

Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri ¹

Zehra Nur Yüksekdağ ² , Yavuz Beyatlı ³

Kefirin Tanımı ve Tarihçesi

Kefir tanelerinin süte ilave edilmesiyle elde edilen kefir, asidik ve alkolik fermentasyonların bir arada olduğu ve geçmişi olan kültüre edilmiş bir süt ürünüdür (1, 2, 3).

Araştırmacılar, kefirin anavatanının Kafkas Dağları olduğunu bildirmişlerdir Kefirin Kafkasya 'da Elburus Dağları eteklerinde yapıldığı ve yapımının gizli tutulduğu; Rusya' da yayınlanan "Kefyr" kitabının 1984 yılında Moritz Schulz tarafından Almanca' ya çevrilmesi ile Avrupa' da tanındığı açıklanmıştır (3-9).

Wiese, kefir kelimesinin Türkçe "keyif veren, sarhoş eden, coşturan, mest eden", "kef" sözcüğünden türediğini bildirmiştir. Klupsch ise, bu kelimenin Kafkasya orijinli "en iyi yapıldı" anlamına gelen "keyf" sözcüğünden türediğini bildirmiştir (10).

Kefirin önceleri Güneybatı Asya' da Türkler tarafından yapıldığı, alkol ve asit fermentasyonlarıyla meydana gelen hafif alkollü, ekşi ve köpüklü bir süt içkisi olduğu belirtilmektedir. Ayrıca Kafkasya' da "Kyppe" adı verilen, yağlı veya yağsız sütlerden (inek, koyun, keçi, kısırak), peynir altı sularından yapıldığından söz edilmektedir (11).

Kefirin bileşiminde %0,5-1,5 etil alkol, yaklaşık %0,7 kadar süt asili ve %3,2 yağ olduğu tespit edilmiştir (5, 12, 13).

Tipik bir kefirin duyuşal özellikleri, acılığa kaçmayan ve hoş a giden ekşimsi bir tat, hafif maya tat ve aroması, yumuşak bir yapı ve iç erdiği CO₂' den dolayı hafif köpüklü, ferahlatıcı ve serinletici niteliklerden oluştuğu belirtilmiştir (9, 14, 15).

¹ Bu çalışma Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Yavuz Beyatlı danışmanlığı altında Z. Nur (Mumcu) Yüksekdağ tarafından yapılan ve 1997 yılında tamamlanan "Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal Özellikleri ve Plasmid DNA 'larının İncelenmesi" adlı Yüksek Lisans tezinden alınmıştır.

² Arş. Grv., Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Beşevler Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: zehranur@gazi.edu.tr

³ Prof. Dr., Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Beşevler Ankara.

Kefir Tanesinin Yapısı ve Kefirin Mikroflorası

Kefir taneleri beyaz-sarımtırak renkte, çapı 1-2 mm' den 3-6 mm' ye kadar değişen, karnabahara benzer yapıda, bezelye veya fındık büyüklüğündedir. Şekilleri düzgün olmayan kefir taneleri, suda erimez. Süte katıldıkları zaman ise şişerler ve renkleri beyazlaşır (9, 14, 15).

Tanelerin, sütü fermente edici rol oynadığı, kazein ve birbirleriyle ortaklaşa yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiği jelatinimsi kolonilerden oluştuğu ve tanenin en önemli özelliğinin fermentasyon sonunda süzülerek geri kullanılması olduğu bildirilmiştir (14, 16).

Geleneksel olarak, Kafkas halkı hayvan postlarından yapılan tulumların içerisinde sütü fermente ederek kendi kefirlerini hazırlamışlardır. Fermente olmuş sütün bir kısmı bu tulumlar içerisinde alınarak taze süt yeniden eklemiş ve böylece devamlı ve doğal fermentasyon sağlamışlardır. Fermentasyondan haftalar sonra, tabaka şeklinde biriken protein pıhtılarını içeren karnabahar benzeri yapılar oluşmuştur. Tulumun iç yüzeyindeki süngerimsi yapılar alınıp bölünerek kurutulmuş ve kuruma sonucunda oluşan küçük parçalar kefir taneleri olarak isimlendirilmiştir (8, 17).

Kefir yapmak için kullanılan kefir taneleri, "Kefiran" adı verilen suda-çözülmeyen bir polisakkaritten oluşan karakteristik bir fibrillar maddeden oluşmuştur. Kefiran' ın glukoz ve galaktozdan eşit miktarlarda içerdiği ve antitümör aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (4, 15, 18, 19, 20).

Duitschaever ve arkadaşları, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kefir tanesinde yer alan mikroorganizmaları incelediklerinde, mikroorganizmalarda en zengin koloniyi oluşturan kısmın, dışa yakın kısmı olduğunu bildirmişlerdir. Bu kısımda başlıca bakteriler ve çok az sayıda mayalar bulunurken, tanenin merkezine yakın kısımlarda ise mayalar miktarca artarken bakterilerin azaldığını tespit etmişlerdir. Görünüm olarak kefir tanesinin ağ gibi ince-levhamsı bir yapı ile süngerimsi ve lifsi bir yapıya sahip olduğu, özellikle tanenin merkezindeki lif kütesinin dallanma ve uzun bağlar gösterdiği belirtilmiştir. Tanenin merkezinde, mayalar ve bakterileri birlikte tutan ağın, mayalar tarafından üretildiği, tanenin kenar yapısının daha düz olmasının da mikroorganizmaların taneden süte geçişini kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür (21).

İyi bir kefir akıcı kıvamda, homojen ve parlak bir görünümde olmalıdır. İyi bir kefir %0,6-0,9 laktik asit, %0,6-0,8 alkol ve %50 CO₂ (hacim olarak) içermelidir (14).

Kefirler asit, alkol ve CO₂ içeriklerine göre; zayıf kefir (asit, alkol ve CO₂' ce fakir), orta kefir, kuvvetli kefir (asit ve alkolce zengin, CO₂ miktarı fazla, dolayısıyla çok köpüklü) şeklinde sınıflandırılmıştır (14, 22).

Kefir tanelerinin laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar ile homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinin farklı türlerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahip olduğu tespit edilmiştir (7, 23-26). Kefir tanesi içerisinde mikroorganizmaların simbiyoz halde yaşadığı belirtilmiştir (27, 28).

Tanedeki mikroorganizma türü ve bunların birbirine oranı, tanelerin orijinine göre değişmektedir. Bu nedenle tanelerdeki mikroorganizma türü konusunda farklı bildirişler vardır (28).

Koroleva (28), kefir tanesindeki mikroorganizma gruplarını aşağıdaki gibi bildirmiştir : Mesofil homofermentatif streptokoklar: *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*, *S. durans*. Laktobasiller: *Lactobacillus brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. kefir*, *L. casei*. Lökonostoklar: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Mayalar: *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir*.

Kwak ve arkadaşlarına göre, kefir taneleri laktobasil, laktokok ve lökonostok türlerini içerir. Laktobasil türlerini *Lactobacillus caucasicus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. kefiranoferiens*, *L. cellobiosus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* spp. *jugurti* ve *L. lactis*, laktokok türlerini *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *L. lactis* spp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *L. filant* ve *Streptococcus durans* ve yaygın lökonostokları *Leuconostoc dextranicum*, *L. mesenteroides* ve *L. kefir* olarak belirtmişlerdir. Kefir tanelerindeki mayaları ise *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis*, *Torula kefir* ve *Saccharomyces kefir* gibi laktozu fermente eden mayalar ve *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* gibi laktozu fermente edemeyen mayalar olarak bildirmişlerdir (9).

Angula ve arkadaşları, kefir tanelerinde laktozu fermente edemeyen mayaların laktozu fermente eden mayalara göre daha fazla olduğunu ve laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* cinsi bakterilerin daha baskın olduğunu tespit etmişlerdir (29).

