

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEFİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceyda SARI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER

HAZİRAN 2017

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEFİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ceyda SARI
(506131531)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER

HAZİRAN 2017

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506131531 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Ceyda SARI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KEFİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Fatma Ebru FIRATLIGİL**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Derya KAHVECİ KARINCAOĞLU.....
Yeditepe Üniversitesi

Teslim Tarihi : 5 Mayıs 2017
Savunma Tarihi : 7 Haziran 2017





Aileme,



ÖNSÖZ

Günümüzde gıda güvenliğinin sağlanması giderek büyüyen bir sorundur. Tüketicilerin kimyasal katkı maddeleri hakkındaki önyargıları, araştırmacıları doğal antimikrobiyal ajanlara yönlendirmiştir. Bu çalışmada kefirde elde edilen mayaların gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü yardımda bulunan, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli hocam Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan Ar. Gör. Ceren DAŞKAYA DİKMEN'e ve Gıda Yük. Müh. Evren DEMİRCAN'a; bütün süreç boyunca pozitif enerjileriyle ve motivasyonlarıyla bana destek olan Nihan AYDIN, Esra KOCAMAN, Turgay ÇETİNKAYA ve diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen benimle birlikte üzüldüğüm her şeyim, canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2017

Ceyda SARI
(Gıda Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Antimikrobiyal Maddeler	3
2.1.1 Doğal antimikrobiyal maddeler	4
2.1.1.1 Hayvansal kaynaklı doğal antimikrobiyal maddeler.....	4
2.1.1.2 Bitkisel kaynaklı doğal antimikrobiyal maddeler	6
2.1.1.3 Mikrobiyal kaynaklı doğal antimikrobiyal maddeler.....	9
2.2 Fermente gıdalarda rol alan mikroorganizmalar	11
2.3 Mayaların antimikrobiyal özellikleri.....	13
2.4 Kefir	15
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1 Materyal	21
3.1.1 Örnekler	21
3.1.2 Besiyerleri ve çözeltiler	21
3.2 Metot	22
3.2.1 Mayaların izolasyonu	22
3.2.2 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	22
3.2.2.1 Nokta ekim (spot-inoculated) yöntemi.....	22
3.2.2.2 Kuyucuk difüzyon yöntemi.....	23
3.2.2.3 Mikrodilüsyon yöntemi.....	23
3.2.3 Hesaplamalar ve istatistiksel analiz	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1 Maya izolasyonu	25
4.2 Maya izolatlarının nokta ekim yöntemiyle mikroorganizmalar üzerine etkisi. 25	
4.3 Maya izolatlarının kuyucuk difüzyon yöntemiyle <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> üzerine etkisinin incelenmesi	26
4.4 Maya izolatlarının mikrodilüsyon yöntemiyle <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> üzerine antimikrobiyal etkisinin incelenmesi	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR	41
EKLER	49
ÖZGEÇMİŞ.....	59

KISALTMALAR

FDA	: Food and Drug Administration
LPS	: Laktoperoksidaz sistem
GRAS	: Generally Recognized as Safe
MİK	: Minimum inhibitor konsantrasyon
OD	: Optik yoğunluk
LAB	: Laktik asit bakterileri
MEA	: Malt Extract Agar
MEB	: Malt Extract Broth
TSA	: Trypticase Soy Agar
TSB	: Trypticase Soy Broth
YPD	: Yeast Peptone Dextrose



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 : Tween 80 çözeltisinin kimyasal bileşimi.	21
Çizelge 3.2 : Soft Malt Ekstrakt Agar çözeltisinin kimyasal bileşimi.	21
Çizelge 3.3 : YPD çözeltisinin kimyasal bileşimi.	22
Çizelge 4.1 : Kefirden izole edilen mayaların kodları.	26
Çizelge 4.2 : Süpernatantların <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.	27
Çizelge 4.3 : Maya izolatlarının <i>E. coli</i> üzerine antimikrobiyal etkisi.	29
Çizelge 4.4 : Maya izolatlarının <i>S. aureus</i> üzerine antimikrobiyal etkisi.	30
Çizelge 4.5 : <i>E. coli</i> ve <i>S.aureus</i> 'un maya izolatları varlığında Baranyi modeli ile hesaplanan gelişme hızları, lag fazları ve R ² değerleri.	32
Çizelge B.1 : 0. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	53
Çizelge B.2 : 2. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	53
Çizelge B.3 : 4. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	53
Çizelge B.4 : 6. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	53
Çizelge B.5 : 8. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	53
Çizelge B.6 : 10. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	53
Çizelge B.7 : 12. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	54
Çizelge B.8 : 14. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	54
Çizelge B.9 : 16. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	54
Çizelge B.10 : 18. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	54
Çizelge B.11 : 20. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	54
Çizelge B.12 : 22. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	54
Çizelge B.13 : 24. saatte maya izolatlarının <i>E. coli</i> gelişimine etkisi.	55
Çizelge B.14 : 0. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	55
Çizelge B.15 : 2. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	55
Çizelge B.16 : 4. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	55
Çizelge B.17 : 6. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	55
Çizelge B.18 : 8. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	55
Çizelge B.19 : 10. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	56
Çizelge B.20 : 12. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	56
Çizelge B.21 : 14. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	56
Çizelge B.22 : 16. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	56
Çizelge B.23 : 18. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	56
Çizelge B.24 : 20. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	56
Çizelge B.25 : 22. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	57
Çizelge B.26 : 24. saatte maya izolatlarının <i>S. aureus</i> gelişimine etkisi.	57



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1 : <i>E. coli</i> 'nin pozitif kontrol, K5.5, K6.6, K5.8, K3.2 ve K5.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.	33
Şekil 4.2 : <i>E. coli</i> 'nin K6.52, K6.51, K6.1, K5.6, ve K6.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.	34
Şekil 4.3 : <i>S. aureus</i> 'un pozitif kontrol, K5.5, K6.6, K5.8, K3.2 ve K5.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.	35
Şekil 4.4 : <i>S. aureus</i> 'un K6.52, K6.51, K6.1, K5.6, ve K6.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.	36
Şekil A.1 : 5.5 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus flavus</i> üzerine etkisi.	50
Şekil A.2 : 5.6 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus flavus</i> üzerine etkisi.	50
Şekil A.3 : 5.8 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus flavus</i> üzerine etkisi.	50
Şekil A.4 : 3.2 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus flavus</i> üzerine etkisi.	50
Şekil A.5 : 6.52 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus niger</i> üzerine etkisi.	51
Şekil A.6 : 6.51 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus niger</i> üzerine etkisi.	51
Şekil A.7 : 6.4 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus niger</i> üzerine etkisi.	51
Şekil A.8 : 5.3 no'lu maya izolatının <i>Aspergillus niger</i> üzerine etkisi.	51
Şekil A.9 : 6.1 no'lu maya izolatının <i>E. coli</i> üzerine etkisi.	52
Şekil A.10 : 5.4 no'lu maya izolatının <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.	52
Şekil A.11 : 6.51 no'lu maya izolatının <i>E. coli</i> üzerine etkisi.	52
Şekil A.12 : 3.2 no'lu maya izolatının <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.	52



KEFİRDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ

ÖZET

Mikroorganizmalar gıdaların bozulmasına, ürün kalitesinin düşmesine, insanlarda zehirlenmelere ve hastalıklara neden olabilmektedir. Bu nedenle gıdalar güvenli hale getirilmek amacıyla çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle korunmaktadır. Günümüzde tüketicilerin kimyasal koruyuculara karşı olumsuz düşünceli ve önyargılı olması, araştırmacıları doğal antimikrobiyal maddeleri araştırmaya sevk etmiştir. Kefir ve içeriğindeki bakterilerle mayaların antimikrobiyal özellik gösterdiği ve doğal antimikrobiyal madde olarak kullanılabilmesi yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Kefir mikroorganizmaları, besin için rekabetlerinden dolayı diğer mikroorganizmaların gelişmesini engellemekle birlikte, fermantasyon sırasında ürettikleri polisakkaritler, peptidler, bakteriyosinler, organik asitler ve serbest yağ asitleri gibi metabolitlerden kaynaklanan antimikrobiyal etkiye sahiptirler.

Mayaların, fermente gıdalardaki lezzet gelişimine katkılarının yanında, istenmeyen bakterilere ve funguslara karşı antimikrobiyal etkinliklerinin varlığı bilinmektedir. Araştırmalar sonucunda fermente yiyecek ve içeceklerde bulunan mayaların antimikrobiyal aktivitelerinin, organik asitlerin, antibiyotik faktörlerin, uçucu asitlerin, hidrojen peroksitin ve ürün içerisine atılan diğer çeşitli substratların etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada ilk olarak çeşitli markaların ticari kefirleri ile kefir danelerinden hazırlanan kefir içeceklerinden maya izole edilmiştir. Ardından bu maya izolatlarının *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* ile *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkilerin araştırılması amacıyla nokta ekim (spot-inoculated), kuyucuk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Nokta ekim yönteminde küfler üzerinde antimikrobiyal etkiyi gösteren zon çapının oluşmadığı, bununla birlikte sporlanmanın azaldığı görülmüştür. Kuyucuk difüzyon yönteminde ise oluşan zon çapının 1 mm'nin altında olduğu belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon yönteminde, maya izolatlarından elde edilen süpernatantlara nötrleme işlemi uygulanmamış, süpernatantlar doğrudan kullanılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı maya izolatlarının antibakteriyel etkisi optik yoğunluk ölçümü yapılarak 2 saat aralıklarla 24 saat boyunca incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mayaların *E. coli* ve *S. aureus* gelişmesini tam olarak önlemediği görülmüştür. Bununla birlikte mayaların *S. aureus*'a karşı daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği, *S. aureus*'a karşı en etkili mayaların ise 6.51 ve 6.52 kodlu izolatlar olduğu belirlenmiştir. *E. coli*'ye karşı en etkili maya izolatları ise 3.2 ve 5.8 olmuştur.

Elde edilen maya izolatlarının düşük de olsa antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Antibakteriyel madde üretimi farklı substratlar kullanılarak ve inkübasyon koşullarının düzenlenmesiyle artırılabilir. Antimikrobiyal özellik gösteren metabolitler saflaştırılarak gıdalarda doğal antimikrobiyal madde olarak kullanım olanakları bulabilir.



ANTIMICROBIAL EFFECT OF YEAST ISOLATED FROM KEFIR

SUMMARY

Microorganisms occur during the food supply and can contaminate food in many ways. It can be found through irrigation water, field workers, insects, and fecal contamination by wild animals at the farm level, also postharvest sources, such as handling by workers, transport vehicles, and processing equipment; wash water; and cross-contamination from other foods. These microorganisms cause two major problems in the food chain: the risk to human health from foodborne illness and the economic losses associated with food loss because of spoilage.

Traditionally many food preservation techniques have been used to control microorganisms in food. Some examples for preservation techniques are such as chilling, freezing, water activity reduction, acidification, modified atmosphere packaging, fermentation, and nonthermal physical treatments or the addition of synthetic antimicrobials.

Preservation methods that utilise synthetic preservatives has large applications in the food industry. However, increasing concerns about negative health issues associated with the use of synthetic preservatives were noticed in recent years, These increased concerns have referred the scientists to investigate natural antimicrobial products as an alternative to synthetic preservatives.

Antimicrobials are chemical compounds that are naturally occur in or added to foods, food processing environments, food packaging or food contact surfaces to eliminate microbial growth or inactivate microorganisms. The main functions of antimicrobial preservatives are to inhibit or inactivate pathogenic and spoilage microorganisms in food. Natural antimicrobials can be obtained from different sources including plants, animals and microorganisms.

Fermentation is one of the oldest and most economical methods to produce and preserve food. A variety of fermented foods and beverages are produced naturally by inhabitant microorganisms or by using microorganisms and are consumed all over the world, and every nationality has its fermented foods that are specific to it. Fermented foods are foods where microorganisms lead some biochemical changes in the substrates during fermentation, such as development of a wide variety of flavors, aromas, and textures in foods; the preservation of foods through lactic acid, alcoholic, acetic acid, and alkaline fermentations; the enrichment of food substrates biologically with proteins, essential amino acids, essential fatty acids, and vitamins.

Kefir is acidic, viscous, and mildly alcoholic milk beverage produced by fermentation of milk with a kefir grain as the starter culture. The kefir grain is an inert polysaccharide matrix in which a relatively stable and that contain specific microbial community composed of different lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, and yeast species coexists in a complex symbiotic relationship.

Lactic acid bacteria are mainly responsible for the transformation of lactose to lactic acid, resulting in a pH decreasing and in this way aiding preservation of the milk in kefir. After the fermentation of lactose by lactic acid bacteria, lactose fermenting yeasts transform lactose to ethanol and CO₂. Other microbial components of kefir include non-lactose fermenting yeasts and acetic acid bacteria.

Many studies have demonstrated that kefir has some inhibitory effects against gram negative and gram-positive food-borne bacterial pathogens. It has been reported that they have antimicrobial activities against other microorganisms in connection with competition for nutrients from kefir microorganisms as well as due to metabolites such as, peptides, polysaccharides, bacteriocins, organic acids, and free fatty acids that are produced throughout fermentation.

Yeasts are commercially important in food industry, specially in dairy processing, because they generate desirable changes in the fermented milk products and have significantly stable association with lactic acid bacteria.

The yeasts comprise wide range and heterogeneous group of microorganisms that are attracting increasing interest from scientists and industry. They are promising candidates for a large scale of applications not limited to the food sector because of their countless and various biological activities. Beside to their main contribution to flavor development in fermented foods, their antimicrobial activities against undesirable bacteria, and fungi are now widely known. These activities are connected with their fight for nutrients, their tolerance of high concentrations of ethanol, acidification of their growth medium and release of antimicrobial composites.

In this study, yeasts isolated from kefir were studied for their antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Four different commercial kefir and 2 different kefir drink obtained from kefir grains were used for isolation of yeasts. Sixty five yeast isolates were obtained from kefir samples by spread plate technique. After examination of yeast isolates according to filamentous growth and morphological properties, 10 yeasts were selected for further analysis.

Selected yeasts were firstly screened for their antimicrobial activity by using spot-inoculating assay. No inhibition zones were seen in the moulds but sporulation were decreased. Then antimicrobial activity of the supernatants from isolated yeasts were investigated by using agar well diffusion method. In this method, there were inhibition zones less than 1 mm in the bacteria. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of supernatants against *E. coli* and *S. aureus*, microdilution method were used.

Dilution methods are generally used to obtain MIC. MIC is defined as the lowest concentration of the yeast isolates which inhibits bacterial growth.

Inhibitory effect of these selected yeast isolated from kefir were monitored during incubation period (0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18, 20; 22 and 24 h) and the bacterial growth was determined by measuring optical density (OD) at 660 nm. Microdilution method was used to determine MIC.

The results showed that the isolated yeasts from kefir showed a limited inhibitory activity against target bacteria. Yeasts were more effective against *S. aureus* than *E. coli* according to results. Among the isolates, most effective ones were 6.51 and 6.52 samples against *S. aureus*. In addition, in yeast supernatant supplementation, *S. aureus*

growth were decreased after 8 hours, whereas growth in positive control were continued in logarithmic phase.

The difference in optical densities after 24 hours for *E. coli* were not as high as in *S. aureus*. Maximum antibacterial activity for *E. coli* were seen in example 3.2, 5.8, 6.6 and 6.4 but this effect was found to be minimal.

According to this result, kefir yeasts have not been completely effective to inhibit *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth. On the other hand, production of antimicrobial metabolite may be increased by using different substrates and incubation conditions. There has been relatively little research devoted to identifying the mechanisms of inhibition by yeasts. In this regard further research should be undertaken.



1. GİRİŞ

İnsanlar tarih öncesi zamanlardan beri gıda ürünlerini mikroorganizmaların zararlı etkilerinden korumak için farklı yöntemler uygulamıştır. Gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak ve bozulmaları önlemek için ısıtma, kurutma, fermantasyon ve dondurma gibi işlemleri kullanmışlardır (Branen ve diğ., 2001). Kimyasal koruyucular mikroorganizmaların gıdalarda gelişmesini sınırlandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Fakat tüketicilerin tutumları, bilim insanlarını ‘doğal’ inhibitörleri araştırmaya sevk etmiştir (Gould, 2012).

Bitkilerin çoğu antimikrobiyal aktiviteye sahip farklı bileşikler içerir. Örneğin baharat ve tıbbi otların; bakteri, maya ve küfleri inhibe ettiği bilinmektedir. Bu bitkiler tıbbi amaçlı kullanımlarının yanında, gıda muhafazası açısından da geniş kullanım alanı bulmuştur. Doğal antimikrobiyal madde üreten mikroorganizmalar biyokoruyucu olarak adlandırılmaktadır ve bu biyokoruyucular arasında günümüzde en çok kullanılan laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterileri uzun zamandır güvenli bir şekilde gıda fermantasyonunda ve gıda muhafazasına ilişkin birçok uygulamada kullanılmaktadır (Rahman, 2007).

Fermente gıdaların üretimi, en eski işleme teknolojilerinden biridir. Fermantasyon, bir gıdanın raf ömrünü ve mikrobiyolojik güvenliğini artırmakla kalmayıp aynı zamanda bazı gıdaları daha sindirilebilir yapar ve doğal toksik bileşikleri azaltır (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

Fermantasyon ile korumada, raf ömrünün artırılması ve mikroorganizmaları ve/veya mikroorganizmaların metabolitlerini kullanarak gıda güvenliğinin artırılması sağlanmaktadır. Bu açıdan, starter kültürlerin, gıda ürünlerindeki istenmeyen mikroflorayı inhibe edebilen veya azaltabilen çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler ve proteinli maddeler ürettiği bilinmektedir (Ross ve diğ., 2002). Fermente gıdalar, miselli veya iplikli küfler, mayalar ve bakteriler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaları barındırır (Tamang ve Kailasapathy, 2010).

