

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

**KEFİRDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİ VE MAYALARIN MOLEKÜLER
TEKNİKLER İLE TANIMLANMASI**

**NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ
FBA-9-1140**

SONUÇ RAPORU

**Proje Yürütücüsü
Yrd.Doç.Dr. Zülal KESMEN
Gıda Mühendisliği Bölümü**

**03/2012
KAYSERİ**

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kefirin Tanımı ve Tarihçesi	4
2.2. Kefir Tanesinin Fiziksel Yapısı.....	5
2.3. Kefir Tanesinin Kimyasal Özellikleri	5
2.4. Kefir Tanesinin Mikrobiyolojik Özellikleri	7
2.4.1. Laktik Asit Bakterileri.....	9
2.4.2. Asetik Asit Bakterileri.....	10
2.4.3. Mayalar.....	10
2.5. Kefirin Beslenme Değeri ve Sağlık Üzerine Etkileri	10
2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması	11
2.6.1. Fenotipik Metotlar	12
2.6.2. Genotipik Metotlar	13
2.6.2.1. Kültürel Olmayan Teknikler	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. MATERYAL.....	26
3.1.1. Kefir ve Kefir Tanesi Temini	26
3.2. METOT	26
3.2.1. Kefir Tanelerinin Aktifleştirilmesi	26
3.2.2. Kefir ve Kefir Tanelerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	26
3.2.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	26
3.2.2.2. Gram Reaksiyonlarının Belirlenmesi	27
3.2.2.3. Katalaz Reaksiyonlarının Belirlenmesi	27
3.2.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin 16 S rRNA Tam Sekans Analizi ile Tanımlanması.....	28
3.2.3. PCR-DGGE Tekniği ile Kefir Florasındaki LAB ve Mayaların Tanımlanması	30
3.2.3.1. Kefir Tanelerinden ve Kefir Örneklerinden DNA İzolasyonu	30
3.2.3.2. Laktik Asit Bakterilerinin 16 S rRNA V3 Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu	31
3.2.3.3. Mayaların 26S rRNA D1 Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu	32
3.2.3.4. DGGE Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.2.3.5. Poliakrilamid jelin hazırlanması.....	34
3.2.3.6. DGGE bantlarının jelden alınması ve saflaştırılması	35
3.2.3.7. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Dizi Analizi	35
4. BULGULAR	36
4.1. LAB Sayım Sonuçları	36
4.2. Kefir Mikroflorasının PCR-DGGE Analiz Sonuçları	36
4.3. Rep-PCR Fingerprint Analizi	39
5. SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR.....	52

ÖZET

KEFİRDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİ VE MAYALARIN MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE TANIMLANMASI

Kefir, beslenme ve sağlık üzerindeki olumlu etkileri her geçen gün daha iyi anlaşılan fermente bir süt ürünüdür. Kefirin karakterisitk özellikleri ve sağlık üzerindeki etkilerinin mikroflora kompozisyonuna bağlı olduğu anlaşılmıştır. Son yıllarda fermente ürünlere özgü nitelikler kazandıran mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla yoğun araştırmalar yapılmakta ve DNA'ya dayalı tanımlama teknikleri, özellikle Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) bu ürünlerin karmaşık mikroflorasının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu araştırmada farklı üniversitelerden sağlanan kefir taneleri ve piyasadan temin edilen farklı marka kefirlerin laktik asit bakteri profili, PCR-DGGE ve 16S rRNA tam sekans analizi ile kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, kefir ve kefir tanelerinden direkt DNA izole edilerek PCR-DGGE analizine tabi tutulmuş ve sonuçta, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Aeromonas media*, (*Lb. Buchneri*, *Lb. Kefiri*, *Lb. Sunkii*, *lb. Otakiensis*), *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lc. Raffinolactis*, *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Bifidobacterium*, *Lb. Helveticus*, *Lb. Jensenii* olmak üzere 12 farklı bakteri tespit edilmiştir. İkinci aşamada ise, MRS ve M17 agar ortamında geliştirilen saf bakterilere ait DNA'ların 16S rRNA tam sekans analizi yapılmıştır. Tam sekans analizi sonucunda *Lc. lactis*, *leuconostoc mesenteroides*, *St. Epidermidis*, *St. Thermophilus*, *Leu. Pseudomesenteroides*, *Lb. Casei*, *Lb. Kefiri*, *Pseudomonas sp.*, *Acetobacter ghanensis*, *Lb. diolivorans*, *Lb. acidophilus* olmak üzere toplam 11 adet farklı bakteri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak kefir ve kefir tanelerinin bakteriyel florasını tanımlamada PCR-DGGE oldukça güçlü bir teknik olmakla beraber sonuçların güvenilirliğinin artırılması ve ortamın gerçek bakteri profilinin ortaya çıkarılması için diğer moleküler tekniklerle birlikte kullanılmasının gerekli olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler : Kefir, Laktik Asit Bakterileri, PCR-DGGE, 16S rDNA

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF BACTERIA AND YEASTS ISOLATED FROM KEFIR MICROFLORA BY MOLECULAR METHODS

Kefir is a fermented dairy product whose positive effect on nutrition and health are understood better day by day. It has been realized that Kefir's characteristic features and effects on health depend on microflora composition. But it is also pointed out that this flora is not stable and changes more or less depending on a number of factors. Therefore, it is of paramount importance that kefir's microflora be described in detail in studies on kefir.

Several studies are carried out in order to define the microorganisms that bring in the specific features of fermented products and definition techniques based on DNA especially Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) is commonly used in definition of the complicated microflora of these products.

In this study, lactic acid bacteria profiles, PCR-DGGE and 16S rRNA supplied from kefir grains from different universities and different kefir brands from the market were examined using full sequence analysis. In the first step of the study, DNA was directly isolated from kefir and kefir grains afterwards it was analysed consequently 12 different bacteria namely *Lactobacillus kefirianofaciens*, *Aeromonas media*, (*Lb. buchneri* *Lb. kefiri*, *Lb. sunkii*, *Lb. otakiensis*), *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lc. raffinolactis*, *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus* sp, *Aeromonas hydrophila*, *Bifidobacterium*, *Lb. helveticus*, *Lb. jensenii* have been determined. In the second step full sequence analysis was carried out for 16S rRNA of DNAs belonging to pure bacteria cultivated in MRS and M17 agar medium. At the end of the full sequence analysis 11 different bacteria namely *Lc. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *St. epidermidis*, *St. thermophilus*, *Leu. pseudomesenteroides*, *Lb. casei*, *Lb. kefiri*, *Pseudomonas* sp, *Acetobacter ghanensis*, *Lb. diolivorans*, *Lb. acidophilus* were determined.

Consequently PCR-DGGE is a quite reliable technique in defining the bacterial flora of kefir and kefir grains but it should be used with the other molecular techniques for the reliability of the results and for determining the real bacteria profile of the medium.

Key words: Kefir, Lactic Acid Bacteria, PCR-DGGE, 16S rRNA

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Kefir, etil alkol ve laktik asit fermentasyonları sonucu elde edilen, tadı çok hoş olan içimiyle canlılık veren, tarihi geçmişe sahip fermente bir süt ürünüdür. Çok uzun zamandır Kafkasya’da bilinen ve yöresel olarak üretilip tüketilen kefir, besleyici değerinin ve fizyolojik özelliklerinin anlaşılmasından sonra 19. yüzyılın sonlarına doğru Doğu ve Orta Avrupa ülkelerinde de üretilmeye başlanmıştır.

Kefir süttten yapıldığı için, sütteki protei0in, yağ, laktoz, mineral maddeler ve vitaminler gibi besin maddelerinin hepsini yapısında bulundurmaktadır. Hatta oluşumu sırasında bazı vitaminlerin sentezlenmesi, proteinler ve laktozun da kısmen parçalanması kefirin besleme değerini artırmaktadır. Kefirin yapısında bulunan mikroorganizmalar sütte meydana getirdikleri değişikliklerle onu daha kolay sindirilebilir hale getirirler. Böylece kefirdeki besin elementlerinin vücut tarafından kolayca emilmesi sağlanır. Özellikle sütteki laktozun laktik aside dönüşmesiyle, kefir laktoz intolerans kişiler tarafından da rahatca tüketilmektedir. Ayrıca kefir, kalsiyum, fosfor, aminoasitler, folik asit ve B vitaminleri bakımından oldukça zengin bir süt ürünüdür.

Kefir, diğer fermente süt ürünlerinden, üretiminden sadece laktik asit bakterilerinin metabolik faaliyetinin sorumlu olmamasıyla ayrılmaktadır. Geleneksel kefirin kendine özgü tat ve aroması kefir kültürü içinde bulunan değişik türde bakteri ve mayalardan kaynaklanmaktadır. Kefir danelerinin mikroflorası çok sayıdaki bakteri ile mayanın kompleks bir şekilde birleşmesiyle oluşmuştur. Daneler; mikrobiyel hücreler, bunların metabolik ürünleri, pıhtılaşmış süt proteinleri ve karbonhidratlardan oluşur ve 0,3-2,0 cm çapında, irili ufaklı düzensiz şekillerdedir.

Kefir danelerinin bakteriyel florasının en önemli bölümünü homofermentatif laktobasillerden *Lactobacillus kefir* oluşturur. Son yıllarda kefirde yeni bir *Lactobacillus* türü olan *Lactobacillus kefiranofaciens* de tanımlanmıştır. Kefir danesinin dış polisakkarid katmanının daha ziyade bu bakteriler tarafından üretildiği bildirilmektedir. “Kefiran” olarak bilinen bu polimer eşit oranlarda glikoz ve galaktoz içermekte ve kefir danesinin en az % 25’ini oluşturmaktadır. Kefir danesinde Laktobasillerden başka homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit streptokokları ve asetik asit bakterileri ile laktozu fermente edebilen ve fermente edemeyen mayalar (*Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora*

delbrueckii, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir* gibi) da bulunmaktadır. Genel olarak dane mikroflorasının % 65-80'ini Laktobasiller, % 20'sini Streptokoklar, % 5'ini de mayalar oluşturmaktadır.

Kefir sürekli içildiğinde vücuda alınan yararlı bakteriler, özellikle de laktobasiller bağırsaklara yerleşerek buradaki mikroflorayı düzenlemekte ve ürettikleri asit, hatta antibiyotik bileşiklerle hastalık yapan bakterilerin ortadan kalkmasına yol açabilmektedirler.

Kefir, dünyanın çok değişik bölgelerinde tüberküloz, kanser ve gastrointestinal bozukluklar gibi hastalıklarda tedaviyi destekleyici unsur olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Bugüne kadar kefirin gastrointestinal rahatsızlıklar üzerine etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ayrıca son yıllarda kefirin bazı kanser türlerini kontrol etme özelliği, kolesterol düşürücü etkisi ve bağışıklık sistemi üzerine etkileri ile ilgili olarak pek çok çalışma yapılmış ve bu yönde olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan araştırmalardan kefirin karakteristik özellikleri ve sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin mikroflora kompozisyonuna bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Ancak bu floranın sabit olmayıp birçok faktöre bağlı olarak az ya da çok değişebildiği de bildirilmektedir. Bu durumda öncelikle kefir mikroflosunun detaylı olarak ortaya konmasının kefirle ilgili araştırmalarda kritik önem arz ettiği bir gerçektir.

Kefir mikroflorasını açığa çıkarmak amacıyla selektif besiyeri ortamı, morfolojik ve biyokimyasal karakteristiklerin belirlenmesine dayanan çok sayıda çalışma mevcuttur. Bununla birlikte, bu çalışmalarda kompleks mikroflora içindeki mikroorganizma türlerinin identifikasyonu, besiyeri ortamında gelişebilen türler ile sınırlıdır. Diğer taraftan son yıllarda moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmelere paralel olarak mikroorganizmaların tanı ve teşhisinde son derece hassas ve güvenilir sonuçlar veren DNA dizlerinin analizine dayanan yeni yöntemler geliştirilmiş ve yoğun olarak bu tip ürünlerin mikrobiyal florasını belirlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır.

Ülkemizde ise kefirde izole edilen mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla sınırlı sayıda araştırmalar yapılmış ve bu araştırmalarda da geleneksel kültüre alma metotları kullanılmıştır. Oysa bu tip metotlar, uzun zaman alması, fenotipik özelliklerin ortaya

ıkmasındaki yetersizlikler ve kültüre alınamamış canlı hücrelerin belirlenmesinin imkansız oluşu gibi ciddi dezavantajlara sahiptirler.

Sonuç olarak geleneksel fermente süt ürünleri içerisinde seçkin bir yere sahip olan kefire karakteristik nitelikler kazandıran mikrobiyal floranın hassas ve güvenilir teknikler ile ortaya konulması gerekmektedir. Bu amaçla bu çalışmada farklı üniversitelerden sağlanan kefir taneleri ve piyasadan temin edilen farklı marka kefirlerin laktik asit bakterileri ve maya profili, PCR-DGGE yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Böylece fenotipik metotların yetersizliğini elemine eden genotipik metotlar kullanılarak kefirin karmaşık mikroflorasının daha detaylı olarak açığa çıkarmak ve farklı kaynaklardan temin edilen kefir ve tanelerinin mikrofloralarını karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kefirin Tanımı ve Tarihçesi

Kefir, tarihi bir geçmişi olan, içimiyle canlılık veren, hoş bir tada sahip fermente bir süt ürünüdür. İnek, koyun veya keçi sütüne kefir tanelerinin ilave edilmesiyle elde edilen kefir, asidik ve alkolik fermentasyonların bir arada olduğu bir üründür. Dolayısıyla kefir, geleneksel fermente süt ürünleri içerisinde seçkin bir yere sahiptir [1, 2, 3, 4, 5].

Kefirin tarihçesi hakkında çok fazla bilgi bulunmamakla birlikte 18. yüzyıldan beri evlerde yapılıp tüketildiği bilinmektedir. Kafkasya orijinli olduğu bilinen kefirin ilk olarak nerede üretildiği hakkında farklı bilgiler mevcuttur. Bazı kaynaklarda kefirin Kafkasya'da Elburus Dağları eteklerinde yapıldığı ve yapımının gizli tutulduğu, bildirilmektedir [4]. Ayrıca kefirin Güneybatı Asya'da Türkler tarafından yapıldığı da açıklanmıştır. Dr. Sipowitz, kefirin ilk üretildiği yerin 2500 m yükseklikteki Karatsccajeff dağ köyü olduğunu, üretiminin uzun yıllar bu yörede gizlilik içerisinde sürdürüldüğünü bildirmiştir [1, 2, 3, 4].

Kefir, özellikle kuzey Kafkasya'da uzun yaşamın sırrı olarak kabul edilmektedir. Günümüzde bu yönü ile birçok ülkede büyük ilgi görmekte ve sağlık açısından son derece yararlı bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Bugün dünyada yoğurttan sonra en fazla tanınan fermente süt ürünü kefirdir. Halen dünyada kefir tüketimi, özellikle Birleşik Devletler, Macaristan, Polonya, Norveç, İsveç, Finlandiya ve Almanya'da küçümsenmeyecek düzeydedir. Ülkemizde de halk arasında kefire duyulan ilginin, özellikle konu ile ilgili haberler ve yayınlar sayesinde gün geçtikçe arttığı belirtilmektedir [6].

