

Ticari ve Lokal Kefir Danelerinden Elde Edilen Kefirlerin Biyoaktivitelerinin KarşılaştırılmasıSide Selin Su YİRMİBEŞOĞLU¹, Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK^{1*}

ÖZET: Fermente süt ürünlerinden kefir özellikle son yıllarda sağlık üzerindeki etkileri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Geleneksel yöntemle hazırlanan kefirde kullanılan danelerin mikrobiyolojik içerikleri, elde edildikleri bölge ile oldukça ilişkilidir ve üretilen kefirin özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Dolayısıyla kullanılan danelerin biyoaktivitelerinin incelenmesi önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada Antalya, Türkiye bölgesinden lokal bir dane ve ticari dane ile fermente edilen keçi ve inek sütleri kefirlerinin biyoaktivitelerinin karşılaştırmalı analizi yapılmıştır. Bu amaçla, kefir örneklerinin mikrobiyolojik analizleri, antibakteriyel, antioksidan aktivite analizleri, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktar tayinleri yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar lokal dane ile elde edilen kefirlerin antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerinin ticari dane ile üretilenlere oldukça yakın olduğu ve aynı zamanda fenolik madde ve flavonoid açısından tüketicilerin güvenle kullanabilecekleri bir alternatif olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kefir, antimikrobiyal aktivite, antioksidan, toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde

Bioactivity Comparison of Kefirs Obtained from Commercial and Local Kefir Grains

ABSTRACT: For recent years fermented milk products, especially kefir, are highly preferred food product due to their positive and therapeutic effects on health. Microbial composition of the kefir grains directly related with the region they are obtained and affect properties of kefir straightforwardly in traditional fermentation method. Therefore, bioactivity investigation of kefir grains used in fermentation process has great importance. In this study, comparative bioactivity analysis of cow milk and goat milk kefirs fermented with one local grain obtained from Antalya, Turkey and one commercial grain are demonstrated. For this purpose, microbiological analysis, antibacterial and antioxidant activity analysis, total phenolic and total flavonoid compound measurements of kefir samples were done. Our results concluded that, antibacterial and antioxidant activity of kefirs fermented with local grain are almost similar to those fermented with commercial grain and local grain kefirs can be a valuable and safe alternative for consumers due to its phenolic compound and flavonoid content.

Keywords: Kefir, antimicrobial activity, phenolic content, total flavonoid content

¹ Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU (Orcid ID: 0000-0003- 4196-7149), Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK (Orcid ID: 0000-0003-1690-9879), Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 07070 Antalya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK, e-mail: burcutefon@akdeniz.edu.tr

GİRİŞ

Günümüzde sütün besin içeriğini korumak ve depolama süresini arttırmak için tüm dünyada sıklıkla tercih edilen fermantasyon ürünlerinden biri, yüzyıllar önce Kafkaslar, Tibet ve Moğolistan'dan dünyaya yayıldığı düşünülen kefirdir (Irigoyen ve ark., 2005). Kefir, çeşitli bakteri ve maya türlerinin simbiyotik birleşiminden oluşan dinamik yapısı olan bir içecektir (Otles ve Cagindi, 2003; Rodrigues ve ark., 2005; Bengoa ve ark., 2019). Bu fermente ürünler aynı zamanda terapötik etkileri nedeniyle tüketicilerin diyetlerinde sıklıkla yer bulmuştur (Farnwoth, 2006; Fiorda ve ark., 2017). Geleneksel yöntemlerle evlerde yapılan kefirlerde büyükbaş hayvan sütlerinden yararlanılmaktadır (Altay ve ark., 2013). Fakat insanların beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak keçi, koyun gibi hayvansal sütler ya da hindistan cevizi, pirinç ve soya sütü gibi bitkisel kaynaklar da kefir üretiminde kullanılmaktadır (Otles ve Cagindi, 2003). Fermantasyon için kullanılan kaynak ve kullanılan başlangıç kültürünün mikrobiyal bileşimi, fermente ürünün içeriğini doğrudan etkilediği için elde edilen kefirlerin tat ve terapötik etkileri kullanılan kaynağa ve kefir danesinin mikrobiyal kompozisyonuna bağlı olarak farklılıklar göstermektedir (Dertli ve Çon, 2017). Endüstriyel olarak üretilen kefirlerde kullanılan bakteri ve mayaların birleşimi, geleneksel yöntemde kullanılan daneden farklı olduğundan üretilen fermente ürünlerin içerikleri farklılık göstermektedir (Davras ve ark., 2018). Kefir oluşurken ortaya çıkan süt kaynaklı antioksidan peptitlerin, radikallerin temizlenmesinde veya bu radikallerin oluşumunun önlenmesinde büyük etkisi olduğu gösterilmiştir (Mohanty ve ark., 2016). Tüketiciler diyetlerine eklemek için meyve, sebze gibi doğal antioksidanları, toksik, karsinojenik ve güvensiz yapıdaki yapay üretilmiş antioksidanlara tercih etmektedirler (Bartosz, 2013; Landete, 2013). Bu noktada kefir, yüksek antioksidan içeriği ile de tüketiciler tarafından sıklıkla tercih edilen fermente bir süt ürünü olarak yüksek tüketime sahiptir (Yılmaz-Ersan, 2018).