Kafkas dağlarından gelen asitli ve hafif alkollü fermente süt olan kefir, probiyotik bakteri ve maya karışımına bir örnek olarak kabul edilir. Bu karışım, laktik ve asetik asit bakterileri ile mayalar arasında simbiyotik bir birliktelik olarak tanımlanır ve bu birlikteliğin patojenik türlere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Kefiri oluşturan mikroorganizmaların işlevi, patojen mikroorganizmaların gelişimini engelleyen laktik asit, antibiyotik ve bakterisitlerin üretimidir (Ulusoy ve diğ, 2007).

Bu çalışmada, kefir danesi ve ticari kefir örneklerinden maya izolasyonu yapılarak bu maya izolatlarının bazı küfler (*Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*) ve bakteriler (*Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*) üzerine antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Antimikrobiyal Maddeler

Antimikrobiyal maddeler, gıdalarda mikrobiyal gelişmeyi geciktirebilen veya mikrobiyal inaktivasyona neden olan kimyasal bileşiklerdir. Antimikrobiyal maddelerin ana hedefi, metabolik ürünleri veya enzimleri ile istenmeyen tat, koku ve tekstür sorununa neden olarak gıdayı bozan ve gıda zehirlenmelerine yol açan mikroorganizmalardır (Davidson ve diğ, 2013).

Gıda ürünlerinde koruyucular kaliteyi sürdürmek, raf ömrünü uzatmak ve güvenliği sağlamak açısından gereklidir. Food and Drug Administration (FDA) tarafından yapılan düzenlemeler, işlenmiş maddelerin son ürünlerinde en dirençli patojen sayısının $5.0 \log_{10}$ azaltılmasının sağlanmasını gerekli kılmaktadır. Bu yüzden çoğu koruma tekniğinin amacı bozulma yapan mikroorganizmalarının bütün formlarını kontrol altına almaktır. Sentetik koruyucular gıda muhafazasında önemli bir role sahiptir. Bazı sentetik koruyucuların birtakım yan etkileri olduğu konusunda çeşitli araştırmalar mevcuttur (Taylor, 2014).

Gıdalarda kullanılan antimikrobiyallerden en yaygın olanları benzoatlar, sorbatlar, propionatlar, nitritler ve parabenlerdir (Carocho ve diğ, 2015). Kullanılan doza bağlı olarak, sodyum sorbatın *in vitro* kan lenfositlerinde genotoksik olduğu kanıtlanmıştır (Mamur ve diğ, 2010). Parabenlerin *in vitro* göğüs kanseri hücrelerinin aktivitelerini artırdığı kanıtlanmıştır (Karpuzoglu ve diğ, 2013; Khanna ve diğ, 2014). Nitritler işlenmemiş meyve ve sebzelerde bulunurlar ve nitrosaminlerin oluşumunda yer alabilirler. Nitritlerin insanlara diğer zararlı etkilerinin yanı sıra oksihemoglobinin ferrihemoglobine oksidasyonu gibi kanserojen etkileri olduğu bildirilmiştir (Cammack ve diğ, 1999). Sülfidler veya tuzları, mikrobiyal kontaminasyonu önlemek, antioksidan ve esmerleşmeyi önleyici aktiviteleri desteklemek amacıyla şarap, kurutulmuş meyve, kuru bisküvi, balık gibi gıdalarda kullanılır. Bu maddelerin de sitotoksik ve kanserojen etkileri olduğu bilinmektedir (Iammarino ve diğ, 2012; Suh ve diğ, 2007).

Bu nedenle tüketiciler, daha düşük seviyelerde kimyasal koruyucular içeren, taze veya doğal ürün özellikleri gösteren ve mikrobiyolojik olarak güvenli olan gıdalara yönelmektedir (Taylor, 2014).

2.1.1 Doğal antimikrobiyal maddeler

Gıda maddelerinde doğal antimikrobiyal bileşiklerin kullanılması tüketiciler ve gıda endüstrisi tarafından önemli düzeyde ilgi görmektedir. Bunun iki önemli nedeni vardır. Birinci neden; antimikrobiyallerin hatalı kullanımı, sadece antibiyotiklere dirençli değil, aynı zamanda çeşitli gıda işleme ve koruma yöntemlerine toleranslı gıda patojenlerinin artmasıdır. Diğer nedeni ise, sentetik koruyuculara alternatif olarak doğal katkı maddelerinin araştırmacılar arasında ilgi uyandırması ve tüketicilerin buna olan farkındalığının artmasıdır (Gyawali ve Ibrahim, 2014).

Son yıllarda gıdalarda raf ömrünü iyileştirmek ve gıda güvenliğini sağlamak amacıyla bakteriyel ve fungal gelişimi inhibe eden doğal antimikrobiyallerin elde edilmesi için büyük çaba sarf edilmektedir. Doğal antimikrobiyaller bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar dahil olmak üzere çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir (Gyawali ve Ibrahim, 2014).

2.1.1.1 Hayvansal kaynaklı doğal antimikrobiyal maddeler

Hayvansal kaynaklı antimikrobiyaller, hayvanlardan izole edilen veya türetilen proteinler ve enzimler gibi bileşiklerdir (Carocho ve diğ, 2015).

Kitosan

Kitosan kabuklulardan, mantarlardan ve böceklerden ekstrakte edilen bir biyopolimer olan kitinden alkali deasetilasyonu ile elde edilmektedir ve bazı funguslara, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Verlee ve diğ, 2017). *Aspergillus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Mucor racemosus*, *Byssoschlamys spp.*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* ve *Lactobacillus fructivorans* gibi gıda kaynaklı küf, maya ve bakterilere karşı inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir. Fakat bakteriler ve mayalar için raporlanan minimum inhibe edici konsantrasyonu, polimer karakteristiğine, pH'ya, sıcaklığa ve protein ile yağ gibi karışan maddelere bağlı olarak oldukça geniş bir aralıkta (%0,01 ile %5,0) değişmektedir. Kitosan sitoplazmik zarın bileşenleri veya

anyonik hücre duvarı polisakkaritleriyle etkileşerek hücreyi doğrudan etkileyebilir ve bu geçirgenliğin azalmasına ve taşınımın önlenmesine neden olur (Zeuthen ve Bøgh-Sørensen, 2003). Araştırmalar %1 ve daha düşük konsantrasyonlarda (%0,2 ve %0,5) kitosanın kıyılmış sığır eti köftesinde *Pseudomonas*, staphylococci ve toplam bakteri miktarını 1-2 log düşürmek için yeterli olduğunu göstermiştir (Darmadji ve Izumimoto, 1994). Başka bir araştırmada 0.1 – 2 g/l arası konsantrasyonlardaki kitosan glutamatın 25°C’ deki elma suyunda 8 mayayı inhibe ettiğini göstermiştir. Çalışmada en hassas suş, 0.1 g/l kitosan glutamat varlığında tamamen inaktive olan *Z. bailii* olmuştur. *S. cerevisiae* için inhibitör konsantrasyonu 0.4 g/l olmuştur ve 32 gün sonrasında da herhangi bir gelişme görülmemiştir (Roller ve Covill, 1999). Bir diğer çalışmada ise 5.0 mg/ml konsantrasyondaki kitosanın 5 ± 1°C’ de depolanan istiridyenin raf ömrüne etkisi belirlenmiştir. Bu çalışma, kitosan muamelesinin istiridyenin raf ömrünü 8-9 günden 14-15 güne çıkardığını ve kitosanın deniz ürününün korunmasında mükemmel bir potansiyelinin olduğunu göstermiştir (Cao ve diğ, 2009).

Laktoferrin

Sütte bulunan laktoferrin, demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Antimikrobiyal aktivitesi çoğunlukla iki mekanizma tarafından yönlendirilir. Birincisi bakteriostatik etkiyle sonuçlanan, mikroorganizmayı besinlerdeki demirden mahrum ederek demir yoksunluğu yaratmaktır. İkinci mekanizma ise laktoferrin molekülünün bulaşan mikroorganizma ile doğrudan etkileşimidir. Laktoferrin, geniş bir spektrumdaki gram pozitif ve gram negatif bakterilere, funguslara ve virüslere karşı güçlü antimikrobiyal etki göstermektedir (García-Montoya ve diğ, 2012). Demir yoksunluğu *in vitro* ortamda *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Bacillus*, *Streptococcus* ve *Candida albicans* gibi bakteri ve mayaları inhibe etmektedir (Korhonen ve Marnila, 2011). Laktoferrin, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* ve *L. monocytogenes* gibi kültürlerle bakteriostatik etki uygulayabilmektedir (Özer, 2014).

Laktoperoksidaz

Laktoperoksidaz çiğ süt, kolostrum, salya ve diğer biyolojik sekresyonlarda bulunan bir enzimdir. Bu enzim hidrojen peroksit varlığında tiyosiyanat (SCN^-) ile reaksiyona girer ve antimikrobiyal etkili bir bileşik oluşur. Laktoperoksidaz sistem (LPS) olarak

adlandırılan bu sistem genellikle *Pseudomonas* dahil olmak üzere gram negatif bakterilere gram pozitif bakterilere göre daha etkilidir. Fakat *Salmonella* spp. dahil *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni* gibi hem gram pozitif hem de gram negatif gıda kaynaklı patojenleri inhibe eder. LPS çiğ sütün raf ömrünü artırabilir. LPS ayrıca bebek maması, dondurma, krema, peynir ve likit yumurtada koruma proseslerinde kullanılmaktadır (Zeuthen ve Bøgh-Sørensen, 2003).

Lizozim

Lizozim kuş yumurtalarında ve memelilerin sütlerinde doğal olarak bulunan bir enzimdir ve GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak kabul edilir. Et ve et ürünleri, balık, balık ürünleri, süt ve süt ürünleri ile meyve ve sebzelerde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Lizozimin antimikrobiyal etkisi bakteri hücre duvarının peptidoglikanındaki N-asetilmuramik asit ile N-asetilglukozamin arasındaki β -1,4 bağımlı hidrolize ederek hücre duvarı yapısını bozmasından kaynaklanmaktadır (Gyawali ve Ibrahim, 2014).

Lizozim en çok peynirlerde *Clostridium tyrobutyricum*'un neden olduğu bozulma ve istenmeyen tada bağlı kalite kabını önlemede kullanılmaktadır (FDA, 1998). Lizozim en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Listeria innocua* ve *Saccharomyces cerevisiae*'e karşı göstermektedir (Rawdkuen ve diğ, 2012). Tavuk yumurtası lizoziminden elde edilen peptidler *Bacillus subtilis*'in hem vejetatif hem de spor formuna karşı inhibitör etki göstermiştir. Lizozimin birçok gıdada *Bacillus* bozulmasına karşı raf ömrünü artırmada kullanışlı olabileceği belirtilmiştir (Abdou ve diğ, 2007).

Gram pozitif bakteriler, hücre duvarlarının peptidoglikan tabaka içermesi nedeniyle lizozime karşı duyarlıdır (Tiwari ve diğ, 2009). Gram negatif bakteriler fiziksel bir bariyer görevi gören lipopolisakkaritik dış zar tabakası nedeniyle lizozime daha dirençlidir. Lizozim ile birlikte EDTA kullanımında *E. coli*'ye karşı etki görülmüştür (Branen ve Davidson, 2004).

2.1.1.2 Bitkisel kaynaklı doğal antimikrobiyal maddeler

Bitki ve baharatlar gıda katkı maddesi olarak tüm dünyada kullanılmaktadır. Gıdanın sadece organoleptik özelliklerini geliştirdiği için değil, ayrıca birçok gıda patojenini azaltarak veya tamamen ortadan kaldırarak gıdanın raf ömrünü artırdığı için kullanılmaktadır (Lai ve Roy, 2004).

Baharatlar ve esansiyel yağları

Bitki ve baharatların çoğunluğu farklı bakteri, maya ve küflere karşı antimikrobiyal etki gösterir (Tajkarimi ve diğ, 2010). Bitki ve baharatlardan elde edilen fenolik bileşikler potansiyel gıda koruyucusu olarak kullanılabilirler (Lai ve Roy, 2004).

Yapılan bir çalışmada *Pelargonium purpureum* ve *Sideritis scardica* bitkilerinin *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas putida* ve *Bacillus cereus*'a karşı özellikle de *E. coli* ve *L. monocytogenes* üzerinde güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Proestos ve diğ, 2013).

Karanfil et, soslar, şerbet ve şekerlemelerdeki bozulmaları önlemede kullanılmıştır. Tarçın ve hardal, 1910'larda elma sosunda koruyucu olarak tanımlanmıştır. Yenibahar, defne yaprağı, keraviye otu, kişniş, kimyon, mercanköşk, biberiye, adaçayı ve kekiğin güçlü bakteriyostatik etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir (Tajkarimi ve diğ, 2010).

Havuç ve elmada kekik, çörek otu, adaçayı, biberiye ve defne yaprağının hidrosollarının *S. typhimurium* ve *Escherichia coli* O157:H7 üzerine inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu baharatlar arasında hem *S. typhimurium*'a hem de *Escherichia coli* O157:H7'ye karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi kekik hidrosolü göstermiştir (Tornuk ve diğ, 2011).

Tarçın, karanfil ve hardalın *Aspergillus parasiticus*, *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*'ne karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir (Lai ve Roy, 2004).

Psidium guajava, *Citrus limonium*, *Allium sativum* ve *Zingiber officinale* bitkilerinin sulu ekstraktlarının *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. *S. aureus*'a karşı sarımsağın meyvesi daha etkili olurken, guava yaprakları *B. subtilis* üzerinde daha güçlü antibakteriyel etki göstermiştir. Limon yaprağı ekstraktı ve suyunun *P. aeruginosa* ve *E. coli* gelişimini büyük ölçüde engellediği bildirilmiştir (Kumar ve diğ, 2012).

Pastörize elma suyunda 5°C ve 20°C'de depolama sırasında 4 log CFU/mL *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica* ve enterotoksijenik *S. aureus*'a karşı tarçının antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve tarçın *S. aureus* (3. günde 1,2 log CFU/mL) ve *Y.*

enterocolitica (1. günde 0.3 log CFU/mL)'e karşı etkili olmuştur. 20°C'de her üç patojen için de inaktivasyon oranları oldukça yüksek çıkmıştır (Yuste ve Fung, 2003).

Periago ve diğ (2006) tarafından daha önce uygulanan ısıtıl işlemin *Bacillus megaterium* hücrelerinin gelişmesine etkisi; nisin, karvakrol ve timol içeren ve içermeyen bir kültür ortamında araştırılmıştır. Timol ve karvakrol en yüksek dozda (0,6 mM) kombine edildiğinde lag fazında daha fazla uzama ve gelişme hızında belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Isıtıl işlem sonrası timol ve/veya karvakrolun birlikte kullanımının mikrobiyal popülasyonun %90'ını öldürdüğü ve canlı kalan mikroorganizmaların gelişmelerinin en az 7 gün engellendiği bildirilmiştir.

Misk, adaçayı, ardiç, limon ve kekik otundan elde edilen dört esansiyel yağ, elma suyu ve süttten izole edilen *Geotrichum candidum*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* mayalarına karşı test edilmiştir. *S. pombe* en hassas maya (0,0625–0,125 µL/mL minimum inhibitor konsantrasyon (MİK) değerleri), *G. candidum* ise en dirençli maya (0,5–2 µL/mL MİK değerleri) olmuştur. Sadece esansiyel yağ konsantrasyonunun en yüksek olduğu durumlarda mikroorganizma gelişmesinde önemli azalma sağlandığı belirtilmiştir (Tserennadmid ve diğ, 2011).

Farklı konsantrasyonlarda (%0,01-15) kekik (*Thymus vulgaris*), karabiber (*Mentha piperita* L.), keraviye tohumu (*Carum carvi*), rezene (*Foeniculum vulgare*), tarhun otu (*Artemisia dracunculoides*) ve habak (*Mentha pullegium*) esansiyel yağlarının, sıvı besiyerinde *S. aureus* ve *E. coli*'ye etkisi incelenmiştir. Kekik esansiyel yağı en geniş spekturumda antibakteriyel etkiyi gösterirken; karabiber, keraviye tohumu, habak ve rezene esansiyel yağları test edilen mikroorganizmalara karşı daha düşük antimikrobiyal etki göstermiştir. Tarhun otu ise en az etkiyi göstermiştir (Mohsenzadeh, 2007).

Diğ bir çalışmada sarımsak, defne, karabiber, mercanköşk, portakal, kekik, çay ağacı, nane, karanfil ve kimyonun esansiyel yağlarının, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis*, *B. cereus*, *Saccharomyces uvarum*, *Kloeckera apiculata*, *Candida albicans*, *Candida oleophila* ve *Metschnikowia fructicola*'ye karşı etkisine bakılmıştır. Ayrıca %0,5 konsantrasyonunda kekik yağının +4°C (1–5 gün)'de elma suyu ve havuç suyunda *L. monocytogenes* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Kekik, mercanköşk, karanfil ve portakal esansiyel yağları en etkili

antimikrobiyal etkiyi göstermiştir. Kimyon, çay ağacı ve nane yağlarının mayaları etkili bir biçimde inhibe ettiği bildirilmiştir (Irkin ve Korukluoglu, 2009).

Mercanköşk ve kekik bitkileri eklenmiş soya proteinli yenilebilir filmlerin *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *L. plantarum*'a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada *E. coli*, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* bu filmlerde önemli miktarda inhibe edilirken, *L. plantarum* ve *P. aeruginosa*'nın en dirençli bakteri olduğu görülmüştür. Mercanköşk, kekik ve mercanköşk ile kekiğin birlikte ilave edildiği filmin kıyılmış sığır eti köftesinde koliformlar ve *Pseudomonas* spp. miktarını azalttığı görülmüştür. Fakat bu uygulamanın toplam canlı miktarına, laktik asit bakterilerine ve *Staphylococcus* spp.'a karşı çok önemli bir etkisi görülmemiştir (Emiroğlu ve diğ., 2010).