Kefir üretiminde kefir taneleri (kefir danesi), kullanılmaktadır. Kefir tanelerinin ne zaman ve nasıl oluştuğu, nasıl elde edildiği kesin olarak bilinmemektedir. Sütü fermente edici rolü olan kefir taneleri, fermentasyon sonrasında süzülerek yeniden kullanılabilir. Kaynaklarda Kafkasya'da, geleneksel olarak hayvan postlarından yapılan deri tulumların içerisinde sütün fermente edildiği ve fermentasyondan haftalar sonra tulumun iç yüzeyinde tabaka şeklinde biriken protein pıhtılarının (süngerimsi karnabahar benzeri) alınıp bölünerek kurutulduğu ve kuruma sonucunda oluşan küçük pıhtıların kefir taneleri olarak isimlendirildiği aktarılmaktadır [1,4].

2.2. Kefir Tanesinin Fiziksel Yapısı

Kefir tanesi, sarımtırak renkte, çapı 1-2 mm'den 3-6 mm'ye kadar değişen minyatür karnabahar görünümündedir (Şekil 1). Taneler bezelye veya fındık büyüklüğünde küçük, düzensiz şekilli, kıvrımlı, yüzeyi pürüzlü, elastik ve yarı sert yapıya sahiptir. Ağ benzeri lifsi uzantıların birleşmesi ile oluşan tabaka şeklindeki yapılardan ibarettir. Görünüm olarak özellikle tanenin merkezindeki lif kütlelerinin dallanma ve uzun bağlar gösterdiği belirtilmiştir [7].



Şekil 2.1. Kefir tanesinin görünümü [8].

Kefir tanelerinin mayalanmış sütte bir sonraki fermentasyon için süzülerek geri kazanılması gerekmektedir. Fermentasyon sonunda geri kazanılan taneler suyla yıkandığında büyüklükleri değişkenlik göstermektedir (0.5 ile 3.5 cm arasında). Taneler dayanıklı ve esnek olup koparıldığında elastikiyet gösterirler ve özel bir kokuya sahiptirler. Kefir taneleri suda erimemekle birlikte, süte katıldıklarında şişmekte ve renkleri beyazlaşmaktadır [4].

2.3. Kefir Tanesinin Kimyasal Özellikleri

Kefir taneleri, kazein ve mikroorganizmaların oluşturduğu jelatinimsi kolonilerdir. Kefir tanesi, çözünmeyen tipte proteinler; kazein, polisakkarit ve yağ içermektedir. Kefir tanesinin kuru maddesi % 10-16, protein oranı % 30, karbonhidrat içeriği % 25-50 arasındadır.

Dolayısıyla kefir tanesinin kütlesini, mikrobiyal hücreler, otoliz ürünleri ile süt proteinleri ve karbonhidratların parçalanması sonucu meydana gelen ürünlerin oluşturduğu söylenebilir [7, 9, 10].

Kefir tanesinde, kefiran adı verilen polisakkarit bulunmaktadır. Kefiran laktozun mikrobiyal metabolizması sonucu oluşan glukoz ve galaktoz zincirlerini içermektedir. Dolayısıyla kefiranın, bazı bakterilerin metabolik faaliyetleri sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Kefiran, kefir tanesinin % 24'ünü oluşturur ve suda çözünmez. Kefiranın kimyasal yapısı; bir ya da iki şeker molekülünün rasgele bağlandığı pentasakkarit ünitelerinden oluşan tekrar edilmiş hekza veya hepta üniteleridir. Eşit miktarda glukoz ve galaktoz içeren kefiranın, gıda katkı maddesi olarak kullanımının yararlı olacağı düşünülmektedir [11].

Kefirin bileşimi ve kimyasal özellikleri kefir yapımında kullanılan sütün niteliklerine, inkübasyon süresine ve soğuk odada muhafaza süresine bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Kefir bileşimi, tadı ve aroması üzerinde sütün mayalama sıcaklığı ve bekleme süresi etkili olabilmektedir. Kefirdeki kuru madde miktarı kullanılan sütün kuru maddesine bağlı olarak değişmektedir [6].

Kefirin kimyasal özellikleri kefirin duyuşal özellikleri üzerine direkt etki etmektedir. Kimyasal değışiklikler fermentasyon sırasında oluşmaktadır. Laktik asit fermentasyonu yüksek, alkol fermentasyonu ise düşük sıcaklıkta meydana gelmektedir. Kimyasal özelliklerdeki değışimin, kullanılan kefir tanesinin veya kültürün aktivitesine bağlı olduğu belirtilmektedir. Kefir üretimi sırasında başlayan bu biyokimyasal olayların muhafazası sırasında da devam ettiği bilinmektedir [4].

Kefirler farklı özellikleri dikkate alınarak farklı araştırmacılarca farklı gruplandırmalara tabi tutulmaktadır. Nitekim Koçak ve Gürsel [12], kefir asit, alkol ve CO₂ içeriklerine göre zayıf, orta ve kuvvetli kefir olarak sınıflandırılmaktadır. Bu gruplandırmaya göre; zayıf kefir, asit, alkol ve CO₂'ce fakirdir. Kuvvetli kefir ise, asit ve alkolce zengin, CO₂ miktarı fazla dolayısıyla çok köpüklüdür. Şahan [7] ise kefir yağ oranlarına göre; yağsız süt kefir (en az % 0,3 yağ), yağca fakir kefir (% 1.5-1.8 yağ), kefir (en az % 3.5 yağ), krema kefir (en az % 10 yağ) şeklinde sınıflandırmışlardır. Sezer ise kefirin bileşimini şeker ve etil alkol miktarı dikkate alınarak tatlı sert, orta sert, sert, çok sert olarak sınıflandırmıştır (Tablo 1) [4].

Tablo 2.1. Farklı Sertlikteki Kefirlerin Bileşimi [4].

	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 Şekeri	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

Kefirde fermentasyon sırasında laktozdan laktik asit, etil alkol ve CO₂ oluşmaktadır. Laktoz, laktik asit bakterilerinin salgıladığı laktaz enzimi sayesinde parçalanmaktadır. Bu nedenle, kefirdeki laktoz oranı azaldığı için, laktoz intoleransı olan kişiler rahatlıkla içilebileceği bildirilmiştir. Kefir üretiminde alkol ve CO₂ miktarı, ürünün olgunluğuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir [7].

Kefirde, bazı laktik asit bakterilerinin ürettikleri enzimler aracılığıyla parçalanan laktozdan, laktik asit ve CO₂'in yanı sıra aroma maddeleri olan asetaldehit, asetoin, diasetil ve aseton meydana geldiği bilinmektedir. Kefirde asetaldehitin diasetile oranı 3:1 olduğunda en uygun lezzet dengesinin sağlandığı tespit edilmiştir. Bu nedenle; kefirin tipik aromasının oluşmasında uçucu yağ asitleri, alkoller, karbonil bileşikler, diasetil, propiyon aldehit, asetaldehit, n-propanol ve izoamil alkolün rol oynadığı bilinmektedir [4].

2.4. Kefir Tanesinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Kefire işlenecek olan sütte katılan kefir taneleri, laktik asit ve etil alkol fermentasyonunu gerçekleştirecek mikroorganizmaları içerir ve kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Kefir tanesinde bulunan mikroorganizmaların sayısı, cinsi, türleri ve birbirine oranları kefirde farklılık göstermektedir. Bu nedenle kefir tanesindeki mikroorganizma türleri ile ilgili araştırma sonuçları birbirinden farklıdır [7,9].

Kefir florası tanenin orjinine, üretim tekniğine bağlı olarak değişmektedir. Özellikle bakteri/maya oranı kefirin duyuşal özellikleri üzerinde etkilidir. Kefirde, kontamine mayalarla doğal mayaların birbirinden ayırt edilebilmesinin oldukça zor olduğu bildirilmektedir [4,6].

Kefirin karakteristik özellikleri ve sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin mikroflora kompozisyonuna bağlı olduğu anlaşılmıştır. Ancak bu mikrofloranın sabit olmayıp birçok faktöre bağlı olarak az veya çok değişebildiği bildirilmektedir [6, 7, 13].

Kefirde yer alan mikroorganizmaların temel fonksiyonları laktik asit, hidrojen peroksit (H_2O_2), antibiyotik ve bakteriyosin üretmeleridir. Kefirde mikroorganizmalar tarafından oluşturulan asetik asit, hidrojen peroksit ve antibiyotiklerin *E. coli* ve *Salmonella* gibi patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir. Kefir, pek çok faydalı bakteri ve mayayı içermesi nedeniyle probiyotik özelliktedir. Kefirin 10^7 kob/g'dan daha yüksek oranda faydalı mikroorganizma içerdiği için probiyotik özelliği mevcuttur. Kefir mikroflorasını oluşturan bakterilerin pek çoğu bakteriyosin üretme özelliğine sahiptir. Ayrıca kefir mikroflorası fekal enzim aktivitesini de azaltmaktadır [2, 3].

Kefir mikroflorasında, tanenin orijinine bağlı olarak laktozu fermente eden veya etmeyen mayalar ile homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileri bulunmaktadır. Kefirden izole edilen laktik asit bakterilerinin patojen Gram (-) ve (+) bakteriler üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmektedir [3, 4, 14].

Ergüllü ve Üçüncü [10], kefir mikroflorasının ana kaynağının *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinslerinin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Kefirden izole edilen mikroorganizmalar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Kefirden İzole Edilen Mikroorganizmalar.

Simova ve ark. [15]	Ergüllü ve ark.[10]	Akkuzu [9],
<i>Lc. lactis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lb. helveticus</i>
<i>St. thermophilus</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Leu.lactis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lc. cremoris</i>	<i>Leu. dextranicum</i>
<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Leu. cremoris</i>	<i>Leu. cremoris</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Lb. casei</i> subsp.	<i>Lb. kefir</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>E. durans</i>
	<i>Lb. brevis</i>	<i>E. hiraе</i>
	<i>Lb. caucasicum</i>	<i>Lc. lactis</i>
		<i>Lc. raffinolactis</i>
		<i>St. thermophilus</i>
		<i>St. acidominimus</i>
		<i>Candida sphaerica</i>
		<i>Candida parapsilopsis</i>
		<i>Candida famata</i>
		<i>Candida kefir</i>

Bazı kefir örneklerinde enterokokların ve koliform grubu bakterilerin bulunduğunu belirten araştırmacılar bu iki gruptaki mikroorganizmaların doğal olarak kefir mikroflorasında bulunmadığını ve çeşitli kaynaklardan bulaşmış olabileceğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan sirke asidi bakterileri (*Acetobacter* spp.) normal kefir florası içerisinde yer almakla birlikte, düşük ısı derecelerinde çoğalarak kefirin ekşi bir tat oluşumuna neden olduklarından, yabancı mikroflora olarak kabul edilebileceği belirtilmektedir [3,6].

Kefir tanesine bulaşabilen en önemli mikroorganizmalar; koliform grubu bakteriler, Kahm mayaları (*Candida* spp.) ve *Geotrichum candidum*'dur. Bu bulaşmanın kefir tanesindeki orijinal mikroorganizmaların işlevini bozmadığı, ancak bunların tespit edilebilmesinin oldukça zor olduğu bildirilmektedir [4].

2.4.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri Gram (+), hareketsiz, spor oluşturmeyen, katalaz (-), mikroaerofil veya anaerob bakterilerdir. *Sporolactobacillus inulinus* hariç hiçbiri spor oluşturmaz. Laktik asit bakterileri, süt ve süt ürünlerinde, bitkilerde, bitki atıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların barsak mukozasında bulunabilirler. Su ve toprakta hemen hemen hiç bulunmazlar. Laktik asit bakterileri, laktik asitin yanı sıra hidrojen peroksit, CO₂, bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler oluşturmaktadırlar. Laktik asit ekşi, kokusuz zayıf bir asit olup, iyi bir çözücüdür. Besin maddelerinin korunmasını sağlar [16].

Bu organizmalar doğal ortamlarında insanlar hayvanlar ve bitkileri kapsar. Birçok ilginç metabolik karakteristik özelliklerinden ve uzun zamandır güvenle kullanılmalarından dolayı geniş endüstriyel kullanıma sahiptirler. Peynir, yoğurt, ekşi hamur ve yem gibi birçok fermente gıdada aroma tekstür ve bozulmayı önlemek amacıyla kullanılan yedi LAB türü belirlenmiştir. Bunlar; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus*'tur. Filogenetik olarak LAB den olmadıkları halde *Bifidobacterium*, *Bropionibacterium* ve *Bervibactrium* cinslerinin LAB ile benzer özellik gösteren bazı türleri de gıda endüstrisinde kullanılırlar. Son zamanlarda biyokimyasal ve biyoteknoloji ile üretilen biyopolimer ve büyüme enzimleri gibi ağız yoluyla alınan ürünlerin üretiminde de LAB'lar kullanılmaktadır [20].

Laktik asit bakterileri glukozu fermente etmelerine göre; homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri olarak ikiye ayrılırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri, Embden Meyerhoff Parnas (EMP) yolu ile (Fruktoz Di Fosfat –FDP-yolu)

glukozu parçalayarak % 90 oranında laktik asit oluştururlar. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, Hekzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile glukozu parçalarlar ve % 50 oranında oluşan laktik asitin yanı sıra etanol, asetik asit, gliserol, mannitol, fruktoz ve CO₂ gibi yan ürünler meydana getirirler [6, 13].

Laktik asit bakterileri gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların gelişimini engeller. Bu özellik insan sağlığı açısından da önemlidir. Laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit, asetik asit, formik asit, propiyonik asit ve hidrojen peroksitin birçok mikroorganizma üzerine inhibitör etkisi olduğu bilinmektedir [17].

2.4.2. Asetik Asit Bakterileri

Kefir tanesinde, kefir viskozitesini ve kıvamını artıran, kefir yapısını düzenleyici rol oynayan asetik asit bakterilerinin (*Acetobacter aceti* ve *A. raseus*) önemli bir role sahip olduğu bildirilmektedir [4, 6].

2.4.3. Mayalar

Mayalar diğer mikroorganizmalarla simbiyotik yaşam sürerler. CO₂ oluşumunda ve aroma gelişiminde rol oynarlar. Maya fermentasyonu diasetil oluştuğu bilinmektedir. Fazla maya fermentasyonu sonucunda, CO₂ oluşumları artar, hacim artışı ve bu nedenle ambalajlama sorunu ortaya çıkar [4, 6, 11].

Kefir üretiminde laktozu fermente edemeyen mayaların da mevcut olduğu bilinmektedir. En çok izole edilen mayaların *C. kefir* ve *S.cerevisiae* olduğu belirtilmektedir [6].

2.5. Kefirin Beslenme Değeri ve Sağlık Üzerine Etkileri

Kefirdeki CO₂'in sindirimi kolaylaştırdığı belirtilmektedir. Sindirimi kolay ve proteince zengin olması nedeniyle hastalar ve çocuklar için uygun bir besindir. Kefirin düzenli tüketildiğinde iyileşmeyi teşvik ettiği ve ağırlık artışı sağladığına da dikkat çekilmektedir. Kefirin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin mikroflora kompozisyonuna bağlı olduğu anlaşılmaktadır [17,18].

Fermente gıdalarda antimikrobiyal etkiyi oluşturan en önemli faktörlerden biri bakteriosinlerdir. Laktik asit bakterilerinin bakteriosinleri bazı Gram (+) ve (-) bakterilere

karşı inhibisyon etkisine sahiptir. Yapılan araştırmalarda *Lactobacillus acidophilus* ve *L. bulgaricus* içeren fermente süt ürünlerinin tüketilmesi ile midedeki koliform grubu mikroorganizmaların sayısında azalma olduğu ve bağırsak şikayetlerinin kaybolduğu bildirilmektedir [14].