Bu çalışmada, inek ve keçi sütünün bir ticari ve bir lokal kefir danesi kullanılarak fermente edilmesi ile üretilen kefirlerin antibakteriyel ve antioksidan özellikleri karşılaştırılmış, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları tayin edilerek mikrobiyolojik özellikleri değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Başlangıç Kefir Kültürleri ve Sütler

Lokal 1 (L1) kefir danesi, Antalya'da (Türkiye) kendi tüketimleri için sürekli kefir üreten bir aileden alınmıştır. Ticari tanımlanmış kefir olarak Danem (D) (Danem Süt ve Süt Ürünleri, Isparta, Türkiye) kullanılmıştır. İnek sütü olarak tam yağlı UHT inek sütü (Migros, İstanbul, Türkiye) ve tam yağlı UHT keçi sütü yerel marketten (Baltalı Gıda ve Hayvancılık, İzmir, Türkiye) alınmıştır.

Kefirlerin Hazırlanması

Kefir daneleri, 100 ml inek sütüne aşılanarak aktifleştirilmiştir. Aşılanan örnekler 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş, steril plastik süzgeçten geçirilerek daneler toplanmış ve ürünlerin pH ölçümü yapılmıştır. Toplanan kefir daneleri dH₂O ile iki kere yıkandıktan sonra tartılmış, %1 kefir danesi ile inek ve keçi sütü aşılama yapılmış ve örneklerin pH'ları 4.6 ya ulaşınca kadar oda sıcaklığında fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon sonunda kefir daneleri toplanmış, dH₂O ile iki kere yıkayıp süt içinde +4°C'de saklanmıştır.

Kefir Örneklerinin Mikrobiyolojik Profilleri

L1 ve D danelerinin mikrobiyolojik profilleri belirlenmiştir. Maya sayımı için Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) (Merck, Almanya) (Witthuhn ve ark., 2005), toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı için Plate Count Agar (PCA) (Merck, Almanya) (Mainville ve ark., 2001), laktobasil sayımı için De Man Rogosa Sharp Agar (MRS), laktokok sayımı için M17 Agar (Irigoyen ve

ark., 2005) kullanılmıştır. Lökonostok sayımı için Mayeux, Sandline and Elliker (MSE) Agar kullanılmıştır (Fontán ve ark., 2006; Aşçı Arslan, A., 2015) Koliform sayımı için Violet Red Blue (VRB) Agar kullanılmıştır (Anonymous, 2006). İnkübasyonu takiben koloni sayımları yapılmış, kob ml⁻¹ olacak şekilde Eşitlik 1.'e göre hesaplanmış ve logaritması alınarak log kob ml⁻¹ birimine dönüştürülmüştür:

$$N=C/[V(n_1+0.1X n_2)Xd] \quad (1)$$

Eşitlik 1.'e göre N, gıda örneğinin 1 g ya da 1 ml'sinde bulunan mikroorganizma sayısı; C sayımı yapılan tüm petri kutularındaki toplam koloni sayısı; V sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (ml); n₁ ilk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi; n₂ ikinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi; d, sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır (Halkman, 2000).

Antibakteriyel Testler ve Kullanılan Bakteri Suşları

Kefir örneklerinin antibakteriyel test için hazırlanmasında Kim ve ark. (2016)'nın çalışmasındaki protokol kullanılmıştır. Süzülen kefir örnekleri 3200 g'de 10 dak santrifüjlenmiş, süpernatantlar toplanarak 0.45 µm por çaplı filtrelerden geçirilmiştir. Antibakteriyel etkilerin belirlenmesi için disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Steril disklere (Whatman No. 3.6 mm çaplı) 50 µl kefir örneklerinden, inek ve keçi sütlerinden, ampisilin (25 µg ml⁻¹) (Sigma Aldrich), ve kanamisin (50 µg ml⁻¹) (Sigma Aldrich) emdirilmiştir.