Karagözlü, kefir tanelerinde genel olarak laktik asit bakterileri, laktozu fermente eden veya edemeyen mayalar bulunduğunu ve bunların taneden taneye değişiklik gösterdiğini, bazı kefir örneklerinde enterokokların ve koliform grubu bakterilerin de bulunabileceğini belirtmiştir. Son iki gruptaki mikroorganizmaların normal kefir mikrobiyotasında bulunmadığı fakat, çeşitli kaynaklardan kefire bulaşmış olabileceğini bildirmiştir (2).

Kefirin Kimyasal Özellikleri

Kefirin bileşimine ve duyusal özelliklerine etki eden faktörler, öncelikle kullanılan kefir tanesinin veya kültürünün mikrobiyotası ve uygulanan üretim yöntemleridir. Bu nedenle kefirin kimyasal özelliklerinin (asitlik, laktoz, yağ, protein oranları, serbest yağ asitleri miktarı, alkol gelişimi, uçucu bileşikler) kefirin duyusal özelliklerine direkt etki ettiğini ifade edilmektedir (2).

Kefirin bileşimi ve kimyasal özellikleri, kefir yapımında kullanılan sütün niteliklerine, inkübasyon süresine ve soğuk odada muhafaza süresine bağlı olarak değişmektedir (28).

Tüm kefirlerde fermantasyon sırasında oluşan olayların aynı ve aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebileceği belirtilmektedir (21).

1. Laktozdan laktik asit oluşumu (Laktik asit fermentasyonu)
2. Laktozdan etil alkol ve CO₂ oluşumu (Alkol fermentasyonu)
3. Kefire özgü tipik mayayı andırır kefir aroması oluşumu
4. Sınırlı ölçüde proteinin, pepton ve amino asitlere parçalanması

Kefir tanelerinin muhafazası sırasında kefirde asitlik, CO₂ ve alkol miktarı artışına bağlı olarak kefir, tatlı kefir, orta sert kefir, sert kefir ve çok sert kefir olarak sınıflandırılmaktadır (22, 28). Çeşitli kefirlerin özellikleri Çizelge1' de verilmiştir (30).

Çizelge 1. Çeşitli kefirlerin özellikleri

	Tatlı Sert Kefir	Orta Sert Kefir	Sert Kefir	Çok Sert Kefir
Su (%)	88,2	88,9	89,4	89,0
Süt Asidi (%)	0,8	0,6	0,7	0,9
Etil Alkol (%)	0,6	0,7	0,8	1,1
Süt Şeker (%)	2,7	2,9	2,3	1,7
Kazein (%)	2,9	2,7	2,9	2,5
Albumin (%)	0,3	0,2	0,1	0,1
Yağ (%)	3,3	3,1	2,8	3,3
Kül (%)	0,8	0,6	0,7	0,6

Kefir ayrıca ekşi süt kefiri, kefir sodası, glukozlu kefir ve peynir suyu kefiri olarak da sınıflandırılmaktadır (22).

Konar ve Şahan (21), kefiri yağ oranlarına göre, yağsız süt kefiri (en az %0,3 yağ), yağca fakir kefir (%1,5-1,8 yağ), kefir (en az %3,5 yağ) ve krema kefiri (en az %10 yağ) olarak sınıflandırmışlardır.

Kefirin Beslenme Değeri ve Sağlık Üzerine Etkileri

Sütteki tüm besin maddelerini içerdiği için kefirin beslenme değeri yüksektir. Kefirin bileşimi, yapıldığı süt ve yağ oranına bağlıdır. Kefirin oluşumu sırasında mikroorganizmalar, sütteki proteinleri pepton, peptit hatta amino asitlere, süt şekerini de süt asidi ve alkole kadar parçaladıklarından sindirimi kolaylaştırır. Ayrıca ortaya çıkan bu maddeler serinletici, iştah açıcı, sevilen tat ve aromaya sahip olan bu süt ürününün karakteristik özelliklerini oluşturur (31).

Çeşitli araştırmacılar kefirdeki CO₂' in sindirimi kolaylaştırdığını, başta B₁₂ olmak üzere bazı B grubu vitaminleri sentezlediklerini ve kefirde oluşan süt asidinin %90' dan fazlasının L(+) süt asidi olduğunu, L(+) süt asidinin kolayca hazmedilebilme özelliğinin bulunduğunu bildirmişlerdir (28, 32).

Yaygın (28), kefirde oluşan asetik asit, H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) gibi antibakteriyal maddeler ile antibiyotiklerin *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojen bakterilere antibakteriyal etki yaptığını, ayrıca asetik asit bakterilerinin bağırsaktaki bakterilere karşı antibakteriyal etki gösterdiğini ve bu nedenlerle kefirin bazı rahatsızlıkları iyileştirdiğini bildirmiştir.

Rusya' daki pediatri uzmanlarının fermente sütü bilhassa kefir, yalnızca besleyici özelliğinden değil, aynı zamanda diyareye karşı yararlı olmasından dolayı hem sağlıklı hem de hastalıklı çocuklarda tercih edildiği bildirilmiştir (33).

Kefirin iştahsızlık, uykusuzluk, verem ve böbrek hastalıklarında, safra bozukluklarında, sarılık, çeşitli enfeksiyon ve ekzemada iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (22).

Sezginer (31), sindirim sistemi üzerinde bulunan ve kimyasal sindirim için gerekli salgıları yapan mide, karaciğer, safra kesesi, bağırsakların dinlenebilmesi dolayısıyla onlarda ve onların neden olduğu hastalıkların tedavisi için en iyi ilacın kefir olduğunu bildirmektedir.

Kefirin gençlik ikisi olarak tanındığı ve su yerine içildiği Kafkasya' da tüberküloz, kanser ve hazım bozukluğu gibi hastalıklara rastlanmaması ve ortalama insan ömrünün 110-130 seneye ulaşması dikkatleri çekmiştir. Yapılan araştırmalarda kefirin bu konuda önemli rol oynadığı saptanmış ve bazı hastalıkların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği grlmştir. Mide iltihapları, enfeksiyon, sarılık, i ve dış ular, kronik barsak iltihapları, ekzama, kalbin atardamar ile ilgili hastalıkları, yüksek tansiyon, ishal, kabızlık bu hastalıklar arasında belirtilmektedir (14, 31).

Hayvanlarda ve insanlarda yapılan araştırmalarda *Lactobacillus acidophilus* ve *L. bulgaricus* içeren fermente süt ürünlerinin tüketilmesi ile, mide' deki koliform grubu organizmaların sayısında düşme, laktobasillerde de artma grldğu rapor edilmektedir. Bu raporlar fermente süt ürünleri tüketimiyle, barsak florasının yenilendiğini ve barsak şikayetlerinin kaybolduğunu vurgulamaktadır (33).

Karagözlü (2), kefir mikroflorasındaki mayalar ve asetik asit bakterilerinin yoğurt ve diğer fermente süt mamullerinde barsak mikroorganizmalarına karşı yüksek oranda antibiyotik aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Kefirde sindirimi kolaylaştıran diğer bir olayın da CO₂ oluşumu olduğunu, kalsiyum tuzları ve CO₂' in varlığı ile ürün salgısının sıvılaşması ile idrarı arttırdığını, kefirdeki süt asidinin tadı ve karakteristik mikroflorası nedeniyle mide ve pankreas salgılarını arttırdığını belirtmektedir.

Kefirden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Ege Üniversitesi Tarım rnleri Teknolojisi Bölümü' nde kefir tanelerinden *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. faecalis*, *Lactobacillus casei*, *L. brevis* bakterileri ve *Kluyveromyces lactis* mayası izole edilmiştir (2).

Danimarka kefir tanelerinden izole edilen mikroorganizmaların yaklaşık %70' inin streptokoklar, %20' sinin laktobasiller ve %5' inin de mayalardan oluştuğu bildirilmiştir (34).

Ticari olarak üretilmiş Yunan kefirlerinden *Saccharomyces italicus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* mayaları ve yaklaşık $3,4 \times 10^8$ adet/ml düzeyinde laktobasiller, az sayıda *Streptococcus lactis* ve *S. thermophilus* izole edilmiştir (35).