Kefir mikroflorasındaki mayalar ve asetik asit bakterileri de patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Ayrıca kefirin antifungal etkisinin de bulunduğu bildirilmektedir. Bu kapsamda; *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. crusei*, *C. albicans klaur*, *S.cerevisiae*, *Rhodotula*, *Torulapsis glabrata*, *Microsporium nanum* ve *Tirubrum mentagrophytes*, *Trichopyton rubrum*'a karşı antifungal etkisinin bulunduğu bilinmektedir [4].

Kefir tanesinde bulunan kefiranın antitümör aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Kefirin kolon kanserine karşı koruyucu etkiye sahip olduğuuna dair çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür [4].

Kefirin kolestrolü azaltabileceği, anemi üzerine olumlu etkisi olduğu ve kandaki hemoglobini artırdığı, diyareye karşı yararlı olduğu, iştahsızlık, uykusuzluk, tüberküloz, sarılık, ekzama, böbrek ve safra bozuklukları ile mide iltihapları, kronik barsak iltihapları, kalbin atardamarları ile ilgili hastalıkları, yüksek tansiyon, kabızlık gibi bazı hastalıklarda başarılı bir şekilde kullanılabileceği bildirilmektedir [14].

Kefir tanesinde bulunan LAB'ne olan yoğun ilginin sebepleri bu organizmaların sağlık üzerinde olumlu etkileri ve besleyici veya kaliteyi artırıcı özellikleri nedeni ile pek çok gıda ürününe katılmaları, yasal ya da endüstriyel birimlerin ve tüketicilerin, sağlık, etiketleme ve patentle ilgili talepleridir. En fazla çalışılan ve kabul edilmiş probiyotik türler *Lb. acidophilus* LA1, *Lb. acidophilus* NCFB 1748, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. casei* Shirota, *Lb. gasseri* ADH ve *Lb. reuteri* 'yi içerir.

2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

Laktik asit bakterilerin tanımlanmasında, mikroorganizmaların karakteristik özelliklerini tespit etmeye dayanan fenotipik metotlar ile mikroorganizmaların kromozomal ve ektrakromozomal genetik elementlerinin analizine dayanan genotipik metotlar kullanılmaktadır [21]. Tanımlamalarda farklı metotların birbirlerine göre geniş bir aralıkta

tanımlama gücü, güçlü ayırım, tekrarlanabilirlik ve iş yükü yönünden göreceli üstünlükleri mevcuttur [20].

2.6.1. Fenotipik Metotlar

Fenotipik yöntemler, genetik bilginin ekspresyonu ile ortaya çıkan özelliklere göre mikroorganizmaların birbirleri ile olan ilişkilerini ortaya koymaktadır [20]. Mikroorganizmaların karakterizasyonunun da kullanılan geleneksel metotlar genellikle fenotipik test metotlarına dayanmaktadır [23].

Özellikle endüstriyel ya da uygulamalı mikrobiyoloji birimlerinde gıdalarda bulunan laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında hala fenotipik metotlar rutin olarak kullanılmaktadır [20]. Tanımlamada kullanılan fenotipik yöntemler arasında biyotiplendirme, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirmesi, antimikrobiyal direnç testleri, faj tipi ya da bakteriyosin duyarlılık profili gibi yöntemler yer almaktadır [23].

Fenotipik tiplendirme metotlarının temel dezavantajı mikroorganizmaların fenotipik özelliklerini değiştirme eğilimleridir. Fenotipik özelliklerde meydana gelen bu değişiklikler değişen çevre koşullarına bir yanıt olabilir ve önceden fark edilmemektedir. Ayrıca tek bir nükleotitte meydana gelen değişiklik fenotipten sorumlu olan herhangi bir genin fonksiyonunu bozabilmektedir. Böylece genotipik olarak farklı fakat fenotipik olarak ayırt edilmez izolatlar meydana gelebilmektedir [22].

Yapılan bir çalışmada ekşi hamurdan elde edilen ve morfolojik ve fizyolojik analizler neticesinde LAB olarak tanımlanan 317 izolatın API50 CHL sistemiyle sadece % 38'i tür seviyesinde tanımlanabildiği belirtilmiştir. Benzer bir yöntem Uganda'nın geleneksel fermente bir içeceğinde 113 LAB izolatının tanımlanmasında da kullanılmıştır [24]. Bu çalışmaların tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, sınıflandırmada karşılaşılan güçlükler ve tanımlamaların sadece soy seviyesinde gerçekleştirilebilmesi gibi nedenlerle fenotip metotların ayırma güçlerinin sınırlı olduğu belirtilmektedir [20].

Ayrıca fenotipik yöntemlerin iş yükünün fazla olması, uzun zaman alması, çoğunlukla değişken sonuçlar veren yöntemler olması nedeniyle genotipik yöntemlere olan ilgi artmaktadır [20].

2.6.2. Genotipik Metotlar

1990'lerden sonra DNA'ya dayalı pekçok tabanlı tanımlama metodu geliştirilmiştir [20, 25, 26]. Özellikle polimer zincir reaksiyonuna (polymerase chain reaction, PCR) dayanan yöntemler mikroorganizmaları karakterize etmek ve tiplendirmek için hızlı, güvenilir ve basit yöntemler olarak öne çıkmıştır. PCR temelli tiplendirme metotları mikrobiyal genom yapısının tamamını veya bir kısmını tarama yeteneğine sahiptir [23].

Amann ve ark. [27] tarafından yapılan çalışmada değişik habitatlarda kültüre alınabilen bakterilerin toplam sayılarının karşılaştırılması büyük farklılıklar göstermiştir. Bu farklılığın nedenlerinden bir tanesi değişik organizmaların birbirine bağımlı olması, diğeri ise bakterilerin çoğunun doğal ortamlarındaki büyüme koşullarının tam olarak bilinmemesidir. Dolayısıyla mikrobiyal çeşitliliğin ekosistemlerin devamındaki rolünü daha iyi anlamak için geleneksel mikrobiyal prosedürlere ek olarak başka yöntemler de gerekmektedir. Mikroorganizmaların tespit edilmesi ve tanımlaması için, 16S rRNA, ya da onu kodlayan gen gibi bazı moleküler markırların (işaretleyicilerin) kullanıldığı moleküler biyolojik teknikler, mikrobiyel çeşitliliği araştırmak ve mikrobiyal toplulukların yapılarını analiz etmek için artık daha sıklıkla kullanılmaktadır.

Şüphesiz, bu metotların en önemli avantajlarından birisi mikroorganizmaların büyüme koşullarından bağımsız olmalarıdır. Genotip metotlar tür seviyesinden suş ve biyovaryete seviyesine kadar çeşitli seviyelerde ayırım yapabilme gücüne sahiptirler. [19,20].

Çoğu genotipik metodun dayandığı PCR, moleküler biyolojide geniş çapta uygulanan bir teknik olup, basitçe bir gen ya da DNA bölgesinin uç bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığı ile bir dizi replikasyon geçirerek çoğaltılması esasına dayanır. PCR, bir çeşit "in vitro replikasyon" işlemidir. PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılmasından (denatürasyon) sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyonu) ve daha sonra zincirin uzamasından oluşan bir döngünün (polimerizasyonu) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanmaktadır [29].

Bir gıda matriksindeki bakteriyel izolatların cins seviyesinin ötesinde, tür seviyesinde tanımlanması için, 16S rRNA üzerinde türe özgü primerler dizayn edilebilmektedir. Bilinmeyen bakteriyel izolatlar tanımlanacağı zaman, 16S ya da 23S rRNA dizilerinin analizi tanımlama gücü yüksek bir yöntem olarak değerlendirilmektedir [30].

Genetik parmak izi teknikleri mikrobiyal topluluklardaki genetik çeşitliliğin belirlenmesini sağlar. Gıda örneklerinden ekstrakte edilen düşük moleküler ağırlıklı rRNA moleküllerinin (5S rRNA, tRNA) yüksek çözünürlüklü poliakrilamid jellerde elektroforetik ayrımı mikrobiyal ekolojide 1990 lardan beri kullanılan parmak izi tekniklerinden bir tanesidir [26].

Son on yılda PCR ve 16S rRNA dizi analizinin yaygın kullanımı, klinik mikrobiyolojide yeni bakterilerin bulunması ve bakteriyel izolatların doğru olarak tanımlanmasında çok önemli rol oynamıştır. 16S rRNA genomun oldukça korunmuş bir bölgesi olup ayrıca değişken bölgeleri de içermektedir [31].

Mikroorganizma türlerin tanımlanmasında ve filogenetik analizlerinin yapılmasında 16S rRNA'nın değişken V1-V3 bölgelerinin dizi analizi azalan maliyetle birlikte uygun bir seçenek haline gelmiştir [27]. Ancak *Lb. plantarum*, *Lb. paraplatarum*, *Lb. pentosus* gibi yakın ilişkili türlerin ayrılması için 16S rRNA tam sekans analizi yeterli değildir. Alternatif olarak arasında tRNA genlerinin bulunduğu 16S-23S rRNA bölgesi dizi analizi uygun bir seçenek olabilir [32, 33].

PCR'ın keşfi DNA fingerprint metotları için önemli bir gelişmedir. Bu yöntemle çoğaltılan herhangi bir DNA molekülünün hedef fragmentleri, daha sonraki analiz basamaklarında kullanılmaktadır. Yüksek oranda korunmuş bölgelerin çoğaltılması ile akrabalık ilişkileri tanımlanabilir. Değişken DNA segmentlerinin çoğaltılması ise, yakın ilişkili türler arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılmaktadır [33, 34].

PCR'a bağlı DNA fingerprinting teknikleri; Randomly Amplified Polimorfik DNA (RAPD), repetitive extragenic palindrom (rep)-PCR, PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Amplified rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (ARDRA)'yı içerir [19, 20].

Restriksiyon enzimleri (RE) çift zincirli DNA'yı belli nükleotit dizilerinden tanıyan ve kesen enzimlerdir. Spesifik primerlerle gerçekleştirilen seçici PCR reaksiyonundan sonra elde edilen toplam DNA ya da ampikonlar restriksiyon enzimleri (RE) tarafından da kesilebilir. Bu da boyutça birbirinden farklı bir fragment karışımının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. RE'lerin DNA analizinde kullanılması ile ayırım gücü oldukça yüksek bir teknik olan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi geliştirilmiştir [34]. Genellikle izolatları tür seviyesinde tanımlamak için kullanılan bu DNA fingerprint metodunun ayırım

gücü çok yüksektir. Bu yüzden laktik asit bakterileri starter kültürlerinin seçiminde çok yararlıdır [20].

Daha gelişmiş bir parmak izi belirleme tekniği ise, PCR Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)'dir. AFLP yöntemi aslında PCR ve RFLP yöntemlerinin bir kombinasyonudur. Bu teknik genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra oluşan DNA parçalarının bir grubunun selektif amplifikasyonuna dayanır. Bakteriler için çok etkili bir parmak izi metodu olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem bakterilerde hem tür hem de suş seviyesinde tanımlama yapabilir. AFLP epidemiolojik çalışmalarda ve gıda kökenli patojenlerde, DNA virusları, hücre içi bakteriler, gram negatif ve pozitif bakterilerin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [19,20,23]. Hedef organizmanın DNA dizisinin bilinmesine gerek yoktur. AFLP'nin performansı 2 faktöre bağlıdır bunlar; DNA saflığı ve konsantrasyonudur [23]. Tekrarlanabilirliği yüksektir ve bütün polimorfizimlerin hızlıca taranmasına olanak sağlar. AFLP tekniğinin genomdaki *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum* ve *Lb. paraplantarum* türleri arasında iyi bir ayırım sağladığı bildirilmiştir [19].

Ribotyping'in bir çeşidi olan ARDRA'nın prensibi, PCR ile çoğaltılmış ribozomal genlerin restriksiyon enzimleri ile kesilmesine dayanmaktadır [23]. Kesim için sık kesen tetramerik restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır [23]. 16S rRNA fragmentlerinin restriksiyon enzim analizi yöntemidir. ARDRA yöntemi *Lactobacillus* türleri arasında tür seviyesinde ayırım yapabilmektedir. 16S-23S rRNA spacer bölgesinin ARDRA analizi ile *Lb. alimentarius* ve *Lb. farciminis* [35] gibi yakın ilişkili türlerin ya da *Lb. casei* ve *Lb. acidophilus*'u içine alan diğer *Lactobacillus* türlerinin ayırımı yapılabilmektedir. Ancak tüm genomdaki farklılıkları inceleyen Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemine göre ayırım gücü daha düşüktür [36].

Rep-PCR AFLP tiplendirmesine alternatif olan daha az karışık bir tiplendirme metodudur. Bu metotta prokaryotik genomdaki karakteristik bölgelerde bulunan tekrarlanan DNA elemanlarına yönelik primerler kullanılmaktadır [23]. Tekrarlanan bakteriyel DNA elementlerinin PCR amplifikasyonu, yüksek ayırma gücü ve hızı, düşük maliyeti nedeni ile PCR tabanlı güçlü bir tanımlama tekniği olarak ortaya çıkmıştır. Berthier ve Beuvier [37] yaptıkları bir çalışmada, Rep-PCR ile sosisde bulunan *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* ve *Lb. alimentarius* ve *Lb. paralimentarius* türlerinin ayırımını yapabilmişlerdir.

RAPD rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA metodudur [19]. Bütün genomlara uygulanabilen bu teknikte, tek bir primer yardımı ile hedef bakteriyel genomun rastgele amplifikasyonu sonucunda oluşan farklı uzunluktaki amplifikasyon ürünleri, kompleks bir fingerprint oluşturur. Tekniğin en büyük avantajlarından biri genom dizisi hakkında detaylı bilgiye ihtiyaç duymamasıdır. Diğerisi ise, çok miktarda yüksek saflıkta DNA gerektirmemesidir. En önemli dezavantajı ise nonspesifik primerler kullanıldığından duyarlılığının reaksiyon koşullarına bağlı olmasıdır. Patojenik ve patojenik olmayan suşların ayrımı ve sınıflandırılmasında RAPD'in uygun bir yöntem olduğu bildirilmiştir [23, 38]. Bu teknik 16S rRNA tam sekans analizi ile birlikte gıdalarda bulunan laktobasilleri karakterize etmede kullanılan en yaygın tekniklerden biridir [19].

PCR'a dayalı olmayan moleküler teknikler ise Genetik problar/DNA dot blot tekniği, ribotiplendirme, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)'dir [19].

Genetik problar/DNA dot blot tekniğinde, bakteriyel genomik DNA'daki hedef tanımlama sekansına bağlanacak oligonükleotit problar sentetik olarak hazırlanırlar. Genelde problar 16S ya da 23S rRNA genlerine yönelik olarak hazırlanırlar. Ancak 16 S rRNA (1.5 kbp) 23 S rRNA'dan (2.3 kbp) daha küçük olduğu için daha çok tercih edilir [19].