Antibakteriyel testlerde kullanılacak olan bakteri suşları *Bacillus cereus* (DSM 22648), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus. epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 35218) ve Akdeniz Üniversitesi Klinik Mikrobiyoloji Bölümü'nden alınan hasta izolatu *Proteus mirabilis* ve *Listeria monocytogenes* katı besi yerine (Merck KGaA, Almanya) %0.85'lik NaCl (Sigma Aldrich, ABD) solüsyonu içerisinde 0.5 McFarland'a ayarlanmıştır. Bakteri solüsyonlarından 200 µl besi yerine yayılıp üzerine diskler yerleştirilmiş, 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Tüm antibakteriyel testler üç tekrar olarak yapılmıştır.

Antioksidan Aktivitesi Tayini

Antioksidan aktivitesi için, 2.2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalinin inhibisyonuna dayanan, Von Gadow ve ark. (1997) tarafından kullanılan kolorimetrik yöntem bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Antioksidan aktivitesi ölçümü için 100'er µl sterilize edilmiş örnekler, 4'er ml metanol içerisinde hazırlanmış 6x10⁻⁵ M DPPH (Sigma Aldrich, ABD) çözeltisi ile karıştırılıp, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dak bekletilmiştir. Çözeltilerin absorbansı suya karşı 516 nm dalga boyunda okunmuştur. Örneklerin antioksidan aktiviteleri askorbik asit eşleniği olarak hesaplanmıştır. İnhibisyon hesaplamalarında Eşitlik 2 kullanılmıştır:

$$\text{İnhibisyon \%} = [(Absorbans_{\text{Kontrol}} - Absorbans_{\text{Örnek}}) / Absorbans_{\text{Kontrol}}] * 100 \quad (2)$$

Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini için Skerget ve ark. (2005) çalışmasındaki yöntem izlenmiştir. Folin-Ciocalteu çözeltisi Singleton ve Rossi (1965)'nin çalışmasındaki protokole göre hazırlanmıştır. Filtrelenmiş örneklerden 500 µl alınıp, üzerine dH₂O ile 10 kat seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 2.5 ml konulup 2 dak beklenmiştir. Bunu takiben karışıma 2 ml %7.5'lik Na₂CO₃ (Merck, Almanya) çözeltisi eklenmiş, 30 s vorteks ile karıştırıldıktan sonra 50°C ye ayarlanmış su banyosunda 5 dak bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örneklerin spektrofotometre yardımıyla

760 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit (Sigma Aldrich, ABD) eşdeğerine (GAE) dönüştürülmüştür.

Toplam Flavonoid Madde Tayini

Kefir örneklerinin toplam flavonoid madde tayini için Chang ve ark. (2006) çalışmasındaki alüminyum klorür yöntemi kullanılmıştır. Bunun için filtrelenmiş 500 µl örneğin üzerine 2.5 ml dH₂O ve 150 µl %5'lik NaNO₂ (Merck, Almanya) çözeltisi eklenmiş ve 30 s vortekslenmiştir. Beş dakika sonra sırasıyla 300 µl %10'luk AlCl₃ (Merck, Almanya) çözeltisi, daha sonra 1 ml 1M NaOH (Sigma Aldrich, ABD) çözeltisi ve 550 µl dH₂O eklenmiştir. Karışım 5 dak bekletildikten sonra, 510 nm dalga boyunda spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri, kuersetin eşdeğerine (KE) dönüştürülmüştür.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiki analizi IBM SPSS 22 ile yapılmış ve verilerin karşılaştırmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır. p<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kefir Örneklerinin Mikrobiyolojik Profilleri

L1 danesi ile üretilen kefirlerden yapılan mikrobiyolojik profil çalışmalarında, toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı 2.1×10^6 kob ml⁻¹ (6.32 log kob ml⁻¹), toplam maya sayısı 9×10^3 kob ml⁻¹ (3.95 log kob ml⁻¹), laktokok sayısı 7.1×10^8 kob ml⁻¹ (8.85 log kob ml⁻¹), laktobasil sayısı 2.2×10^8 kob ml⁻¹ (8.34 log kob ml⁻¹) ve lökonostok sayısı 6.9×10^6 kob ml⁻¹ (6.84 log kob ml⁻¹) olarak bulunmuştur. Koliform bakteri üremesi gözlenmemiştir. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre kefirlerde toplam spesifik mikroorganizma sayısı en az 10⁷ kob ml⁻¹, maya sayısı en az 10⁴ kob ml⁻¹ düzeyinde olmalıdır (Anonim, 2009). Çalışmamızda L1 danesi ile üretilen kefir örneklerinin bu tebliğe uygun olduğu görülmektedir.