Tane kefirde izole edilen, katalaz pozitif ve gram negatif özellik gösteren 84 adet aerobik asetik asit bakterileri, *Acetobacter acetii* türü olarak tanımlanmıştır (36).

Lee ve Kim (16), tanelerden izole ettikleri 90 bakteriyal suşun karakterizasyonunu çalışmışlar ve suşların %40-60 üzerindekiilerinin *Lactobacillus brevis* ve *L. buchneri* olduğunu bildirmişlerdir. Laktik streptokok izole edememişler ve izole edilen 50 mayanın %4-96' sının *Saccharomyces* spp. ve *Candida pseudotropicalis* olarak belirlemişlerdir.

Babina (37), olgunlaşmamış kefir örneklerinden *Streptococcus lactis*, *S. paracitrovorus*, *Leuconostoc dextranicum* izole etmiştir.

Kojima ve arkadaşları (38), homofermentatif laktobasillerin kefiran üreten bir suşunun, seçici bir besiyeri (Rogasa-CW agar) kullanılarak kefir tanelerinden izole edilebileceğini göstermişler ve bu mikroorganizmanın *Lactobacillus kefiranofaciens* olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, kefir tanelerinden *Lactobacillus kefir* olarak tanımladıkları heterofermentatif laktobasiller izole etmişlerdir.

Angula ve arkadaşları (29), kefir tanelerinden 46 laktik asit bakterisi izole etmişler ve bunlardan homofermentatif laktobasiller içinde, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, *L. casei* subsp. *pseudopiantarum*, *L. casei* subsp. *rhannosus*, *L. acidophilus* ve *L. gasseri*, heterofermentatif grup içinde *L. brevis*, *L. viridescens*, *L. kefir* ve *L. fermentum* olduğu bildirmişler ve homofermentatif suşların heterofermentatif suşlardan daha fazla izole edildiği tespit etmişlerdir.

Ergülü ve Üçüncü (5), kefir mikroflorası üzerine yapmış oldukları araştırmada, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinslerinin sayıları örneklerde çok yüksek değerler göstermiş ve kefir mikroflorasının ana kaynağını oluşturduğu belirtilmiştir. İncelenen kefir örneklerinde *Staphylococ*, *Micrococ* ve *Pseudomonas* bakterileri ile *Clostridium* ve *Bacillus* gibi spor yapan bakterilere rastlanılmadığı bildirilmiştir. İncelenen kefir örneklerinden *Streptococcus lactis*, *S. faecalis*, *S. cremoris*, *Leuconostoc cremoris*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. kefir*, *Lactobacillus casei*, *L. brevis*, *L. caucasicum* bakteri türleri izole edilmiştir.

Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan mikroorganizmaları kapsar (39). Laktik asit bakterileri laktozu, çoğunlukla %0,5-1,5' luk laktik asit konsantrasyonuna kadar parçalarlar, ancak %3 konsantrasyona kadar fermentasyon yapan türleri de vardır (40).

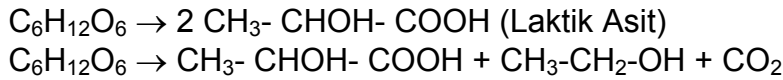
Laktik asit bakterileri gram pozitif reaksiyon verirler. *Sporolactobacillus inulinus* hariç hiçbirisi spor oluşturmaz. Bir iki ayrıcalık gösteren üye dışında hepsi hareketsizdir. Fizyolojik karakterleri bakımından birbirine yakın veya benzer bulunan, ancak morfolojileri oldukça farklı olan cinsleri içerirler. Morfolojileri kok veya çubuklardan oluşan farklı uzunlukta zincir şeklindedir (40-42).

Laktik asit bakterileri iki ayrı familya da toplanmıştır. *Streptococcaceae* familyasına ait *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türleri yer alırken, *Lactobacillaceae* familyasına ait *Lactobacillus* türleri bulunur (39,41,43).

Laktik asit bakterilerinin "hem" grupları (sitokrom ve katalaz) yoktur. "Hem" gruplarının eksikliğine karşın havanın oksijeninde gelişip üreyebilirler. Bir diğer deyişle katalaz enzimleri olmaksızın aerob koşullarda gelişebilen nadir bakteriler arasında laktik asit bakterileri de bulunur. Bütün üyeleri anaerob veya mikroaerofiliktir (42).

Laktik asit bakterileri fermantasyonda oluşan ürünlerin cins ve miktarına göre de sınıflandırılırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu %95-100 oranında laktik asit üretirler. Bunun yanında az miktarda besi yerinin özelliğine göre formik asit, asetik asit ve etanol oluştururlar. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, glukozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu %50 laktik asit üretirken, bunun yanı sıra yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (40, 42, 44, 45).

Homofermentatif yol:



Heterofermentatif yol:



Laktik asit bakterileri çok hassas mikroorganizmalardır. Bu bakteriler sütte bulunan laktoz şekerini parçalayarak, galaktoz ve glukoz şekeri oluştururlar (39).

Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakterilere, cins ve türe göre değişmek üzere süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların barsak sistemlerinde rastlanır (39, 41).

Laktik asit bakterilerinin bir başka karakteristik özelliği de karmaşık büyüme ve gelişme sistemleridir. Grubun hiçbir üyesi, içinde yalnız glukoz ve amonyum bulunan bir mineral besi ortamında gelişmez. Pek çoğu vitaminlerden bir yada birden fazlasına gerek duyarlar. Ayrıca amino asit istemleri de çok fazladır. Laktik asit bakterileri genellikle, vitamince zengin, maya ekstraktı, domates suyu, peynir altı suyu, süt serumu veya kan içeren karmaşık besi yerlerinde iyi gelişirler (41, 42).

Laktik asit bakterileri, laktik asidin yanında hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler oluştururlar (43, 46-49).

Laktik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucu oluşan çeşitli antimikrobiyal maddeler, diğer kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engeller (50, 51).

Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Metabolik Ürünler

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat kaynaklarından laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler üretebilmektedir. Çoğu mikroorganizmalar bu asitlere ve pH düşüşüne hassastır. Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme sırasında üretilen hidrojen peroksit de bir çok mikroorganizma üzerine inhibitör etki göstermektedir. Ayrıca oluşturdukları diasetil gibi metabolitlerin birikimi ve mikrobiyal gelişme sırasında azalan besin elementleri açısından rekabetin de etkili olabileceği belirtilmektedir (52).

Laktik asit

Laktik asit, laktik asit bakterilerinin fermantasyon yolu ile ürettikleri bir üründür ve mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etki yapmaktadır.

Laktik asit, organik bir asittir. Ekşi tatta, kokusuz bir maddedir. Su, alkol ve eterle kolaylıkla karışabilir. Kloroformda çözülmez. İyi bir çözücü, zayıf bir asittir. Kolaylıkla polimerleşir. Bu özellikleri nedeniyle geniş kullanım alanları vardır. Besin maddelerinin korunmasında asidite sağlar (53).

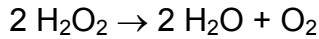
Laktik streptokoklar oluşturdukları laktik asit' le pH' yı 4,5-4,3' e kadar, laktobasiller de pH' yı 3,5-3,2' ye kadar düşürmektedirler. Laktobasiller daha fazla asit oluşturduklarından asitliğe karşı daha dayanıklıdırlar (54).

Yapılan çalışmalar sonucu laktik asit bakterilerinde, laktik asit üretiminin plasmid DNA ile kontrol edildiği sonucuna varılmıştır (55-58).

Savay-de- Giori ve arkadaşları (59), *L. plantarum* suşlarının asit üretim yeteneklerinin inkübasyon sıcaklığına bağlı olduğunu ve *L. plantarum* CRL 60 ve *L. plantarum* CRL83 suşlarının 30-37 °C' de asit üretirken, 15 °C' de asit üretmediğini bildirmişlerdir.