Ribotiplendirme bakterilerin rRNA'daki farklılıklarına dayanarak tür seviyesinde tanımlama ve sınıflandırma yapmaktadır. Bu teknik bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin anlaşılmasına olanak vermektedir. Ribotiplendirme birçok bakterinin tanımlanmasında kullanılmaktadır [20, 39]. Popülaritesinin temel nedeni tanımlama gücü ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olmasıdır. Ancak pahalı ve uzun zaman alabilen bir tekniktir. *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei* ve *Lb. gasseri* türlerinin tanımlanmasında oldukça iyidir.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) agaroz içinde karıştırılan bakteri hücrelerinin deterjan ve enzim yardımı ile parçalanarak DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bakteriyel DNA'nın nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir RE ile kesimine dayanmaktadır. Elektroforez sonucunda elde edilen bant profilleri bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilerek suşların birbiri ile olan ilişkileri ortaya konulmaktadır. PFGE analizi diğer parmak izi stratejilerine göre daha zaman alıcı olmakla birlikte, bu teknik bütün genomu temsil eden büyük DNA fragmentlerini analiz ettiğinden, çok iyi tanımlama gücüne sahiptir. Pek çok mikroorganizmanın alt tür seviyesinde ayrımı çok doğru bir şekilde yapılabilmektedir

[40]. PFGE, pek çok türün karakterize edilmesinde, genom büyüklüğü hakkında bilgi edinmede, bakteri kromozomlarının genetik haritalarının oluşturulmasında büyük oranda kullanılan bir metottur [41]. *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ve 3 alt türünün (*bulgaricus*, *delbrueckii* ve *lactis*), *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. sakei*'nin ve bazı probiyotik türlerin ayrımında başarılı bir tekniktir.

2.6.2.1. Kültürel Olmayan Teknikler

Kültürel metotların tekrarlanabilirliğinin düşük olması, örnekten izole edilen izolatların örneğin mikrobiyal kompozisyonunu tam olarak yansıtamaması gibi bazı sınırlamaları vardır. Daha spesifik olarak bakterinin kültürel metotlar ile saptanmasında izolasyon ortamlarının yetersizliğinden kaynaklanan problemler nedeniyle kültürel olmayan tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur [20].

Moleküler biyoloji hızla gelişen bir alandır. Bu bilim dalındaki branşlardan birisi de mikroorganizmaların doğal ekosistemde gözlemlenmesi ve tanımlanmasına dayalı metotların geliştirilmesidir. Hızlılık ve güvenilirlik moleküler metotların en önemli özelliklerindendir. Eğilim genellikle kültürel olmayan metotlara yöneliktir. Kültürel olmayan tekniklerin tercih edilmesindeki temel neden, birçok bakterinin geliştiği doğal ortamla ilgili bilginin yetersiz olması ve bu ortamlara benzeyen şartların sağlanma zorluğudur. Çünkü doğal ortamlardan bakteriyel DNA'nın direkt izolasyonu ile, seçici kültürle ilgili sorunların üstesinden gelindiğine inanılmaktadır [20].

DNA, türler arasında ve zaman içinde genetik bilginin korunmasından sorumlu bir moleküldür. Nükleotit denilen kimyasalların anlamlı bir şekilde sıralanmasından oluşur. Bu nükleotitler; A, T, G, C ile sembolize edilir. Bu dizilimler organizma ya da birey hakkında bilgi verir. Dizilimdeki herhangi bir değişime mutasyon denir ve bu mutasyonlar çoğunlukla rastgele olurken, bazı organizmalarda yeni bir ortama alışırken meydana gelir. Dolayısıyla, bu değişimlerin gözlemlenmesi ve anlaşılması ile ortamdaki organizmaların tanımlanması sağlanır. DGGE bunu yapmayı deneyen bir tekniktir [42].

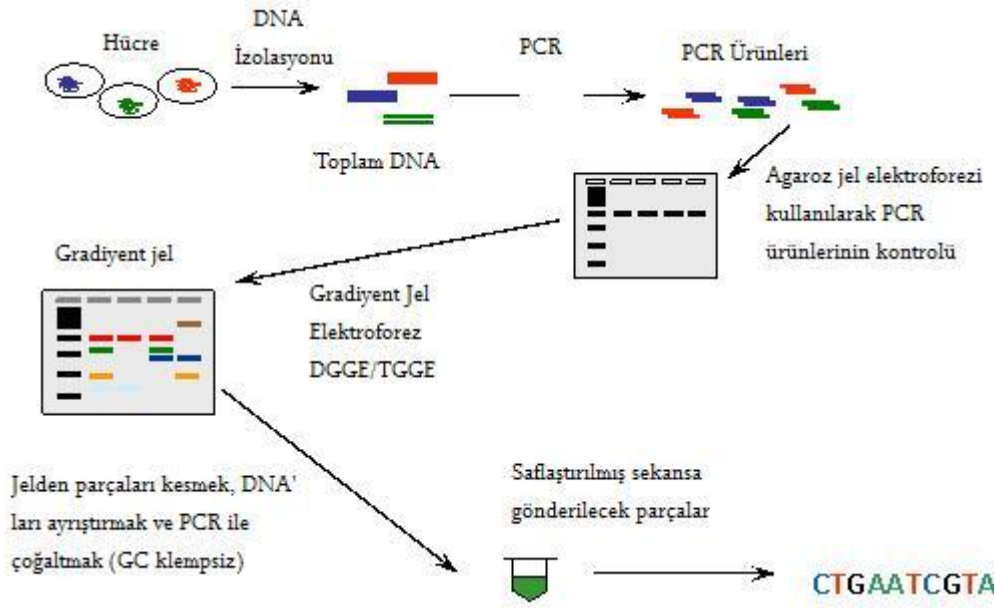
2.6.2.1.1. PCR-DGGE

PCR-DGGE moleküler bir parmak izi metodudur ve aynı boyuttaki farklı dizilimdeki PCR ürünlerinin ayrılmasında kullanılan bir elektroforetik metottur [20, 43].

DGGE kültürel olmayan tekniklerinden en yaygın kullanılanıdır. Tıp, çevre, endüstri, farmakoloji gibi alanlarda birçok uygulaması olan bu teknik, son zamanlarda yaygın olarak gıda mikrobiyolojisinde de kullanılmaya başlamıştır. PCR-DGGE ile gıdaların doğal ekosisteminde bulunan mikroorganizmaların populasyon dinamikleri izlenebilmektedir [20]. Bu teknik mikroorganizmaların kültüre alınmadan bulundukları ortamlarda tanımlanabilmesini sağlayabildiği gibi, kültüre alınan mikroorganizmaların tanımlanmasında da sıklıkla kullanılabilir.

DGGE kompleks mikrobiyal toplulukların tanımlanması için en uygun ve en fazla kullanıma sahip olan bir metottur [25]. Çift sarmallı DNA (dsDNA) molekülünün doğrusal denaturantlar (üre ve formamit karışımı) gradiyenti içeren poliakrilamid jellerdeki azalan elektroforetik mobilitesi bu ayrımın nedenidir [26]. PCR tabanlı bu teknik amplifiye edilmiş DNA parçalarından oluşmuş karışımın, denatüre edici bileşenler içeren poliakrilamid jel içinde ayrılmasını sağlar. Normalde agaroz ya da akrilamid jel elektroforezinde her bir DNA parçasının elektronik mobilitesi onun boyutu ile orantılıdır. DGGE’de aynı boyuttaki DNA parçaları denaturasyon profillerine göre jel üzerinde ayrılır. Çift zincirli DNA (dsDNA) artan denatürasyon şartlarına maruz kalınca tek zincirli DNA (ssDNA) haline dönüşür [44]. dsDNA’nın denatürasyonunda fragmentler erime bölgeleri denen yerlerde kademe kademe denatüre olurlar ve sonuçta dsDNA, ssDNA’ya dönüşür. Erime bölgeleri, aynı sıcaklıkta eriyen baz dizilerinin oluşturduğu alanlardır. Denature edici gradiyent jelin belli bir noktasındaki erime sıcaklığı çift zincirli DNA’nın erime sıcaklığına ulaştığı zaman sarmallar kısmi olarak açılır ve molekülün ilerleyişi pratik olarak durur. Sekans varyasyonu erime sıcaklıklarının farklı olmasına neden olur ve farklı dizilime sahip moleküllerin ilerleyişi jelin değişik noktalarında sonlanır ve böylelikle farklı jel görüntüleri oluşturur. dsDNA parçalarının eriyip tek zincirli haline geldiği nokta nükleotid dizilimine ve G-C yüzdesine bağlıdır [20, 26].

PCR-DGGE’yi mikrobiyal ekolojiye Muzer kazandırmıştır [43]. Bu ayrımın teorik yönleri ise Fisher ve Lerman tarafından ortaya konmuştur. PCR-DGGE’nin çalışma prensibi Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. PCR-DGGE nin çalışma prensibi [46]

DGGE jellerine yüklenen DNA parçaları genellikle PCR ürünleridir [20]. Bu teknikte öncelikle birçok organizmayı içeren bir örnektekten direkt DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hedef bölgeler PCR tekniğiyle amplifiye edilir. Hedef bölge olarak 16S rRNA'nın değişken bölgeleri yaygın bir seçimdir. Bu fragmentler daha sonra DGGE analizine tabi tutulurlar. DGGE jelindeki denaturasyon koşullarını üre ve formamid oluşturur. % 100 denaturasyon jeli % 40 formamid ve 7M üre içerir. Akrilamid solusyonuna düşük ve yüksek konsantrasyonda denatürantlar eklenip düşük solüsyondan yükseğe doğru aşamalı denatürant gradienti oluşturmak için cam plakalar arasına dökülür. Jel döküldükten sonra örneklerin yükleneceği kuyucukları oluşturacak tarak yerleştirilir ve jelin polimer yapısı belirli bir sürede oluşur. DGGE, DNA moleküllerinin çözülmesini sağlamak için 60°C civarında sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilen jel elektroforez tipidir. Dolayısıyla DNA, proteinler ve RNA gibi moleküllerin elektriksel yük ve molekül ağırlığına dayalı bir ayırma tekniği olan elektroforezin temel prensipleri geçerlidir. [20, 44]. DGGE'de negatif yüklü DNA pozitif yüklü elektrot tarafından çekilir ve poliakrilamid jelin porlarından (gözeneklerinden) geçmeye zorlanır (Şekil 3) [20].



Şekil 2.3. Çalışmada kullanılan D-code mutasyon tespit sistemi

En yüksek çözünürlük moleküller özelliklerini tamamen kaybetmedikleri zaman kaydedilir. Bu nedenle 16S rDNA fragmentlerini çoğaltmak için kullanılan PCR primerlerinden birisine 30-40 GC'lik parça eklenmesi DNA parçasının kısmen iki sarmallı kalmasını ve hedef bölgenin en düşük erime alanı içinde kalmasını sağlar [42]. PCR primerlerinin birinin 5' ucuna guanin ve sitozinlerden oluşan bir dizi eklenir. G ve C yönünden zengin olan bu diziye GC klemp (clamp) denir ve yüksek erime bölgesi gibi davranıp iki sarmallı DNA'nın birbirinden tamamen ayrılıp tek sarmal haline dönüşmesini engeller. GC klempinin uzunluğu 30-50 nükleotit arasında değişir. GC klemplere alternatif olarak kimyasal klemplerde kullanılmıştır [26].

DGGE parmak izindeki bantlar etidyum bromür boyama ile ortaya çıkarılabilir. Bunun yanında syber green boyama da DGGE bantlarının görüntülenmesinde alternatif olarak kullanılabilir [20]. SYBR Green'in avantajı arka bölge lekelerinin olmamasıdır bu da daha az miktardaki DNA parçalarının gözlemlenebilmesine imkan sağlar. Daha hassas bir belirleme metodu ise gümüş boyamadır. Ama gümüş boyama tek bantlı DNA'ları da boyar ve gümüş boyalı jeller daha sonra yapılan hibridizasyon analizinde kullanılamazlar [26]. DGGE profilindeki bantlar jelden kesilerek alındıktan sonra dizi analizi ile mikroorganizma türleri tanımlanır. Jelden kesilen bantlara saflaştırma ya da klonlama yapılabilir. Elde edilen saf bantlar dizi analizi için hazırdır [26]. Dizi analizi sonucu elde edilen baz dizileri online veri tabanlarındaki DNA dizileri ile karşılaştırılır. Bu veri tabanlarından en önemlileri EMBL ve Genbank veri tabanlarıdır. Bu veri tabanlarında elde edilen dizileri daha önce depolanmış tüm dizilerle karşılaştırmak için BLAST ya da FASTA gibi algoritmalar kullanılır. Ribosomal

genlerin dizi analizi eldeki veri tabanlarının kapsamına ve güvenilirliğine çok bağlıdır [20,45].

ABD'nin Ulusal Bioteknoloji Enformasyon Merkezinin bünyesindeki (National Center For Biotechnology Information NCBI) BLAST programı, internet erişimiyle kullanılabilmesi, hızı ve hassasiyeti sebebiyle daha popülerdir. Protein ve nükleik asit dizilerinin farklı kombinasyonlarla karşılaştırmaları veri tabanındaki farklı BLAST tipleriyle mümkün olmaktadır [45].

DGGE analizinden önce DNA parçalarının erime özelliklerini belirlemek gerekmektedir. Ayrıca DNA parçalarının en iyi şekilde ayrımını sağlamak için elektroforezin gadiyentini ve süresini optimize etmek gerekmektedir [26].

Denaturant ya da sıcaklık gradiyenti, elektroforez yönüne paralel olarak yukardan aşağıya doğru artan jeller, “paralel gradiyent jeller” olarak isimlendirilir. Paralel gradiyent jellerde bir çok örneğin analizi aynı anda yapılabilir. Paralel jeldeki örneklerin analizinden önce, farklı dizilimdeki DNA parçaları arasındaki maksimum ayrımı sağlamak için gerekli olan elektroforez zamanı belirlenmelidir. Bu amaçla sabit zaman aralıklarında örnekler teker teker paralel jele yüklenirler buna “zaman yolculuğu deneyi (time travel experiment)” denilmektedir [26]. Elektroforez için optimal zaman, paralel gradiyent elektroforez ile belirlenirken, paralel jellerdeki çoklu bant analizi için optimal denaturant gradiyent aralığı dikey (perpendicular) gradiyent jel elektroforezi ile belirlenir.

DNA parçalarının erime özellikleri ve en iyi gradiyent aralığı, dikey gradiyent jeller ile deneysel olarak belirlenebilir. Dikey jellerde, soldan sağa artan denaturantlar ya da sıcaklık gradiyenti vardır ve bu elektroforez yönüne diktir. Örnek jele enine uygulanır ve 3 saat boyunca 200 V da elektroforeze tabi tutulur. Jel etidyum bromide ile boyandıktan sonra UV ışık altında elektroforetik pattern S şeklinde bir eğri olarak görülür. Denaturant konsantrasyonu ya da sıcaklığın düşük olduğu jelin sol tarafındaki DNA molekülleri çift sarmallı DNA olarak göç ederler. Denaturant konsantrasyonu ya da sıcaklığın yüksek olduğu jelin diğer tarafındaki moleküller ise, jel içinde eriyerek zincirleri kırılacağından jeldeki ilerleyişleri durur. Orta seviyedeki denaturant konsantrasyonlarında, değişik erime derecelerine sahip moleküller değişik şekillerde ilerlerler. Fragmentin en düşük erime bölgesinin erime sıcaklığına karşılık gelen denaturasyon konsantrasyonunda, molekülün ilerleyişinde dikey

yönde bir geçiş meydana gelir. Perpendeküler jeller DNA parçalarının erime davranışlarını belirlemek için kullanılır [26].

Bugün PCR-DGGE tekniği yaygın bir şekilde mikrobiyal ekolojide kullanılmaktadır. Karmaşık mikrobiyal toplulukların bakteriyel profilini açığa çıkarmak için, doğal ortamlardan bakteriyel genomik DNA ekstrakte edildikten sonra genellikle 16S rDNA'nın V1, V2-V3, V3 ve V6-V8 gibi değişken bölgeleri PCR ile amplifiye edilmektedir. Böylece örnekte bulunan farklı bakterilere ait PCR ürünlerinin bir karışımı oluşmaktadır. PCR ürünleri daha sonra DGGE ile birbirinden ayrılarak sonuçta her bir örnek için bir dizi bant elde edilmektedir. Bu bantların her biri ise, bakteriyel topluluklardaki baskın bir bireye tekabül etmektedir [26].