D danesi ile üretilen kefirlerden yapılan mikrobiyolojik profil çalışmalarında ise, toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı 1.1×10^9 kob ml⁻¹ (9.04 log kob ml⁻¹), toplam maya sayısı 1.8×10^2 kob ml⁻¹ (2.25 log kob ml⁻¹), laktokok sayısı 8.4×10^8 kob ml⁻¹ (8.92 log kob ml⁻¹), laktobasil sayısı 1.1×10^8 kob ml⁻¹ (8.04 log kob ml⁻¹) ve lökonostok sayısı 5.7×10^6 kob ml⁻¹ (6.75 log kob ml⁻¹) olarak bulunmuştur. Koliform bakteri üremesi gözlenmemiştir. Benzer şekilde, Taş ve ark. (2014)'nın çalışmasına göre Danem daneleri kullanılarak inek sütü ile yapılan kefirin toplam mikroorganizma sayısı 9.08 ± 0.03 log kob ml⁻¹, *Lactobacillus* spp. sayısı 8.99 ± 0.08 log kob ml⁻¹, *Lactococcus* spp. sayısı 9.04 ± 0.03 log kob ml⁻¹ ve toplam maya sayısı 2.00 ± 0.06 log kob ml⁻¹ olarak bulunmuştur.

L1 danesi ile D danesinden elde edilen örneklerin mikrobiyolojik analiz sonuçları karşılaştırıldığında toplam aerobik mezofilik bakteri ve laktokok sayısının D kefir örneklerinde daha yüksek; toplam maya, laktobasil ve lökonostok sayılarında ise L1 kefir örneklerinde daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar da bize danelerin kompozisyonlarının farklı olduğunu göstermektedir.

Antibakteriyel Etki

Antibakteriyel etkinin incelenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Bu teste göre antibakteriyel etkisi araştırılan maddeler diske emdirilerek diskin etrafında büyümenin inhibisyonuna dayalı oluşan temiz bölgenin çapı ölçülerek, test edilen örneğin antibakteriyel etkisi araştırılır. İnhibisyona uğrayan bu bölgenin çapı (inhibisyon zon çapı) ile antibakteriyel etki arasında doğrusal bir korelasyon bulunmaktadır. Çalışmamızda, kullanılan süte bakılmaksızın L1 danesi ile elde edilen kefirlerin antibakteriyel profilleri, D kullanılarak elde edilen kefirlerin antibakteriyel profillerinden

farklıdır. Bunun muhtemel nedeni ise D danesinin mikrobiyal kompozisyonunun, L1'inkinden daha farklı olmasıdır. Antibakteriyel özelliklerdeki farklılıklar yalnızca danelerin floralarındaki farklılıktan kaynaklanmamaktadır. Fermantasyonda kullanılan sütlerin kimyasal yapısı da oluşacak fermente ürünün özelliklerinin belirlenmesinde kefir danesinin kompozisyonu kadar önem teşkil etmektedir (Garrote ve ark., 1998). Ayrıca kontrol olarak kullanılan β -laktam antibiyotiklerinden Ampisilin ve aminoglikozid grubu antibiyotiklerden Kanamisin ile üretilen tüm kefirlerin antibiyotik etkileri karşılaştırıldığında, üretilen kefirlerin antibakteriyel etkisinin düşük olduğu görülmektedir. Bunun temel nedenleri, kullanılan antibiyotiklerin araştırma ölçeğinde saf olması ve üretilen kefirlerde antibakteriyel ajanların yanı sıra birincil ve ikincil metabolitler, bakteriyosinler gibi bir çok molekül bulunması olarak sayılabilir (Ahmed ve ark., 2013).

İnek sütü kullanılarak yapılan kefirlerin antibakteriyel etkisi

İnek sütü kullanılarak elde edilen tüm kefir örnekleri karşılaştırıldığında, her iki dane için de en büyük inhibisyon zon çapları *S. epidermidis*'te görülmüştür (Çizelge 1). L1 danesi ile yapılan kefirlerde en büyük inhibisyon zonları *S. epidermidis*'ten sonra *K. pneumonia*'da görülmektedir ve bu bakterinin her iki daneden yapılan kefirlerle gösterdiği duyarlılığın birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada L1 kefirinden elde edilen sonuçlar D kefirinden elde edilen sonuçlarla oldukça benzerdir.