Baskaran ve diğ. (2010), elma suyuna ve elma şarabına ilave edilen trans-sinamaldehitin *E. coli* O157:H7 suşuna karşı etkisini incelemiştir. Çalışmada başlangıç yükü 6,0 log CFU/mL olan elma suyu ve şarabına %0, %0,025, %0,075 ve %0,125 (v/v) seviyelerinde trans-sinamaldehit eklenmiştir ve elma suyu örnekleri 4 ve 23°C'de, elma şarabı örnekleri ise sadece 4°C'de 21 güne kadar inkübe edilmiştir. Elma suyunda 23°C'de, 0,125% ve %0,075 (v/v) konsantrasyonunda bulunan trans-sinamaldehit *E. coli* O157:H7'yi sırayla 1. ve 3. günlerde tamamen inaktive etmiş, 4°C'de depolanan örneklerde ise aynı düzeyde sırayla 3. ve 5. günde çok düşük seviyelere azaltmıştır.

2.1.1.3 Mikrobiyal kaynaklı doğal antimikrobiyal maddeler

Koruyucu kültürler, besin maddeleri için rekabetleri sonucu diğer mikroorganizmalara karşı biyolojik koruyucu olarak bakteriyosinler, organik asitler, hidrojen peroksit veya enzimler gibi antimikrobiyal bileşikler salgılayabilirler. Sadece laktik asit bakterileri (örneğin laktobasiller, streptokoklar, enterokoklar, laktokoklar) değil, bifidobacteria, ayrıca *E. coli* ve *Bacillus* türleri, *Saccharomyces* gibi maya türleri ve *Aspergillus* gibi küfler dahil birçok mikroorganizma türü koruyucu kültür olarak kullanılabilir. Koruyucu kültürlerin kullanımı, özellikle süt, et ve deniz ürünleri endüstrilerinde ilgi görmektedir, çünkü tüketim için güvenlidirler (GRAS) ve birçok gıdanın mikrobiyotasında doğal olarak bulunmaktadırlar (Taylor, 2014).

Natamisin

Natamisin, Actinomycetes suşları tarafından üretilen polien makrolid antifungal bir maddedir. Natamisin bakterilere karşı etki göstermediğinden bakteriyel fermantasyonla üretilen fermente gıdalarda maya ve küflere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu için kullanılabilir. Natamisin daha çok peynir yüzeyinde küf gelişiminin önlenmesi amacıyla ilave edilmektedir (Delves-Broughton, 2014).

Natamisin hem gıda katkı maddesi olarak (E-235), hem de enkapsülendirilmiş şekilde filmlerin bir bileşeni olarak gıda maddelerinde kullanılmaktadır. Peynirde maya gelişimini kontrol etmek için kitosan esaslı filmlerin bir unsuru olarak kullanılmıştır (Carocho ve diğ., 2015).

Natamisin 4,4; 10,0 veya 15,6°C'de saklanan süzme peynirin raf ömrünü artırdığı belirlenmiştir (Nilson ve diğ., 1975). Başka bir çalışmada 500 veya 1000 µg/mL konsantrasyondaki natamisin peynirde 6 aya kadar küf gelişimini geciktirdiği fakat tamamen engellemediği tespit edilmiştir (Luck ve Cheeseman, 1978). Natamisin meyve ve etlerde fungal gelişimi önlemek amacıyla kullanılması önerilmiştir. Çilek, ahududu ve kıvılcık üzerine yapılan deneylerde natamisin, meyvelerin raf ömrünün uzatılmasında etkili olduğu ifade edilmiştir (Ayres ve Denisen, 1958). Bir diğer çalışmada natamisin fırıncılık endüstrisinde kullanımı araştırılmıştır. 100 ppm natamisin, unlu mamullerden izole edilen *Aspergillus flavus* dahil 5 küf üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Ticha, 1975).

Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal peptidlerdir. Bakteriyosinler genellikle hedef hücre duvarını depolarizasyon veya hücre duvarı sentezinin inhibisyonu yoluyla etkilemektedir. Genellikle 30 – 60 amino asit uzunluğundadırlar ve birçok bakteri türü ile ilişkilendirilirler (Taylor, 2014).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler üç gruba ayrılır; lantibiyotik olarak bilinen modifiye bakteriyosinler (sınıf I), ısıya dayanıklı, modifiye olmamış bakteriyosinler (sınıf II) ve daha büyük, kararsız bakteriyosinler (sınıf III). Nisin en iyi bilinen ve karakterize lantibiyotiktir ve yaygın ticari kullanıma sahiptir (Papagianni, 2012).

Nisin, *C. botulinum* sporlarının gelişmesini ve toksin oluşumunu inhibe ettiği için onaylanmış ve daha sonra diğer gıdalarda da kullanılmaya başlanmıştır. Gıda Sağlık

Örgütü tarafından gıda koruyucusu olarak doğrudan ilave edilmesi onaylanan tek bakteriyosindir. Nisin ve diğer koruyucuların (organik asit, şelatörler, lizozim, vakum paketlenme veya modifiye atmosfer paketlenme) birlikte kullanımı yüzey uygulamalarında *L. monocytogenes*, *B. thermophacta* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı bakterisit etkiyi artırmaktadır (Rai, 2011)

Bir diğer bakteriyosin, pediosinlerin *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* ve *Clostridium perfringens* gibi bozulma yapan ve patojen mikroorganizmalara karşı etkili olduğu literatürde belirtilmektedir. Ayrıca, pediosinin *Oenococcus oeni* ve diğer şarap bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi raporlanmıştır (Gyawali ve Ibrahim, 2014).

2.2 Fermente gıdalarda rol alan mikroorganizmalar

Fermentasyon gıda üretimi ve muhafaza yöntemleri arasında en eski ve en ekonomik olanıdır. Buna ek olarak fermentasyon, taşınacak malzemenin hacmini azaltmak, istenmeyen bileşikler yok etmek, gıdanın besin değerlerini ve görünüşünü iyileştirmek, pişirme için gerekli enerjiyi azaltmak ve daha güvenli bir ürün yaratmak için doğal bir yol sunar (Blandino ve diğ, 2003).

Fermentasyon, genellikle mikroorganizmaların ve bunların enzimlerinin aktivitesinden kaynaklanan, gıda ürünlerinin biyokimyasal modifikasyonu için arzu edilen bir süreçtir. Ayrıca fermentasyon tat, lezzet, doku, besin değeri ve raf ömrü gibi özellikleri kolayca artırma imkanı doğurur (Gotcheva ve diğ, 2000).

Fermente gıdalar için içerdiği mikroorganizma çeşidi, fermentasyon türü, kullanılan hammaddeler dahil olmak üzere birçok sınıflandırma yapılmıştır. Dört ana fermentasyon prosesi olduğu düşünülürse (alkolik, laktik asit, asetik asit ve alkali fermentasyonu) sınıflandırmalar arasındaki farklar azaltılabilir. Alkol fermentasyonu (şaraplar ve buralar gibi) etanol üretimiyle sonuçlanır ve bu aşamada mayalar baskın organizmalardır. Laktik asit fermentasyonu (fermente sütler ve tahıllar) çoğunlukla laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir. Gıda fermentasyonunda önem taşıyan ikinci bir bakteri grubu da asetik asit üreten *Acetobacter* türleridir. *Acetobacter*, fazla oksijen varlığında alkolü asetik aside dönüştürür. Alkali fermentasyonu genelde çeşni olarak kullanılan balık ve tohumların fermentasyonu sırasında gerçekleşir (Kohajdová, 2017).

Laktik asit bakterileri birçok fermente yiyecek ve içecekte görülmektedir (Stiles ve Holzapfel, 1997; Tamang, 2010). Çeşitli fermente yiyecek ve içecekler arasından izole edilen laktik asit bakterileri (LAB)'lerinin en çok görülen türleri *Alkalibacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır (Axelsson ve diğ., 2012; Holzapfel ve Wood, 2014; Salminen ve diğ., 2004).

Bacillus, Asya ve Afrika'da fermente gıdalarda görülür (Parkouda ve diğ., 2009; Tamang, 2015). Çoğunluğu bakliyat bazlı olmak üzere fermente gıdalardan *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* subsp. *natto* ve *Bacillus thuringiensis* türleri izole edilmiştir (Kiers ve diğ., 2000; Kubo ve diğ., 2011).

Fermente süt, sosis, et ve balık ürünleriyle *Micrococcus* ve *Staphylococcus*'un birçok türünün ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Coton ve diğ., 2010; Martín ve diğ., 2006). *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium* ve *Propionibacterium* türleri peynirden izole edilmiş, *Arthrobacter* ve *Hafnia* türleri fermente et ürünlerinden izole edilmiştir (Bourdichon ve diğ., 2012). *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Haloanaerobium*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas* vb. de birçok fermente gıdada görülen mikroorganizmalardır (Tamang, 2010).

Mayalar dünyada birçok fermente içecekte ve bazı fermente gıdalarda temel mikrobiyal florayı oluşturmaktadır (Tamang ve Fleet, 2009). Fermente yiyecek ve içeceklerde *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia* ve *Zygosaccharomyces* dahil olmak üzere yaklaşık 21 maya türü bildirilmiştir (Kurtzman ve diğ., 2011; Pretorius, 2000; Romano ve diğ., 2006; Tamang ve Fleet, 2009). Maya fermantasyonu, hemen hemen bütün ülkelerde bakteriyel ve fungal fermantasyonun ardından veya onlarla kombinasyon halinde uygulanır. Herhangi bir substratın fermantasyonunda *Saccharomyces* şekeri fermente eder, sekonder metabolitler üretir, mikotoksin üreten küflerin gelişimini engeller. Ayrıca *Saccharomyces* lipolitik,

proteolitik, pektinolitik, glikosidazik ve üreaz aktiviteleri gibi çeşitli enzimatik faaliyetlere sahiptir. *Debaryomyces* şeker fermantasyonuna katkıda bulunur ve substratların pH'sını artırır. *Hanseniaspora* ve *Candida* şeker fermantasyonuna katkıda bulunur, sekonder metabolitler üretir ve enzimatik aktiviteleri vardır. *Yarrowia lipolytica* şeker fermantasyonunda rol oynar, lipolitik, proteolitik ve üreaz aktiviteleri vardır ve ürünlerde yağ ransiditesini azaltır (Tamang ve Fleet, 2009).

Fermente gıdalarda ve alkollü içeceklerde filamentli küflerin temel rolü enzim üretimi ve besleyici olmayan faktörlerin degradasyonudur (Aidoo ve Nout, 2010). Birçok fermente gıdada ve alkolik içeceklerde *Actinomucor*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Monascus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Parcilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ve *Ustilago* türleri görülmüştür (Chen ve diğ., 2014; Nout ve Aidoo, 2002).

2.3 Mayaların antimikrobiyal özellikleri

Mayalar, günümüzde bilim insanları ve endüstri tarafından artan bir ilgi gören önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. Mayaların, fermente gıdalardaki lezzet gelişimine katkılarının yanında, istenmeyen bakterilere ve funguslara karşı antagonistik etkinliklerinin varlığı bilinmektedir. Bu etkiler, besin maddeleri için diğer mikroorganizmalara karşı rekabet etmeleri, geliştikleri ortamı asitlendirmeleri, yüksek konsantrasyondaki etanole karşı toleransları ve antimikrobiyal bileşikler salgılamalarıyla ilişkilidir. Bununla birlikte, mayaların inhibisyon mekanizmalarının saptanması için yapılan kısıtlı sayıda çalışma vardır (Rima ve Ismail, 2012).

Alkollü içeceklerin ve mayalı ekmeklerin tüketimi baz alındığında, ticari olarak dünyadaki fermente yiyecek ve içeceklerin üretimindeki en önemli mikroorganizmalar fermentatif mayalardır. Bu mikroorganizma grubunun en yaygın olanı ise *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Gıda muhafazası açısından *Saccharomyces cerevisiae* ile diğer alkol üreten mayalar etanol ve karbondioksit salgılayarak diğer mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen bir ortam meydana getirirler. Etanol uzun zamandır dezenfektan olarak kullanılmakta ve alkolik içeceklerde önemli koruyucu bileşiklerden biri olarak gösterilmektedir. Maya suşlarının metabolik faaliyeti sonucu açığa çıkan karbondioksit aynı zamanda antimikrobiyal ajan olarak işlev görür. Mayaların fermantasyonda oksijeni kullanması sonucu karbondioksit üretimiyle anaerobik koşullar oluşur. Şekerler, vitaminler, mineraller ve diğer besin maddelerinin

mayalarla metabolize edilmesi rekabetçi mikrobiyotayı bu besinlerden yoksun bırakır (Barbara ve diğ., 2000).

Mayanın metabolizması ve gelişimi sonucu üretilen etanol, karbondioksit, asitler ve diğer yan ürünlerin seviyesi ürünün duyusal kalitesini değiştirir. Mayaların ürettiği bu antibakteriyel bileşikler, düşük konsantrasyonlarda ürünün aroma, tat, doku ve görünümünde önemli bir değişiklik yaratmazken koruma amacıyla gıda katkı maddesi olarak güvenli ve etkili şekilde işlev görebilir (Barbara ve diğ., 2000).

Tarihsel olarak mayaların antagonistik özelliklerine dair ilk olumlu işaret 20. yüzyılın başlarında Hayduck ve Fernbach tarafından keşfedilmiştir. Bu araştırmacılar mayada muhtemelen bir amin olan ve *Escherichia coli* ve *Staphylococcus*'u inhibe eden uçucu termolabil toksik bir ekstraktı bildirmişlerdir (Viljoen, 2006). Başka bir araştırmacı *Debaryomyces hansenii*'nin *Clostridium tyrobutyricum* ve *Clostridium butyricum* üzerine antibakteriyel aktivitesinin ekstraselüler ve intraselüler antimikrobiyal bileşik üretme yeteneğinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir (Fatichenti ve diğ., 1983). Diğer bir araştırmacı metilen mavisinin *Kloeckera apiculata* ve *Kluyveromyces thermotolerans* tarafından farmakolojik açıdan aktif bir forma dönüştürülmesinden dolayı birada bozulmaya neden olan *Bacillus megaterium* ve *Lactobacillus plantarum*'un gelişmesinin inhibe edildiğini bildirmiştir (Bilinski ve Casey, 1989). Başka bir araştırmada Fransız tipi bir peynirden izole edilen *Geotrichum candidum*'un bir suşunun *Listeria* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu tanımlanmıştır (Dieuleveux ve diğ., 1998). Ayrıca bir diğer araştırma sonucu *Candida bombicola*'nın, *Staphylococcus aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisi kanıtlanmış ve *Candida albicans*'ı inhibe eden sophoroside olarak adlandırılan ekstraselüler glikolipitler ürettiği bildirilmiştir (Cavalero ve Cooper, 2003). Goerges ve diğ. (2006), süttten elde edilen mayalarda yapılan testler sonucu *Candida intermedia*'nın bir suşunun *Listeria* miktarını 4 log CFU/cm² azaltma kapasitesini ve ayrıca *Candida intermedia* ve *Kluyveromyces marxianus*'un *L. monocytogenes* gelişimini 3 log CFU/cm² kadar baskıladığını bildirmişlerdir. Aynı grup, *Issatchenkia orientalis*, *Candida krusei* ve *K. marxianus*'un birçok suşu *Listeria* miktarını 4-5 log birim azaltırken, *Pichia norvegensis*'in bir suşunun *L. monocytogenes* miktarını 7 log azalttığını raporlamışlardır (Goerges ve diğ., 2011). Hatoum ve diğ. (2013), *Debaryomyces hansenii*, *Pichia fermentans*, *Candida tropicalis* ve *Pichia anomala* olmak üzere 4 süt mayası kültüründen antilisterial hidrofobik peptid ekstrakte etmiştir. Araştırmalar

sonucu *D. hansenii* ve *P. anomala*'dan izole edilen antilisterial bileşiklerin *L. monocytogenes* miktarını olgunlaşmanın ilk 9 gününde 3 log azalttığı bulunmuştur. Bu çalışmada peptidlerin bakteri duvarında sızıntı meydana getirdiği ve nihayetinde bakteri lizisine neden olduğu görülmüştür.

Ekmeklerde *Bacillus* spp.'nin gelişimi sonucu rop denilen yapışkan yapılar oluşmaktadır. *Bacillus* spp.'nin vejetatif hücreleri fırında pişirme sırasında inaktive olur fakat sporları ısıya dayanıklıdır ve depolanma sırasında uygun koşullarda çimlenebilir. Rop oluşumu kontrolünde en etkili metot likit maya, ekşi maya ve starter kültürleri içeren biyolojik metottur. Son yıllarda maya suşlarının gıda maddelerinin mikrobiyal bozulmasıyla mücadele yeteneğinin araştırılması için önemli talep bulunmaktadır. Fırınlama işleminde kullanılan starter kültürlerin mikroorganizmaları, nihai üründe ekzojen mikroflora gelişimini inhibe eden maddeleri sentezleyebilmektedir. Yapılan çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'in ekmekten izole edilen spor formundaki bakteriler *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* üzerine antagonistik etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucu *S. cerevisiae* suşunun *Bacillus subtilis* ve *B. licheniformis* üzerinde inhibe edici etkisi olduğu bildirilmiştir (Soboleva ve diğ, 2016).

Başka bir çalışmada Hindistan'a özgü donmuş İdli hamurundan izole edilen *Pichia kudriavzevii*'nin antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* ve *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere 13 enteropatojenin gelişimini inhibe ettiği görülmüştür. Çalışma *Pichia kudriavzevii*'den elde edilen süpernatantların 24 ve 48 saat sonunda gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde inhibisyon çapı ölçülerek yapılmıştır (Chelliah ve diğ, 2016).