Gıda mikrobiyolojisinde PCR-DGGE'nin ilk uygulamaları 1999 yılında Ampe ve ark. tarafından yapılmış ve bir tür fermente mısır hamuru olan pozol kürelerdeki mikrobiyal dağılım belirlenmiştir [47]. Daha sonra yapılan çalışmalarda da başta fermente ürünler olmak üzere pek çok gıdanın mikrobiyal profili PCR-DGGE tekniği kullanılarak incelenmiştir. Örneğin Cecilia ve ark. kuru fermente geleneksel Arjantin peynirinin mikrobiyal popülasyonunu incelemişlerdir. Sonuçta bu teknik kullanılarak *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. curvatus*, *St. saprophyticus*, *St. equorum*, *Pediococcus acidilactici*, *E. faecalis*, *E. flavescentis*, *E. faecium*, *E. mundtii* and *E. durans* türlerini tanımlayabilmişlerdir [28]. Başka bir çalışmada ise bu teknik fermente İtalyan sosislerindeki *Micrococcaceae* türlerini belirlemek için kullanılmıştır [33]. Yine fermente İtalyan sosislerinin fermentasyon sırasındaki bakteriyel popülasyonundaki değişim birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir [48, 54].

PCR-DGGE analizi, direkt örnek matrisine uygulanabildiği gibi katı ya da sıvı besiyeri ortamında kültüre alınan bakteri topluluklarının çeşitliliğini hızlı bir şekilde kontrol etmek için de kullanılabilir. Bu amaçla petride geliştirilen kolonilerin tamamı toplanarak DNA izolasyonunu ve ardından PCR-DGGE analizine tabi tutulur. Sonuçta her bir kültür ortamı veya besiyeri için bir DGGE parmak izi profili elde edilir. Kültür ortamında gelişebilen mikrobiyal toplulukları araştırmak için kullanılan bu metodun gıda mikrobiyolojisinde iyi bir potansiyele sahip alternatif bir yöntem olduğu ortaya konmuştur [20].

PCR-DGGE yaklaşımı gıda fermentasyonlarında önemli rol oynayan ökaryotik toplulukların incelenmesinde de kullanılmaktadır [20]. Ökaryotlar için genellikle 26S rRNA ya da 18S

rRNA'nın hedef bölgelerini amplifiye edecek primer çiftleri dizayn edilmiştir. Örneğin Cocolin ve ark. 26S rRNA geninin PCR-DGGE analizi ile çiğ sütlerin maya populasyonunu araştırmıştır [53]. Başka bir çalışmada ise, bu yöntem *Saccharomyces cerevesia*'nın şarap fermentasyonundaki etkinliğini incelemek için kullanılmıştır [68].

Sonuç olarak birçok araştırmacı tarafından gıda ve içeceklerdeki mikrobiyal çeşitlilik PCR-DGGE ile analiz edilmiştir. Ortaya çıkan mikroorganizma profilleri, gıda ürünlerinin mikrobiyolojik özelliklerinin tanımlanmasına ve kalite kontrollerinin yapılmasına imkan sağlamıştır.

Gıdaların karmaşık yapılarından dolayı nükleik asitlerin izolasyonu bazen çok zor olabilmektedir. Aynı gıda matriksi içerisinde bulunan farklı tür mikroorganizmaların hepsi lysis ajanlarına karşı aynı hassasiyete sahip değildir ve bu farklılık genel olarak mikroorganizmaların hücre duvarı yapısından kaynaklanmaktadır [20]. Bu durum DNA izolasyonuna dayalı analizlerin sonucu üzerinde oldukça etkilidir. Çünkü analiz için ortamdaki bütün mikroorganizma türlerine ait DNA'ları yüksek verimde içeren bir karışımın kullanılması gerekmektedir.

Diğer taraftan gıdanın karmaşık bir yapıya sahip olması, amplifikasyon aşamasını da olumsuz yönde etkileyeceğinden tüm kirliliklerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Gıda matriksleri lipid, protein, karbonhidrat ve tuzlar gibi pek çok doğal bileşeni içerir. Bu moleküllerden bazıları izolasyonun sonuna kadar parçalanmayarak kirlilik meydana getirebilirler. İzole edilen DNA, PCR için bir kalıp olarak kullanılacağından gıda bileşiminden kaynaklanan kirlilikler, PCR analizinde inhibitör olarak etki edebilir [44]. Bu amaçla izolasyonda yüksek verimde ve reaksiyonlarda kalıp olarak kullanılabilen kadar saf bir DNA elde etmek için DNA izolasyon yönteminin optimize edilmesi gerekir.

DGGE ile ayrılacak DNA parçaları 500 baz çiftinden (bç) uzun olmaması bazen mikrobiyal türlerin güvenilir olarak tespitini zorlaştırmaktadır. Çünkü veri tabanı ile karşılaştırılacak olan DGGE bantlarına ait baz dizisi nispeten kısadır. 16S rRNA'nın amplifiye edilen hedef parçalarının dizilimleri, bazen farklı türler arasında bile farklılık göstermeyebilir. Hedef baz dizisi farklı olmayan türleri DGGE ile ayırmak her zaman mümkün değildir. Aynı zamanda dizilim farklı olsa bile 16S rRNA parçaları aynı erime davranışını gösterebilir ve bu yüzden DGGE'de ayrılmazlar. Bu durum elektroforetik şartlardan ve amplifikon-spesifik erime alanlarının oluşumundan oldukça etkilenir [20].

Sonuç olarak, ülkemizde kefirden izole edilen mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla sınırlı sayıda araştırmalar yapılmış ve bu araştırmalarda genellikle geleneksel kültürel metotlar kullanılmıştır. Ancak ülkemizde kefir mikroflorasını oluşturan fermentatif LAB'nin moleküler teknikler ile tanımlanmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. İşte bu nedenle kefire karakteristik nitelikler kazandıran fermentatif bakterilerin hassas ve güvenilir yöntemlerle tanımlanması gerekmektedir. İşte bu çalışmada, kefirin mikroflorasındaki LAB'nin tanımlanmasında; kompleks bakteriyel toplulukların incelenmesinde birçok üstünlük sağlayan, yüksek bir güven aralığında tanımlanmaların yapılabildiği, zaman ve iş yükü açısından da büyük kolaylık sağlayan PCR-DGGE yöntemi, oldukça güvenilir diğer bir yöntem olan 16S rRNA tam sekans analizi ile birlikte kullanılmıştır.

Bugün dünyada fermente süt ürünlerine özgü nitelikleri kazandıran mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler yakından takip edilerek fermentasyonda aktif rol alan bakterilerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Özellikle, DNA'ya dayalı tanımlama teknikleri, özellikle denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) bilinmeyen mutasyonların tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, aynı boyuttaki DNA dizilimleri arasındaki tek bazlık farkı ayırt edebilecek hassasiyete sahip olabilmekle birlikte kısa sürede çok sayıda numunenin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); tek zincirli işaretli prob dsDNA ile aynı ortamda denatüre ve renatüre edildikten sonra DGGE uygulanır. Denaturasyonla dsDNA molekülü ayrılır ve proba komplementer olan zincir, renaturasyon aşamında proba hibridizasyon yapar. Renaturasyona katılmayan probu ortamdan uzaklaştırmak için dışardan proba komplementer olan tek zincirli halkası DNA eklenir. Mutasyon nedeni ile oluşan 'mismatch'ler denature edici ortamda normalden daha yavaş hareket ederler. Mutant/ normal DNA heterodupleksi varsa erime özellikleri ve migrasyonu normale göre değişiktir. Böylece hangi mutasyon olduğu saptanamamakla birlikte ilgili bölgede mutasyonların varlığı gösterilebilir. Bu nedenle günümüzde hız ve hassasiyet açısından en avantajlı mutasyon tarama sistemi olarak kabul edilmektedir.

Ülkemizde ise kefirden izole edilen mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla sınırlı sayıda araştırmalar yapılmış ve bu araştırmalarda da geleneksel kültüre alma metotları kullanılmıştır. Ancak ülkemizde kefir mikroflorasını oluşturan fermentatif

mikroorganizmaların moleküler biyolojik teknikleri ile tanımlanmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. İşte bu nedenle kefire karakteristik nitelikler kazandıran fermentatif bakteri ve mayaların hassas ve güvenilir yöntemlerle tanımlanması gerekmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kefir ve Kefir Tanesi Temini

Bu çalışmada kullanılan taneler, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi (A), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü (C), Ortadoğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (D) ve Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden (B) temin edilmiş ve ayrıca piyasadan toplanan farklı marka [Eker (E), İçim (F), Altıncılık (G) ve Kefir Aktivya (H)] kefir içeceği satın alınarak kullanılmıştır. Kefir taneleri koyu renkli cam şişeler ve steril fizyolojik su içinde, içecekler ise orijinal ambalajlarında laboratuara ulaştırılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1. Kefir Tanelerinin Aktifleştirilmesi

Araştırmada kullanılan kefir taneleri 1/5 oranında UHT süte steril şartlarda mayalanarak 25 °C'de yaklaşık 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda taneler steril süzgeç vasıtasıyla süzülerek üründen ayrılmış ve elde edilen taneler saf su ile yıkanmıştır. Mayalama işlemine sütte gaz oluşumu gözlenene kadar devam edilmiştir. Sütte gaz oluşumu tanelerin aktif hale geldiğinin göstergesidir.

Tanelerin aktif durumda muhafazası buzdolabında +4 °C'de bekletilerek sağlanmıştır. Kısa süre içerisinde kullanılacak taneler +4 °C'de, uzun sürede kullanılacak olanlar ise, -80 °C'de muhafaza edilmiştir [49].

3.2.2. Kefir ve Kefir Tanelerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

3.2.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Kefir tanelerinden 10 g'lık örnek alınarak 90 ml ringer solüsyonu ile süspanse edilmiş ve laboratuvar kurallarına uygun olarak stomacher (Masticator IUL Instruments/Spain) yardımıyla homojenize edilmiştir. Hazırlanan homjenatta (10^{-1} lik dilüsyon) maya ve küf gelişimini önlemek amacı ile 200 ppm cycloheximide ilave edildikten sonra 10^{-1} 'den 10^{-8} 'ye kadar seri dilüsyon hazırlanmıştır. Kefir içecek numunlerinden ise 1 ml örnek alınmış ve 9 ml lik ringer solüsyon içeren tüplere ilave edilerek 10^{-1} 'den 10^{-8} 'ye kadar seri dilüsyon hazırlanmıştır.

Kefir tanesi ve içecek numunelerinin içerdiği laktobasillerin izolasyonu ve mikrobiyolojik sayımı için MRS agar ile laktokoklar ve streptokoklar için ise M17 agar besiyerleri

kullanılmıştır. Her bir dilüsyonundan yüzeye yayma yöntemi ile MRS ve M17 agar bulunan petrilere ekim yapılmıştır ve 30 ± 1 °C’de 72 saat inkübe edilmiştir [50]. MRS agaralı petriler 2.5 litrelik aneorobik kavanoza yerleştirilmiş ve içerisine bir adet Aneorocult C atılarak oluşturulan aneorobik ortamda inkübasyona bırakılmıştır [51]. İnkübasyon sonunda MRS ve M17 agar üzerinde gelişen ve sayılabilir yoğunlukta koloni içeren petrilerde sayım yapılmış ve morfolojik görünimleri birbirinden farklı düz, şekilsiz, yuvarlak, şişkin, yaygın, konveks, mat, parlak, şeffaf, beyaz, renksiz, küçük ve büyük atipik koloniler belirlenmiştir. Seçilen kolonilerden MRS agarda gelişenler MRS agar ortamına, M17 agarda gelişenler ise M17 agar ortamına 3 faz çizilerek saflaştırılmıştır. Bu işleme saf koloniler elde edilinceye kadar devam edilmiştir. Saflaştırma işlemi sırasında seçilen koloniler tekrar agarlı ortama çizilirken kodlama yapılmıştır. Bu kodlamalarda ilk olarak örnek kodu, ikinci olarak dilüsyon numarası ve üçüncü olarak da o dilüsyondan seçilen bakterinin sayısı verilmiştir. Örnek olarak A62 kodu Ankara Üniversitesinden elde edilen kefir tanesi numunesinin 6. dilüsyonundan ekim yapılan petriden seçilen 2. bakteri kolonisini ifade etmektedir. Saflaştırılan bakteri kolonileri, içerisinde 150 µm çapında steril cam boncukların bulunduğu tüplerde %20 oranında gliserol içeren MRS broth içerisine aktararak -80 C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Gram Reaksiyonlarının Belirlenmesi

Gram reaksiyonu için 18-24 saatlik genç kültürler kullanılmıştır. Öze ile temiz bir lam üzerine seçilen kültürlerden alınmıştır. Lama bir damla serum fizyolojik damlatılmış kültür ince bir tabaka oluşturacak şekilde lam üzerine öze ile yayılmıştır. Preparat oda sıcaklığında kuruduktan sonra lamın alt yüzeyi üç kez buzen beki alevinden geçirilmiştir. Daha sonra preparata kristal viyole damlatılmış 1-2 dakika bekletilmiş sonra lugol çözeltisi ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılmış ve ardından tekrar lugol çözeltisi damlatılmış ve 1-2 dakika bekletilmiştir. Saf su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırılmış ve preparata % 95 lik etil alkol damlatılarak 10-15 saniye bekletilmiştir. Lam tekrar damıtık su ile yıkanmış ve sulu füksin çözeltisi damlatılmış 20-30 saniye bekletilmiştir. Son olarak peraparatlar damıtık su ile yıkanmış ve kuruduktan sonra mikroskopta incelenmiştir. Mor bakteriler Gram pozitif (+), pembe bakteriler Gram (-) olarak değerlendirilmiştir [52].

3.2.2.3. Katalaz Reaksiyonlarının Belirlenmesi

Bakteri kültürlerinden öze ile alınıp temiz bir lam üzerine yayılmıştır. Bunu üzerine 1-2 damla baktident katalaz damlatılmıştır. Hava kabarcıkları çıkışı katalaz (+) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.4 Laktik Asit Bakterilerinin 16 S rRNA Tam Sekans Analizi ile Tanımlanması

3.2.2.4.1. Saf Bakterilerden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunun ticari izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmış ve işlem aşamalarında üretici firma tarafından gram pozitif bakteriler için önerilen izolasyon posedürü takip edilmiştir. Buna göre; MRS ve M17 agara ekim yapılan petrilere saflaştırılan ve gram pozitif, katalaz negatif özellik gösteren tipik kolonilerden toplanan 2-3 öze dolusu bakteri, içerisinde 180 µl lizozimli sukroz çözeltisi bulunan 2 ml hacmindeki tüpe aktarılmıştır. Tüpler 5 saniye vortekslenerek 37 °C’de 45 dakika ısıtıcı blok içerisinde (Thermo Cell-HB-202, Bioer /Chine) inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 25 µl proteinaz K ve 200 µl AL buffer (lysis buffer) eklenmiş 15 saniye vortekslenmiş ve 56 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 95 °C’de 15 dakika daha inkübasyon uygulanmıştır. Tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 4 °C’de 10 dakika 5.000 x g hızda santrüfjü (Hettich 22R Zentrifugen/ Germany) edilmiş ve üst faz temiz bir tüpe alınıp alt faz uzaklaştırılmıştır. Üst faza 200 µl etanol ilave edilmiştir. Tüpteki karışım spin kolona alınmış 4 °C’de 1 dakika 6.000 x g hızda santrüfjü edilmiştir. Santrüfjü sonunda tüplere 500 µl AW1 buffer (1. yıkama tamponu) ilave edilmiş ve tekrar 4 °C’de 1 dakika 6.000 x g hızda santrüfjü edilmiştir. Daha sonra tüpe 500 µl AW2 buffer (2. yıkama tamponu) ilave edilmiş ve 4 °C’de 3 dakika 23.000 x g hızda santrüfjü edilmiştir. Santrüfjü sonrasında altta kalan sıvı atılmış ve spin kolonlar ağızları açılarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra spin kolona temiz ependorf tüpü yerleştirilmiş, üzerine 50 µl AE buffer (elasyon buffer) ilave edilmiş ve 4 °C’de 1 dakika 6.000 x g hızda santrüfjü edilmiş. Santrifjü sonrasında ependorf tüpüne geçen DNA’nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede (Shimadzu/ UV-1700 Pharma Spec/ Japan) 260 nm (DNA için) ve 280 nm (protein için) dalga boylarında ölçülmüştür. PCR reaksiyonlarında izole edilen DNA’lardan A₂₆₀/A₂₈₀ değeri 1.8 ile 2.0 arasında olanlar kullanılmıştır.

Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik dansitenin (OD) 50µg/ml’ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA’nın miktarının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{seyreltme oranı} \times 50$$

Lizozimli solüsyonunun hazırlanması:

- 40 mM Tris base'in hazırlanması: 0,484 gr tris base (Sigma/ T6066) tartılıp üzerine 100 ml ultra saf su ilave edilerek pH sı HCl ile 8'e ayarlanmıştır.

-20 mM EDTA'nın hazırlanması: 0.74 gr EDTA (Sigma/ E5134) tartılıp üzerine 100 ml ultra saf su ilave edilmiş ve pH'sı NaOH ile 8'e ayarlanmıştır

- Lizozimli solüsyon için 40 mM tris base'den 50 ml, 20mM EDTA'dan 10 ml alınmıştır ve 1.2 ml Triton X-100 (Sigma T 8787) ilave edilmiştir. Çözeltinin hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Daha sonra soğuyan çözeltiliye 300 mg lizozim ilave edilmiştir.

3.2.2.4.2. 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

M17 ve MRS agarda gelişen saf bakterilerin DNA'ları izole edildikten sonra 16S rRNA bölgesinin tamamı LPW57 ve LPW205 primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (Tablo 3.1). PCR işlemi 25 µl ticari PCR master mix (Qiagen, GmbH / Germany) , 19.4 µl dH₂O, 0.8 µl ileri primer ve 0.8 µl geri primer, 4 µl kalıp DNA'yı içeren toplam 50 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü (Line-gene II, Bioer/ Chine); 95 °C'de 15 dakika ilk denatürasyonun ardından, 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 58 °C'de 1 dakika yapışma ve 72 °C'de 2 dakika uzama aşaması olmak toplam üzere toplam 35 döngü uygulanmış ve en son 72 °C'de 15 dakikada final uzaması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. 16S rRNA tam sekans analizi için kullanılan primerlerin baz dizilimi

Oligonükleotid	Dizi (5'-3')	Amplikon uzunluğu	Literatür
İleri pimer (LPW57)	5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'		
Geri primer (LPW205)	5'-CTTGTTACGACTTCACCC-3'	1515	69

3.2.2.4.3. PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforezinde Kontrolü

Elde edilen PCR ürünleri, 25 µl etidium bromide içeren % 1,5'lik agaroz jele 20 µl yüklendikten sonra 1 x TAE tamponunda, 80 V'da 30 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonucu DNA'ların varlığı ve boyutları kontrol edilmiştir.

3.2.2.4.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünleri ticari saflaştırma kiti (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, GmbH, Germany) kullanılarak saflaştırılmıştır.

Saflaştırma işleminde takip edilen basamaklar şu şekildedir:

- PCR ürününe hacminin beş katı kadar PB buffer (250 µl) eklendikten sonra karışım spin kolona aktarılmıştır.
- Spin kolonlar 4°C’de 45 saniye 17.900 x g hızda santrifüj edilerek DNA’nın kolona tutunması sağlanmıştır.
- Alta geçen sıvı kısım uzaklaştırılmış ve spin kolon temiz bir tüp içine yerleştirilmiştir.
- Spin kolonların içerisine 750 µl PE buffer eklendikten sonra, 4°C’de 45 saniye 17.900 x g hızda santrifüj edilmiştir.
- Spin kolonların altına geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı hızda tekrar santrifüj edilmiş ve kapakları açılarak kuruması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika kadar bekletilmiştir.
- Daha sonra temiz bir tüp içine yerleştirilen spin kolonlara 30 µl EB buffer ilave edilmiştir.
- Spin kolonlar 4°C’de 1 dakika 17.900 x g hızda santrifüj edilerek DNA fragmentleri kolonlardan elüe edilmiştir.

3.2.2.4.5. Dizi Analizi

Saflaştırmış PCR ürünleri dizi analizi için REFGEN’e (Teknokent, ODTÜ, Ankara) gönderilmiştir. REFGEN’den gönderilen dizi analizi sonuçları BLAST sistemi kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır.

3.2.3. PCR-DGGE Tekniği ile Kefir Florasındaki LAB ve Mayaların Tanımlanması

3.2.3.1. Kefir Tanelerinden ve Kefir Örneklerinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda ticari izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmış ve işlem aşamaları üretici firma tarafından önerilen izolasyon prosedürü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kefir örneklerinden 2 ml alınarak 2 ml’lik tüplere aktarılmıştır. Tanelerden ise 10 g numune aseptik koşullarda steril stomacher torbasına (AND/GR-200 /Germany) tartılmış ve 10 ml ringer çözeltisi ile birlikte stomacher yardımı ile homojenize

edilmiştir. Bu homojenizattan steril otomatik pipet yardımı ile 2 ml alınarak 2 ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır. Tüpler 4 °C'de 10 dakika 10.000 x g hızda santrüfuj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra çökelti üzerine 180 µl lizozimli sukroz çözeltisi ilave edilmiş ve 5 saniye vorteksenerek 37 °C'de 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 25 µl proteinaz K ve 200 µl AL buffer (lysis buffer) eklenmiş 15 saniye vorteksenmiş ve 56 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 95 °C'de 15 dakika daha inkübasyon uygulanmıştır. Tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 4 °C'de 10 dakika 5.000 x g hızda santrüfuj (Hettich 22R Zentrifugen/ Germany) edilmiş ve üst faz temiz bir tüpe alınıp alt faz uzaklaştırılmıştır. Üst faza 200 µl etanol ilave edilmiştir. Tüpteki karışım spin kolona alınmış 4 °C'de 1 dakika 6.000 x g hızda santrüfuj edilmiştir. Santrüfuj sonunda tüplere 500 µl AW1 buffer (1. yıkama tamponu) ilave edilmiş ve tekrar 4 °C'de 1 dakika 6.000 x g hızda santrüfuj edilmiştir. Daha sonra tüpe 500 µl AW2 buffer (2. yıkama tamponu) ilave edilmiş ve 4 °C'de 3 dakika 23.000 x g hızda santrüfuj edilmiştir. Santrüfuj sonrasında altta kalan sıvı atılmış ve spin kolonlar ağızları açılarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra spin kolona temiz ependorf tüpü yerleştirilmiş, üzerine 50 µl AE buffer (elusyon buffer) ilave edilmiş ve 4 °C'de 1 dakika 6.000 x g hızda santrüfuj edilmiş. Santrifuj sonrasında ependorf tüpüne geçen DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede (Shimadzu/ UV-1700 Pharma Spec/ Japan) 260 nm (DNA için) ve 280 nm (protein için) dalga boylarında ölçülmüştür. PCR reaksiyonlarında izole edilen DNA'lardan A_{260}/A_{280} değeri 1.8 ile 2.0 arasında olanlar kullanılmıştır.

3.2.3.2. Laktik Asit Bakterilerinin 16 S rRNA V3 Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

DGGE ile analiz için 16S rRNA geni üzerindeki V3 bölgesi, V3GCf ve V3r primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (Tablo 3.2). PCR işlemi 20 µl ticari PCR master mix (Qiagen, GmbH, Germany), 14.02 µl dH₂O, 1.32 µl ileri primer, 0.66 µl geri primer, 4 µl DNA toplam 40 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA'nın V3 bölgesinin amplifikasyonu için, touchdown (iniş kademesi) PCR döngü şartları optimize edilmiştir. Buna göre; 94 °C sıcaklıkta 1 dakika denaturasyon, sonrasında, yapışma sıcaklığı toplam 20 döngüde 61 °C'den 51 °C'ye düşürülmüş ve 51 °C sıcaklıkta 10 döngü daha gerçekleştirilmiştir. Uzama aşaması 72 °C sıcaklıkta 3 dakika uygulanmış ve amplifikasyonu sonlandıran final uzama, 72 °C sıcaklıkta 30 dakikada gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3) [53,54].

Tablo 3.2. V3 bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primerlerin baz dizilimi.

Oligonükleotid	Dizi (5'-3')	Amplikon uzunluğu	Literatür
İleri primer V3f	5'ACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	193 bç	57
Geri primer V3r	5'ATTACCG CGGCTGCTGG-3'		
GC clamp	5'CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGGC-3'		

Tablo 3.3. V3 bölgesinin amplifikasyonu için uygulanan Touchdown PCR döngü şartları

İşlem basamağı	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	10 dak.	1
Denatürasyon	95	1 dak.	20
Yapışma	61→51 (0.5 °C/döngü)	50 s	
Uzama	72	3 dak	
Denatürasyon	95	1 dak.	10
Yapışma	51	50 s	
Uzama	72	3 dak	
Final uzama	72	30 dak.	1

3.2.3.3. Mayaların 26S rRNA D1 Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

DNA izolasyonunda ticari izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmış ve işlem aşamalarında üretici firma tarafından mayalar için önerilen izolasyon posedürü takip edilmiştir. Kefir mikroflorasında bulunan mayaların PCR-DGGE yöntemi ile analizi için 26S rRNA geninin D1 bölgesi üzerinde yaklaşık 250 baz çiftlik (bç) bir fragmenti mayalara spesifik NL1 ve LS2 primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (Cocolin et al. 2000) (Tablo 3.4). PCR karışımı bakterilerin DNA amplifikasyonunda olduğu gibi hazırlanarak ve döngü şartları optimize edilmiştir.

Tablo 3.4. Mayaların 26S rRNA geni D1 bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primerlerin baz dizilimi.

Oligonükleotid	Dizi (5'-3')	Amplikon uzunluğu
NL1GC	5'GCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGG AGGAAAAG-3'	

NL1	5'-GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	250 bç
LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'	

3.2.3.4. DGGE Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

% 40 lık akrilamid/bis (37.5:1) hazırlanması: 38.93 g akrilamid (Sigma/ A9099) ve 1.07 g bis-akrilamid (Sigma/ M7279) tartılmıştır ve dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.45µl'lik filtreden geçirilerek 4 °C'de muhafaza edilmiştir

50 x TAE tamponunun hazırlanması: 242 g tris base (Sigma/ T6066), 57.1 ml glacial asetik asit (SigmaA 9977), 100 ml 0.5 M EDTA (Sigma/ E5134) (pH 8.0), dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım 120 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1 x TAE yürütme tamponunun hazırlanması: 140 ml 50 x TAE tamponuna 6860 ml dH₂O ilave edilerek toplam hacim 7.000 ml tamamlanmıştır.

% 10 luk amonyum persulfat hazırlanması: 1 g amonyum persulfat (Sigma/ A9164) tartılıp dH₂O ile 10 ml' ye tamamlanmıştır, -20 °C'de muhafaza edilmiş ve bir hafta boyunca kullanılmıştır.

Dcode Boyama Solüsyonunun hazırlanması: 0.1 g bromfenol blue-xylene cyanol (Sigma/ B3269), 1 x TAE tamponu ile 10 ml'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Dcode 2x Jel Yükleme Boyası Solüsyonu hazırlanması: 0.50 ml %2lik bromfenol blue-xylene cyanol (Sigma/ B3269), 7 ml gliserol (Sigma /G5516), 2.5 ml dH₂O ile 10 ml' ye tamamlanmıştır.

% 8 lik % 55 denatürant içeren jelin (high jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 22 ml deiyonize formamid (Sigma/ F9036), 23.1 g üre (Sigma/ U5378) ve 2 ml 50 x TAE tamponu dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 20 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

% 8 lik % 15 denatürant içeren jelin (low jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 6 ml deiyonize formamid, 6.3 g üre ve 2 ml 50 x TAE tamponu, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 20 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

% 8 lik % 60 denatürant içeren jelin (high jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 24 ml deiyonize formamid (Sigma/ F9036), 25.2 g üre (Sigma/ U5378) ve 2 ml 50 x TAE tamponu dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 20 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

% 8 lik % 30 denatürant içeren jelin (low jel) hazırlanması: 20 ml % 40 akrilamid / bis (37.5:1), 12 ml deiyonize formamid, 12.6 g üre ve 2 ml 50 x TAE tamponu, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ultrasonik su banyosunda 20 dakika degaz edilmiş ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

3.2.3.5. Poliakrilamid jelin hazırlanması

Laktik asit bakterileri için yüksek konsantrasyonlu (% 55) ve düşük konsantrasyonlu (%15) solüsyonların, mayalar için ise yüksek konsantrasyonlu (% 60) ve düşük konsantrasyonlu (%30) solüsyonların her birinden 20 ml kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyonlu solüsyona jeli renklendirerek görünürlüğünü sağlamak amacı ile 400 µl Dcode Boyama Solüsyonu ilave edilmiştir. Her iki solüsyonada jelleşmeyi sağlamak amacı ile 14 µl TEMET (Tetrametilendiamin/ Sigma) ve 140 µl % 10'luk APS (Amonyum Persülfat/ Sigma) eklenmiştir.

Gradient jel oluturmak için DGGE (Dcode Universal Mutation Detection System /BioRad) sisteminin özel jel dökme aparatından faydalanılmıştır. 30 ml'lik enjektörlerden birine %15, diğerine %55 denaturant içeren jel enjektörle çekilerek gradiyenti jel oluşturacak olan aparata yerleştirilmiştir. Denaturant konsantrasyonu jelin altından üstüne doğru azalacak (%55 → %15) şekilde cam plakalar arasına yaklaşık 10 ml/dak hızla jel dökülmüş ve ardından kuyucukları oluşturacak olan tarak yerleştirilmiştir. Jelin polimerleşmesi için minimum 2 saat beklenmiştir. Diğer taraftan DGGE tankına 7 litre 1 x TAE tampon konulmuş ve 60 °C sabit sıcaklığa ulaşınca kadar ısıtılmıştır. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki tarak çıkarılarak tanka yerleştirilmiş ve oluşan kuyucuklar önce 1 x TAE tamponla yıkanmıştır. Daha sonra 40

µl PCR ürünleri ve 7 µl jel yükleme boyası karışımı kuyucuklara sırası ile yüklenmiştir. Tampon sıcaklığı 60 °C'ye ayarlanmış ve sistemin pompa çalıştırılmıştır. Sistem güç kaynağına bağlanarak örnekler önce 50 V'da 10 dakika ardından 200 V'da 3.5 saat elektrik akımı uygulanmıştır. Elektroforez sonunda tanktan çıkarılan jel 50 µg/ml etidyum bromide (Sigma / E1510) içeren 1xTAE buffer içerisinde 20 dakika bekletildikten sonra 5 dakika saf içerisinde bekletilerek yıkanmıştır. Oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (GelDoc XR/BioRad) görüntülenmiştir.