Çizelge 1. İnek sütü kullanılarak elde edilen kefir örneklerinin antibakteriyel etki testlerinde kullanılan test organizmaları üzerinde oluşturduğu zon çapları (mm)

	Zon çapı (mm)*							
	SA	PA	SE	KP	BC	EC	LM	PM
Ampisilin	23.4±2.1	17.6±2	29±2.8	22.3±1	17.9±1.2	8.7±0.5	21.1±1.2	20.3±0.8
Kanamisin	22.9±2.8	13.8±1.6	22.8±2.4	12.5±1.6	12.4±1.5	24.5±2.2	22.4±2.1	6±0
İnek Sütü	6±0	6±0	11.6±1.9	6.8±0.7	6±0	6±0	6±0	6±0
Kefir D	9±1.4	6±0	16.7±0.6	14±1.7	13±1.4	6±0	7±0	6±0
Kefir L1	8±1.4	6±0	15.3±1.1	14±1	12±0	6±0	7±0	6±0

*D: Ticari kefir danesi Danem kullanılarak inek sütünden elde edilmiş kefir, L1: Lokal 1 kefir danesi kullanılarak inek sütünden elde edilmiş kefir, SA: *S. aureus*, PA: *P. aeruginosa*, SE: *S. epidermidis*, KP: *K. pneumonia*, BC: *B. cereus*, EC: *E. coli*, LM: *L. monocytogenes*, PM: *P. mirabilis*

Keçi sütü kullanılarak yapılan kefirin antibakteriyel etkisi

Keçi sütü kefirlerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *P. mirabilis* bakterilerinin her iki kefir örneğine de dirençli olduğu, en duyarlı bakterinin ise hem D kefirini hem de L1 kefirini için *S. epidermidis* olduğu görülmüştür (Çizelge 2).

Literatürde inek sütü kullanılarak yapılan kefirlerin antibakteriyel aktivitelerini farklı bakteri türleri üzerinde test eden birçok çalışma bulunurken, keçi sütünden yapılan kefirin antibakteriyel aktivitesi Said ve ark. (2019) tarafından *E. coli* ATCC 8739 ve *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028 bakterileri üzerinde test edilmiştir. Bu çalışmada keçi sütünden elde edilen kefirin farklı kısımlarının (kefir peyniri, kefir altı suyu ve kefir danesi) bu iki patojen üzerinde etkisi araştırılmış ve en düşük inhibisyon zonları kefir danesinde görülmüştür. Antibakteriyel aktivite açısından bakıldığında, hem inek hem de keçi sütünden elde edilen kefirlerin antibakteriyel etkileri beklendiği üzere sütlere oranla daha yüksektir. Buna ek olarak, sonuçlarımız kefirin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisi olduğunu gösteren çalışmalarını desteklemektedir (Chifiriuc, 2011).

Çizelge 2. Keçi sütü kullanılarak elde edilen kefir örneklerinin antibakteriyel etki testlerinde kullanılan test organizmaları üzerinde oluşturduğu zon çapları (mm)

	Zon çapı (mm)*							
	SA	PA	SE	KP	BC	EC	LM	PM
Ampisilin	23.4±2.1	17.6±2	29±2.8	22.3±1	17.9±1.2	8.7±0.5	21.1±1.2	20.3±0.8
Kanamisin	22.9±2.8	13.8±1.6	22.8±2.4	12.5±1.6	12.4±1.5	24.5±2.2	22.4±2.1	6±0
Keçi Sütü	6±0	6±0	9.3±0.8	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0
Kefir D	6±0	6±0	15±0	11.3±2.3	12±2	7.5±0.7	7±0	6±0
Kefir L1	6±0	6±0	16±2	13.3±1.5	8.3±1.5	9.5±0.7	7±0	6±0

*D: Ticari kefir danesi Danem kullanılarak keçi sütünden elde edilmiş kefir, L1: Lokal 1 kefir danesi kullanılarak keçi sütünden elde edilmiş kefir, SA: *S. aureus*, PA: *P. aeruginosa*, SE: *S. epidermidis*, KP: *K. pneumonia*, BC: *B. cereus*, EC: *E. coli*, LM: *L. monocytogenes*, PM: *P. mirabilis*

