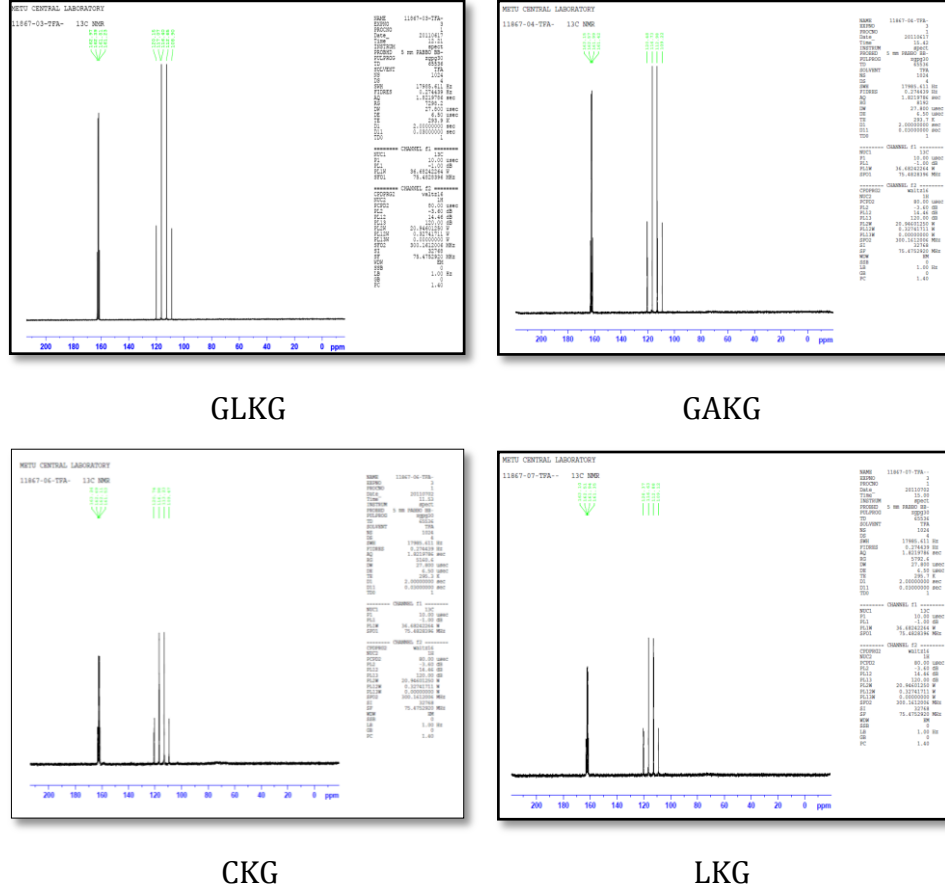


Şekil 4.11. Laktoz ile geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran yapı (LKG) <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

Ökaryotlar ve prokaryotlar tarafından üretilen EPS' lerin kompozisyonlarındaki farklılık pentoz şekerlerinin varlığıdır. Ökaryotik polisakkaritler D-riboz veya D-ksiloz gibi pentozları içerebilirler, fakat prokaryotlar tarafından üretilen ekstraselüler polisakkaritlerde bu pentozların oluşumu yaygın değildir. Kefiran yapı üzerinde mayaların da etkili olduğu düşünülmektedir.

Tüm örneklerden elde edilen kefiran yapıların TFA ortamında alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumları şekil 4.12'de belirtilmektedir.

Kefir danelerine farklı karbon kaynaklarının uygulanması polisakkarit yapıyı etkilemediği ve kimyasal yapıyı değiştirmedeği tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Tüm örneklerden elde edilen kefiran yapıların TFA ortamında alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumları

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bakteriyel polisakkarit sentezi sıcaklık, pH, uygun karbon kaynakları, fermentasyon zamanı ve birbirleri arasındaki ilişkilerden etkilenmektedir. Galaktoz ile zenginleştirilmiş süt ortamında geliştirilen kefir danesi örneği biyokütle artışı diğer karbon kaynakları ile zenginleştirilen örneklerin biyokütle artışına benzer oranda çıkmıştır. Laktoz standardı ile belirlenen kefir örnekleri arasında galaktoz kullanılarak geliştirilen kefir danesinden elde edilen kefiran (GAKG)  $610,96 \text{ mgL}^{-1}$  olarak, kontrol kefir danesi (CKG) örneğine göre  $99,52 \text{ mgL}^{-1}$  daha fazla polisakkarit yapının geliştiği belirlenmiştir. GLKG örneği viskozite değeri  $29,2 \text{ mPas}$  en yüksek olarak belirlenmiştir. GAKG, CKG ve LKG örneklerinde  $66 \text{ 1/s}$  kayma hızında viskozite değerleri sırasıyla  $17,9$ ;  $18,5$  ve  $14,6$  olarak belirlenmiştir.