2.4 Kefir

Kefir düzenli tüketildiğinde sağlık üzerine olumlu etkileri olan doğal bir fonksiyonel süt ürünüdür. Kefir, sütteki laktozun kombine olarak laktik asit ve alkolik fermantasyonu nedeniyle benzersiz bir kültür ürünüdür (Taş ve diğ, 2012).

Kefir, starter kültürü kefir danesi olan, viskoz, asitli ve hafif alkollü bir süt içeceğidir. Kefir daneleri beyaz – sarımtırak arası rengi olan, çamursu fakat sert bir yapısı olan karnabahar benzeri çiçeksi taneciklerdir. Günümüzde farklı mikrobiyal topluluklara sahip ve farklı duyuşal özellikler gösteren çok çeşitli kefir daneleri mevcuttur (Tamang ve Kailasapathy, 2010). Kefir danelerinde maya ve laktobasillerler birbirlerine karşılıklı bağımlı olup dengeli bir oranda gelişmektedirler ve kefir üretimi boyunca mayalar, laktobasiller ve streptokoklar arasındaki simbiyoz ilişki dikkat çekmektedir (Sarkar, 2008). Kefir, mayalar tarafından üretilen karbondioksitin neden olduğu kabarma sonucu hafif asitli bir tat kazanır. Bunun dışında tadını, düşük konsantrasyonda etanol (genellikle %2'nin altında), asetaldehit, asetoin ve diasetil gibi bir dizi aromatik bileşik verir. Kefirdeki çoğu LAB asetoin, asetaldehit veya her ikisini birden üretmektedir (Tamang ve Kailasapathy, 2010).

Kefir, ticari olarak liyofilize edilmiş kefir starter kültürleri ile veya geleneksel kefir daneleri ile süt fermantasyonu sonucu üretilir. Ürün esas olarak sığır sütünün yanı sıra keçi ve koyun sütlerinden üretilmektedir. Geleneksel kefir üretimi için kefir daneleri 1:20 oranında inek sütüne eklenir ve 18-20°C'de 20 saat fermantasyona bırakılır. Fermantasyon sonunda kefir daneleri elenerek alınır ve yeni fermantasyon için tekrar kullanılır (Cetinkaya ve Elal Mus, 2012).

Kefir daneleri, mikrobiyotasının uygun koşullar altında korunması durumunda faaliyetlerini yıllarca korur. Kefir danelerinde bulunan farklı mikroorganizma grupları fermantasyonun farklı evrelerinde aktiftirler. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* dahil olmak üzere *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* kefir daneleriyle genel olarak ilişkilidir ve çoğunlukla fermantasyonun ilk saatlerinde asitlendirmeden sorumludur. Mayalar, asetik asit bakterileri, tat üreten *Lactobacillus* türleri ve *Leuconostoc* türü çok daha yavaş gelişir ve bu da yavaş aroma, alkol ve CO₂ üretimiyle sonuçlanır (Tamang ve Kailasapathy, 2010).

Kefir danelerinde en sık rastlanan bakteriler homofermantatif ve heterofermantatif *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve asetik asit bakterileridir. Tanımlanan türler *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum* ve *Lactobacillus parakefir*'dir (Guzel-Seydim ve diğ, 2010). Garrote ve diğ (2001)'nin

Arjantin kefir danelerinde tanımladığı mikroorganizmalar *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Lactobacillus parakefir*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Lactobacillus lactis* subs. *lactis* biovar. *diacetylactis*' tir. Lin ve diğ (1999), Tayvanlı kefir danelerinden izole ettikleri LAB ile mayaları tanımlanmış ve karakterize etmişlerdir. Bu araştırmacılar kefir danelerinden izole ettikleri suşların *Lactobacillus helveticus* ve *Leuconostoc mesenteroides* bakterileri ile *Kluyveromyces marxianus* ve *Pichia fermentans* mayaları olduğunu gözlemlemiştir.

Kefire özgü mayalar, kefirin duyuşal özelliklerinde önemli bir rol oynamaktadır. Buna göre kefir için standart olan, içecekte bulunan minimum maya miktarı 10^4 cfu/g' dir. (Tamang ve Kailasapathy, 2010). Guzel-Seydim ve diğ (2010), kefirde *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir*, *Saccharomyces delbruecki*, *Torulopsis holmii*, *Candida holmii*, *Saccharomyces unisporus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulospora delbrueckii*, *Candida friedricchi* ve *Pichia fermentans* mayalarını izole etmiştir. Latorre-García ve diğ (2007), 10 farklı ev yapımı ve ticari kefir örneklerinden maya kolonileri izole etmiştir. DNA saflaştırması, PCR amplifikasyonu ve dizi analizi kullanarak en yaygın görülen maya türlerinin *Kluyveromyces lactis*, *Issatchenkia orientalis*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces exiguus* ve *Saccharomyces humaticus* olduğunu belirlemiştir. Wang ve diğ (2008) ise Tayvanlı kefir danelerinde klasik mikrobiyoloji ve PCR yöntemiyle tanımlanan izolatlar arasında *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces turicensis* ve *Pichia fermentans* olduğunu bildirmiştir.

Kefirden izole edilen mayalar laktozu fermente eden veya laktozu fermente edemeyen olarak sınıflandırılabilir. Laktozu fermente edemeyen mayalar diğerlerine göre baskındır. Laktozu fermente eden mayalar kefir danesinin yüzey katmanında bulunurken, laktozu fermente edemeyen mayalar kefir danelerinin derin katmanlarında bulunurlar. Laktozu fermente eden mayalar başlıca *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Debaryomyces hansenii* ve *Dekkera anomala* iken laktozu fermente edemeyen mayalar ise *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Torulospora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* ve *Debaryomyces occidentalis*'tir. (Ratray ve O'Connell, 2011).

Birçok çalışma kefirin antitümöral aktivitesini, bağışıklık sistemini uyarmasını ve hem antibakteriyel hem de antifungal aktivitelerini ortaya koymuştur (Garrote ve diğ, 2000). Kefirin antimikrobiyal etkisi, kefir mikroorganizmalarının besin için diğer organizmalara karşı rekabetinin yanı sıra fermantasyon sırasında üretilen polisakkaritler, peptidler, organik asitler (laktik ve asetik asit), karbondioksit, hidrojen peroksit, etanol, diasetildir ve serbest yağ asitlerinden kaynaklanmaktadır (Guzel-Seydim ve diğ, 2010). Kefirden izole edilen LAB aynı zamanda, antimikrobiyal aktiviteden kısmen sorumlu bazı bakteriyosinler üretmektedir. Bu biyoaktif bileşikler, antimikrobiyal aktivite sağlamak için bağımsız veya sinerjik olarak hareket edebilirler. Birkaç araştırmada kefirin ve kefirin hücre içermeyen ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin asidik ortamda oldukça etkili olduğu, nötr ve alkali ortamda ise etkili olmadığı bildirilmiştir (Kesenkaş ve diğ, 2017).

Kefir, kefir danesi, kefir süspansiyonu veya kefirde elde edilen bakteriyel izolatların inhibe ettiği patojenler arasında *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Listeria monocytogenes* vardır (Kesenkaş ve diğ, 2017). Çalışmalar ayrıca kefir, kefiran, kefir daneleri ve su kefirinin *Candida albicans* (Rodrigues ve diğ, 2005; Silva ve diğ, 2009), *Fusarium graminearum* (Ismaiel ve diğ, 2011), *Torulopsis glabrata*, *Microsporum nanum*, *Trichopyton mentagrophytes*, *Trichopyton rubrum* (Cevikbas ve diğ, 1994) ve *Aspergillus ochraceus* (Velez ve diğ, 2014)'a karşı antifungal etkisi olduğunu göstermiştir.

Cevikbas ve diğ (1994), kefir ve kefir danelerinin *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Bacillus subtilis*'e karşı agar difüzyon yöntemiyle antibakteriyel etkilerini belirlemişlerdir. Kefir, gram pozitif bakterilere karşı oldukça yüksek bir antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu araştırma grubu bunun yanında kefirin *Candida*, *Torulopsis glabrata*, *Microsporum nanum*, *Trichopyton mentagrophytes* ve *Trichopyton rubrum*'a karşı da inhibisyon etkisi gösterdiğini ancak *Cryptococcus neoformans* ve *Candida parapsilosis*'e karşı antifungal etki göstermediğini bildirmiştir.

Diğer çalışmada kefirin *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas*

aeruginosa ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Kefir 24 ve 48 saat fermente edilmiş, ardından 7 gün 4 – 8°C' de muhafaza edilmiş ve *in vitro* ortamda disk difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin yoğunluğu, ampisilin ve neomisin gibi 2 antibiyotikle karşılaştırılmalı olarak yorumlanmıştır. Buna göre 24 saat ve 48 saat fermente edilen taze kefir ile 7 gün muhafaza edilen kefirde *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* ve *S. enteritidis*'e karşı aynı etkiler gözlenmiştir. Kefir örneklerinin *E. coli*, *E. faecalis* ve *S. enteritidis* üzerine antimikrobiyal aktivitesi her iki test antibiyotiğinden üstün çıkmıştır. *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi ise sadece bir antibiyotikten üstün çıkmıştır. Test edilen örnekler *P. aeruginosa* ve *C. albicans* üzerinde etkili olmamıştır (Chifiriuc ve diğ, 2011).

Başka bir çalışmada 24 ve 48 saat fermente edilen kefirin disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* üzerine antimikrobiyal etkilerine bakılmıştır. 24 ve 48 saat fermente edilen kefirde en iyi antimikrobiyal etkinin sırasıyla 21,4 ve 21,1 mm inhibisyon zon çapıyla *Staphylococcus aureus*'a karşı olduğu gözlenmiştir. 24 ve 48 saat fermente edilen kefirle benzer sonuçları +4°C'de muhafaza edildiği süre boyunca 1., 4., ve 7. günlerde de göstermiştir. 7. güne kadar +4°C'de muhafaza edilen örneklerin test edilen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisi zamanla azalırken veya değişmezken, sadece *Salmonella enteritidis*'e karşı antimikrobiyal aktivitede bir artış görülmüştür (Ulusoy ve diğ, 2007).

Bir diğer çalışmada kefirin insan dışkı örneklerinden izole edilen gram negatif mikroorganizmalar (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella flexneri* ve *Shigella sonnei*) ve gıda örneklerinden izole edilen gram pozitif bakteriler (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) üzerinde inhibisyon etkisine bakılmıştır. Ayrıca kefirin inhibisyon etkisinin daha detaylı araştırılması için organik asitlerin rolü incelenmiştir. Bunun için steril yağsız süte ve MRS broth içine inoküle edilen kefir daneleri 20°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürler santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı alınmıştır. İnhibitor aktivitesi hem agar spot test ile hem de agar kuyucuk yöntemiyle belirlenmiştir. Etki çapları gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı 11 mm ile 20,50 mm arasında ölçülmüştür. Gram pozitif bakterilerde etki çapları gram negatif türlere karşı daha büyük olmuştur. Bu çalışmada

inhibitör etkilerin fermantasyon sırasında üretilen laktik ve asetik asitlerin ayrışmamış formlarından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Garrote ve diğ, 2000).

Yüksekdağ ve diğ (2004), Türk kefirinden izole edilen suşların *Staphylococcus aureus*, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğunu bildirmiştir. Powell ve diğ (2007), kefirde izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşunun ürettiği 35-kDa bakteriyosinin dar bir spektrumda antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Örnekler

Tez çalışmasında İstanbul'da iki farklı aktardan alınan kefir daneleri ile 2 farklı firmaya ait ticari kefir örnekleri kullanılmıştır.

Mikroorganizma olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterileri ile *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* küfleri kullanılmıştır.

3.1.2 Besiyerleri ve çözeltiler

Çalışmada Malt Extract Agar (MEA, Merck No: 1.05398), Malt Extract Broth (MEB, Merck No: 1.05397), peptonlu su, Tween 80'li peptonlu su (Çizelge 3.1), Soft Malt Extract Agar (Çizelge 3.2), Trypticase Soy Agar (TSA, MERCK No: 1.05458), Trypticase Soy Broth (TSB, Merck 1.05459), Soft Trypticase Soy Agar, Yeast Peptone Dextrose (YPD) (Çizelge 3.3) kullanılmıştır. Soft TSA, TSB besiyerine %1 agar-agar ilavesi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1 : Tween 80 çözeltisinin kimyasal bileşimi.

Bileşen	Miktar
NaCl	8,5 g
Pepton	1 g
Tween 80	0,5 g
Distile su	1 L

Çizelge 3.2 : Soft Malt Ekstrakt Agar çözeltisinin kimyasal bileşimi.

Bileşen	Miktar
Malt Ekstrakt	30 g
Pepton	3 g
Agar agar	10 g
Distile su	1 L

Çizelge 3.3 : YPD çözeltilisinin kimyasal bileşimi.

Bileşen	Miktar
Maya ekstraktı	10 g
Pepton	20 g
Glikoz	20 g
Distile su	1 L

3.2 Metot

3.2.1 Mayaların izolasyonu

Bu çalışmada 2 farklı kefir danesiyle hazırlanan kefir içeceği ile 4 farklı ticari kefir kullanılmıştır. Aktarlardan alınan kefir daneleri 1 gün önceden süt içine konularak oda koşullarında fermantasyona bırakılıp kefir içeceği haline getirilmiştir. Örneklerden mikroorganizma izolasyonu için ileri dilüsyonlar hazırlanarak MEA'da yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış ve 25°C'de 2 gün aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır (Simova ve diğ., 2002).

Koloni özellikleri ve mikroskopik görüntülerine göre seçilen maya izolatları MEA besiyerinde saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda elde edilen mayalar Barnett ve diğ (1983)'dan alınan yöntemle göre; cam petri içine kavanoz kapağı konulup, üzerine sıvı besiyeri damlatıp çizgi şeklinde maya sürülen lamel yerleştirildikten sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında mikroskopta incelenerek filamentöz gelişimine ve morfolojik özelliklerine göre 10 adet izolat seçilmiştir. Saflaştırılarak seçilen 10 adet maya izolatı yatık MEA ve gliserol çözeltilisine alınmıştır. Yatık agardaki kültürler + 4°C'de, gliserol stokları -20°C'de saklanmıştır (Tra ve diğ., 2016).

3.2.2 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

3.2.2.1 Nokta ekim (spot-inoculated) yöntemi

Lee ve diğ (2008)'den modifiye edilerek uygulanmıştır. Maya izolatları MEB'da 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 2 McFarland konsantrasyonuna ayarlanan maya izolatları MEA'a 2 µL nokta ekim yapıp 25°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Yatık MEA'a alınan küfler (*Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*) 25°C'de 5 gün inkübasyon sonucunda spor süspansiyonu hazırlanarak yaklaşık 10⁶ CFU/mL'ye ayarlanmış ve 100 µL spor süspansiyonu soft agara eklenerek daha

önceden nokta ekim yapılan petrilere üzerine dökülmüş ve 25°C'de 24 saat inkübasyon sonunda inhibisyon çapı ölçümü yapılmıştır.

Bakteriler üzerinde nokta ekim yöntemiyle antimikrobiyal analiz yapmak için yine benzer bir metot izlenmiştir. Maya izolatları MEB'da 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 2 McFarland konsantrasyonuna ayarlanan maya izolatları MEA'a 2 µL nokta ekim yapıp 25°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. TSB'de 37°C'de 1 gün inkübasyona bırakılmış bakteriler (*E. coli* ve *S. aureus*), inkübasyon sonunda 1 McFarland konsantrasyonuna ayarlanmış ve 100 µL konsantrasyon soft agara eklenerek daha önceden nokta ekim yapılmış petrilere üzerine dökülmüştür. 37°C'de 24 saat inhibisyon sonunda inhibisyon çapı ölçümü yapılmıştır (Lee ve diğ., 2008).

3.2.2.2 Kuyucuk difüzyon yöntemi

Bu yöntem Chelliah ve diğ (2016)'dan modifiye edilmiştir. 4 McFarland konsantrasyonuna ayarlanan maya süspansiyonundan 2 µL, 40 mL YPD besiyerine inoküle edilmiş ve çalkalayıcı inkübatörde 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. TSB'ye bakteri (*E. coli* ve *S. aureus*) ekimi yapıp 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 3500 xg'de 30 dakika santrifüjlenip 0,22 µm'lik filtre ile süzölmüştür. Elde edilen süpernatantların pH ölçümü yapıldıktan sonra TSA'lı petrilere 0,5 McFarland, 100 µL bakteri yayma plak yöntemi ile ekim yapılmış, ardından açılan kuyucuklara maya süpernatantlarından 20 µL koyulup 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından çap ölçümü yapılmıştır.

3.2.2.3 Mikrodilüsyon yöntemi

Mayaların *in vitro* antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesinde MİK değerlerinden yararlanılmıştır. MİK, mikroorganizmanın gelişmesini engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonudur. (Arda, 2000).

Bu yöntem Chelliah ve diğ (2016)'dan modifiye edilerek uygulanmıştır. Kuyucuk difüzyon yöntemi için elde edilen süpernatantlar mikrodilüsyon yönteminde de kullanılmıştır. Bunun için kullanılacak bakteriler (*E. coli* ve *S. aureus*) TSB'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 96 kuyucuklu plaklarda 95 µL besiyeri (TSB), 100 µL süpernatant ve 5 µL bakteri içeren kuyucuklar örnek olarak değerlendirilmiştir. 100 µL besiyeri (TSB) ve 100 µL süpernatant içeren kuyucuklar negatif kontrol, 195

μL besiyeri (TSB) ve 5 μL bakteri içeren kuyucuklar pozitif kontrol olarak değerlendirilmiş ve 37°C 'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Toplam olarak her bir kuyucukta 200 μL karışım bulunmaktadır.