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Laktik asit bakterileri üremeleri sonucu hidrojen peroksit oluştururlar. Oluşturulan hidrojen peroksit miktarı, laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık gösterir. Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşiktir, su ve oksijene ayrışır (43, 60).



Bu reaksiyon ısı, ışık ve katalizör olmadıkça yavaş cereyan ettiğinden hidrojen peroksit uzun süre saklanabilir.

Fernandes ve arkadaşları (61), bazı bakterilerin patojen mikroorganizmaların üremesini kontrol eden çeşitli antimikrobiyal maddeler oluşturduğunu saptamışlardır. Örneğin, *Lactobacillus lactis* 'in hidrojen peroksit üretilip *E. coli* 'nin invivo olarak üremesini durdurduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından

Üretilen antimikrobiyal maddelerin, intestinal infeksiyonunu ve üriner infeksiyonunu koruduğunu tespit etmişlerdi

Hidrojen peroksit, ortamda yüksek konsantrasyona vardığı zaman, gerçek antibiyotik olmadığı halde *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Clostridium* gibi bir çok bakterilerin gelişimini engelleyebilmektedir (62).

Nötr pH' da ve beş karbonlu dekstrozu içeren besiyerinde *Lactobacillus*' ların maksimum hidrojen peroksit oluşturmaktadır (63). Nötr pH' da düşme veya yükselmeler hidrojen peroksit miktarında azalmaya sebep olmaktadır (64).

Reinheimer ve arkadaşları (65), laktik streptokok ve laktobasillerin hidrojen peroksit oluşturma yeteneklerinin aerobik koşullarda, anaerobik koşullara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

L. plantarum, glukozlu substratta ve oksijenli ortamda üretildiği zaman, bakterinin NADH oksidaz, piruvat oksidaz ve NADH peroksidaz aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir. Enzimlerin aktivitesi sonucu ortamda belirli miktarda hidrojen peroksit oluştuğu gösterilmiştir. NADH oksidaz, piruvat oksidaz enzimlerinin in vivo koşullarda, NADH peroksidaz enziminin in vitro koşullarda hidrojen peroksit ürettikleri açıklanmıştır (66).

Berthier (67), *Lactobacillus sake* ATCC 15521, *L. plantarum* ATCC 14917 ve *L. lactis* NCDO 280 bakterilerinin hidrojen peroksit oluşturduklarını tespit etmiştir.

Kot ve arkadaşları (68), *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842' nin glukoz varlığında, pH 6,5-5,0' de ve aerobik koşullarda hidrojen peroksit ürettiğini bildirmişlerdir.

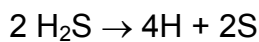
Daeschel (44), büyüme ortamında laktobasiller tarafından üretilen hidrojen peroksidin birikmesi sonucu *S. aureus* ve *Pseudomonas* türleri üzerinde inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hidrojen peroksit, mikroorganizmaların enzim aktivitelerinin bozulmasına, enzimlerin kimyasal yapısının, biyokimyasal karakterinin ve aktivitelerinin değişikliğe uğramasına ve böylece enzimlerin inaktive olmasına sebep olur.

Hidrojen sülfür (H₂S)

Hidrojen sülfür çok etkili toksik bir maddedir. Hidrojen sülfüre kükürtlü hidrojen de denir. Kükürdün hidrojenle oluşturduğu renksiz, çok zehirli gaz halindeki bir bileşiktir.

Hidrojen sülfür, karakteristik çürük yumurta kokusunda bir gazdır. Termodinamik bakımdan kararlı olmasına rağmen çok yüksek sıcaklıklarda ayrışması mümkündür (69).



Sülfatların bakteriler tarafından redüksiyonu ve proteinlerin parçalanması sonucunda hidrojen sülfür oluşur. Laktik asit bakterileri aracılığı ile besi yerindeki kükürtlü amino asitleri kullanarak hidrojen sülfür oluştururlar. Bu amino asitler sistein, sistin ve metiyonindir (70).

Bazı laktik asit bakterilerinin değişik miktarlarda hidrojen sülfür ürettikleri belirlenmiştir (69, 71-73).

Lactobacillus plantarum, *L. viridescens* ve *L. coryneformis* türlerinin peptonlu demir agarda hidrojen sülfür oluşturduğu bildirilmiştir (74).

Sharpe ve Franklin (75), bir çok laktobasil suşunun anaerobik şartlar altında ve düşük sıcaklık derecelerinde hidrojen sülfür oluşturduklarını açıklamışlardır. Ayrıca, besi yerinde karbon kaynağı az olduğunda da hidrojen sülfürün meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Proteolitik aktivite

Proteolitik aktivite, mikroorganizmalarca salgılanan proteolitik enzimler ile proteinlerin hidrolize edilmesidir. Proteolitik aktivite, hem starter kültürlerin asit oluşturma fonksiyonu hem de ürünün duyuşal nitelikleri açısından önemlidir. Bu özelliğın belirlenmesinde Hull yönteminden yararlanılır ve kazeinin paçalanması sonucu serbest kalan tiroşin ve triptofan belirlenir. Sonuçlar ise tiroşin ekivalenti olarak verilir.

Laktik asit bakterileri, gelişebilmeleri için ortamda bazı serbest amino asitlerin bulunmasına gerek duyarlar. *Streptococcus* türleri, ekstrasellüler proteinaz enzimiyle özellikle hücre zarına bitişik olan kazeini peptitlere parçalar. Bu peptitler, bakteri hücresi tarafından alınır ve intrasellüler olarak hidrolize edilirler (76).

de Giori ve arkadaşları (77), laktik asit bakterilerinde bulunan proteolitik enzimlerin peynir aromasının ve belli ürünlerin kokusunun oluşmasında etkili olduğunu belirtmişler ve proteolitik aktivite de pH ve ısının etkili olduğunu ispatlamışlardır.

Rasic ve Kurmann (54), proteolitik aktivitenin bakterilerin logaritmik gelişme fazında meydana geldiğini, *S. thermophilus*' un yalnızca endosellüler enzim ürettiğini, *L. bulgaricus*' un ise endosellüler ve az miktardada ekzosellüler enzim oluşturduğunu bildirmişlerdir. Ekzosellüler enzimlerle proteinlerin, küçük parçalara ayrılarak hücre içine daha fazla girmesinin sağlandığını ileri sürmüşlerdir.

Streptokokların spesifik proteolitik aktivitelerinin 0,1' in (μg kristal tripsin eşdeğeri/ml hücresel DNA) altında, laktobasillerin aktivitesinin 0,2-3,2 arasında değiştiğı bildirilmiştir. Ayrıca, *L. bulgaricus* hücrelerinin yüksek proteolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (33, 39).

Yapılan araştırmalarda, laktik asit bakterilerinde, laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitenin cins, tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (77-79).

Diasetil ve asetaldehit

Süt ürünlerinin (peynir, yoğurt, tereyağı, kefir, kıymız) kendine özgü lezzet ve aroması vardır. Starter kültürlerinin önemli işlevlerinden biriside kullanıldıkları süt ürünlerinde lezzet ve aromayı oluşturmalarıdır. Lezzet ve aromayı oluşturan bileşikler, genellikle ürünün yapımında kullanılan starter kültürlerinin faaliyetleri sonucu meydana gelmektedir. Süt ürünlerinde tat ve kokuyu oluşturan diasetil ve asetaldehit, karakteristik aroma bileşikleridir (39, 80).

Sütte bulunan sitrik asit veya ara ürün olan piruvat fazlasından yararlanılarak diasetil oluşturulmaktadır (39, 41, 43). Sitratı kullanabilen laktik asit bakterileri ile kullanamayanlar arasındaki ayrıcalık, sitrat metabolizmasında önemli rol oynayan sitrataz (sitrat-liyaz) enziminin varlığına bağlanmaktadır (41).