Kefir dane mikroflorası çok kompleks bir yapıdadır. Kefir dane biyokütle artışına ve polisakkarit miktarına galaktoz karbon kaynağının etkili olduğu tespit edilmiştir. Kefir danesi içerisinde bulunan özellikle *Lactobacillus* spp. türlerinin karbon olarak galaktoz ile zenginleştirilmiş ortamda teşvik oldukları ve polisakkarit üretim miktarını artırdıkları belirlenmiştir. Dane mikroflorasının pek çok bakteri içeriği sebebiyle hangi mikroorganizmanın buna sebep olduğu başka araştırmalarda uygulanabilir. Farklı karbon kaynaklarında kefir danesinin geliştirilmesinde önemli farklılıklar belirlenmemiştir. Polisakkarit yapı hakkında literatür bilgisi sağlanmıştır.

Gıda sektöründe kullanılmak üzere, kefir danesi çok kıymetli bir yapı olduğundan bu polisakkarit yapının eldesinin sağlanmasının uygun olacağı düşünülmektedir

## KAYNAKLAR

- Abraham, A.G., De Antoni, G.L., 1999. Characterization of Kefir Grains Grown in Cows' Milk and in Soya Milk. *Journal of Dairy Research*, 66, 327-333.
- Altuğ, B., 2013. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin Memeli Kültür Hücrelerinde Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu niversitesi, 73s., Eskişehir.
- Aslim, B., Beyatlı, Y., Soran, H., Mercan, N., Durlu zkaya, F., Yüksekdağ, Z. N. ve Ediz, N., 2005a. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit retiminin Belirlenmesi. Proje No, TBAG-2090 (101T129), 242 s.
- Auld, W.E., 2010. Survival and exopolysaccharide production of lactic acid Bacteria Grown on Grape Pomace. Master of Science, University of Misseouri, USA.
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. 2011. New Perspectives for Lactobacilli Exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, pp. 54-66.
- Balcı, M. 2004. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.ř. Yayınları, ISBN: 975-7064-23-8, Ankara.
- Barbosa-Cnovas, G.V., Kokini, J.L., Ma, L., Ibarz, A., 1996. The Rheology of Semiliquid Foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39,1-69.
- Bejar, V., Llamas, I., Calco, C. and Quesada, E. 1998. Characterization of Exopolysaccharides Produced by 19 Halophilic Strains of the Species *Halomonas eurihalina*. *Journal of Biotechnology*, 61, pp. 135-141.
- Bottazzi, V., Bianchi, F., 1980. A Note on Scanning Electronmicroscopy of Microorganisms Associated with the Kefir Granule. *Journal of Applied Bacteriology*, 48, 265-268.
- Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P.G., Dallavalle, P., Parisi, M.G., 1994. Kefir *Microbiologia, Chimica, e Tecnologia L'industria Latte*, 30, 41-62.
- Bourne, M., 1982. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Pres, Inc. London. 199-245.
- Cerning, J. (1990). Exocellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 113-130.
- Cerning, J. 1995 Production of Exopolysaccharides by Lactic Acid Bacteria and Dairy Propionibacteria. *Le Lait* 75, 463-472.
- Challinor, S. W., Rose, A. H., 1954. Inter-Relationships between Yeast and Bacterium When Growing Together in a Defined Medium. *Nature*, 174, 877.

- Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S., 2003b. Enhanced Kefiran Production of *Lactobacillus kefiranofaciens* by Mixed Culture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Biotechnology*, 100, 43-53.
- Cheirsilp, B., Shoji, H., Shimizu, H., and Shioya, S. (2003). Interactions Between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in Mixed Culture for Kefiran Production. *Journal Bioscience and Bioengineering*, 96, 279-284.
- C van Zyl, B A Prior, S G Kilian and E V 1993, Brandt Role of D-ribose as a Cometabolite in D-xylose Metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied of Environment Microbiology* 59(5), 1487.
- Çevikbaş, A., Yemni, E. , Ezzedenn, F.W., Yardimici, T. , Çevikbaş , U. ,Stohs, S. J.,1994, Antitumoural Antibacterial and Antifungal Activities of Kefir and Kefir Grain, *Phytotherapy Research*, 8(2), 78–82.
- Daubert, C.R. ve Foegeding, E.A., 1998. Rheological Principles for Food Analysis. In: *Food Analysis*. (Nielsen, S.S.,-ed.), pp551-570. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Degeest, B. and De Vuyst, L. (2000), "Correlation of Activities of the Enzymes  $\alpha$ -Phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDPglucose Pyrophosphorylase with Exopolysaccharide Biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03", *Applied of Environment Microbiology*, 66, 8, pp. 3519–3527.
- Deegest, B., Mozzi, F. and De Vuyst, L. 2002. Effect of Medium Composition and Temperature and pH Changes on Exopolysaccharide Yields and Stability During *Streptococcus thermophilus* LY03 Fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 161-174.
- Deegest, B., Vaningelgem, F. and De Vuyst, L. 2001. Microbial Physiology, Fermentation Kinetics, and Process Engineering of Heteropolysaccharide Production by Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 747-757.
- Demir M. S., 2007. Çesitli Makrofunguslara Ait Fruktifikasyon, Vejetatif Misel ve Ekzopolisakkaritlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar. Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- De Vuyst, L. and Deegest, B. 1999. Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, pp. 153-177.
- De Vuyst, L. and Marshall, V. M. 2001. First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria from Fundamentals to Applications. *International Dairy Journal*, 11, pp. 659-768.

- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Deegest, B. 2001. Recent Developments in the Biosynthesis and Applications of Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, pp. 687-707.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. and Deegest, B. 1998. Production by and Isolation of Exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* Grown in a Milk Medium and Evidence for Their Growth-Associated Biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84, pp. 1059-1068.
- Duboc, P. and Mollet, B. 2001. Applications of Exopolysaccharides in the Dairy Industry. *International Dairy Journal*, 11, pp. 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956), "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Analytical Chemistry*, 28, pp. 350-356.
- Duitschaever, C.L., Kemp, N. ve Emmons, D., 1987. Pure Culture Formulation and Procedure for The Production of Kefir. *Milchwissenschaft*, 42 (2), 80-82.
- Duitschaever, C.L., Kemp, N., Smith, A.K., 1988b. Microscopic Studies of the Microflora of Kefir Grains and of Kefir Made by Different Methods. *Milchwissenschaft*, 43, 479-481.
- Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., 2000. Comparison of Exopolysaccharide Production by Strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* Grown in Chemically Defined Medium and Milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 251-255.
- Ertekin, B., Guzel-Seydim, Z.B. 2010. Effect of Fat Replacers on Kefir Quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 543-548.
- Escher, F., Conde-Petit, B., Nuessli, J., 2003. From Structure and Rheology to Sensory Quality of Food. 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure, 45-46.
- Essia Ngang, J. J., Wolniewicz, E., Letourneau, F., Villa, P., 1992. Stimulation of Lactobacilli During Alcoholic Fermentation, Action of Sucrose Hydrolysis by Yeast. *Biotechnology Letter*, 14, 741-746.
- Farnworth, E.R., 2005. Kefir – a Complex Probiotic. *Food Science and Technology Bulletin, Functional Foods*, 2 (1), 1-17.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011. Milk and Milk Products Erişim Tarihi: 08.06.2013  
<http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>.

- Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M., Simov, Z.I., 2002. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 0939.5075/2002/0900, 805-810.
- Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M. and Simov, Z.I. (2000), "Production and Monomer Composition of Exopolysaccharides by Yogurt Starter Cultures", *Canada Journal of Microbiology*, 46, pp. 1123–1127.
- Fujisawa, T., Adachi, S., Toba, T., Arihara, K. and Mitsouka, T. (1988). *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. Isolated from Kefir Grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 12-14.
- Furukawa, N., Iyama, R., Takahashi, T., Yamanaka, Y., 1992. Effect of Oral Administration of Water Soluble Fraction from Kefir Grain on Antibody Production in Mice. *Animal Science Technology (Japan)*, 63, 428-436.
- Furukawa, N., Takahashi, T., Yamanaka, Y., 1996. Effects of Supernatant of Peyer's Patch Cell Culture with Kefir Grain Components on the Mitogenic Response of Thymocyte and Splenocyte in Mice. *Animal Science Technology (Japan)*, 67, 153-159.
- Furukawa, Y., Kikuchi, J., Nakamura, M., Iwase, S., Yamada, H., and Matsuda, M. (2000). Lineage-Specific Regulation of Cell Cycle Control Gene Expression During Haematopoietic Cell Differentiation. *British Journal Haematol.* 110, 663-673.
- Furukawa, Y., Nishi, K., Kondo, T., Mizuno, Y., and Narabayashi, H. (1993). CSF Biopterin Levels and Clinical Features of Patients with Juvenile Parkinosis. *Advances Neurology*. 60, 562-567.
- Furuno, T. ve Nakanishi, M. 2012. Kefiran Suppresses Antigen-Induced Mast Cell Activation. *Biology Pharmacology Bulletin* 35(2), 178-183.
- Gamar-Nourani, L., Blondeau, K. and Simonet, J. M. 1998. Influence of Culture Conditions on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* Strain C83. *Journal of Applied Microbiology*, 85, pp. 664-672.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L., 1998. Characteristics of Kefir Prepared with Different Grain Milk Ratios. *Journal of Dairy Research*, 65, 149- 154.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. S. (2011). Development and Characterization of a New Biodegradable Edible Film Made from Kefiran, an Exopolysaccharide Obtained from Kefir Grains. *Food Chemistry*, 127, 1496-1502.
- Ghasemou M., Khodaiyan F., Jahanbin K., Gharibzahedi S.M., Taheri S., 2012. Structural Investigation and Response Surface Optimisation for

Improvement of Kefiran Production Yield from a Low-Cost Culture Medium. *Food Chemistry* 133, 383-389.