Antioksidan Aktivite

Çalışmamızda üretilen kefirlerin antioksidan özellikleri Çizelge 3'te özetlenmiştir. İnek sütüne göre, L1 danesi ile fermantasyonundan elde edilen kefir %49.63 inhibisyon ve D danesi ile fermantasyonundan elde edilen kefir %52.44 inhibisyon göstermiştir. Keçi sütüne göre kefirlerin inhibisyon yüzdelerine bakıldığında keçi sütünün L1 danesi ile fermantasyonundan elde edilen kefir %33.58 ve keçi sütünün D danesi ile fermantasyonundan elde edilen kefir %38.09 inhibisyon göstermiştir. İnek sütünden farklı olarak keçi sütü ürünlerinde, L1 ve D daneleri arasında antioksidan testleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0.05$).

Bu çalışmada inek sütünden elde edilen kefirlerin antioksidan aktivitelerinin, keçi sütünden elde edilen kefiirlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun muhtemel nedeni, fermantasyon süresince kefir danelerinin ortaya çıkardığı süt peptitlerinin miktarının, süt proteinlerinin proteolizinin ve organik asitlerin oluşumunun, inek sütünün protein yapısı ve miktarının keçi sütünden daha farklı olmasıdır (Yılmaz-Ersan, 2016). Her iki süt ile yapılan fermantasyonlarda danelerin genel profili benzer olsa da, L1 danesi ile fermente edilen keçi sütünün antioksidan aktivitesi tüm örnekler arasında en düşük, D danesi ile fermente edilen inek sütünün antioksidan aktivitesi tüm örnekler arasında en yüksektir.

Çizelge 3. Üretilen kefirlerin inhibisyon yüzdeleri

	İnek sütü kefiri	Keçi sütü kefiri
Danem	% 52.44±0.50	%38.09±0.44
L1	% 49.63±1.24	%33.58±0.34

Toplam Fenolik Madde

Keçi ve inek sütünden farklı daneler kullanılarak fermente edilen kefir örneklerinin $\mu\text{g ml}^{-1}$ GAE cinsinden toplam fenolik madde miktarı sonuçlarına göre kullanılan daneden bağımsız olarak inek sütünden elde edilen kefirlerdeki fenolik madde miktarı, keçi sütünden elde edilen kefiirlere oranla daha yüksektir (Çizelge 4). İnek sütü kullanılarak elde edilen kefirlerden L1 danesi kullanılanların toplam fenolik madde miktarı $516.61 \mu\text{g ml}^{-1}$ GAE ve D danesi kullanılanların toplam fenolik madde miktarı $511.23 \mu\text{g ml}^{-1}$ GAE'dir. Toplam fenolik madde içeriği açısından inek sütü fermantasyonunda kullanılan danelerin arasında belirgin bir fark olmamasına karşın, en yüksek sonuç veren örneklerin L1 danesi ile fermente edilmiş örnekler olduğu görülmektedir. Buna karşılık, keçi sütünden elde edilen kefirlerden L1 danesi kullanılanların toplam fenolik madde miktarı $487.46 \mu\text{g ml}^{-1}$ GAE ve D danesi kullanılanların toplam fenolik madde miktarı $476.46 \mu\text{g ml}^{-1}$ GAE'dir. İnek sütü fermantasyonunda olduğu gibi keçi sütünde de en etkili dane L1 danesi olarak görülmektedir. Keçi ve inek sütünden elde

edilen kefir örnekleri göz önünde bulundurulduğunda, L1 daneleri ile yapılan kefirlerin toplam fenolik madde miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), D daneleri ile yapılan kefirlerin toplam fenolik madde miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Çizelge 4. Üretilen kefirlerin toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g ml}^{-1}$ GAE)

	İnek sütü kefiri	Keçi sütü kefiri
Danem	511.23±4.14	476.46± 3.03
L1	516.61±34.50	487.46±1.15

Toplam Flavonoid Madde

Bu çalışmada, toplam flavonoid madde miktarının keçi sütünden elde edilen kefirlerde inek sütünden elde edilen kefirlerle göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 5). Keçi sütünden elde edilen kefirlerdeki toplam flavonoid miktarlarına bakıldığında, L1 kefirlerinde 190.33 ve D kefirlerinde 3239.67 $\mu\text{g ml}^{-1}$ KE toplam flavonoid madde bulunduğu hesaplanmıştır. Bunun muhtemel nedeni keçi sütünün yapısındaki yağ oranının depolanan flavonoid madde miktarını doğrudan etkilemesi ve keçi sütünün kompozisyonunun inek sütünden farklı olması ile açıklanabilir. Antioksidan aktivite sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, toplam flavonoid madde miktarının danenin florasından ziyade kullanılan sütün içeriğinden doğrudan etkilendiği sonucu çıkarılabilir.