Sitratın, laktik asit bakterileri için enerji kaynağı olmadığı ve diasetilin de bakteri metabolizmasında önemli rolü olmadığı, starter kültürlerinin bu bileşiği ortamdaki fazla piruvatın toksik etkisini gidermek amacıyla, tesadüfen oluşturdıkları sanılmaktadır (39, 81).

Kullanılan sütün çeşidi, sütteki sitrat miktarı, bakterinin inoküle edildiği sıcaklık ve pH dereceleri de diasetil oluşumunu etkileyen faktörler arasındadır (41).

Asetaldehit üretiminde *Lactobacillus*' ların önemli rolü olduğu bilinmektedir. Fakat tür ve suşlar arasında asetaldehit üretimi bakımından farklılık olduğu gözlenmiştir. *Streptococ* 'ların ise daha az miktarda asetaldehit ürettiği tespit edilmiştir (82).

Tzanetaki ve Mastrojannaki (80), *S. thermophilus* ve *L. casei* kullanılarak üretilen S1 peyniri ile *S. thermophilus*, *S. diacetylactis*, *S. durans* kullanılarak S2 peynirinin her ikisinde de asit üretimi ile diasetil üretimi arasında bir bağlantı olduğunu tespit etmişler ve asit üretimi arttıkça diasetil üretiminin de arttığını gözlemişlerdir.

Yoğurtlarda uçucu tat komponentleri içinde en önemlisinin asetaldehit olduğu belirtilmiş ve %0, %4, %8, %12 oranında sakkaroz ihtiva eden, %2' lik yağlı süte *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* aşılandığı zaman, %4 ve daha fazla sakkaroz bulunan besi yerinde hücre sayısında ve asit üretiminde azalma, %8 ve üzerinde sakkaroz ihtiva eden besi yerinde de asetaldehit üretiminde düşme olduğu tespit edilmiştir (83).

Raya ve arkadaşları (84), *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*' un 4 suşunda fosfoketolaz, alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenaz enzimlerini tespit edememişlerdir. Az miktarda piruvat karboksilaz enzimi bulmalarına rağmen, asetaldehitin piruvattan oluşmadığını belirtmişlerdir. Tüm suşlarda asetat kinaz ve fosfat asetil transferaz enzimlerinin bulunduğunu gözlemişlerdir. Threanine aldolaz enziminin *S. thermophilus*' da az, *L. bulgaricus*' da yüksek miktarda bulunduğunu ve theaninin asetaldehit oluşumunda etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Araştırmacılar tarafından, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* ve *Leuconostoc cremoris* tarafından oluşturulan diasetil ve asetoinin piruvattan kaynaklandığı belirtilmektedir. Ayrıca, *L. cremoris*' in diasetil üretiminde özellikle *S. lactis* subsp. *diacetylactis* ve/veya *S. cremoris* ile etkili olduğu bildirilmiştir (85-87).

Jay (1982), 200 µg/ml seviyesinde diasetilin, mayalar ve gram negatif bakteriler için inhibitör etkiye, 300 µg/ml seviyesinde gram pozitif bakteriler için inhibitör etkiye sahip olduğunu ve 350 µg/ml veya daha fazla konsantrasyonlara kadar laktik asit bakterilerini etkilemediğini göstermiştir (43).

Homofermentatif laktik asit bakterilerinin heterofermentatif olanlara oranla daha fazla ve hızlı diasetil oluşturmaktadır. Laktik asit bakterilerinin 18-22 °C' de, 30 °C ve üzerindeki sıcaklık derecelerine oranla daha fazla diasetil üretmektedirler. Ortamın pH' sına bağlı olarak düşük pH' larda yüksek pH derecelerine oranla diasetil fazla oluşmaktadır (41).

Bottazi ve Dellaglio (88), yapmış oldukları çalışmada *S. thermophilus*' un bütün suşlarının diğer homofermentatif laktik streptokoklardan daha fazla asetaldehit ve diasetil ürettiğini tespit etmişlerdir.

Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Süt ürünlerinin yapımında kullanılan laktik asit bakterilerinin önemli bir özelliği de, ortamda bulunan gıda kaynaklı patojen ve kontaminant mikroorganizmaların (*E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* gibi) gelişimini engellemeleri ve ölümlerine sebep olmalarıdır. Starter seçiminde ürünün saklama süresini uzatma ve kalite bakımından, bu özelliğe dikkat edilmektedir. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*' un antibakteriyal aktivitesi insan sağlığı açısından da önem taşımaktadır (89, 90).

Laktik asit bakterilerinin en önemli inhibitör etkisi özellikle asidik ortamlarda oluşmaktadır. Ayrıca inoküle edilen starter kültür miktarı ve aktivitesi de, özellikle fermantasyonun ilk aşamasında, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir (39).

Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu laktik asidin ve küçük konsantrasyonlarda üretilen formik asit, propiyonik asit, asetik asit gibi organik asitlerin patojen mikroorganizmalar üzerinde, antibakteriyal etkisi olmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Lactobacillus*' ların inhibisyonik etkisinin, *Streptococcus*' lara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (50,90).

Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme sırasında üretilen hidrojen peroksidin de bir çok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebildiği bildirilmiştir (48, 49, 60, 91-94).

Dahiya ve Speck (63), *Lactobacillus lactis* ve *L. bulgaricus*' un kültür filtratlarında *S. aureus*' a karşı oluşan inhibitör faktörü, hidrojen peroksit olarak tespit etmişlerdir. *Lactobacillus*' ların nötr pH' da 5 °C' de, dekstrozu ortamda saklandıklarında, maksimum hidrojen peroksit oluşturduğu sonucuna varmışlardır.

Abdel-Bar ve arkadaşları (95), *L. bulgaricus*' un laktik asitten farklı bir antimikrobiyal madde ürettiğini ve bu maddenin gram pozitif bakterilerden *S. aureus*' a, gram negatif bakterilerden de *Pseudomonas fragilis*' e etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çok araştırma sonucunda organik asitler (laktik asit, asetik asit, formik asit), diasetil ve hidrojen peroksidin tek başına veya birlikte gerek gram pozitif gerekse gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (60,96).

Laktik asit bakterilerinin, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria* ve *Pseudomonas* cinsi mikroorganizmalara karşı da antagonistik etki gösterdikleri saptanmıştır (50, 89, 96, 97).

Bakteriosin ve/ veya Bakteriosin Benzeri Maddelerin Etkisi

Bakteriosinler, protein veya protein kompleksleri olup, bakteriyal türlerin oldukça büyük bir kısmı tarafından üretilen potansiyel antimikrobiyal maddelerdir (43, 94, 98, 99).

Tagg ve arkadaşları, bakteriosin için 6 karakteristik özellik belirlemişlerdir. Bakteriosinler, biyolojik olarak aktif proteinlerdir, plasmid orijinlidir, bakterilerde bulunan spesifik bağlanma kısımlarıyla reaksiyona girerler, bakteriosidalırlar, letal biyosentezle üretilirler (100).

Protein veya peptitlerden oluşan bakteriosinin antagonistik etkisi olduğu ve bakteriosinin proteolitik enzimlerle inhibe olabileceği açıklanmıştır (47).

Bir çok gram pozitif ve gram negatif bakterilerin geniş bir oranda bakteriosin ürettiği bildirilmiştir (100, 101, 102).

Klaenhammer' e (99) göre, şimdiye kadar karakterize edilmiş olan *Lactobacillus* bakteriosinleri protein yapısında, bakteriosidal etki mekanizması sergileyen ve kendisine çok yakın cinsleri etkileyen bir etki mekanizmasına sahiptir.

Laktik asit bakterileri içinde bakteriosin üreten *Lactobacil*, *Leuconostoc*, *Micrococ*, *Pediococ* ve *Lactococ* cinsleri gıda maddelerinin korunmasında doğal koruyucu olarak rol oynamaktadır (100).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriosinler, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria* türleri ve *Staphylococcus aureus* gibi gıda maddelerinin bozulmasına neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde bakteriosidal etki gösterirler (91,100,103).