- Gorret, N., M., Aubois, J. L., Engasser, J. M. and Ghoul, M. 2001. Study of the Effects of Temperature, pH and Yeast Extract on Growth and Exopolysaccharides Production by *Propionibacterium acidi-propionici* on Milk Microfiltrate Using a Response Surface Methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp. 788-796.
- Grobben, H.J., Sikkema, J., Smith, M.R., Bont, J.A.M., 1995. Production of Extracellular Polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* NCFB 2772 Grown in a Chemically Defined Medium. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 103-107.
- Guzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T., Greene, A.K., 2010a. Kefir and Koumiss: Microbiology and Technology. In: "Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products". 143-164. ISBN 978-1-4200-8207-4.
- Guzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T., Greene, A.K., 2010b. Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (in press).
- Guzel-Seydim, Z.B., Seydim, A.C., Greene, A.K., Tas, T., 2006. Determination of Antimutagenic Properties of Some Fermented Milks Including Changes in the Total Fatty Acid Profiles Including CLA. *International Journal of Dairy Technology*, 59 (3), 209-215.
- Güzel-Seydim, Z.B., Seydim, A.C., Greene, A.K. and Bodine, A.B. 2000a. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir During Fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 35-43.
- Guzel-Seydim Z.B., Wyffels, J., Seydim, A.C., Greene, A.K., 2005. Turkish Kefir and Kefir Grains: Microbial Enumeration and Electron Microscopic Observation. *Society of Dairy Technology*, 58 (1).
- Güzel-Seydim Z. B., Wyffels, J., Seydim, A.C. and Greene, A.K., 2005a. Turkish Kefir and Kefir Grains: Microbial Enumeration and Electron Microscopic Observation. *Journal of International Dairy Technology*, 58(1),25-29.
- Hayaloğlu, A.A. ve Erginkaya, Z. 2001. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri. *Gıda Teknolojisi Derneği*, 23, 26 s., Ankara.
- Hertzler, S.R., Clancy, S.M., 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, 582-587.

- Hoa, P.T., Nair, L. and Visvanathan, C. 2003. The Effects of Nutrients on Extracellular Polymeric Substance Production and Its Influence on Sludge Properties. *WaterSA*, 29, pp. 437-442.
- Hosono, A., Tanabe, T., Otani, H., 1990. Binding Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Milk with Mutagenic Amino Acid Pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, 45, 647-651.
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., Ibáñez, F.C., 2005. Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Kefir During Storage. *Food Chemistry*, 90, 613-620.
- Kandler, O., and Kurath, P., 1983. *Lactobacillus Kefir sp. nov.*, a Component of the Microflora of Kefir. *Systematic Applied Microbiology*, 4, 286-294.
- Karaca H., Dinçer E., Kıvanç M., *Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri*, Akademik Gıda 8 (1) (2010) 32-38 Derleme Makale / Review Paper.
- Karagözlü, C., 1990. Farklı Isıl İşlem Uygulanmış İnek Sütlerinden Kefir Kültürü Danesi ile Üretilen Kefirlerin Dayanıklılığı ve Nitelikleri Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ürünleri Teknolojisi, Yüksek Lisans Tezi,, İzmir.
- Kitazawa, H., Harata, T., Vemura, J. Saito, T., Kaneko, T&Itoh, T.(1998). Phosphate Group Requirement for Mitogenic Activation of Lymphocytes by an Extracellular Phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 16 -175.
- Kok-Tas, T. and Guzel-Seydim, Z.B. 2010. Determination of Effects of Some Fat Replacers on Probiotic Fermented Milk. *Milchwissenschaft*, 3, 65.
- Kooiman P. [1968]. The Chemical Structure of Kefiran, the Water-Soluble Ppolysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research* ,7[2], 200-211.
- Koroleva, N.S., 1982. Special products (kefir, koumyss, etc.). *Proceedings XXI International Dairy Congress, Moscow*, 2, 146-151.
- Kumar, A. S., Mody, K. and Jha, B. 2007. Bacterial Exopolysaccharides-a Perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47, pp. 103-117.
- Kuntiya, A., Hangmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki,K. and Seesuriyachan, P. 2010. Influence of pH, Sucrose Concentration and Agitation Speed on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus confusus* TISTIR 1498 Using Coconut Water a Raw Material Substitute. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4(02), pp.318-330.