Bakteri gelişimi, bakteri yoğunluğunun optik olarak belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Bakterilerin optik yoğunluğu 660 nm de, mikro plak okuyucu (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Vermont, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Okumalar inkübasyondan önce (0. saat), inkübasyon sırasında 2'şer saat aralıklarla 24 saat boyunca yapılmıştır.. Her okumadan önce 96 kuyucuklu plaklar mikro plak okuyucu makinede otomatik olarak çalkalanmıştır.

3.2.3 Hesaplamalar ve istatistiksel analiz

Bakteri gelişmesine mayaların etkisinin belirlenmesin amacıyla Baranyi modeli kullanılmıştır. Baranyi modeli bakteriler için yaygın olarak kullanılır. Bu modelde belirli bir periyottan sonra büyüme hızının sabit kaldığı, ancak lineer faz oluşumundan sonra bir üst asimptotun olduğu varsayılmaktadır. Baranyi modelinde kullanılan denklemler 2.1 ve 2.2'deki gibidir (Garcia ve diğ, 2009).

$$y = y_0 + \mu_{max}A - \ln \left\{ 1 + \frac{[\exp(\mu_{max}A) - 1]}{\exp(y_{max} - y_0)} \right\} \quad (3.1)$$

$$A = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln [\exp(-\mu_{max}t) + \exp(-\mu_{max}\lambda)] - \exp(-\mu_{max}t - \mu_{max}\lambda) \quad (3.2)$$

Baranyi modelinin uygulanmasında Microsoft Excel DMFit eklentisi kullanılarak Baranyi ve Roberts (1994)'e göre maksimum gelişme hızı hesaplanmıştır.

Bakteri gelişmesine maya izolatının etkisi $\alpha = 0,05$ önem düzeyinde tek yönlü ANOVA ile araştırılmıştır. Ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS (IBM SPSS STATICS 20) programı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Maya izolasyonu

Kefir daneleri ile hazırlanan kefir ieeği ve ticari kefir örnekleri ileri dilüsyonlar hazırlanarak petrilere ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda ticari kefirlerden yapılan ekimlerde sadece 3 numaralı örnekte gelişme gözlenmiş, diğerlerinde ise gelişme olmamıştır.

Üç numaralı ticari kefir ile 5 ve 6 numaralı kefir daneleri ile hazırlanan kefir içeceklerinden elde edilen mayalar saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda elde edilen mayalar Barnett ve diğer (1983)'dan alınan yönteme göre mikroskopta incelenerek filamentöz gelişimine ve morfolojik özelliklerine göre 10 adet izolat seçilmiştir.

Literatüre göre kefirde bulunan mayalar *Kluyveromyces marxianus/Candida kefir*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera anomala*, *accharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* ve *Debaryomyces occidentalis*'tir (Leite ve diğer, 2013).

İzolasyon ile elde edilen mayalar kodlarıyla birlikte izelge 4.1'de verilmiştir. Mikroskopta yapılan incelemeler sonucu seçilen mayalar 3.2, 5.4, 5.5, 5.6, 5.8, 6.1, 6.4, 6.51, 6.52 ve 6.6'dır.

4.2 Maya izolatlarının nokta ekim yöntemiyle mikroorganizmalar üzerine etkisi

Kefirden elde edilen 10 adet maya izolatı tek nokta ekim yapılarak geliştirilmiştir. Inkübasyon sonunda petrilere *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* ve *S. aureus* içeren soft agar ilave edilip tekrar inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucunda zon oluşumu gözlenmemiştir. Bununla birlikte özellikle *A. flavus*'da sporlanmanın daha düşük düzeyde gerçekleştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 : Kefirden izole edilen mayaların kodları.

Kefir 3	Kefir 5	Kefir 6
3.1	5.1	6.1
3.2	5.2	6.2
3.3	5.3	6.3
3.4	5.4	6.4
3.5	5.5	6.51
3.6	5.6	6.52
3.7	5.7	6.6
3.8	5.8	6.7
3.9	5.9	6.8
3.10	5.10	6.9
3.11	5.11	6.10
3.12	5.12	6.11
3.13	5.13	6.12
3.14	5.14	6.13
	5.15	6.14
	5.16	6.15
	5.17	6.16
	5.18	6.17
	5.19	6.18
	5.20	6.19
	5.21	6.20
	5.22	6.21
	5.23	6.22
	5.24	6.23
	5.25	
	5.26	
	5.27	

4.3 Maya izolatlarının kuyucuk difüzyon yöntemiyle *E. coli* ve *S. aureus* üzerine etkisinin incelenmesi

Kefirden elde edilen 10 adet maya izolatına ait süpernatantlar kuyucuklara ilave edilerek *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkisi 48 saatlik inkübasyon sonrası incelenmiştir. İnkübasyon sonunda bazı maya izolatlarının çok düşük etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon zon çapının 1 mm'nin altında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2’de süpernatantların *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisi verilmiştir.

Literatüre göre bakteriyel gelişme inhibisyonu bakteriyel inaktivasyon anlamına gelmediği için nokta ekim ve kuyucuk yöntemleri bakterisit ve bakteriyostatik etkileri ayırt edemez. Üstelik, agar difüzyon yöntemi, agar ortamına dağıtılan antimikrobiyal maddenin miktarının nicelleştirilmesi mümkün olmadığından, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) belirlemek için uygun değildir (Balouiri ve diğ., 2016).

Mikrodilüsyon yöntemi kullanılmaya başlanmadan önce, laktik asit bakterilerinin gram negatif bakterilere karşı bakteriyosin üretiminin tespiti genellikle hassas yöntemlerin bulunamaması ile engellenmiştir ve kuyucuk difüzyon veya nokta ekim yöntemleri gram negatif bakterilerin organik asitlere, hidrojen peroksit veya aromatik bileşiklere duyarlı olması nedeniyle yanlış sonuç vermektedir (Yaakoubi ve diğ., 2009).

Çizelge 4.2 : Süpernatantların *E. coli* ve *S. aureus* üzerine etkisi.

İzolat kodu	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
K5.5	+/-	+/-
K6.6	+/-	+
K5.8	+/-	+
K3.2	+/-	+
K5.4	+	+
K6.52	+	+
K6.51	+	+/-
K6.1	+	+
K5.6	-	+/-
K6.4	+	+

4.4 Maya izolatlarının mikrodilüsyon yöntemiyle *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisinin incelenmesi

Katı besiyerinde gerçekleştirilen çalışmalarda düşük seviyede etki belirlendiğinden çalışmanın devamı sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Çünkü literatürde de broth dilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin daha etkili ve doğru bir şekilde tespit edildiği ifade edilmektedir (Balouiri ve diğ, 2016; Yaakoubi ve diğ, 2009).

Çalışmada mayaların antimikrobiyal etkisinin incelenmesinde mikrodilüsyon yöntemiyle belirli zaman aralıklarında ölçümler gerçekleştirilerek bakteri gelişmesi izlenmiştir. *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı maya izolatlarının antimikrobiyal etkisi optik yoğunluk ölçümü yapılarak 2 saat aralıklarla incelenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.2 ve 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 ve 4.3'den de görüldüğü gibi maya izolatlarının *E. coli* ve *S. aureus* gelişmesini tamamen önlemediği belirlenmiştir. Bununla birlikte elde edilen bulgulara göre *S. aureus*'a karşı mayaların daha etkili olduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrolle maya süpernatantı eklenmiş örneklerde optik yoğunluklar arasındaki fark daha yüksek olmuştur. İstatistiksel olarak da pozitif kontrolde görülen gelişme ile maya süpernatantı eklenmiş örneklerdeki gelişmeler arasında da fark bulunmaktadır. 6.51, 6.52 numaralı maya izolatlarında 24 saat sonunda en yüksek fark elde edilmiştir. Ayrıca maya süpernatantı ilave edilen örneklerde *S. aureus* gelişmesi 8. saatten sonra durmakta iken pozitif kontrolde gelişme logaritmik fazda devam etmektedir.

E. coli için 24 saat sonunda optik yoğunluklar arasındaki fark *S. aureus*'daki kadar yüksek olmamıştır. *E. coli* için en yüksek etki 24 saat sonunda 3.2, 5.8, 6.6 ve 6.4 numaralı örneklerde görülmekle birlikte bu etkinin az miktarda olduğu gözlenmiştir.

E. coli de yaklaşık 12. saatten sonra sabit duruma geçmektedir. Aynı durum pozitif kontrol için de geçerlidir. *E. coli* üzerine mayaların etkisinin daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada identifikasyon işlemleri gerçekleştirilmemiş ancak maya izolatlarının *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkisinin düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3 : Maya izolatlarının *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkisi.

Süre	PK	K5.5	K6.6	K5.8	K3.2	K5.4	K6.52	K6.51	K6.1	K5.6	K6.4
0	0,294±0,027 ^b	0,017±0,012 ^a	0,028±0,016 ^a	0,017±0,017 ^a	0,013±0,016 ^a	0,020±0,010 ^a	0,021±0,009 ^a	0,031±0,004 ^a	0,022±0,017 ^a	0,015±0,012 ^a	0,021±0,019 ^a
2	0,102±0,004 ^b	0,021±0,006 ^a	0,021±0,004 ^a	0,022±0,006 ^a	0,017±0,016 ^a	0,025±0,007 ^a	0,022±0,006 ^a	0,023±0,004 ^a	0,032±0,004 ^a	0,035±0,026 ^a	0,023±0,007 ^a
4	0,577±0,091 ^{ab}	0,477±0,087 ^{ab}	0,498±0,083 ^{ab}	0,514±0,090 ^{ab}	0,424±0,042 ^a	0,498±0,069 ^{ab}	0,472±0,157 ^{ab}	0,476±0,135 ^{ab}	0,639±0,095 ^b	0,613±0,134 ^{ab}	0,551±0,101 ^{ab}
6	1,020±0,019 ^e	0,892±0,082 ^{ab}	0,902±0,040 ^{abc}	1,002±0,043 ^{de}	0,858±0,039 ^a	1,006±0,050 ^{de}	1,148±0,012 ^f	1,156 ±0,014 ^f	0,973±0,024 ^{cde}	1,125±0,046 ^f	0,950±0,026 ^{bcd}
8	1,216±0,020 ^{cde}	1,124±0,012 ^b	1,121±0,010 ^b	1,165±0,044 ^{bc}	1,062±0,020 ^a	1,199±0,047 ^{cd}	1,246±0,022 ^{de}	1,269±0,011 ^e	1,219±0,036 ^{cde}	1,280±0,064 ^e	1,173±0,036 ^{bc}
10	1,347±0,016 ^{cd}	1,250±0,023 ^{ab}	1,251±0,011 ^{ab}	1,300±0,052 ^{bc}	1,221±0,043 ^a	1,315±0,052 ^{bcd}	1,350±0,032 ^{cd}	1,339±0,011 ^{cd}	1,331±0,049 ^{cd}	1,387±0,071 ^d	1,320±0,031 ^{bcd}
12	1,424±0,028 ^{de}	1,344±0,002 ^{abc}	1,325±0,006 ^{ab}	1,360±0,035 ^{abc}	1,300±0,041 ^a	1,387±0,049 ^{bcd}	1,409±0,029 ^{cde}	1,405±0,019 ^{cde}	1,402±0,038 ^{cde}	1,450±0,061 ^e	1,374±0,021 ^{bcd}
14	1,456±0,022 ^{de}	1,385±0,005 ^{bc}	1,363±0,011 ^{ab}	1,401±0,041 ^{bcd}	1,325±0,039 ^a	1,416±0,037 ^{bcd}	1,441±0,023 ^{cde}	1,435±0,010 ^{cde}	1,437±0,041 ^{cde}	1,475±0,065 ^e	1,403±0,023 ^{bcd}
16	1,500±0,018 ^f	1,416±0,001 ^{bc}	1,417±0,023 ^{bc}	1,411±0,027 ^b	1,345±0,033 ^a	1,449±0,014 ^{bcd}	1,467±0,003 ^{def}	1,461±0,007 ^{cde}	1,468±0,032 ^{def}	1,491±0,050 ^{ef}	1,434±0,016 ^{bcd}
18	1,547±0,007 ^e	1,447±0,005 ^{bc}	1,439±0,017 ^b	1,444±0,032 ^{bc}	1,367±0,031 ^a	1,474±0,010 ^{bcd}	1,488±0,003 ^{cd}	1,484±0,013 ^{bcd}	1,495±0,031 ^d	1,500±0,052 ^d	1,457±0,014 ^{bcd}
20	1,547±0,016 ^e	1,459±0,015 ^{bc}	1,448±0,024 ^b	1,449±0,028 ^b	1,377±0,023 ^a	1,492±0,006 ^{bcd}	1,496±0,005 ^{cd}	1,498±0,011 ^{cd}	1,508±0,023 ^{de}	1,505±0,056 ^{cde}	1,467±0,009 ^{bcd}
22	1,550±0,028 ^d	1,471±0,005 ^{bc}	1,459±0,009 ^b	1,457±0,036 ^b	1,389±0,023 ^a	1,505±0,011 ^{bcd}	1,502±0,003 ^{bcd}	1,510±0,007 ^{cd}	1,517±0,022 ^{cd}	1,512±0,059 ^{cd}	1,472±0,012 ^{bc}
24	1,563±0,031 ^d	1,501±0,043 ^{bcd}	1,465±0,009 ^b	1,489±0,055 ^{bc}	1,406±0,014 ^a	1,512±0,015 ^{bcd}	1,505±0,005 ^{bcd}	1,517±0,002 ^{bcd}	1,521±0,018 ^{bcd}	1,544±0,065 ^{cd}	1,475±0,011 ^b

Çizelge 4.4 : Maya izolatlarının *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisi.

Süre	PK	K5.5	K6.6	K5.8	K3.2	K5.4	K6.52	K6.51	K6.1	K5.6	K6.4
0	0,254±0,015 ^b	0,012±0,006 ^a	0,012±0,008 ^a	0,017±0,015 ^a	0,012±0,010 ^a	0,038±0,025 ^a	0,035±0,015 ^a	0,030±0,021 ^a	0,023±0,012 ^a	0,018±0,012 ^a	0,018±0,010 ^a
2	0,094±0,001 ^b	0,043±0,066 ^a	0,005±0,003 ^a	0,008±0,005 ^a	0,002±0,002 ^a	0,010±0,003 ^a	0,009±0,006 ^a	0,018±0,015 ^a	0,007±0,005 ^a	0,009±0,005 ^a	0,009±0,003 ^a
4	0,132±0,004 ^{bcd}	0,097±0,055 ^{ab}	0,107±0,013 ^{abc}	0,151±0,015 ^{cd}	0,061±0,010 ^a	0,159±0,023 ^d	0,097±0,021 ^{ab}	0,097±0,022 ^{ab}	0,082±0,017 ^a	0,131±0,026 ^{bcd}	0,158±0,025 ^d
6	0,256±0,027 ^a	0,386±0,061 ^b	0,365±0,002 ^b	0,432±0,020 ^b	0,274±0,034 ^a	0,403±0,026 ^b	0,283±0,022 ^a	0,280±0,011 ^a	0,358±0,052 ^b	0,369±0,060 ^b	0,371±0,051 ^b
8	0,456±0,025 ^{bcd}	0,518±0,019 ^{def}	0,479±0,020 ^{cde}	0,536±0,036 ^{ef}	0,432±0,035 ^{abc}	0,465±0,010 ^{cd}	0,390±0,009 ^{ab}	0,378±0,014 ^a	0,545±0,051 ^f	0,476±0,071 ^{cde}	0,452±0,043 ^{bcd}
10	0,563±0,025 ^{cd}	0,550±0,033 ^{cd}	0,518±0,039 ^{bcd}	0,559±0,043 ^{cd}	0,488±0,040 ^{bc}	0,470±0,007 ^{ab}	0,405±0,019 ^a	0,405±0,019 ^a	0,576±0,058 ^d	0,508±0,076 ^{bcd}	0,460±0,036 ^{ab}
12	0,599±0,026 ^d	0,568±0,051 ^{cd}	0,533±0,047 ^{bcd}	0,564±0,049 ^{cd}	0,497±0,035 ^{abc}	0,472±0,005 ^{ab}	0,418±0,028 ^a	0,418±0,024 ^a	0,578±0,055 ^d	0,517±0,070 ^{bcd}	0,464±0,032 ^{ab}
14	0,638±0,037 ^d	0,572±0,060 ^{cd}	0,536±0,055 ^{bc}	0,561±0,054 ^{cd}	0,496±0,037 ^{abc}	0,469±0,004 ^{ab}	0,428±0,031 ^a	0,428±0,025 ^a	0,571±0,051 ^{cd}	0,517±0,076 ^{bc}	0,461±0,030 ^{ab}
16	0,673±0,040 ^e	0,580±0,063 ^d	0,543±0,056 ^{bcd}	0,559±0,054 ^{cd}	0,495±0,037 ^{abcd}	0,472±0,006 ^{abc}	0,438±0,033 ^a	0,436±0,028 ^a	0,559±0,047 ^{cd}	0,520±0,081 ^{abcd}	0,460±0,031 ^{ab}
18	0,692±0,039 ^e	0,588±0,067 ^d	0,547±0,059 ^{bcd}	0,560±0,057 ^{cd}	0,489±0,041 ^{abc}	0,475±0,004 ^{abc}	0,444±0,034 ^a	0,442±0,030 ^a	0,546±0,043 ^{bcd}	0,520±0,084 ^{abcd}	0,461±0,037 ^{ab}
20	0,724±0,057 ^d	0,593±0,064 ^c	0,551±0,061 ^{bc}	0,564±0,059 ^{bc}	0,487±0,042 ^{ab}	0,479±0,007 ^{ab}	0,449±0,035 ^a	0,449±0,032 ^a	0,533±0,039 ^{abc}	0,527±0,087 ^{abc}	0,467±0,038 ^{ab}
22	0,735±0,058 ^d	0,604±0,070 ^c	0,553±0,062 ^{abc}	0,566±0,058 ^{bc}	0,484±0,042 ^{ab}	0,485±0,008 ^{ab}	0,455±0,034 ^a	0,454±0,032 ^a	0,521±0,036 ^{abc}	0,530±0,090 ^{abc}	0,469±0,036 ^{ab}
24	0,779±0,032 ^c	0,555±0,074 ^{ab}	0,530±0,065 ^{ab}	0,583±0,087 ^b	0,462±0,051 ^a	0,518±0,051 ^{ab}	0,457±0,030 ^a	0,455±0,032 ^a	0,497±0,046 ^{ab}	0,547±0,073 ^{ab}	0,492±0,041 ^{ab}

Literatürde bir çalışmada kefirde *Saccharomyces cerevisiae*'in 28 suşu izole edilmiş ve patojenik *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak bütün *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının *Klebsiella pneumoniae*'yi inhibe ettiği, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a ise büyük çoğunluğunun antimikrobiyal etki gösterdiği gözlemlenmiştir. *B. subtilis*'a karşı daha az miktardaki suş inhibitör etki göstermiştir (Lima ve diğ, 2017).