3.2.3.6. DGGE bantlarının jelden alınması ve saflaştırılması

DGGE jelinde ayrılan bantlar steril pipet ucu ile kesilerek jelden alınmıştır. Kesilen bantlar, içerisinde 50 ml steril saf su bulunan tüplere aktarılmış ve DNA fragmentlerinin suya geçmesi için iki gün 4°C'de bekletilmiştir. Suya geçen DNA fragmentleri kullanılarak laktik asit bakterileri için V3 bölgesi V3GCf ve V3r primerleri ile, mayalar için D1 bölgesi NL1GC ve LS2 primerleri ile tekrar amplifiye edilmiş ve PCR ürünlerinin saflığı DGGE ile kontrol edilmiştir. Tek tek yürüyen bantlar jelden kesilerek alınmış ve yine 50 ml steril saf su bulunan tüplere aktarılarak DNA fragmentlerinin suya geçmesi için iki gün 4°C'de bekletilmiştir. Suya geçen DNA fragmentleri bu kez laktik asit bakterileri için V3f ve V3r primerleri ve mayalar için NL1 ve LS2 primerleri ile tekrar amplifiye edilmiştir. PCR işlemi için 25 µl ticari PCR master mix (Qiagen, GmbH, Germany), 0.8 µl V3f primer, 0.8 µl V3r primer, 4 µl DNA kullanılmış ve toplam dH₂O ile 50 µl hacime tamamlanmıştır. PCR termal döngü şartları; 95 °C'de 10 dakika boyunca ilk denaturasyon, sonrasında 95 °C'de 1 dak. denaturasyonla birlikte 57°C'de 50 sn. yapışma ve 72 °C'de 1 dak. uzama 40 döngü süresince uygulanmıştır. Final uzama aşaması 72 °C'de 15 dak. olarak gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromide içeren % 2'lik (w/v) agaroz jelde 80 V'de 1 saat yürütülerek amplifikasyon ürünlerinin varlığı ve büyüklüğü kontrol edilmiştir.

3.2.3.7. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Dizi Analizi

PCR ürünleri ticari saflaştırma kiti (QIAquick PCR Purification KIT, Qiagen, GmbH, Germany) kullanılarak 3.2.2.7.'de bildirilen şekilde saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünleri dizi analizi için REFGEN'e gönderilmiştir. REFGEN'den gönderilen dizi analizi sonuçları BLAST sistemi kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

a. LAB Sayım Sonuçları

Bu çalışmanın ilk aşamasında, dört farklı üniversiteden temin edilen kefir taneleri ve piyasadan temin edilen dört farklı marka kefirten alınan numunelerin seri dilisyonları hazırlanarak MRS ve M17 besiyerlerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerde gelişen koloniler sayılmış ve koloni sayım sonuçlarının ortalama değerleri, numunelere göre aşağıda Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Örneklerin LAB Sayım Sonuçları

Besiyeri	A	B	C	D	E	F	G	H
MRS	7.5×10^6 kob/ml	4.6×10^6 kob/ml	4.7×10^6 kob/ml	1.08×10^8 kob/ml	3.3×10^6 kob/ml	3.9×10^6 kob/ml	1.03×10^8 kob/ml	7.5×10^7 kob/ml
M17	3.5×10^6 kob/ml	3.6×10^5 kob/ml	3.2×10^6 kob/ml	5.7×10^6 kob/ml	2.0×10^8 kob/ml	3.7×10^7 kob/ml	2.3×10^8 kob/ml	3.4×10^7 kob/ml

MRS ve M17 besiyerinde morfolojik görünümleri birbirinden farklı tipik ve atipik koloniler seçilmiş ve MRS agarda gelişenler MRS agar ortamına, M17 agarda gelişenler ise M17 agar ortamına 3 faz çizilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan kolonilere Gram boyama ve katalaz testleri uygulanmış ve sonuçta toplam 44 adet bakteri izolatının tümünün gram pozitif, 38 tanesinin de katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

b. Kefir Mikroflorasının PCR-DGGE Analiz Sonuçları

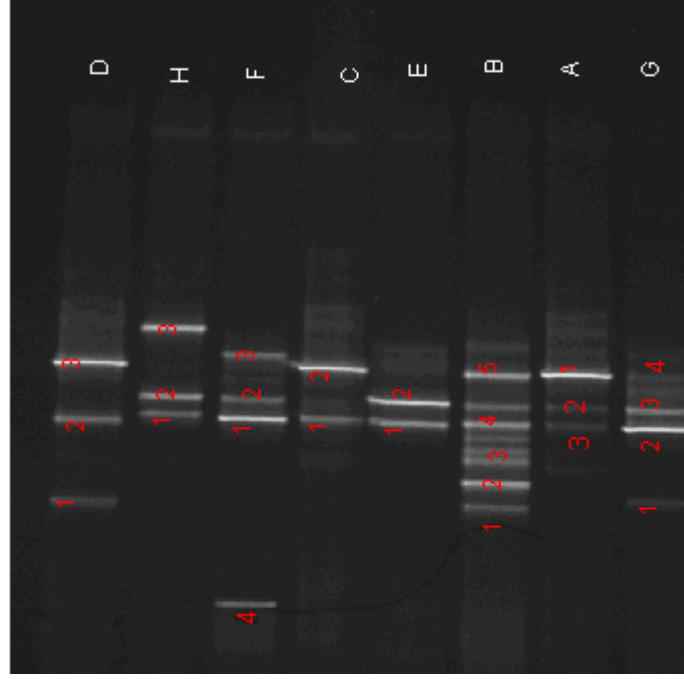
Kefir ve kefir tane örneklerinde direkt DNA izolasyonu yapılarak amplifiye edilen 16S rRNA’nın değişken V3 bölgelerinden elde edilen DNA fragmentleri DGGE analizi ile tanımlanmıştır. Sekiz örneğe ait DGGE profiline ait jel görüntüsü Şekil 1 ve Şekil 2’de, tanımlanan mikroorganizmalar ise Tablo 4.3’de verilmiştir.

Kefir ve kefir tane örneklerinin PCR-DGGE analizine göre toplam 26 bant analiz edilmiştir. Bunlardan 5 tanesini 16 S rRNA tam sekans analizi ile tespit edilmeyen *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* oluşturmuştur. Diğer banların 5 tanesini *Lc. lactis* subsp. *lactis*, 2 tanesini ise *St. thermophilus* olarak tanımlanmış *Lb. kefiri*, *Lb. buchneri*, *Lb. sunkii* ve *Lb. otakiensis*’in V3 bölgesinin baz dizilimi homolog olduğundan bu bakterilerin ayrımı mümkün olmamıştır. Kefir ve kefir tane örneklerinde tespit edilen diğer laktik asit bakterilerini *Lc. jensenii*, *Lc. raffinolactis*, *Lb. helveticus* oluşturmuştur. Bunların dışında *Aeromonas media*,

Aeromonas hydrophila, *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus* sp ve *Bifidobacterium* sp, gibi laktik asit bakterilerinin dışında diğer türlere ait bakteriler de tespit edilmiştir.

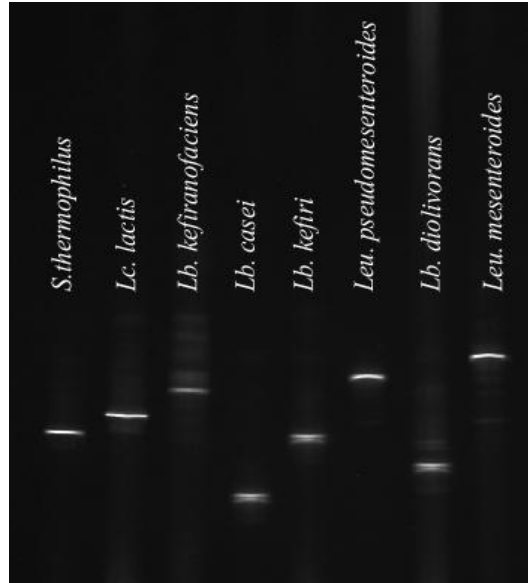
Kefir ve kefir grain örneklerinin PCR-DGGE analizi sonucunda toplam 10 farklı bakteri türü tespit edilmiştir. Kefir tanelerinde *Lb. kefiranofaciens* ve *Lb. kefiri*/ *Lb. buchneri*/ *Lb. sunkii*/ *Lb. otakiensis* en dominant türler olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Lb. kefiri*/ *Lb. buchneri*/ *Lb. sunkii*/ *Lb. otakiensis* türleri DGGE ile birbirinden ayıramamıştır. PCR-DGGE analizinde 16 S rRNA'nın yaklaşık 193 bp'lik bir fragmenti analizi edildiği için bazı türleri ayırmak için bu bölgedeki değişkenlik yetersiz olabilmektedir. Ancak saf bakteri izolatlarının 16 S DNA sequence analizi sonucunda bu türlerden yalnızca *Lb. kefiri* tespit edildiği için elde edilen bu DGGE bandının büyük bir ihtimalle *Lb. kefiri* olabileceği düşünülmüştür. Kefir numunelerinin tümünde *Lc. lactis* tespit edilmesine rağmen kefir tanelerinin yalnızca bir tanesinde (A) *Lc. lactis* tespit edilmiştir. Diğer taraftan kefir örneklerinin hiç birinde *Lb. kefiranofaciens* tespit edilmemiştir. Kefir numunelerinin 2 tanesinde (E,G) *St. thermophilus* ve bir tanesinde (H) *Lb. kefiri*/ *Lb. buchneri*/ *Lb. sunkii*/ *Lb. otakiensis* ve *Lc. raffinolactis*, bir tanesinde de (F) *Lactobacillus acidophilus* ve *Lb. helveticus* tespit edilmiştir. Ayrıca üç farklı tür *Bifidobacterium* sp., *Aeromonas* spp. and *Paenibacillus* sp. Kefir ve kefir tane örneklerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

DGGE analizi kefir ve kefir grain örneklerinden izole edilen ve 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanan LAB izolatlarına uygulanmıştır. Bütün LAB türleri tek bir band vermiş ve tüm türler birbirlerinden farklı bir DGGE profili göstermişlerdir (Şekil 4.2). PCR-DGGE analizi ile *Lb. kefiranofaciens*, *Lc. lactis*, *St. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lc. raffinolactis*, *Lb. casei*, *Lb. kefiri*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leu. mesenteroides* başarılı olarak DGGE ile ayrılmıştır.



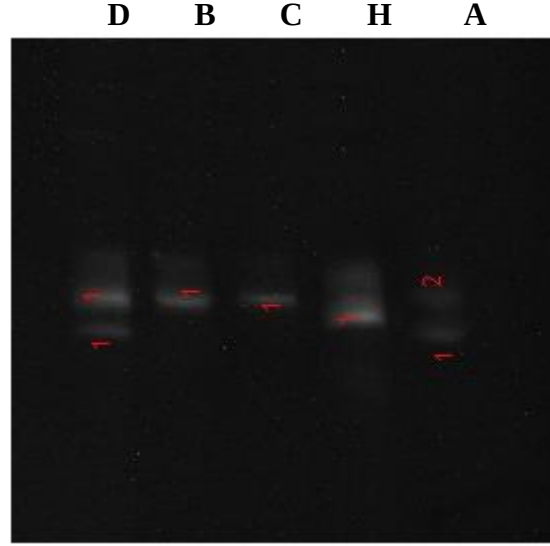
Şekil 4.1. Kefir ve kefir tane örneklerinin V3 bölgesine göre PCR-DGGE analizi.

(**D1:***Paenibacillus apiarius*, **D2:** *Bacillus* sp., **D3:** *Lb. kefiranofaciens*, **H1:** *Lb. buchneri*, *Lb. sunkii*, *Lb. kefir*, *Lb. otakiensis*, **H2:** *Lc. lactis*, **H3:** *Lc. raffinolactis*, **F1:** *Lc. jensenii*, **F2:** *Lc. lactis*, **F3:** *Lb. helveticus*, **F4:** *Bifidobacterium* sp., **C1:** *Lb. buchneri*, *Lb. sunkii*, *Lb. kefir*, *Lb. otakiensis*, **C2:** *Lb. kefiranofaciens*, **E1:** *St. Thermophilus*, **E2:** *Lc. Lactis*, **B1:** *Aeromonas media*, **B2:** *Aeromonas hydrophila*, **B3:** *Aeromonas hydrophila*, **B4:** Tanımlanamadı, **B5:** *Lb.Kefiranofaciens*, **A1:** *Lb. kefiranofaciens*, **A2:** *Lc. Lactis*, **A3:** *Lb. buchneri*, *Lb. sunkii*, *Lb. kefir*, *Lb. otakiensis*, **G1:** *Aeromonas hydrophila*, **G2:** *St. thermophilus*, **G3:***Lc. lactis*)



Şekil 4.2. Kefir ve kefir tanelerinden izole edilen bakterilerin DGGE profili.

Kefir ve kefir tane örneklerinin maya florasını belirlemek amacıyla direkt DNA izolasyonu yapıldıktan sonra NL1 ve LS2 primerleri ile amplifiye edilen 26S rRNA'nın D1 bölgesine ait DNA fragmentleri DGGE ile analiz edilmiştir. Örneklerin DGGE profiline ait jel görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir. Kefir ve kefir tane örneklerinin PCR-DGGE analizine göre *Galactomyces geotrichum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida sake*, *Kazachstania exigua*, *Saccharomyces cerevisiae* olmak üzere toplam 5 farklı maya türü tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Kefir ve kefir tane örneklerinin 26S rRNA D1 bölgesine göre PCR-DGGE analizi.