- La Rivie're, J.W.M., Kooiman, P., Schmidt, K., 1967. Kefiran, a Novel Polysaccharide Produced in the Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. *Archiv fur Mikrobiologie*, 59, 269-278.
- Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, Characterisation, and Design of Bacterial Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology Advances*, pp. 597-625.
- Leroi, F., Pidoux, M., 1993. Characterization of Interactions Between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces folrentinus* Isolated from Sugary Kefir Grains. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 54-60.
- Lin T.Y., Chien M-F., Exopolysaccharides Production as Affected by Lactic Acid Bacteria and Fermentation Time, *Food Chemistry* 100 (2007), 1419-1423.
- Liu, J.R., Chen, M.J., Lin, C.W., 2002. Characterization of Polysaccharide and Volatile Compounds Produced by Kefir Grains Grown in Soymilk. *Journal of Food Science*, 67, 104-108.
- Liu, J.R., Wang, S.Y., Chen, M.J., Chen, H.L., Yueh, P.Y., Lin, C.W., 2006. Hypocholesterolaemic Effects of Milk-Kefir and Soymilk-kefir in Cholesterol-Fed Hamsters. *British Journal of Nutrition*, 95 (5), 939-946.
- Ljungh A., Wadström T., Lactic Acid Bacteria as Probiotics, *Curr Intest Microbiol*, (2006) 7(2) 73-90.
- Looijesteijn, P.J., Boels, I.C., Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. (1999), "Regulation of Exopolysaccharide Production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the Sugar Source", *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 11, pp. 5003-5008.
- Ludbrook, K.A., Russell, C.M. and Greig, R.I. (1997), "Exopolysaccharide Production from Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Foods", *Journal of Food Science*, 62, 3, pp. 597-600.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., Kitamura, S., 2004. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5533-5538.
- Mann, E.J. 1985. Kefir and Koumiss. *Dairy Industry International*, 50, 11-12.
- Marshall, V., Cole, W.M., Brooker, B.E., 1984. Observations on the Structure of Kefir Grains and the Distribution of the Microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 491-497.
- Marshall, V.M. ve Cole, W.M., 1985. Methods for Making Kefir and Fermented Milks Based on Kefir. *Journal of Dairy Research*, 52, 451-456.

- Marshall, V.M., Cowie, E. N., & Moreton, R. S. (1995). Analysis and Production of Two Exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*, 62, 621-628.
- Marshall, V.M.E., 1984. Flavour Development in Fermented Milks. In: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Elsevier Applied Science, pp153-186, London.
- Medrano, M., Pérez, P. F., Abraham, A. G., 2008. Kefiran Antagonizes Cytopathic Effects of *Bacillus cereus* Extracellular Factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122 (1-2), 1-7.
- Medrano, M., Racedo, S.M., Rolny, I.S., Abraham, A.G., Pérez, P. F., 2011. Oral Administration of Kefiran Induces Changes in the Balance of Immune Cells in a Murine Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5299–5304.
- Meulen R.V., Grosu-Tudor S., Mozzi F., Vaningelgem F., Zamfir M., Valdez G.F., Vuyst L., 2007. Screening of Lactic Acid Isolates from Dairy and Cereal Products for Exopolysaccharide Production and Genes Involved, *International Journal of Food Microbiology*, 118, 250–258.
- Mıdık, F., 2011. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi Yönünden İncelenmesi. *Anadolu Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir*.
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., Crescenzi, V., 1999. Isolation and Characterisation of a Ropy *Lactobacillus* strain Producing the Exopolysaccharide Kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 69- 74.
- Mitsue, T., Tachibana, K., Fujio, Y., 1999. Efficient Kefiran Production by a Mixed Culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 and Yeast Strains. *Seibutsukogaku*, 77, 99-103.
- Molska, I., Kocon, J., Zmarlicki, S., 1980. Electron Microscopic Studies on Structure and Microflora of Kefir Grains. *Acta Alimentaria Polonica*, 6, 145-154.
- Motedayen, A.A., Khodaiyan, F. and Salehi, E.A. (2013), “Development and Characterisation of Composite Films Made of Kefiran and Starch”, *Food Chemistry*, 136, pp. 231-238.
- Mozzi, F., Rollan, G., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. 2001. “Effect of Galactose and Glucose on the Exopolysaccharide Production and the Activities of Biosynthetic Enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87”, *Journal of Applied Microbiology* 2001, 91, 160-167.

- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T., Adachi, S., 1988. Structural microheterogeneity of Kefiran from Kefir Grains. *Japanese Journal of Zootechnology*, 59, 167-176.
- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T., Nimura, T., Adachi, S. 1990. Carboxymethyl Kefiran: Preparation and Viscometric Properties. *Journal of Food Science*, 55, 1483-1484.
- Murofushi, M., Shiomi, M., Aibara, K. 1983. Effect of Orally Administered Polysaccharide from Kefir Grain on Delayed-Type Hypersensitivity and Tumor Growth in Mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 36, 49-53.
- Nakajima, H., Hirota, T., Tba, T., Itoh, T., & Adachi, S. (1992). Structure of the Extracellular Polysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*, 62, 621-628.
- Neve, H., 1992. Analysis of Kefir Grain Starter Cultures by Scanning Electron Microscopy. *Milchwissenschaft*, 47, 275-278.
- Ötles, S. and Çagındı, O., 2003. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54-59.
- Patel, S., Majumder, A. and Goyal, A. 2011. Potential of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Microbiology* (in press).
- P. De Wulf á E. J. Vandamme, 1997. Production of D-ribose by Fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* (1997) 48, 141±148.
- Petry, N.M. (2000). A Comprehensive Guide for the Application of Contingency Management Procedures in Standard Clinic Settings. *Drug & Alcohol Dependence*, 58, 9-25.
- Petry, S., Furlan, S., Waghorne, E., Saulnier, L., Cerning, J. and Maguin, E. (2003), "Comparison of the Thickening Properties of Four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Strains and Physicochemical Characterization of Their Exopolysaccharides", *FEMS Microbiology Letters*, 221, 2, pp. 293–298.
- Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. and Cerning, J. (2000), "Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus Rhamnosus* R and Analysis of its Enzymatic Degradation During Prolonged Fermentation", *Applied of Environment and Microbiology*, 66, pp. 2302–2310.
- Piermaria, J.A., Pinotti, A., Garcia, M.A. and Abraham, A.G. (2009), "Films Based on Kefiran, an Exopolysaccharide Obtained from Kefir Grain: Development and Characterization", *Food Hydrocollids*, 23, pp. 684– 690.

- Pintado, M.E., Lopes Da Silva, J.A., Fernandes, P.B., Malcata, F.X., Hogg, T.A., 1996. Microbiological and Rheological Studies on Portuguese Kefir Grains. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 15-26.
- Powell, J.E., 2006. Bacteriocins and Bacteriocin Producers Present in Kefir and Kefir Grains. Stellenbosch University, Faculty of AgriSciences, Department of Food Sciences, M. Sc. Thesis. 115p. Stellenbosch, South Africa.
- Rafter J., Lactic Acid Bacteria and Cancer: Mechanistic Perspective, *British Journal of Nutrition*,(2002) 88(1) 89-94.
- Rao, M.A. ve Steffe, J.F., 1992. *Viscoelastic Properties of Foods*. Elsevier Applied Science, 444p. NY, USA.
- Rea, M.C., Lennartsson, T., Dillon, P., Drinan, F.D., Reville, W.J., Heapes, M., Cogan, T.M., 1996. Irish Kefir-Like Grains: Their Structure, Microbial Composition and Fermentation Kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 83-94.
- Rehm, B. H. A. 2010. Bacterial Polymers: Biosynthesis, Modifications and Applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp. 578-592.
- Ricciardi, A. and Clementi, F. (2000), "Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: 459 Structure, Production and Technological Applications", *Italian Journal of Food Science*, 1, pp. 23-45.
- Rimada, P.S., Abraham, A.G., 2001. Polysaccharide Production by Kefir Grains During Whey Fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68, 653-661.
- Rimada, P.S., Abraham, A.G., 2003. Comparative Study of Different Methodologies to Determine the Exopolysaccharide Produced by Kefir Grains in Milk and Whey. *Lait*, 83, 79-87.
- Rimada, P.S., Abraham, A.G., 2006. Kefiran Improves Rheological Properties of Glucono-d-Lactone Induced Skim Milk Gels. *International Dairy Journal*, 16, 33-39.
- Robinson, R.K., Tamime, A.Y., 1990. Microbiology of fermented milks. In: Robinson RK (ed.) *Dairy Microbiology*, 2, *The Microbiology of Milk Products*, Elsevier Applied Science, 2nd edn, pp. 291-343. London.
- Rodrigues K., Caputo L., Carvalho J., Evangelista J., Schneedorf J., 2005. Antimicrobial and Healing Activity of Kefir and Kefiran Extract *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 404-408.
- Rollas, S., Küçükgülzel, Ş. G., Küçükgülzel, İ. 2005. Sistemik İlaç Analizi. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.