Bir diğer çalışmada kıymıktan elde edilen *Saccharomyces cerevisiae*'in ürettiği antibakteriyel bileşiklerin patojenik *E. coli* üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilen organik asitler *E. coli* üzerinde inhibitör etki yaratmıştır (Chen ve diğ, 2017).

Şeftali, nekrotin ve erikten izole edilen mayaların, *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* ve *Serratia marcescens* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Bu mayalardan *Pichia kluyveri*; *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde etkili olurken, *Saccharomyces boulardii* suşu, *S. aureus* ve *S. marcescens* üzerinde inhibitör etki göstermiştir. *P. Aeruginosa* üzerinde ise her iki maya antibakteriyel özellik göstermiştir (Fai ve diğ, 2014).

Bajaj ve diğ (2013)'nin yaptığı çalışmada *P. kudriavzevii*'nin, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas alcaligenes* üzerinde antibakteriyel, *Aspergillus spp.* üzerinde ise antifungal etki gösterdiği raporlanmıştır.

Poloni ve diğ (2017)'nin fırıncılıkta kullanılan yan ürünlerden izole ettikleri *S. cerevisiae* suşu, *Citrobacter spp.*, *S. marcescens*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* ve *E. coli* üzerinde inhibitör etki yaratmıştır.

Santos ve diğ (2003), kefir danelerinden izole edilen lactobacilli suşlarının *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri* ve *Y. enterocolitica* üzerinde antimikrobiyal etkilerini gözlemlemiştir. Silva ve diğ (2009), esmer şekerde kefir kültürünün *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* üzerinde inhibisyonunu gözlemlemiştir.

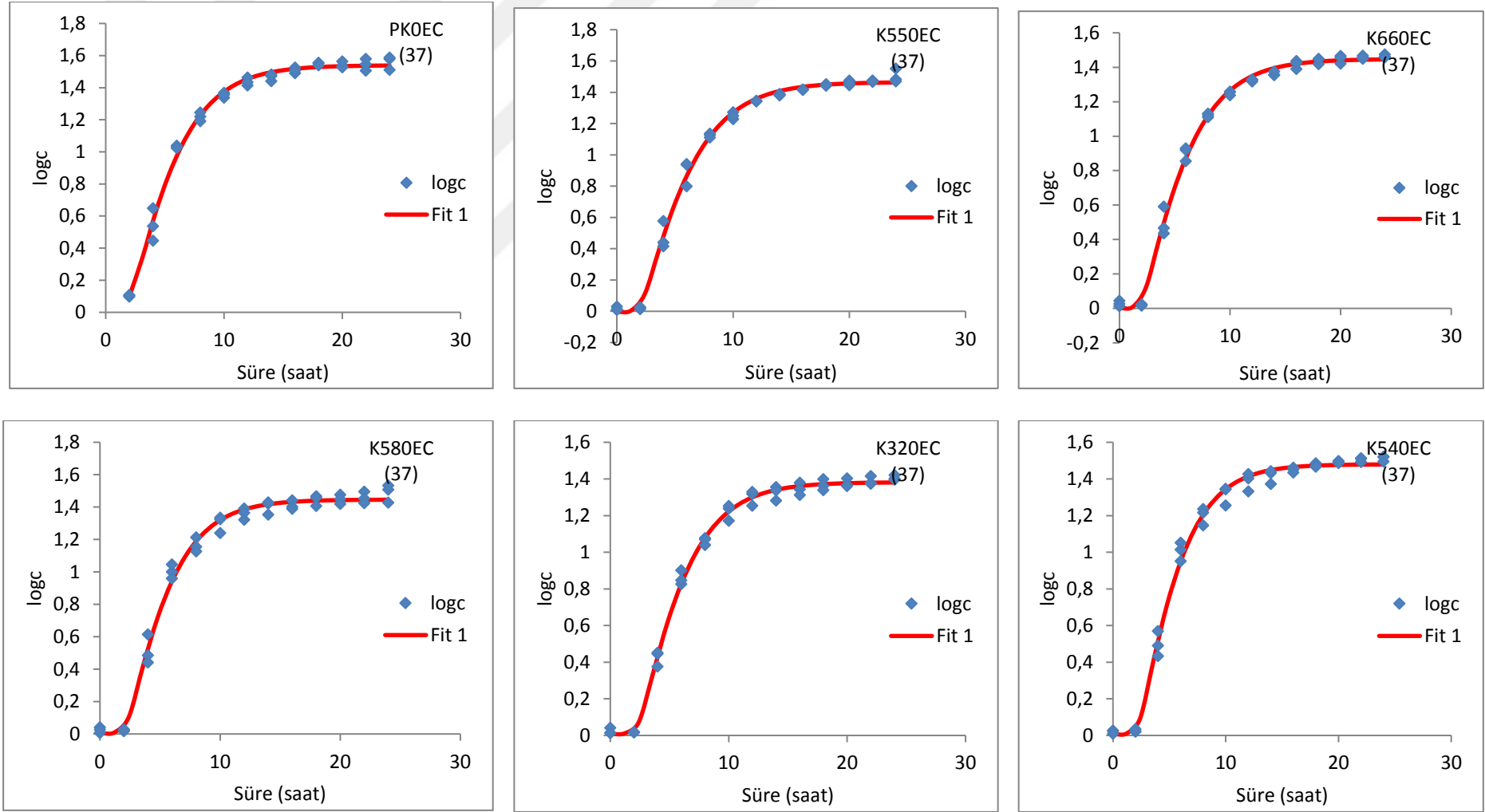
Carasi ve diğ (2014), kefirde izole edilen 6 potansiyel probiyotik *L. kefir* suşu üzerinde çalışmış ve antimikrobiyal özelliklerini araştırmıştır. *L. kefir* suşları

Enterococcus faecalis, *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* üzerinde inhibitör etki göstermiştir.

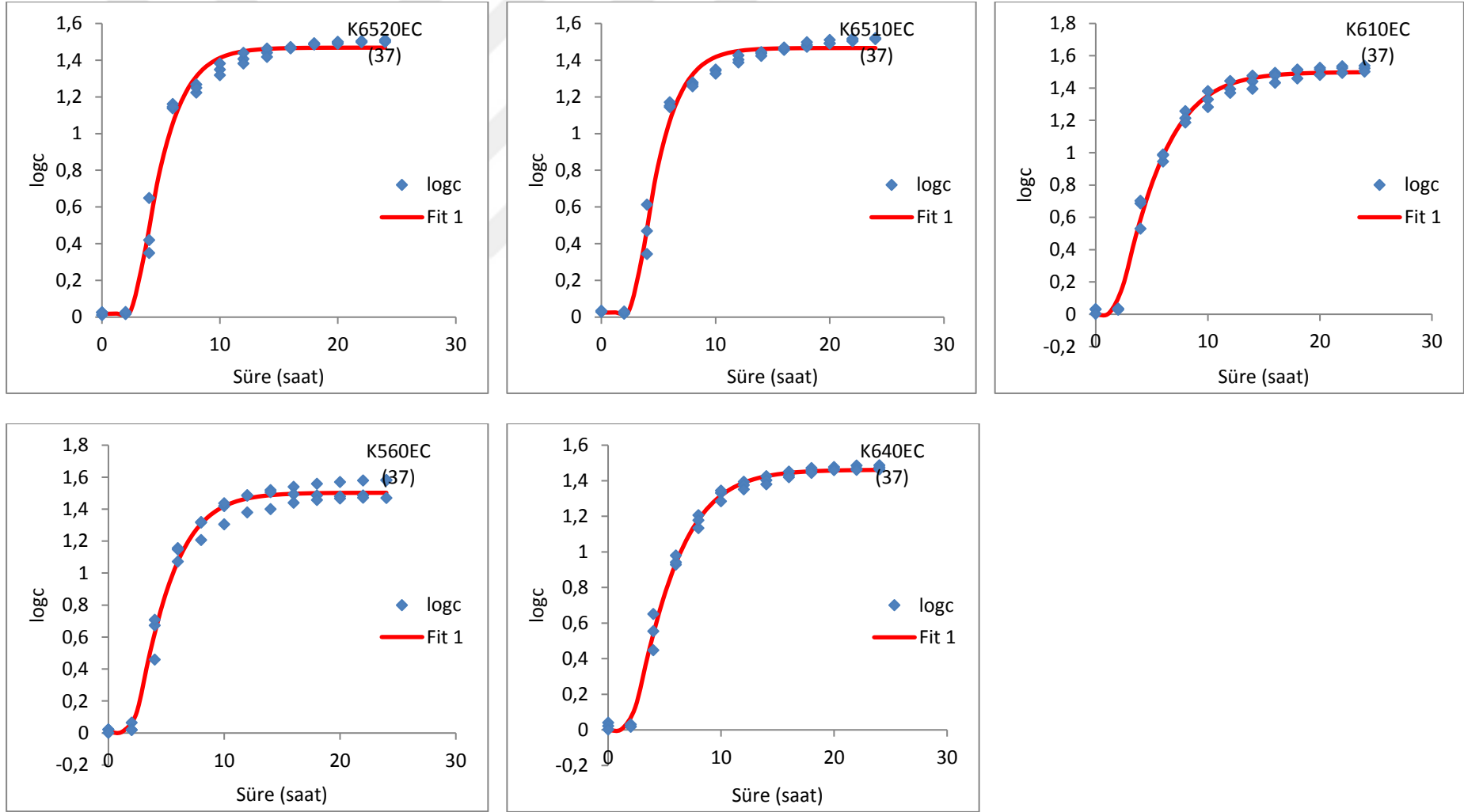
Bu çalışmada *E. coli* ve *S. aureus*'un gelişme hızı ve lag fazı süresine maya süpernatantlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla Baranyi modeli kullanılmıştır. Bu model ile logaritmik fazdaki gelişme hızı hesaplanmıştır. Gerekli denklemlerle zamanla optik yoğunluktaki değişim tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.5'te verilmiştir. Uygulanan modelde her iki mikroorganizma için de yüksek R² ve düşük hata kareler ortalaması elde edilmiştir. Modelin verilere uygunluk gösterdiği Şekil 4.1- 4.4'de gösterilen model grafiklerinde de görülmektedir. Baranyi modeli bakteri gelişimi ve inaktivasyonunun izlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 4.5 : *E. coli* ve *S.aureus*'un maya izolatları varlığında Baranyi modeli ile hesaplanan gelişme hızları, lag fazları ve R² değerleri.

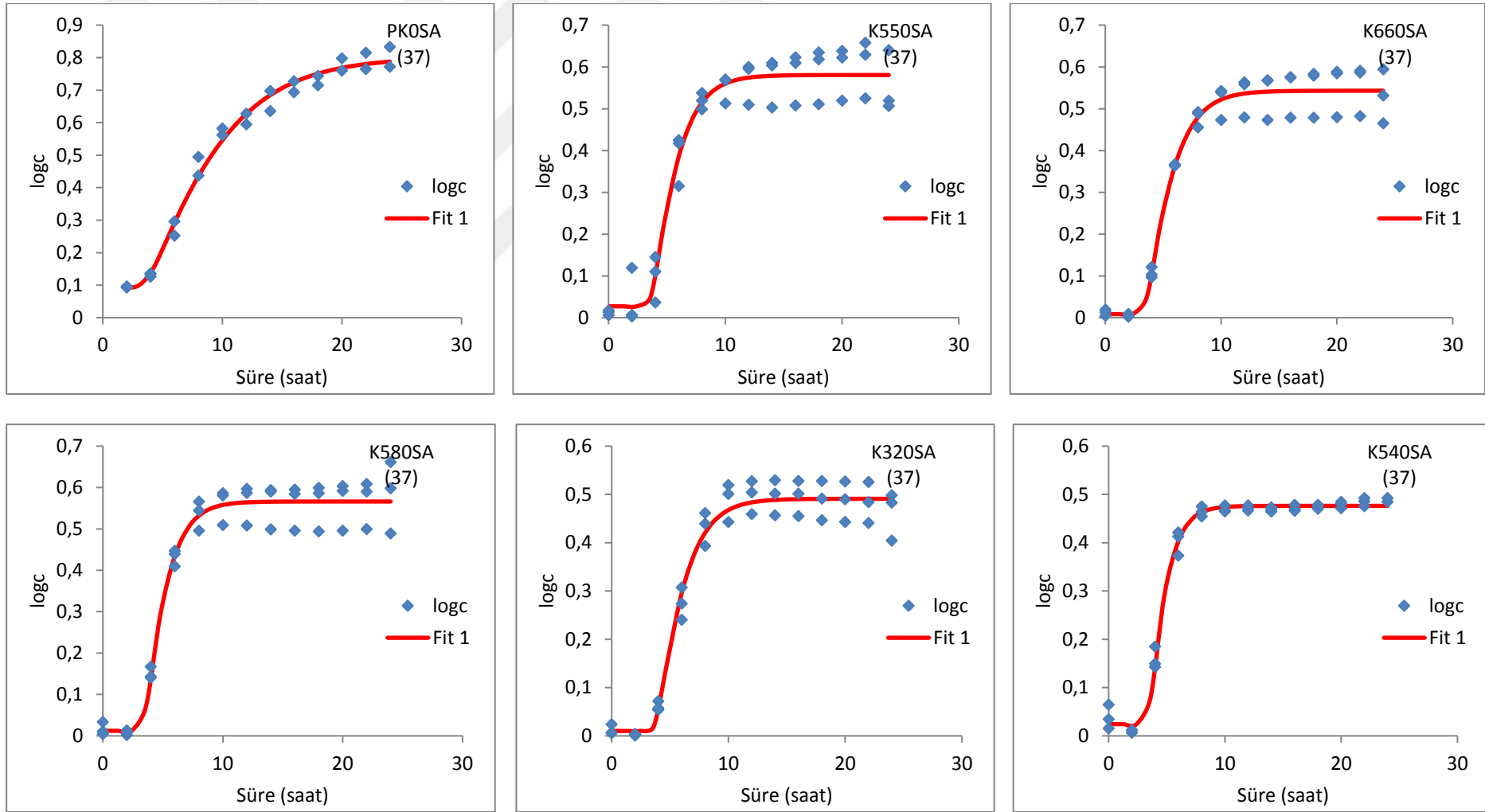
Örnek	<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>			
	g (OD/sa)	lag fazı (sa)	R ²	KO hata	g (OD/sa)	lag fazı (sa)	R ²	KO hata
PK	0,496	0,317	0,992	0,041	0,157	1,756	0,989	0,028
K5.5	0,467	2,161	0,995	0,038	0,335	3,698	0,950	0,051
K6.6	0,466	2,102	0,996	0,033	0,307	3,474	0,967	0,039
K5.8	0,545	2,260	0,992	0,047	0,397	3,409	0,963	0,042
K3.2	0,477	2,432	0,996	0,031	0,278	3,864	0,971	0,033
K5.4	0,552	2,338	0,994	0,042	0,397	3,404	0,994	0,014
K6.52	0,767	2,884	0,988	0,060	0,212	3,403	0,977	0,025
K6.51	0,795	2,936	0,989	0,057	0,201	3,384	0,981	0,023
K6.1	0,524	1,925	0,993	0,043	0,338	3,726	0,940	0,047
K5.6	0,652	2,233	0,988	0,061	0,328	3,378	0,989	0,020
K6.4	0,520	2,109	0,996	0,034	0,297	3,140	0,995	0,013



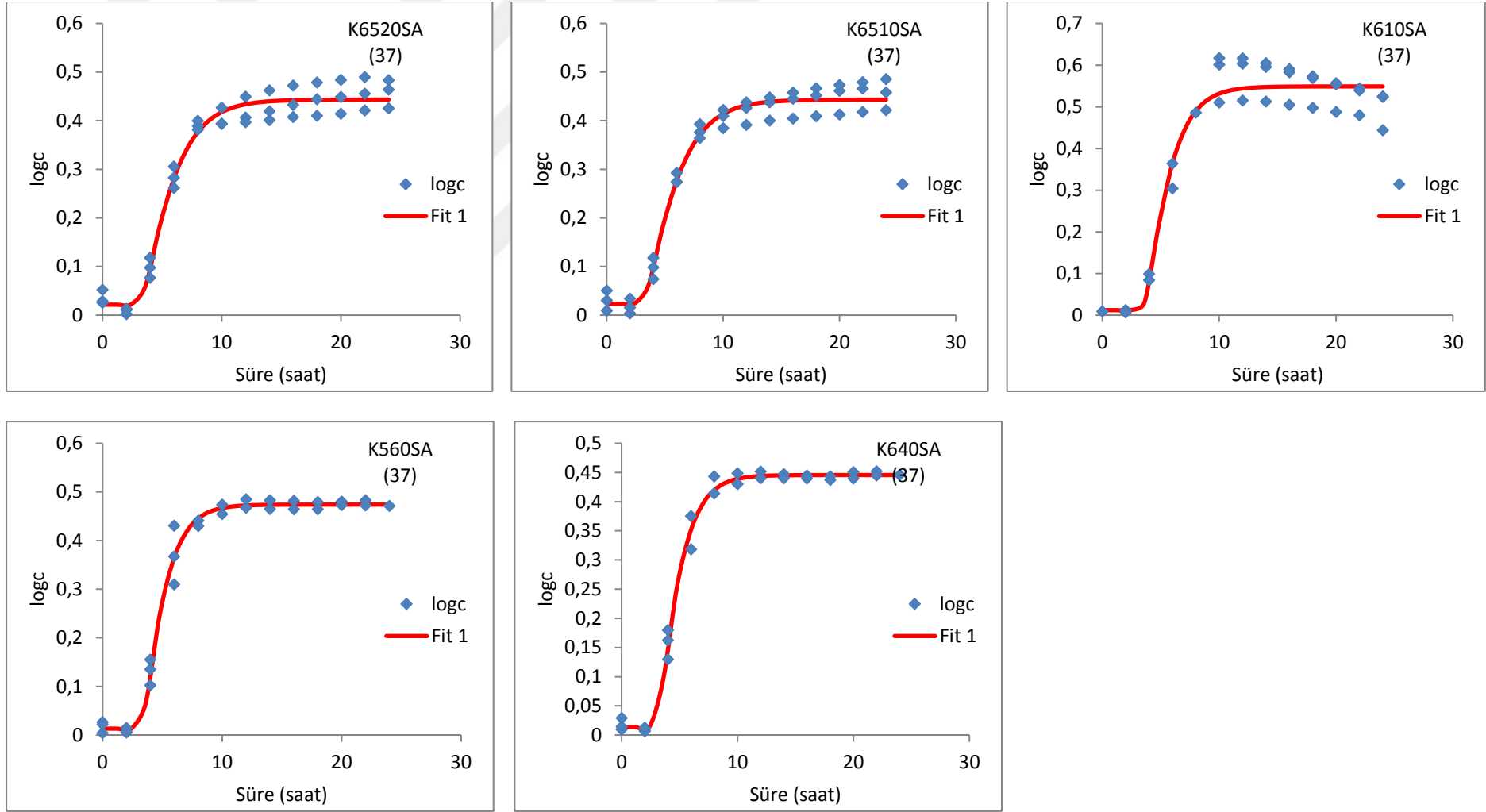
Şekil 4.1 : *E. coli*'nin pozitif kontrol, K5.5, K6.6, K5.8, K3.2 ve K5.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.