İnek sütünden L1 ve D daneleri ile elde edilen kefirlerin toplam flavonoid miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Keçi sütünden yapılan D kefirinin toplam flavonoid miktarı, L1 danesi ile elde edilen kefirdeki toplam flavonoid miktarı ile karşılaştırıldığında, bu iki örnek arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir ($p<0.05$). Ayrıca, total flavonoid miktarı açısından keçi sütünden yapılan D kefirinin, diğer tüm kefir örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği açıktır ($p<0.05$).

Çizelge 5. Üretilen kefirlerin total flavonoid miktarları ($\mu\text{g ml}^{-1}$ KE)

	İnek sütü kefiri	Keçi sütü kefiri
Danem	167.67±39.86	3239.67±59.00
L1	158.33±30.49	190.33±31.92

SONUÇ

Kefirin antibakteriyel ve antioksidan aktivite gibi özelliklerinin belirlenmesinde, kullanılan sütün kimyasal özellikleri ve fermantasyonda kullanılan başlangıç kültürünün içeriği temel belirleyiciler olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada farklı kefir daneleriyle (D ve L1) aşılanan keçi ve inek sütlerinden elde edilen kefirlerin antibakteriyel ve antioksidan özellikleri, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları karşılaştırılmıştır. Antibakteriyel testler için elde edilen kefir örnekleri ve kontroller *B. cereus*, *K. pneumonia*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, hasta izolatu *P. mirabilis* ve hasta izolatu *L. monocytogenes* ile test edilmiştir. Yaptığımız çalışmada, inek sütünden elde edilen kefirlerin *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *P. mirabilis*'e karşı etki göstermediği, en çok etkiyi ise sırasıyla *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* hücrelerine karşı gösterdiği belirlenmiştir. Keçi sütünün fermantasyonu ile elde edilen kefir örneklerinde ise *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *P. mirabilis* hücrelerinin etrafında zon görülmezken, en büyük zon çapları sırasıyla *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *E. coli* ve *L. monocytogenes* hücrelerinin etrafında görülmüştür. Elde edilen sonuçlar *P. aeruginosa* haricinde literatür ile uyumludur. Bu açıdan bakıldığında sonuçlarımız; fermente süt ürünlerinin potansiyel yeni antibakteriyel ajanlar içerebileceğini desteklemekle beraber, bu potansiyel yeni antibakteriyel ajanların tanımlanması,

araştırılması ve klinik uygulamalarda kullanılabilmesi amacıyla saflaştırılması konularının önü açık alanlar olduğunu işaret etmektedir.

Bunun yanında, bitkilerle özdeşleştirilen flavonoidlerin, otlama yoluyla hayvanların sütlerinin çeşitli fraksiyonlarında depolanabildiğini gösteren çalışmaların ışığında, fermente süt ürünlerinin toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı açısından insanların diyetlerini zenginleştirecek, antioksidan aktivitesi yüksek alternatifler olduğu gösterilmiştir. Özellikle kullanılan sütün ve başlangıç kültürünün içeriğine bağlı olarak, elde edilen fermente ürünün antioksidan özellikleri değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, bu özelliklerin ileriki çalışmalarda daha detaylı araştırılması önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü hocalarından Prof. Dr. Meral Dilara Ögünç'e çalışmalarımıza yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. 2013. Kefir and health: a contemporary perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53 (5), 422-434.
- Altay F, Karbancıoğlu-Güler F, Daskaya-Dikmen C, Heperkan D, 2013. A Review on Traditional Turkish Fermented Non-Alcoholic Beverages: Microbiota, Fermentation Process and Quality Characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167 (1), 44-56.
- Anonim, 2009. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği. Ankara, Türkiye. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/02/20090216-8.htm> (Erişim tarihi: 25.07.2019)
- Anonymous, 2006. International Organization for Standardization, 4832: 2006 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Coliforms—Colony-Count Technique. Geneva. <https://www.iso.org/standard/38282.html> (Erişim tarihi: 20.06.2019)
- Aşçı Arslan A, 2015. Üretim Parametrelerinin Kefirin Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi ile Üretilen Kefirlerin Antimikrobiyal Peptid Profilinin Belirlenmesi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış)
- Bartosz G, 2013. Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties. CRC press, pp.1-17, Boca Raton, Florida, USA.
- Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, Abraham AG, 2019. Kefir Microorganisms: Their Role in Grain Assembly and Health Properties of Fermented Milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126 (3), 686-700.
- Chang Q, Zuo Z, Chow MS, Ho WK, 2006. Effect of Storage Temperature on Phenolics Stability in Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) Fruits and A Hawthorn drink. *Food Chemistry*, 98 (3), 426-430
- Chifiriuc MC, Cioaca AB, Lazar V, 2011. In Vitro Assay of the Antimicrobial Activity of Kefir Against Bacterial and Fungal Strains. *Anaerobe*, 17(6), 433-435.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA, USA
- Davras F, Guzel-Seydim ZB, Tas TK, 2018. Immunological Effects of Kefir Produced from Kefir Grains Versus Starter Cultures When Fed to Mice. *Functional Foods in Health and Disease*, 8 (8), 367-378.
- Dertli E, Çon AH, 2017. Microbial Diversity of Traditional Kefir Grains and Their Role on Kefir Aroma. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 85, 151-157.
- Farnworth ER, 2006. Kefir—A Complex Probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, 2 (1), 1-17.
- Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK., Pagnoncelli MGB, de Souza Vandenberghe LP, Soccol CR, 2017. Microbiological, Biochemical, and Functional Aspects of Sugary Kefir Fermentation—A Review. *Food Microbiology*, 66, 86-95.