- Ruas-Madeido, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. 2002. An Overview of the Functionality of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 12, pp. 163-171.
- Sandalcı, M., Kınalıbalaban, B., Sünbül, F., Beyhan, G. 2007. Aynı Bölgeye Ait Zemin Numunelerinin Fiziksel Özelliklerinin NMR ve Zemin Mekaniği Deneyleri ile İncelenmesi. *International Earthquake Symposium*, 22-26 October 2007, Kocaeli, 513- 517.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J.M., Marquina, D., 2003. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated From Kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 434-437.
- Schoevers, A., and T. J. Britz. 2003. Influence of Different Culturing Conditions on Kefir Grain Increase. *International Journal Dairy Technology*, 56, 183–187.
- Seydim, Z. B. (2001). Studies on Fermentative, Microbiological and Biochemical Properties of Kefir and Kefir Grains. Ph.D. Dissertation, Clemson University, Clemson, SC.
- Shiomi M., Sasaki K., Murofushi M., Aibara K., 1982. Antitumor Activity in Mice of Orally Administered Polysaccharide From Kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 35(2), 75-80.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, Ts., Frengova, G., Spasov, Z., 2002. Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Kefir Grains and Kefir Made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 16.
- Steffe, J.F., Mohamed I.O., Ford, E.W., 1986. Rheological Properties of Fluid Foods: Data Compilation. In: *Physical and Chemical Properties of Foods*, American Society of Agricultural Engineers (Okos, M.R. – ed.), pp1–13. St. Joseph, MI, USA.
- Steffe, J.F., 1996. *Rheological Methods in Food Process Engineering* (2nd ed.). New York: Academic Press, Inc. 199-246, 204-214.
- Stepaniak, L., Fetlinski, A., 2002. Fermented Milks/Kefir. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier Science Ltd., 1049.
- Sutherland, I. W. 1972. Bacterial Exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 8, pp. 143-212.
- Sutherland, I. W. 2001. Microbial Polysaccharides From Gram-Negative Bacteria. *International Dairy Journal*, 11, pp. 663-674.
- Şener, B., Orbey, M.T., Temizer, A.: *Modern Analiz Yöntemleri*, Seldem Ofset, Ankara, 1986

- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y., Nakase, T. 1994. "Lactobacillus kefirgranum sp. nov. and Lactobacillus parakefir sp. nov., Two New Species From Kefir Grains", International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 435-439.
- Tamime A., 1995. Dairy Processing Handbook/chapter 11, 241-251.
- Tamime, A.Y. and Marshall, V.M.E., 1997. Microbiology and Technology of Fermented Milks. In: Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks (Law, B.A.- ed.), pp57-133. Chapman & Hall, 2nd ed.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 1999. Yoghurt: Science and Technology, 2nd edn. Cambridge: Woodhead.
- Tavkul U., 2002. Tarihi ve etnik açıdan Karaçay-Malkar Türklerinin Kökeni. Türkler Ansiklopedisi, II, 562-571.
- Thoreux, K., Schmucker, D.L., 2001. Kefir Milk Enhances İntestinal İmmunity in Young But Not Old Rats. Journal of Nutrition, 131, 807-812.
- Toba, T., Abe, S., Adachi, S., 1987. Modification of KPL Medium for Polysaccharide Production by *Lactobacillus* sp. İsolated From Kefir Grain. Japanese Journal of Zootechnology Science 58, 987-990.
- Toba, T., Arihara, K. and Adachi, S. 1990. Distribution of Microorganisms with Particular Reference to Encapsulated Bacteria in Kefir Grains. International Journal of Food Microbiology, 10, 219-224.
- Tok, E. 2007. Probiyotik Olarak Kullanılabilecek Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kollesterol Giderimi Özellikleri ve Safra Tuzu Dekonjugasyonuna Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, 95 s., Ankara.
- Torino, M.I., Taranto, M.P., Sesma, F. and de Valdez, G.F. (2001), "Heterofermentative Pattern and Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in Response to Environmental pH", Journal of Applied Microbiology, 91, 5, pp. 846-852.
- Tunick, M.H., 2000. Rheology of Dairy Foods that Gel, Stretch, and Fracture. Symposium: Dairy Products Rheology. Journal of Dairy Science, 83:1892- 1898.
- Ünal, D. 2008. Tıpta kullanılan görüntüleme teknikleri, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü Fizik Eğitimi Anabilim Dalı, 36s, Ankara.
- Valerin, M. M., Hellen, D., Mark, E., Neil, M., Yucheng, G., Andrew, P. L., 2000. Structural Characterisation of the Exopolysaccharide Produced by

*Streptococcus thermophilus* EU20. [www.elsevier.nl/locate/carres](http://www.elsevier.nl/locate/carres), 413-422.