Streptococcus lactis tarafından üretilen nisin, gıda koruyucusu, besin üretimi ve süt mayalama da kullanılmaktadır. Nisin, laktik asit bakterisi tarafından üretilen antimikrobiyal proteinler içinde en fazla karakterize olanıdır. Dehydroalanine, Lanthionine ve β -methylnanthionine amino asitlerini içerir (99,104).

Geis ve arkadaşları (98), laktik streptokokların bakteriosin üretme potansiyellerini tespit etmişlerdir. İncelenen 280 suşun, yaklaşık %5' inin bakteriosin ürettiğini bildirmişlerdir.

Gonzales ve Kunka (105), *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 suşunda bakteriosin üretiminin plasmid kodlu olduğunu bildirmişler ve bu bakteriosini Pediocin PA-1 olarak tanımlamışlardır.

Lactisin F olarak tanımlanan, *L. acidophilus* 88 tarafından üretilen bir bakteriosinin, *L. acidophilus* 6032, *L. lactis* 970, *L. helveticus* 87, *L. bulgaricus* 1489, *L. leichmanii* 4797, *L. fermentum* 1750 ve *S. faecalis* 19433' e karşı inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiştir (93).

Joerger ve Klaenhammer (106), *L. helveticus* 481 tarafından üretilen bir bakteriosini saflaştırıp, karakterize etmişlerdir. Helveticin J olarak tanımlanan bakteriosinin, dar bir inhibitör spektruma ve bakteriosidal bir etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Daba ve arkadaşları (107), *Leuconostoc mesenteroides* UL5 suşunun, Mesenterocin olarak tanımlanan ve *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı etkili ama birkaç faydalı laktik asit bakterileri üzerine etkisi olmayan bir bakteriosin ürettiğini bildirmişlerdir.

Barefoot ve Klaenhammer (108), *L. acidophilus*' un bir suşunda Lacticin B olarak tanımlanan bir bakteriosin tanımlamışlardır.

Bebek gaitasından izole edilen *L. acidophilus* LAPT 1060, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*' un 6 suşuna ve *L. helveticus*' un 6 suşuna karşı antimikrobiyal bir madde ürettiği ve bununda Acidophilucin A olarak tanımlanan bir bakteriosin olduğu bildirilmiştir (102).

Laktik Asit Bakterilerinde Yapılan Plasmid DNA Çalışmaları

Prestini ve arkadaşları (56), *L. bulgaricus* ve *L. helveticus* suşlarından proteolitik aktivite ve laktozu kullanma yeteneklerinin plasmidle ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. *L. helveticus*' da 6 plasmid, *L. bulgaricus*' da da 4 plasmid gözlemişlerdir.

Kok ve Venema (58), istenilen kalitede süt ürünlerinin elde edilebilmesi için, proteolitik aktivitesi yüksek, hızlı asit üreten laktik asit bakterilerine gerek duyulduğunu ve bu bakterilerle yapılan genetik çalışmaların artırılması, ayrıca klonlama sistemlerinin geliştirilmesinin gerektiğini savunmuşlardır.

Kempler ve McKay (55), *L. lactis* subsp. *lactis* biyotip *diacetylactis*' e akradin oranı uygulayarak, cit⁻ mutantını tespit etmişler ve cit⁻ mutantın 5,5 Mdal.' luk plasmidini kaybettiğini ve sitratı fermente etme yeteneği ile plasmid arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Cit⁻ mutantın sitrataz aktivitesini sürdürmesine karşın, sitrat permeaz aktivitesini koruyamadığını ileri sürmüşlerdir.

Herman ve McKay (57), yaptıkları çalışmada *S. thermophilus*' un 23 suşunda 1,4-2,2 Mdal ağırlığında değişen 5 plasmidin varlığını gözlemişlerdir. Bu plasmidlerin küçük olması nedeni ile klonlamada vektör olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Girard ve arkadaşları (109), çiğ süttten izole ettikleri *S. thermophilus* suşlarının 41 adedinde plasmid bulunmadığını, 6 adedinde 1, 3 adedinde ise 2 plasmid olduğunu

tespit etmişlerdir. Plasmidlerin ağırlığının 2,9-7,6 kb arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Arzulanan niteliklerde ürün elde edebilmek için, fermente süt ürünlerinin yapımında laktik asit bakterilerinin, laktoz metabolizması, proteinaz aktivitesi, sitrat metabolizması, bakteriosin üretimi ve bakteriyofajlara karşı dirençliliğin bağlı olduğu plasmid DNA' lara sahip olmaları gerektiği bildirilmiştir (110).

Leie ve arkadaşları (111), laktoz, sakkaroz metabolizması ve proteinaz üretimi gibi özelliklerin plasmid DNA' da kodlandığını, plazmidlerin konjugal olarak transfer edilebileceğini göstermişlerdir.

Bir çalışmada *Streptococcus* ve *Pediococcus*' ların küçük plasmid içermelerine karşılık, *Lactobacillus* ve laktik streptokok suşlarının büyük plasmid bulundurduğu belirtilmiştir. Ayrıca, *S. lactis*' in çeşitli suşlarında proteolitik aktivite ve laktoz kullanımı ile ilgili genlerin, 45-67,5 kb olarak sıralanan aynı plasmid üzerinde bulunduğu ileri sürülmüştür (58).

Beyatlı (112), laktik asit bakterilerinden endüstriyel suş geliştirme programlarında, plasmidlerin önemli yer tuttuğunu belirtmiştir. Ayrıca Beyatlı, yapılan çalışmaların *S. cremoris* suşlarında laktozun katabolizmasında rol oynayan fosfotransferaz sistemi ve Fosfo- β -galaktozidaz enzimlerinin, plasmid genleri tarafından kontrol edildiğini bildirmiştir.

Kaynaklar

1. Merin, U. and Rosenthal, I., 1986, Production of kefir from UHT milk, *Milchwissens.*, 41(7), 395-396.
2. Karagözlü, C., 1990, Farklı Isıl İşlem Uygulanmış İnek Sütlerinden Kefir Kültürü ve Tanesi ile Üretilen Kefirlerin Dayanıklılığı ve Nitelikleri Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, E. Ü. Fen Bil. Enst. Tarım Ürünleri Tekno., İzmir.
3. Kneifel, W. and Mayer, H.K., 1991, Vitamin profiles of kefirs made from milk of different species, *Int. J. Food Scien., and Technol.*, 26(4), 423-428.
4. Vedamuthu, E.R., 1977, Exotic fermented dairy foods, *J. Food Protect.*, 40(11), 801-802.
5. Ergüllü, E. ve Üçüncü, M., 1983, Kefir mikroflorası üzerine bir araştırma, *Gıda*, 8(1), 3-10.
6. Klupsch, H.J., 1984, Produktverbesserung am beispiel kefir, *Deut-Mol-Zeit.*, 15, 466-473.
7. Marshall, V.M., Cole, W.N. and Brooker, B.E., 1984, Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora, *J. Appl. Bacteriol.*, 57(3), 491-497.
8. Duitschaever, C.L., Kemp, N. and Emmons, D., 1987, Pure culture formulation and procedure for the production of kefir, *Milchwissens.*, 42(2), 80-82.
9. Kwak, H.S., Park, S.K. and Kim, D.S., 1996, Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast, *J. Dairy Scien.*, 79(6), 937-942.
10. Wiese, W., 1986, Kefir, ein Sauermicherzeugnis im wiederstreit Zwieschen hersteller, *Lebensmittelüberwachung und nerbraucher*, *Deut-Mol-Zeit*, 9, 227-229.
11. Adam, R.C., 1971, Süt III, E. Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No: 170, 43-50, Bornova- İzmir.