Şekil 4.2 : *E. coli*'nin K6.52, K6.51, K6.1, K5.6, ve K6.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.



Şekil 4.3 : *S. aureus*'un pozitif kontrol, K5.5, K6.6, K5.8, K3.2 ve K5.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.



Şekil 4.4 : *S. aureus*'un K6.52, K6.51, K6.1, K5.6, ve K6.4 izolatlarının varlığında zamana karşı gelişme grafikleri.

Gelişme hızı ve lag fazı sürelerine göre bazı maya süpernatantlarının *E. coli*'nin gelişme hızında azalmalara neden olduğu görülmekle birlikte her iki bakteri için de asıl etkinin lag fazı süresini uzatması olduğu belirlenmiştir. *E. coli* için pozitif kontrolde lag fazı 0,317 saat olarak belirlenirken maya süpernatantı ilave edilmiş örneklerde lag fazı süresi 1,925-2,936 sa arasında değişmektedir. *S. aureus* için pozitif kontrolde lag fazı süresi 1,756 sa, örneklerde ise 3,140-3,864 saattir.

Mayaların *E. coli* için en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterenlerinin sırasıyla 3.2, 6.6, 6.4 ve 5.8 numaralı izolatlarla ait olduğu görülmüştür. *S. aureus*'ta ise en yüksek antimikrobiyal etki sırasıyla 6.52, 6.51, 3.2, 6.4 ve 6.1 numaralı izolatlarda görülmektedir. 6.54 ve 3.2 numaralı izolatlar her iki mikroorganizmaya karşı yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir.

Antimikrobisyonların lag fazını geciktirdiğine dair literatürde de çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada resveratrol ile kaemferol ve 3 sentetik bileşiğin *Enterococcus faecalis* üzerine antimikrobiyal etkisi analiz edilmiştir. Kaemferol ve resveratrol kombinasyon halinde, lag fazında bir artış ve maksimum spesifik büyüme hızında bir azalma ile karakterize edilen, katyona göre ayarlanmış Mueller-Hinton broth ve kaymağı alınmış sütte bir gelişme inhibisyonu oluşturmuştur. Resveratrolün antimikrobiyal etkisi, maksimum gelişme oranını azaltması ve lag fazında minör değişiklik yaratması ile karakterize edilmiştir. Fakat resveratrol ve kaemferolün ikili kombinasyonu lag fazında artış ve maksimum gelişme hızında kayda değer bir düşüş oluşturmuştur. Lag fazının uzunluğu *E. faecalis* gelişiminin önlenmesi veya geciktirilmesi açısından önemlidir (Valle ve diğ, 2016).

Diğer bir çalışmada *Citrus limon* var. *pompia*'nın yapraklarından elde edilen esansiyel yağın *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* bakterileri ve *Candida albicans*, *Candida bracarensis* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayaları üzerinde mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesine bakılmış ve maksimum gelişme hızı ile lag fazı değerlendirilmiştir. Sonuçlar, bu esansiyel yağların *Lactobacillus* suşlarında düşük inhibitör etki gösterdiği, buna karşılık *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde düşük konsantrasyonlarda dahi inhibisyon etki gösterdiği yönünde olmuştur. *Pompia* esansiyel yağı mayalarda da

antimikrobiyal özellik göstermiştir. Özellikle *Saccharomyces cerevisiae*'in bu esansiyel yağa en hassas suş olduğu görülmüştür. Pompia esansiyel yağı MİK değerinin altındaki konsantrasyonlarda, mikrobiyal gelişimi negatif etkilemiş ve *Candida albicans* dışındaki bütün patojenlerde lag fazını geciktirmiştir (Fancello ve diğ, 2016).

Tang ve diğ (2013), buzdolabı sıcaklıklarında soğuk füme somonda *L. monocytogenes* gelişimini kontrol etmek için organik asitler, nisin ve bunların kombinasyonlarının etkilerini incelemiştir. Soğuk füme somon sodyum diasetat, potasyum laktat, nisin ve aynı seviyelerde inhibitörlerin ikili kombinasyonları ile takviye edilmiştir. Tüm antimikrobiyaller arasında potasyum laktat ve sodyum diasetat, lag fazında en büyük artışı sağlamıştır. Potasyum laktat ile sodyum diasetatın lag fazını artırmada ve maksimum hücre yoğunluğunu azaltmada sinerjistik etki yarattığı bildirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada 4 ticari kefir ve 2 kefir danesiyle hazırlanan kefir içeceğinden izole edilen mayalar arasından 10 tanesi seçilmiş, ardından bu mayaların *Aspergillus flavus* ile *Aspergillus niger* küfleri ve *E. coli* ile *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Bu mikroorganizmalara karşı önce nokta ekim ve kuyucuk difüzyon yöntemleri denenmiştir. Nokta ekim yönteminde küfler üzerinde antimikrobiyal etkiyi gösteren zon çapının oluşmadığı, bununla birlikte sporlanmanın azaldığı görülmüştür. Kuyucuk difüzyon yönteminde ise oluşan zon çapının 1 mm'nin altında olduğu görülmüş, bu yüzden literatüre göre daha hassas bir yöntem olan mikrodilüsyon yöntemine geçilmiştir.

Mayalardan elde edilen süpernatantların pH'sı 7-8 olarak çıktığı için organik asitlerin etkisini belirlemek amacıyla ayrıca bir nötrleme işlemi uygulanmamıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı maya izolatlarının antimikrobiyal etkisi optik yoğunluk ölçümü yapılarak 2 saat aralıklarla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mayaların *E. coli* ve *S. aureus* gelişmesini tam olarak önlemediği görülmüştür. Bununla birlikte mayaların *S. aureus*'a karşı daha etkili olduğu, 24 saat sonunda *S. aureus*'a karşı en etkili mayaların ise 6.51 ve 6.52 izolatları olduğu belirlenmiştir. *E. coli*'ye karşı ise 24 saat sonunda en etkili maya izolatları 3.2 ve 5.8 olmuştur.

Kefir mayalarının antimikrobiyal özellikleriyle ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bu konuda ileri araştırmalar yapılarak mayaların antimikrobiyal özellikleri daha detaylı incelenmelidir. İleri çalışmalarda diğer doğal antimikrobiyallerle veya diğer mayalarla kombine uygulama yapılarak etkileri artırılabilir. Kefir mayaları diğer antimikrobiyaller ve mayalarla birlikte sinerjistik etki yaratabilirler. Kefir mayalarından antimikrobiyal madde üretimi farklı substratlar kullanılarak ve inkübasyon koşulları değiştirilerek artırılabilir. Ayrıca mayaların antimikrobiyal özellikteki bileşenlerinin ayrıştırılıp araştırılması gerekmektedir. Bu bileşenlerin tek başına veya kombine halde mikroorganizmalara karşı inhibitör etkileri araştırılabilir.



KAYNAKLAR

- Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Aboueleinin, A., Kim, M., & Ibrahim, H. R.** (2007). Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. *Food Control*, 18(2), 173-178.
- Aidoo, K. E., & Nout, M. R.** (2010). Functional yeasts and molds in fermented foods and beverages *Fermented Foods and Beverages of the World* (pp. 127-148): CRC Press.
- Arda, M.** (2000). Temel Mikrobiyoloji. 2. baskı: Medisan Yayınevi, Ankara 80-92.
- Axelsson, L., Rud, I., Naterstad, K., Blom, H., Renckens, B., Boekhorst, J., . . . Siezen, R. J.** (2012). Genome sequence of the naturally plasmid-free *Lactobacillus plantarum* strain NC8 (CCUG 61730). *Journal of bacteriology*, 194(9), 2391-2392.
- Ayres, J. C., & Denisen, E. L.** (1958). Maintaining freshness of berries using selected packaging materials and antifungal agents. *Food Technology*, 12(10), 562-567.
- Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S.** (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of basic microbiology*, 53(8), 645-656.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K.** (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A.** (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), 277-294.
- Barbara, M., Tony, C., & Grahame, W.** (2000). The microbiological safety and quality of food. *Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publishers.*
- Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D.** (1983). *Yeasts: Characteristics and identification*: Cambridge University Press
- Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T., & Venkitanarayanan, K.** (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1), 126-129.
- Bilinski, C. A., & Casey, G. P.** (1989). Developments in sporulation and breeding of brewer's yeast. *Yeast*, 5(6), 429-438.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C.** (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36(6), 527-543. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., . . . Ouwehand, A.** (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87-97.
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate, J.** (2001). *Food additives*: CRC Press

- Branen, J. K., & Davidson, P. M.** (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 63-74. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00172-7
- Cammack, R., Joannou, C., Cui, X.-Y., Martinez, C. T., Maraj, S. R., & Hughes, M. N.** (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1411(2), 475-488.
- Cao, R., Xue, C.-h., & Liu, Q.** (2009). Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), 272-276. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.004
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F.** (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3
- Carasi, P., Díaz, M., Racedo, S. M., De Antoni, G., Urdaci, M. C., & Serradell, M. d. I. A.** (2014). Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed research international*, 2014.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R.** (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284-295. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007
- Cavalero, D. A., & Cooper, D. G.** (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal of biotechnology*, 103(1), 31-41.
- Cetinkaya, F., & Elal Mus, T.** (2012). Determination of microbiological and chemical characteristics of kefir consumed in Bursa. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 217-221.
- Cevikbas, A., Yemni, E., Ezzedenn, F. W., Yardimici, T., Cevikbas, U., & Stohs, S.** (1994). Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research*, 8(2), 78-82.
- Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., & Antony, U.** (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401.
- Chen, B., Wu, Q., & Xu, Y.** (2014). Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 179, 80-84.
- Chen, Y.-j., WANG, C.-j., HOU, W.-q., WANG, X.-s., GALI, B.-g., YANG, S.-q., . . . WU, Y.-g.** (2017). Effects of antibacterial compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* in Koumiss on pathogenic *Escherichia coli* O s and its cell surface characteristics. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(3), 742-748.
- Chifiriuc, M. C., Cioaca, A. B., & Lazar, V.** (2011). In vitro assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe*, 17(6), 433-435. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.020
- Coton, E., Desmots, M.-H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S., . . . Talon, R.** (2010). Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2), 221-229.
- Darmadji, P., & Izumimoto, M.** (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat science*, 38(2), 243-254.

- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E.** (2013). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds *Food Microbiology* (pp. 765-801): American Society of Microbiology.
- Delves-Broughton, J.** (2014). PRESERVATIVES | Permitted Preservatives – Natamycin A2 - Batt, Carl A. In M. L. Tortorello (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 87-91). Oxford: Academic Press.
- Dieuleveux, V., Van Der Pyl, D., Chataud, J., & Gueguen, M.** (1998). Purification and characterization of anti-Listeria compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 800-803.
- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K.** (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat science*, 86(2), 283-288.
- Fai, A. E. C., da Silva, J. B., de Andrade, C. J., Bution, M. L., & Pastore, G. M.** (2014). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 343-350.
- Fancello, F., Petretto, G. L., Zara, S., Sanna, M. L., Addis, R., Maldini, M., . . . Pintore, G.** (2016). Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of Citrus limon var. pompia leaf essential oil. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 579-585.
- Fatichenti, F., Bergere, J. L., Deiana, P., & Farris, G. A.** (1983). Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *Journal of dairy research*, 50(04), 449-457.
- Direct food substances affirmed as generally recognized as safe: egg white lysozyme., (1998).
- García-Montoya, I. A., Cendón, T. S., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q.** (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 226-236.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marin, S.** (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiology*, 26(8), 757-769.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L.** (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63(3), 364-369.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L.** (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of dairy research*, 68(04), 639-652.
- Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B., & Scherer, S.** (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 313-318.
- Goerges, S., Koslowsky, M., Velagic, S., Borst, N., Bockelmann, W., Heller, K. J., & Scherer, S.** (2011). Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese. *International dairy journal*, 21(2), 83-89.
- Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, Z. G., & Webb, C.** (2000). Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry*, 36(1-2), 127-130.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00192-8
- Gould, G. W.** (2012). *New methods of food preservation*: Springer Science & Business Media

- Guzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T., & Greene, A. K.** (2010). Kefir and koumiss: Microbiology and technology *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products* (pp. 143-163): CRC Press Boca Raton, FL.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A.** (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I.** (2013). Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(1), 8-17.
- Holzappel, W. H., & Wood, B. J.** (2014). Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy: John Wiley & Sons
- Iammarino, M., Di Taranto, A., & Muscarella, M.** (2012). Investigation on the presence of sulphites in fresh meat preparations: estimation of an allowable maximum limit. *Meat science*, 90(2), 304-308.
- Irkin, R., & Korukluoglu, M.** (2009). Growth inhibition of pathogenic bacteria and some yeasts by selected essential oils and survival of *L. monocytogenes* and *C. albicans* in apple–carrot juice. *Foodborne pathogens and disease*, 6(3), 387-394.
- Ismail, A. A., Ghaly, M. F., & El-Naggar, A. K.** (2011). Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Current microbiology*, 62(5), 1602-1609.
- Karpuzoglu, E., Holladay, S. D., & Gogal Jr, R. M.** (2013). Parabens: potential impact of low-affinity estrogen receptor binding chemicals on human health. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 16(5), 321-335.
- Kesenkaş, H., Gürsoy, O., & Özbaş, H.** (2017). Chapter 14 - Kefir A2 - Frias, Juana. In C. Martinez-Villaluenga & E. Peñas (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 339-361). Boston: Academic Press.
- Khanna, S., Dash, P. R., & Darbre, P. D.** (2014). Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*, 34(9), 1051-1059.
- Kiers, J., Rombouts, F., & Nout, M.** (2000). In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2), 163-169.
- Kohajdová, Z.** (2017). 4 - Fermented Cereal Products *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 91-117): Elsevier.
- Korhonen, H., & Marnila, P.** (2011). Milk Proteins | Lactoferrin A2 - Fuquay, John W *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 801-806). San Diego: Academic Press.
- Kubo, Y., Rooney, A. P., Tsukakoshi, Y., Nakagawa, R., Hasegawa, H., & Kimura, K.** (2011). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6463-6469.
- Kumar, S., Marwaha, N., Singh, D., & Kumar, V.** (2012). Evaluating the antibacterial activity of plant extracts against bacterial pathogens. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(4).
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T.** (2011). The yeasts: a taxonomic study: Elsevier
- Lai, P., & Roy, J.** (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current medicinal chemistry*, 11(11), 1451-1460.