- Van Geel-Schutten, G.H., Faber, E.J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M.R., Ten Brink, B., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F. and Dijkhuizen, L. (1999), "Biochemical and Structural Characterization of the Glucan and Fructan Exopolysaccharides Synthesized by the *Lactobacillus reuteri* Wild-Type Strain and by Mutant Strains", *Applied Environment and Microbiology*, 65, 7, pp. 3008-3014.
- Velasco, S., Arsköld, E., Paese, M., Grage, H., Írastorza, A., Radstrom, P. and Van Niel, E.W.J. 2006. Environmental Factors Influencing Growth of and Exopolysaccharide Formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 252-258.
- Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D et al (2005) Immunomodulating capacity of kefir. *J Dairy Res* 72(2), 195–202 doi:10.1017/S0022029905000828.
- Vinderola, G., Perdigon G., Duarte J., Farnworth E., Matar, C., 2006. Effects of the Oral Administration of the Products Derived From Milk Fermentation by Kefir Microflora on Immune Stimulation. *Journal of Dairy Research*, 73 (4), 472- 479.
- Yang, Z. 2000. Antimicrobial Compounds and Extracellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: Structures and Properties. Academic Dissertation, Department of Food Technology, University of Helsinki, 61s., Helsinki.
- Yang Z., Huttunen E., Staaf M., Widmalm G., Tenhu H., 1999. Separation, Purification and Characterisation of Extracellular Polysaccharides Produced by Slime-Forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Strains. *International Dairy Journal*, 9, 631-638.
- Yokoi, H., Watanabe, T., 1992. Optimum Culture Conditions for Production of Kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B Isolated from Kefir Grains. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 327-329.
- Yılmaz, M. 2006. Bazı *Bacillus* Türlerinin Ekzopolisakkarit Üretimi. Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi. 59 s., Niğde.
- Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T., Adachi, S., 1991. Some Taxonomical Characteristics of Encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B Isolated from Kefir Grains and Characterization of Its Extracellular Polysaccharide. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 257-264.
- Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Toba, T., Adachi, S., 1990. Isolation and Characterization of Polysaccharide-Producing Bacteria from Kefir Grains. *Journal of Dairy Science*, 73, 1684-1689.

- Z. Guzel-Seydim, T. Kok-Tas, B. Ertekin-Filiz, and A. C. Seydim. 2011. Effect of Different Growth Conditions on Biomass Increase in Kefir Grains. *Journal of Dairy Science*. 94(3), 1239-42 doi:10.3168/jds.2010-3349.
- Zisu, B., and Shah, N.P. (2003) Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*, 86, 3405-3415.
- Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. ve Boccio, J., 2001. Effect of Probiotics and Functional Foods and Their Use in Different Diseases. *Nutrition Research*, 21, 569-579.
- Wang, Y., Ahmeda, Z., Fenga, W., Lia, C., Songa, S. 2008. "Physicochemical Properties of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 Isolated From Tibet kefir", *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 283.
- Welman, A. D., Maddox, I. S. 2003. Exopolysaccharides From Lactic Acid Bacteria: Perspectives and Challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), pp. 269-274.
- Weipert, D., Tscheuschner, H.D., Windhad, E., 1993. *Rheologie de Lebensmittel*, B. Behr's Verlag GmbH and Co, Hamburg, Germany.
- White, G.V., 1970. Rheology in Food Research. *Journal of Food Rheology*. 5(1), 1-32.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes From Raw Milk for Fermented Dairy Products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.
- Wu, C. Y., Liang, Z. C., Lu, C. P. and Wu, S. H., 2008. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production and Carbonhydrate Composition of Exopolysaccharide by Submerged Culture of *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (2), pp. 61-67.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ömer Çağdaş KOÇAK  
Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul, 1988  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : cagdas\_muh88@hotmail.com

## Eğitim Durumu

Lise : Edirne Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi, 2002-2006  
Lisans : SDÜ, Mühendisli Fakültesi, Gıda Mühendisliği 2006-2010

## Mesleki Deneyim

Edirne Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü 2013-halen

## Yayınları

Koçak, Ç. Kök Taş, T. (2013). Fonksiyonel Süt Ürünlerinin Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi ve Yakult Örneği. Akademik Gıda,11,(3-4), 114-118.

Koçak, Ç., Kök Taş, T. Gıda Alerjen Profili ve Belirlenme Yöntemleri. İç Anadolu Bölgesi 1. Tarım ve Gıda Kongresi, 2-3 Ekim 2013.

Kök Taş, T., Koçak, Ç. 2012. Fonksiyonel Süt Ürünlerinin Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi ve Yakult Örneği. Süt Endüstrisinde Yenilikçi Yaklaşımlar Sempozyumu. 15-16 Kasım 2012, Denizli.

Kök Taş, T. Koçak Ç. Effect of Different Carbon Sources on Kefiran Production. IDF World Dairy Summit. 28 Ekim-1 Kasım 2013.