12. Krukowski, K. and Rusiecki, M., 1963, Influence of some factors involved in the culture of grains on the organoleptic and chemical properties of kefir, *Przegl. Mlecz.*, 11(10), 0-11, Alınmıştır, D.S.A., 1965, 27(5), 1517.
13. Niketic, G. and Vukenovic, D., 1975 Technology of kefir manufacture in Tetra Pak containers, *Mijekarstvo*, 25(5), 115-118, Alınmıştır, D.S.A., 1976, 38(2), 720.
14. Koçak, C. ve Gürsel, A., 1981, Kefir, *Gıda*, 6(4), 11-14.
15. Yokoi, H., Watanabe, T. and Fujii, Y., 1990, Isolated and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains, *J. Dairy Sci.*, 73(7), 1684-1689.
16. Lee, K.S. and Kim, D.S., 1986, Microbiological characteristics of kefir cultures, *Korean J. Dairy Sci.*, 8(4), 266-274, Alınmıştır, D.S.A., 1987, 49(6), 3773.
17. Kheraskov, S., 1964, Kefir from camels' milk, *Mol. Prom.*, 25(8), 30-31, Alınmıştır, D.S.A., 1964, 26(11), 3168.
18. Mukai, T., Toba, T., Itoh, T. and Adachi, S., 1990, Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranofaciens* K1, *Carbohydr. Res.*, 204, 227-232.
19. Yokoi, H., Watanabe, T., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T. and Adachi, S., 1991, Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide, *Inter. J. Food Microbiol.*, 13, 257-264.
20. Yokoi, H. and Watanabe, T., 1992, Optimum culture conditions for production of Kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB- 167B isolated from kefir grains, *J. Ferment. Bioeng.*, 74(5), 327-329.
21. Konar, A. ve Şahan, N., 1989, İnek, keçi ve koyun sütlerinden üretilen kefirlerin özellikleri ve bu özelliklere olgunlaştırma süresinin etkisi üzerine bir araştırma, *Bursa I. Uluslararası Gıda Sempozyumu*, 184-187.
22. Kaptan, N., 1982, Toplum sağlığında kefirin önemi, *TÜBİTAK, Bilim ve Teknik Dergisi*, 176 (33), 33-35.
23. Toba, T., Arihara, K. and Adachi, S., 1987, Comparative study of polysaccharides from kefir grains, an encapsulated homofermentative *Lactobacillus* species and *Lactobacillus kefir*, *Milchwissens.*, 42(9), 565-568.
24. Pidoux, M., Brilloet, J.M. and Quemener, B., 1988, Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains, *Biotech. Letter.*, 10(6), 415-420.
25. Clementi, F., Gobetti, M. and Rossi, J., 1989, Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production, *Milchwissens.*, 44(2), 70-74.
26. Piodux, M., Marshall, V.M., Zanoni, P. and Brooker, B., 1990, *Lactobacilli* isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation, *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 311-320.
27. Leroi, F. and Pidoux, M., 1993, Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains, *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 54-60.
28. Yaygın, H., 1995, Yoğurt, III. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu 2-3 Haziran 1994-İstanbul, Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları, No:548.
29. Angula, L., Lopez, E. and Lema, C., 1993, Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain), *J. Dairy Research*, 60, 263-267.
30. Yöney, Z., 1967, Yoğurt Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara.
31. Sezginer, A., 1980, Kefirin hikayesi, *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi*, 151(13), 37-39.

32. Cerna, J. and Hrabova, H., 1977, Biologic enrichment of fermented milk beverages with vitamin B₁₂ and folic acid, *Milchwissens.*, 32(5), 274-277.
33. Renner, E. and Saldamlı, I., 1983, Beslenme açısından fermente süt ürünleri, *Gıda*, 8(6), 297-311.
34. Gajdusek, S., 1962, Significance of proteolytic bacteria for the ripening of kefir, *Sborn. Vysoké Skoly Chem. v Praze., Potravin. Tech.*, 6(3), 331, Alınmıştır D.S.A., 1964, 26(2), 391.
35. Georgantas, S., 1970, Microbial flora of Greek Kefir, *Lattle*, 44(8), 568-570, Alınmıştır, D.S.A., 1972, 34(7), 3289.
36. Rosi, J., 1978, The kefir microorganisms: acetic acid bacteria, *Scienza Tecnica Lattiero-Caseria*, 29, 221-227.
37. Babina, N.A., 1971, Quantitative characteristics of the microflora of kefir cultures, *Moloch. Prom.*, 32(2), 18-19, Alınmıştır, D.S.A., 1980, 33(7), 3630.
38. Kojima, S., Takizawa, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benna, Y. and Nakase, T., 1993, An improved medium for the isolation of *Lactobacillus* from kefir grains, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(1), 119-120.
39. Tekinşen, O.C. ve Atasever, M., 1994, Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür, Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayını, 150s., Konya.
40. Yetişmeyen, A., 1995, Süt Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak Yayınları, No:1420, 229s., Ankara.
41. Tunail, N. ve Köşker, Ö., 1989, Süt Mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1116, 138s., Ankara.
42. Halkman, K., 1991, Tarım Mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1214, 82s., Ankara.
43. Daeschel, M.A., 1989, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technol.*, January, 164-167.
44. Drinan, D.F., Tobin, S. and Cogan, T.M., 1976, Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria, *Appl. Envir. Microbiol.*, 31(4), 481-486.
45. Prescott, C.S. and Dunn, G.C. 1987, *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, pp.882.
46. Reiter, B. and Harnulv, G., 1984, Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and partial applications, *J. Food Protect.* 47(9), 724-732.
47. Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M.G., 1988, Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Protec.*, 52(9), 614-617.
48. Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K., 1989, Inhibition of food-borne bacterial pathogenes by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*, *J. Food Protect.*, 52(12), 856-862.
49. Fitzsimmons, N. and Berry, D.R., 1994, Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: Evidence for the involvement of a peroxidase system, *Microbios*, 80, 125-133.
50. Attaie, R., Whalen, P.J., Shahani, K.M. and Amer, M.A., 1987, Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus Yogurt, *J. Food Protec.*, 50(3), 224-228.
51. Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J., 1990, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS- Microbiol. Review.*, 87, 149-164.
52. Okereke, A. and Montville, T.J., 1991, Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, *J. Food Protect.*, 54, 349-353.
53. Çetin, E.T., 1983, Endüstriyel Mikrobiyoloji, İst. Tıp Fak. Vakfı Yayını, 418s.

54. Rasic, J.L. and Kurman, J.A., 1978, Yogurt technology, manufacture and preparation, D.K. 27, 20, Vanlose Copenhagen, 466 pp.
55. Kempler, G.M. and McKay, L.L., 1979, Characterization of plasmid DNA in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, Evidence for plasmid linked citrate utilization, Appl. Envir. Microbiol., 37(2), 316-323.
56. Prestini, P., Bottazzi, V., Vescova, M. and Morelli, L., 1983, Relationship among plasmid DNA, lactose fermentation and proteolytic activity in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus bulgaricus*, Annali della Facolta di Agaria, 23(1), 71.
57. Hermann, R.E. and McKay, L.L., 1985, Isolation and partial characterization of plasmid DNA *Streptococcus thermophilus*, Appl. Envir. Microbiol., 50(4), 1103-1106.
58. Kok, J. and Venema, G., 1988, Genetics of proteinases of lactic acid bacteria, Biochimie, 70, 475-488.
59. Savoy-de-Giori, G., Font-D-Valdez, G., Ruiz-Holgado, A.P. and Oliver, G., 1985, Effect of growth temperature on acid production by lactic acid bacteria, Microbiologie-Aliment. Nutrit., 2, 243-246.
60. Juven, B.J., Schved, F. and Lidner, P., 1992, Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*, J. Food Protect., 55(3), 157-161.
61. Fernandes, C.F., Shahani, K.M. and Amer, M.A., 1987, Therapeutic role of dietary *Lactobacilli* and lactobacillic fermented dairy products, FEMS- Microbiol. Review., 46, 343-356.
62. Eralp, M., 1974, Peynir Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:533, 331s., Ankara.
63. Dahiya, R.S. and Speck, M.L., 1967, Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*, J. Dairy Scien., 51(10), 1568-1572.
64. Collins, E.B. and Aramaki, K., 1980, Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*, J. Dairy Scien., 63(3), 353-357.
65. Reinheimer, J.A., Demkow, M.R. and Condioti, M.C., 1990, Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures, The Aust. J. Dairy Technol., May, 5-9.
66. Murphy, M.G. and Condon, S., 1984, Comparison of aerobic and anaerobic growth of *Lactobacillus plantarum* in glucose medium, Arch. Microbiol., 138(1), 49-53.
67. Berthier, F., 1993, On the screening of hydrogen peroxide-generating lactic acid bacteria, Lett. Appl. Microbiol., 16, 150-153.
68. Kot, E, Furmanov, S. and Bezkorovainy, A., 1996, Hydrogen peroxide production and oxidation of ferrous iron by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, J. Dairy Scien., 79(5), 758-766.
69. İlyaslı, F., 1997, İstavrit (*Trachurus trachurus*) Balığından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, G. Ü. Fen Bilim. Enst., Ankara.
70. Toksoy, A., 1993, Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddelerin Kontaminant Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, G.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.
71. Akbari, M., 1994, Sucuk ve Sosislerden İzole Edilen Bazı Atasal ve Mutant *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, G. Ü. Fen Bilimleri Enst., Ankara.
72. Tulunoğlu, Ş., 1996, Silivri Yoğurtlarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Doktora Tezi, G.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.