- Fontán MCG, Martínez S, Franco I, Carballo J, 2006. Microbiological and Chemical Changes During the Manufacture of Kefir Made From Cows' Milk, Using A Commercial Starter Culture. *International Dairy Journal*, 16 (7), 762-767.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL, 1998. Characteristics of Kefir Prepared with Different Grain [Ratio] Milk Ratios. *Journal of Dairy Research*, 65 (1), 149-154.
- Halkman KA, 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, s. 522, Ankara, Türkiye
- Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibanez FC, 2005. Microbiological, Physicochemical, and Sensory Characteristics of Kefir During Storage. *Food Chemistry*, 90(4), 613-620.
- Kim DH, Jeong D, Kim H, Kang IB, Chon JW, Song KY, Seo KH, 2016. Antimicrobial Activity of Kefir Against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36 (6), 787.
- Landete JM, 2013. Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (7), 706-721.
- Mainville I, Montpetit D, Durand N, Farnworth ER, 2001. Deactivating the Bacteria and Yeast in Kefir Using Heat Treatment, Irradiation and High Pressure. *International Dairy Journal*, 11 (1-2), 45-49.
- Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS, 2016. Milk Derived Bioactive Peptides and Their Impact on Human Health—A Review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23 (5), 577-583.
- Otles S, Cagindi O, 2003. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2 (2), 54-59.
- Rodrigues KL, Caputo LRG, Carvalho JCT, Evangelista J, Schneedorf JM, 2005. Antimicrobial and Healing Activity of Kefir and Kefiran Extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25 (5), 404-408.
- Said N, Fahrodi DU, Malaka R, Maruddin F, 2019. Assessment of the Antibacterial Activity of Goat Milk Kefir on *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Salmonella enteric* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028 Using A Well Diffusion Method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 247, No. 1, p. 012051). IOP Publishing.-
- Singleton VL, Rossi JA , 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144-158.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič, M, Knez Ž, 2005. Phenols, Proanthocyanidins, Flavones and Flavonols in Some Plant Materials and Their Antioxidant Activities. *Food Chemistry*, 89 (2), 191-198.
- Taş TK, İlay E, Öker A, 2014. Determination of Some Quality Criteria of the Kefir Produced with Molasses and Plum. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2 (2), 86-91.
- Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF, 1997. Comparison of the Antioxidant Activity of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) with Green, Oolong and Black Tea. *Food Chemistry*, 60 (1), 73-77.
- Witthuhn RC, Schoeman T, Cilliers A, Britz TJ, 2005. Impact of Preservation and Different Packaging Conditions on the Microbial Community and Activity of Kefir Grains. *Food Microbiology*, 22 (4), 337-344.
- Yilmaz-Ersan L, Ozcan T, Akpınar-Bayizit A, Sahin S, 2016. The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7 (1), 22.
- Yilmaz-Ersan L, Ozcan T, Akpınar-Bayizit A, Sahin, S, 2018. Comparison of Antioxidant Capacity of Cow and Ewe Milk Kefirs. *Journal of Dairy Science*, 101 (5), 3788-3798.