- Latorre-García, L., del Castillo-Agudo, L., & Polaina, J.** (2007). Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 785-791.
- Lee, H., Churey, J. J., & Worobo, R. W.** (2008). Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1), 240-244.
- Leite, A. M. d. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F.** (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349.
- Lima, M. d. S. F. d., de Souza, K. M. S., Albuquerque, W. W. C., Teixeira, J. A. C., Cavalcanti, M. T. H., & Porto, A. L. F.** (2017). *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. *Microbial Pathogenesis*.
- Lin, C.-W., Chen, H.-L., & Je-Ruei, L.** (1999). Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54(1), 14.
- Luck, H., & Cheeseman, C.** (1978). Mould growth on cheese as influenced by pimaricin or sorbate treatments. *South African journal of dairy technology*.
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., & Yılmaz, S.** (2010). Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicology in vitro*, 24(3), 790-794.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M., & Aymerich, T.** (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 148-158.
- Mohsenzadeh, M.** (2007). Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pak J Biol Sci*, 10(20), 3693-3697.
- Nilson, K., Shahani, K., Vakil, J., & Kilara, A.** (1975). Pimaricin and Mycostatin for Retarding Cottage Cheese Spoilage1. *Journal of dairy science*, 58(5), 668-671.
- Nout, M., & Aidoo, K.** (2002). Asian fungal fermented food. *Industrial Applications*, 10, 23-47.
- Özer, B.** (2014). NATURAL ANTI-MICROBIAL SYSTEMS | Lactoperoxidase and Lactoferrin A2 - Batt, Carl A. In M. L. Tortorello (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 930-935). Oxford: Academic Press.
- Papagianni, M.** (2012). Food fermentation and production of biopreservatives. *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology*, 109.
- Parkouda, C., Nielsen, D. S., Azokpota, P., Ivette Irène Ouoba, L., Amoa-Awua, W. K., Thorsen, L., . . . Diawara, B.** (2009). The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Critical reviews in microbiology*, 35(2), 139-156.
- Periago, P. M., Conesa, R., Delgado, B., Fernández, P. S., & Palop, A.** (2006). *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 17-23.
- Poloni, V., Salvato, L., Pereyra, C., Oliveira, A., Rosa, C., Cavaglieri, L., & Keller, K. M.** (2017). Bakery by-products based feeds borne-*Saccharomyces*

- cerevisiae strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibiotic resistance properties for use in animal production. *Food and Chemical Toxicology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.040>
- Powell, J., Witthuhn, R., Todorov, S., & Dicks, L.** (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International dairy journal*, 17(3), 190-198.
- Pretorius, I. S.** (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.
- Proestos, C., Zoumpoulakis, P., & Sinanoglou, V. J.** (2013). Determination of plant bioactive compounds. Antioxidant capacity and antimicrobial screening. *Focusing on Modern Food Industry*, 2(1), 26-35.
- Rahman, M. S.** (2007). Handbook of food preservation: CRC press
- Rai, M.** (2011). Natural antimicrobials in food safety and quality: CABI
- Ratray, F. P., & O'Connell, M. J.** (2011). Fermented Milks | Kefir A2 - Fuquay, John W *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 518-524). San Diego: Academic Press.
- Rawdkuen, S., Suthiluk, P., Kamhangwong, D., & Benjakul, S.** (2012). Antimicrobial activity of some potential active compounds against food spoilage microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 11(74), 13914-13921.
- Rima, H., & Ismail, F.** (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3, 421.
- Rodrigues, K. L., Caputo, L. R. G., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M.** (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International journal of antimicrobial agents*, 25(5), 404-408.
- Roller, S., & Covill, N.** (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1), 67-77.
- Romano, P., Capece, A., & Jespersen, L.** (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts *Yeasts in food and beverages* (pp. 13-53): Springer.
- Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C.** (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 3-16. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Salminen, S., Wright, A. V., & Ouwehand, A.** (2004). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects Marcel Dekker Inc, New York.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J., & Marquina, D.** (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 434-437.
- Sarkar, S.** (2008). Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal*, 110(3), 283-295.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Xavier Filho, L., & Lima, Á. S.** (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied biochemistry and biotechnology*, 152(2), 316-325.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z.** (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1-6.
- Soboleva, E., Sergachyova, E., Davydenko, S., & Meledina, T.** (2016). Influence of Yeast Strains on Microbiological Stability of Wheat Bread. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of*

Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 10(2), 68-72.

- Stiles, M. E., & Holzapel, W. H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Suh, H.-J., Cho, Y.-H., Chung, M.-S., & Kim, B. H.** (2007). Preliminary data on sulphite intake from the Korean diet. *Journal of food composition and analysis*, 20(3), 212-219.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D.** (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
- Tamang, J. P.** (2010). Diversity of fermented foods *Fermented foods and beverages of the world* (pp. 41-84): CRC Press.
- Tamang, J. P.** (2015). Naturally fermented ethnic soybean foods of India. *Journal of Ethnic Foods*, 2(1), 8-17.
- Tamang, J. P., & Fleet, G. H.** (2009). Yeasts diversity in fermented foods and beverages *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 169-198): Springer.
- Tamang, J. P., & Kailasapathy, K.** (2010). Fermented foods and beverages of the world: CRC Press
- Tang, S., Stasiewicz, M. J., Wiedmann, M., Boor, K. J., & Bergholz, T. M.** (2013). Efficacy of different antimicrobials on inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in laboratory medium and on cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 265-275.
- Taş, T. K., Ekinci, F. Y., & Güzel-Seydim, Z. B.** (2012). Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 126-131.
- Taylor, M.** (2014). Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality: Elsevier
- Ticha, J.** (1975). A new fungicide, pimaricin, and its application in the baking industry. *Mlynsko-Pekarensky Prumysl*, 21(7), 225-228.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P.** (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 5987-6000.
- Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdic, O., Bayram, O., & Yetim, H.** (2011). Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), 30-35.
- Tra, B. C., N'guessan, F., Kouakou, C., Jacques, N., Casaregola, S., & Djè, M.** (2016). Identification of yeasts isolated from raffia wine (*Raphia hookeri*) produced in Côte d'Ivoire and genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains by PCR inter-delta. *World journal of microbiology & biotechnology*, 32(8), 125.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., . . . Krisch, J.** (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 480-486.
- Ulusoy, B. H., Çolak, H., Hampikyan, H., & Erkan, M. E.** (2007). An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. *Turk. Mikrobiyol. Cem. Derg*, 37, 103-107.

- Valle, P. d., García-Armesto, M. R., de Arriaga, D., González-Donquiles, C., Rodríguez-Fernández, P., & Rúa, J.** (2016). Antimicrobial activity of kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. *Food Control*, *61*, 213-220.
- Velez, C., Andrés, C., & LEÓN PELÁEZ, Á. M.** (2014). INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Aspergillus ochraceus* MEDIANTE "PANELA" FERMENTADA CON GRÁNULOS DE KEFIR DE AGUA. *Vitae*, *21*(3), 191-200.
- Verlee, A., Mincke, S., & Stevens, C. V.** (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, *164*, 268-283. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
- Viljoen, B. C.** (2006). Yeast ecological interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi interactions and yeasts as biocontrol agents *Yeasts in food and beverages* (pp. 83-110): Springer.
- Wang, S.-Y., Chen, H.-C., Liu, J.-R., Lin, Y.-C., & Chen, M.-J.** (2008). Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and viili starters. *Journal of dairy science*, *91*(10), 3798-3805.
- Yaakoubi, K., Benkerroum, N., Wiorowski, F., Sanson, F., Haydersah, J., & Chevallier, I.** (2009). Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, *17*(1), 32-45.
- Yuste, J., & Fung, D.** (2003). Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. *Food Microbiology*, *20*(3), 365-370.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyath, Y., & Aslım, B.** (2004). Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Molecular Nutrition & Food Research*, *48*(3), 218-220.
- Zeuthen, P., & Bøgh-Sørensen, L.** (2003). Food preservation techniques: Elsevier p. 5-23.

EKLER

EK A: Maya izolatlarının nokta ekim ve kuyucuk difüzyon yöntemi ile mikroorganizmalar üzerine etkileri

EK B: Varyans analiz çizelgesi



EK A: Maya izolatlarının nokta ekim ve kuyucuk difüzyon yöntemi ile mikroorganizmalar üzerine etkileri



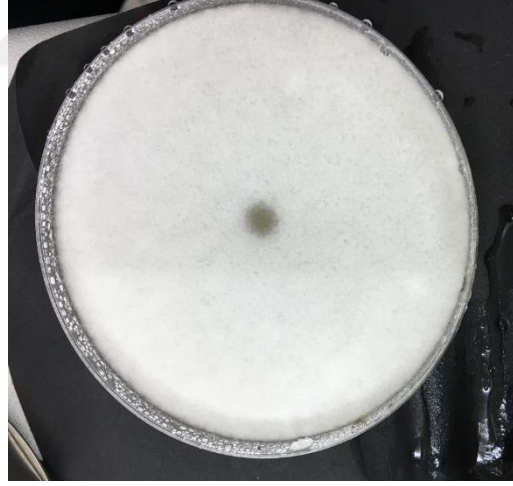
Şekil A.1 : 5.5 no'lu maya izolatının *Aspergillus flavus* üzerine etkisi.



Şekil A.3 : 5.8 no'lu maya izolatının *Aspergillus flavus* üzerine etkisi.



Şekil A.2 : 5.6 no'lu maya izolatının *Aspergillus flavus* üzerine etkisi.



Şekil A.4 : 3.2 no'lu maya izolatının *Aspergillus flavus* üzerine etkisi.



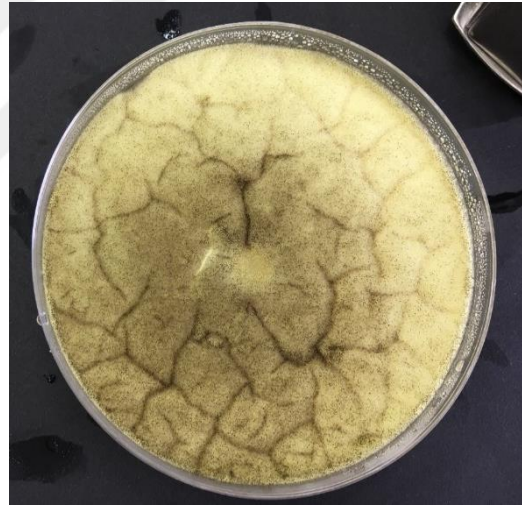
Şekil A.5 : 6.52 no'lu maya izolatının *Aspergillus niger* üzerine etkisi.



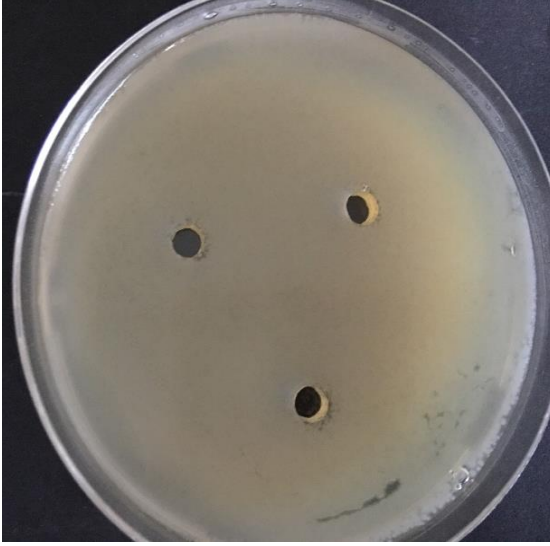
Şekil A.7 : 6.4 no'lu maya izolatının *Aspergillus niger* üzerine etkisi.



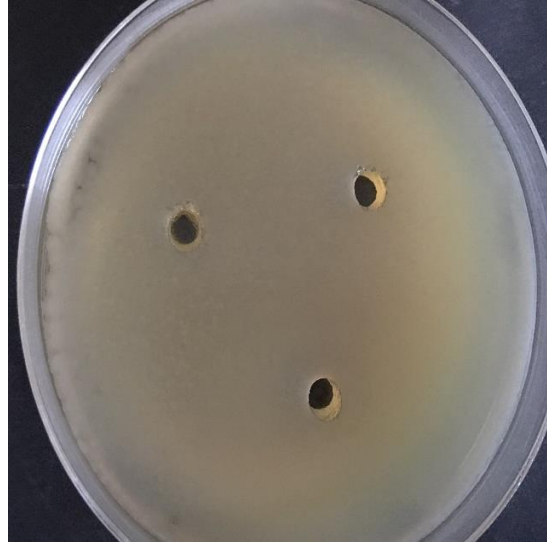
Şekil A.6 : 6.51 no'lu maya izolatının *Aspergillus niger* üzerine etkisi.



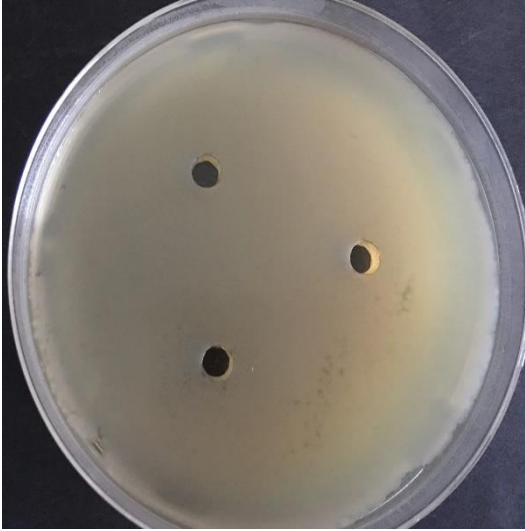
Şekil A.8 : 5.3 no'lu maya izolatının *Aspergillus niger* üzerine etkisi.



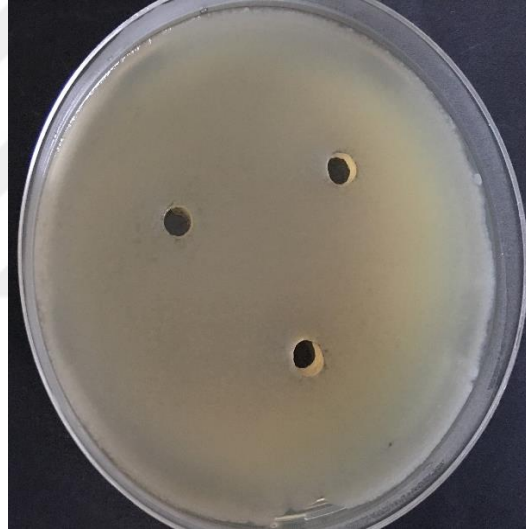
Şekil A.9 : 6.1 no'lu maya izolatının *E. coli* üzerine etkisi.



Şekil A.11 : 6.51 no'lu maya izolatının *E. coli* üzerine etkisi.



Şekil A.10 : 5.4 no'lu maya izolatının *S. aureus* üzerine etkisi.



Şekil A.12 : 3.2 no'lu maya izolatının *S. aureus* üzerine etkisi.

EK B : Varyans analiz çizelgesi

Çizelge B.1 : 0. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,189	10	0,019	71,811	0,000
Hata	0,006	22	0,000		
Toplam	0,195	32			

Çizelge B.2 : 2. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,018	10	0,002	20,060	0,000
Hata	0,002	22	0,000		
Toplam	0,020	32			

Çizelge B.3 : 4. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,122	10	0,012	1,128	0,386
Hata	0,239	22	0,011		
Toplam	0,361	32			

Çizelge B.4 : 6. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,322	10	0,032	19,727	0,000
Hata	0,036	22	0,002		
Toplam	0,358	32			

Çizelge B.5 : 8. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,137	10	0,014	11,730	0,000
Hata	0,026	22	0,001		
Toplam	0,163	32			

Çizelge B.6 : 10. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,078	10	0,008	4,832	0,001
Hata	0,035	22	0,002		
Toplam	0,113	32			

Çizelge B.7 : 12. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,064	10	0,006	5,456	0,000
Hata	0,026	22	0,001		
Toplam	0,090	32			

Çizelge B.8 : 14. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,059	10	0,006	5,314	0,001
Hata	0,024	22	0,001		
Toplam	0,084	32			

Çizelge B.9 : 16. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,060	10	0,006	9,941	0,000
Hata	0,013	22	0,001		
Toplam	0,074	32			

Çizelge B.10 : 18. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,064	10	0,006	10,769	0,000
Hata	0,013	22	0,001		
Toplam	0,077	32			

Çizelge B.11 : 20. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,057	10	0,006	9,826	0,000
Hata	0,013	22	0,001		
Toplam	0,070	32			

Çizelge B.12 : 22. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,052	10	0,005	7,644	
Hata	0,015	22	0,001		
Toplam	0,067	32			

Çizelge B.13 : 24. saatte maya izolatlarının *E. coli* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,051	10	0,005	4,773	0,001
Hata	0,024	22	0,001		
Toplam	0,075	32			

Çizelge B.14 : 0. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,157	10	0,016	75,387	0,000
Hata	0,005	22	0,000		
Toplam	0,162	32			

Çizelge B.15 : 2. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,022	10	0,002	5.144	0,001
Hata	0,010	22	0,000		
Toplam	0,032	32			

Çizelge B.16 : 4. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,032	10	0,003	5,262	0,001
Hata	0,013	22	0,001		
Toplam	0,045	32			

Çizelge B.17 : 6. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,106	10	0,011	6,914	0,000
Hata	0,034	22	0,002		
Toplam	0,140	32			

Çizelge B.18 : 8. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,088	10	0,009	6,691	0,000
Hata	0,029	22	0,001		
Toplam	0,116	32			

Çizelge B.19 : 10. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,108	10	0,011	6,548	0,000
Hata	0,036	22	0,002		
Toplam	0,144	32			

Çizelge B.20 : 12. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,118	10	0,012	6,490	0,000
Hata	0,040	22	0,002		
Toplam	0,157	32			

Çizelge B.21 : 14. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,138	10	0,014	6,316	0,000
Hata	0,048	22	0,002		
Toplam	0,187	32			

Çizelge B.22 : 16. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,162	10	0,016	6,908	0,000
Hata	0,051	22	0,002		
Toplam	0,213	32			

Çizelge B.23 : 18. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,179	10	0,018	7,251	0,000
Hata	0,054	22	0,002		
Toplam	0,233	32			

Çizelge B.24 : 20. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,219	10	0,022	8,010	0,000
Hata	0,060	22	0,003		
Toplam	0,279	32			

Çizelge B.25 : 22. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,231	10	0,023	8,159	0,000
Hata	0,062	22	0,003		
Toplam	0,293	32			

Çizelge B.26 : 24. saatte maya izolatlarının *S. aureus* gelişimine etkisi.

Varyans Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
İşlem	0,260	10	0,026	8,127	0,000
Hata	0,070	22	0,003		
Toplam	0,330	32			



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ceyda SARI
Doğum Tarihi ve Yeri : 1988/Antalya
E-posta : cydsari@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2012, Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

MESLEKİ DENEYİM

- 2010 Uludağ Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi – Laboratuvar stajı
- 2011 Nestle Gıda A.Ş. – Üretim stajı