73. Toksoy, A., 1996, *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, G.Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.
74. Hanna, M.O., Savell, J.W., Smith, G.C., Purser, D.E., Dardner, F.A. and Vanderzant, G., 1983, Effect of growth of individual meat bacteria on pH, color and odor of aseptically prepared vacuum packaged round steaks, J. Food Protect., 46, 216-219.
75. Sharpe, M.E. and Franklin, J.G., 1962, Production of hydrogen sulfide by *Lactobacilli* with special reference to strains isolated from cheddar cheese, (Abst.) 8th Int. Cong. Microbiol., 46.
76. Law, R.A. and Kolstad, J., 1983, Proteolytic systems in lactic acid bacteria, Ant. van Leeuwen., 49, 225-245.
77. de Giori, G.S., de Valdez, G.F., de Holgado, A.P.R. and Oliver, G., 1985, Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria, J. Dairy Scienc., 68, 2160-2164.
78. Rajagopal, S.N. and Sandine, W.E., 1990, Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk, J. Dairy Scien., 73, 894-899.
79. Aslım, B., 1994, *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bazı Fiziksel ve Kimyasal Mutagenlerin Etkisi, Doktora Tezi, G. Ü. Fen Bil. Enst., Ankara.
80. Tzanetaki, E.L. and Mastrojiannaki, A.V., 1988, Diacetyl and acetaldehyde concentrations during ripening of Kefalatyri Cheese, J. Food Scien., 53(2), 663-664.
81. Harvey, R.J. and Collins, E.B., 1963, Roles of citrate and acetoin in metabolism of *Streptococcus diacetylactis*, J. Bacteriol., 86, 1301-1307.
82. Shimazu, Y., Vehara, M. and Watanabe M., 1985, Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria, Agric. Biol. Chem., 49(7), 2147-2157.
83. Bills, D.D., Yang, C.S., Morgan, M.E. and Bodyfelt, F.W., 1972, Effect of sucrose on the production of acetaldehyde and acids by Yogurt culture bacteria, J. Dairy Scien., 55(11), 1570-1573.
84. Raya, R.R., Manca de Nadra, M.C., Ruiz-Holgado, A.P. and Oliver, G., 1986, Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria, Milchwessens., 14(7), 397-399.
85. Kaneke, T., Suzuki, H. and Takahashi, T., 1987, The effects of metal ions on diacetyl production by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 3022, Agric. Biol. Chem., 51(9), 2315-2320.
86. Petit, C., Vilchez, F. and Marczak, R., 1989, Influence of citrate on the diacetyl and acetoin production by fully grown cells of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, Current Microbiol., 19, 319-323.
87. Petit, C., Vilchez, F. and Marczak, R., 1989, Formation and stabilization of diacetyl and acetoin concentration in fully grown cultures of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, Biotech. Letter., 19, 319-323.
88. Bottazi, V. and Dellaglio, F., 1967, Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococci. J. dairy Res., 34, 109-113.
89. Frank, J.F. and Marth, E.H., 1977, Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk, J. Food Protect., 40(11), 754-759.
90. Kılıç, S., 1990, Yoğurt kültürünü oluşturan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin antibakteriyal özellikleri üzerine bir araştırma, Gıda, 15(6), 333-338.

91. Lewus, C.B. Kasier, A. and Montville, T.J., 1991, Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(6), 1683-1688.
92. Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, T., Sletten, K. and Nes, I.F., 1991, Purification and amino acid sequence of Lactocin S, a bacteriosin by *Lactobacillus sake* L45, *Appl. Envir. Microbiol.*, 57, 1829-1834.
93. Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R., 1991, Purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088, *Appl. Envir. Microbiol.*, 57, 114-121.
94. Barefoot, S.F. and Nettles, C.G., 1993, Antibiosis revisited, bacteriocins produced by dairy starter cultures, *J. Dairy Scien.*, 76, 2366-2379.
95. Abdel-Bar, N., Harris, N.D. and Rill, R.L., 1987, Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*, *J. Food Scien.*, 52(2), 411-415.
96. Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R., 1989, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Protect.*, 52(6), 384-387.
97. Keppler, K., Geisen, R. and Holzapfel, W.H., 1994, An α -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*, *Food Microbiol.*, 11, 39-45.
98. Geis, A., Singh, J. and Teuber, M., 1983, Potential of lactic streptococci to produce bacteriosin, *Appl. Envir. Microbiol.*, 45(1), 205-211.
99. Klaenhammer, T.R., 1988, Bacteriosins of lactic acid bacteria, *Biochimie.*, 70, 337-349.
100. Lewus, C.B. and Montville, T.J., 1991, Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *J. Microbiol. Method.*, 13, 145-150.
101. Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W., 1976, Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriol. Review.*, 40(3), 722-756.
102. Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T., 1991a, Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin, *Letter. Appl. Microbiol.*, 12, 228-231.
103. Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B., 1991, Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H, *Appl. Envir. Microbiol.*, 57(4), 1265-1267.
104. Kaletta, C. and Entian, K.D., 1989, Nisin, a peptide antibiotic: Cloning and sequencing of the nis A gene and posttranslational processing of its peptide product, *J. Bacteriol.*, 171(3), 1597-1601.
105. Gonzalez, C.F. and Kunka, B.S., 1987, Plasmid-associated bacteriosin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*, *Appl. Envir. Microbiol.*, 53(10), 2534-2538.
106. Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R., 1986, Characterization and purification of Helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481, *J. Bacteriol.*, 167(2), 439-446.
107. Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J. and Lacroix, C., 1991, Detection and activity of a bacteriosin produced by *Leuconostoc mesenteroides*, *Appl. Envir. Microbiol.*, 57(12), 3450-3455.
108. Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R., 1983, Detection and activity of Lactacin B, A bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, *Appl. Envir. Microbiol.*, 45(6), 1808-1815.
109. Girard, F., Lauterire, M. and Novel, G., 1987, DNA-DNA homology between plasmids from *Streptococcus thermophilus*, *Lait.*, 67(4), 537-544.

110. Feng Xu, F., Lindsay, E.P. and Yu, P.L., 1990, Molecular cloning and expression of a proteinase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H2 and construction of new Lactococcal Vector pFX1, Arch. Microbiol., Sept., 99-104.
111. Leie, D., Wosten, H., Bron, S., Oskam, L. and Venema, G., 1990, Conjugal mobilization of Streptococcal plasmid pMV 158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, J. Bacteriol., 172(1), 45-52.
112. Beyatlı, Y., 1994, Bazı laktik asit bakterilerinde tespit edilen plasmid DNA'ların fonksiyonları, Kükem, 17(1), 51-59.