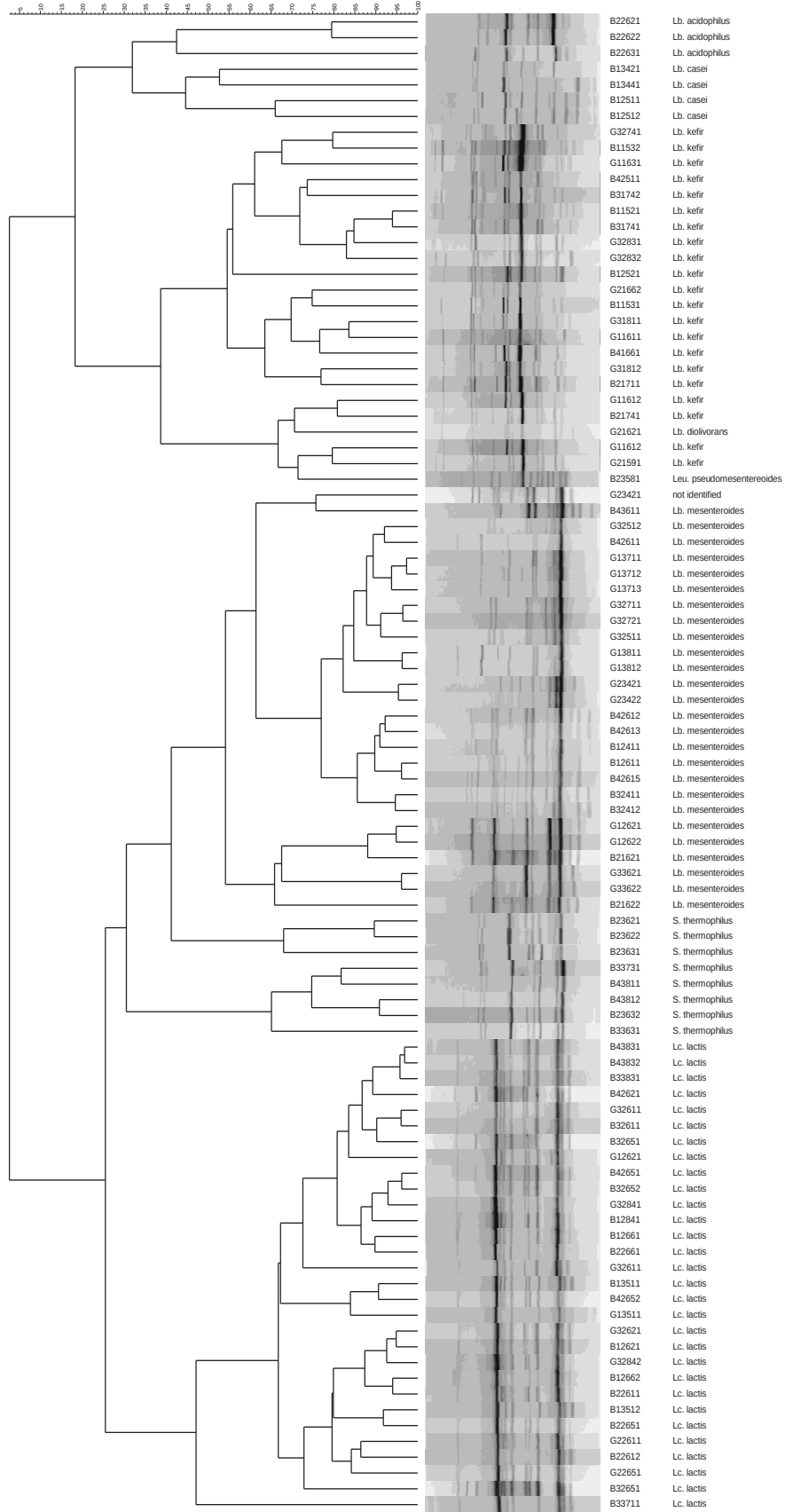
A1: *Galactomyces geotrichum*, A2: *Kluyveromyces marxianus*, H1: *Candida sake*, C1: *Kazachstania exigua*, B1: *Saccharomyces cerevisiae*, D1: *Galactomyces geotrichum*, D2: *Kluyveromyces marxianus*

4.3. Rep-PCR Fingerprint Analizi

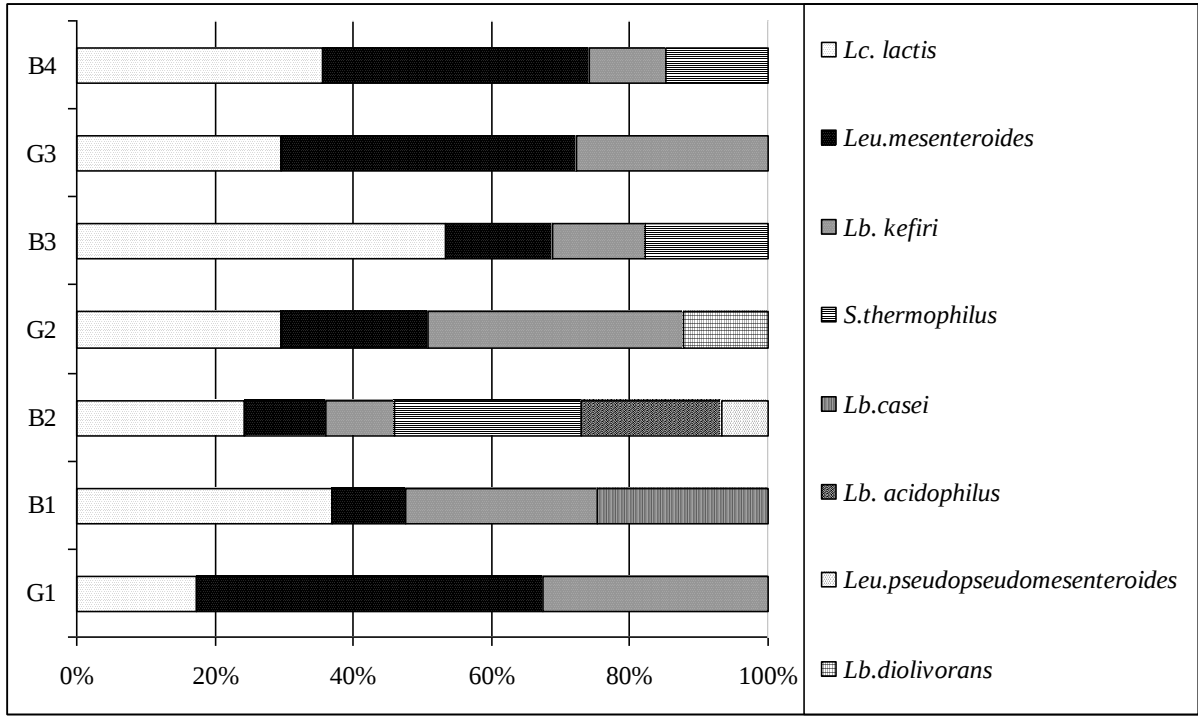
Kefir taneleri ve içecek numunelerinden izole edilen laktik asit bakterilerin (GTG)₅-PCR fingerprint analizi kullanılarak bakteriyel dağılımı belirlenmiştir (Şekil 4.4). Örneklerden MRS agara anaerobik şartlarda ve M17 agara da aerobik şartlarda ekim yapılmıştır. Her iki ortamdan saflaştırılan izolatlar uygulanan GTG5 analizi sonucunda farklı bant profili veren izolatlardan rastgele 3-5 adet seçilerek ve toplam 43 izolat 16 SrRNA sekans analizine tabi tutulmuştur. Toplam 43 adet izolatın 16 S rRNA sequence analizi sonucunda *Leu. mesenteroides* (12 adet), *Lc. lactis* (10 adet) ve *L. kefir* (10 adet)'nin dominant türler olduğu tespit edilmiştir (Şekl 4.5). İlginç bir sonuç olarak, DGGE analizi ile kefir grainlerin tümünde tespit edilen *L. kefiranofaciens*, culture-dependent method ile detecte edilememiştir. Benzer olarak PCR-DGGE ile *L.helveticus* (F) ve *L. rafinolactis* (H) sırasıyla F ve H örneklerinde tespit edilmesine rağmen kültür bağımlı yöntemle tespit edilememiştir. Bu durumun

muhtemelen bu türlerin gelişmesi için gerekli supplementlerin besiyerinde bulunmamasından ileri geldiği düşünülmektedir. Bu sonuç, kefir tanelerinin taşınması sırasında bu türlerin hasar görmesi veya inaktive olması ile açıklanmıştır.

DGGE analizinde olduğu gibi 16 SrRNA sekans analizi ile de *L. acidophilus* yalnızca F numunesinde tespit edilmiştir. Diğer taraftan DGGE analizi ile yalnızca E ve G örneğinde tespit edilen *St. thermophilus*, 16 S rDNA anazi ile bu örneklerin dışında bir de F örneğinde tespit edilmiştir. 16 S rDNA sequence analizi ile tanımlanan türlerin %30'unu oluşturan *Leu.mesentreoides* ve yalnızca bir kefir örneğinde tespit edilen *L.casei*, PCR-DGGE analizinde tespit edilememiştir. Bu durum bu örneklere ait DNA'ların kalitelerinin PCR için uygun olmaması ile açıklanmıştır.



Şekil 4.4.Kefir örneklerinden izole edilen LAB'nin Dendrogram ve rep-PCR bant profili.



Şekil 4.5. Kefir örneklerinden izole edilen kültür bağımlı metodalarla tanımlanan LAB'nin dağılım frekansı

5. SONUÇ

Gıda bulunan mikroorganizmaların tanımlanması ve tespiti gıda endüstrisinde hijyen ve izlenebilirlik açısından çok önemlidir. Farklı laboratuvarlarda gıda kaynaklı mikroorganizmaların tanımlanabilmesi için DNA tabanlı farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu teknikler bakterilerin 16S rRNA'ları üzerindeki V3 bölgeleri ve 26S rRNA'nın D1, D2 domainlerinin farklılıklarına göre mikrobiyal çeşitliliği değerlendirmek için geliştirilmiş ve geniş kullanım alanı bulmuştur. [55,56,57,58,59].

Genetik parmak izi teknikleri belirli bir bölgedeki mikroorganizmaların genetik çeşitliliğini gösterebilmektedir. DGGE kültürel olmayan genetik parmak izi teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Gıda numunelerinden elde edilen DGGE profillerinin analizi ile bakteriyel türlerin tanımlanmasının mümkün oluşu, gıda mikrobiyolojisi alanındaki analiz metotlarına önemli bir yenilik getirmiştir [20].

Farklı yöntemlerle kefirin mikroflorasının belirlendiği birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bir çoğunda kefir ve kefir tanesinde bulunan mikroorganizmalar geleneksel metotla tanımlanmaya çalışılmıştır [9, 10, 15].

Oysaki DNA ve PCR temelli genomik fingerprint metotlarının, mikroorganizmaları karakterize etmek ve tiplendirmek için hızlı, güvenilir ve basit yöntemler olduğu açıktır. Bu çalışmada da kefir ve kefir tanelerinde kültüre alınmadan direk izole edilen bakteri DNA'ları, PCR-DGGE sistemi ile analiz edilmiştir. Diğer taraftan kültüre alınan örneklerden izole bakteriler, yine genotipik bir metot olan 16S rRNA tam sekans analizi ile tanımlanmıştır. Aynı zamanda PCR-DGGE analiz sonuçları, sekans analizi ile desteklenmiştir.

Kefir ve kefir tanelerinden direkt DNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilen PCR-DGGE yöntemi ile farklı türlere ait 12 bakteri tanımlanmıştır. Bunlar: *Lb. kefiranofaciens*, *Aeromonas media*, (*Lb. buchneri* *Lb. kefiri*, *Lb. sunkii*, *Lb. otakiensis*), *St. thermophilus*, *Lc. lactis*, *Lc. raffinolactis*, *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus* sp, *Aeromonas hydrophila*, *Bifidobacterium*, *Lb. helveticus*, *Lb. jensenii* dir.

Kültüre alınarak saflaştırılan bakterilerin 16S rRNA tam sekans analizi ile tanımlanması sonucu, MRS ve M17 agarda gelişen toplamda 11 farklı bakteri türü tanımlanmıştır. Bunlar: *Lc. lactis*, *Leu. mesenteroides*, *St. epidermidis*, *St. thermophilus*, *Leu. pseudomesenteroides*,

Lb. casei, *Lb. kefir*, *Pseudomonas* sp, *Acetobacter ghanensis*, *Lb. diolivorans*, *Lb. acidophilus*'dur. Bu bakterilerden *Leu. mesenteroides*, *St. epidermidis*, *Leu. pseudomesenteroides*, *Lb. casei*, *Pseudomonas* sp, *Acetobacter ghanensis*, *Lb diolivorans*, *Lb. acidophilus* türleri, PCR-DGGE yöntemi ile tanımlanamamıştır. Çalışma sonucunda farklı kefir ve kefir tane örneklerinde toplamda 14 farklı laktik asit bakterisi, bir asetik asit bakterisi ve 5 patojen bakteri tanımlanmıştır.

Bu çalışmada kefir tane ve kefir örneklerinden kültüre alınarak ve alınmadan tanımlanan toplam 63 bakteriden 14 çeşit laktik asit bakterisi tanımlanmıştır [*Lb casei*, *Lb acidophilus*, (*Lb kefir*, *Lb buchneri*, *Lb. Sunkii*, , *Lb. otakiensis*), *Lb diolivorans*, *Lb kefiranofaciens*, *Lb jenseni*, *Lc.lactis*, *Lc.raffinolactis*, *Leu.mesenteroides*, *Leu.pseudomesenteroides*, *St.epidermidis*, *St. thermophilus*, *Lb.helveticus*, *Bifidobacterium* sp.. Aynı şekilde mayaların tanımlanması için 26S rRNA'nın D1 bölgesine ait DNA fragmentleri analiz edilerek 5 farklı maya türü (*Galactomyces geotrichum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida sake*, *Kazachstania exigua*, *Saccharomyces cerevisiae*)

Kefir tanelerindeki mikrobiyal floranın incelendiği pek çok çalışmada en yaygınının *Lactobacillus* türüne ait bakterilerin olduğunu belirlenmiştir [60]. Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan mikroorganizmaları kapsar. Bu bakteriler sütte bulunan laktozu parçalayarak galaktoz ve glikoz oluşturlar [9,10]. Çalışmamızın sonucunda laktik asit bakterilerinin % 53'ünü laktobasillerin oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Simova ve ark. [15] kefirde bulunan LAB ve mayaları izole etmiş ve tanımlamışlardır. Sonuçta toplam mikrobiyal floranın %58-70'ne tekabül eden *Lc. Lactis'in* dominant mikroorganizma olduğu bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada da hem 16S rRNA tam sekans analizi, hem de PCR- DGGE yöntemi ile yapılan tanımlamalarda dominant türün *Lc. lactis* olduğu belirlenmiştir. 16S rRNA tam sekans analizine göre tanımlanan türler arasında *Lb. kefirin'nin*, PCR-DGGE de tanımlanan türler arasında ise *Lb. kefiranofaciens'in* ikinci derecede dominant tür olduğu belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda homofermentatif laktobasillerden *Lb. kefir*'nin bakteriyel floranın en önemli bölümünü oluşturduğu bulunmuştur. Kefirde tanımlanan diğer bir *Lactobacillus* türü olan *Lb. kefiranofaciens'in* tanenin dış polisakkarid katmanını ürettiği bildirilmektedir. "kefiran" olarak bilinen bu

polimer eşit oranlarda glikoz ve galaktoz içermekte ve kefir danesinin en az % 25'ini oluşturmaktadır [65].

Bu çalışmada, *Lb. kefir* 16 S rRNA sekans analizine göre tanımlanan toplam bakterilerin %22 sini oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak bu bakterinin V3 bölgesinin baz dizisi, *Lb.buchneri* *Lb. kefir*, *Lb. sunkii* ile homolog olduğu için PCR-DGGE yöntemi ile tek başına tanımlanması mümkün olmamıştır. Bu durum PCR-DGGE tekniğinin zayıf yönlerinden biri olarak düşünülmektedir

Jianzhong ve ark [55] Tibet kefir tanelerinin mikrobiyal çeşitliliğini PCR-DGGE kullanarak incelemiştir. İncelenen kefir tanelerinin bakteri topluluğunun mayadan çok daha karmaşık olduğunu bildirilmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucu *Pseudomonas sp.*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lc. lactis*, *Lb. kefir*, *Lb. casei* ve *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyce cerevisiae*, *Kazachstania exigua* türlerini tanımlanmıştır. Tibet'in üç farklı bölgesinden temin edilen kefir taneleri arasında %78-84 oranında benzerlik gösteren bu bakteri profilinde, dominant mikroorganizmanın *Lc.lactis* olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar diğer dominant türün *Leu.mesenteroides* olduğunu bildirmişlerdir [55].

Bu çalışmada da kefir ve kefir tane örneklerinin 16 S rRNA tam sekans analizine göre tanımlanan bakterilerin %20'sini *Leu. mesenteroides*'in oluşturduğu bulunmuştur. Bu bakteri aroma üreten bir heterofermentatif laktik asit bakterisidir, laktozu laktik asit, asetik asit, etanol ve karbondioksit ve sitrik asidi diasetile indirgeyebilir ve bu sırada arzu edilen bir aroma üretir. Bu nedenle bazı ülkelerde süt ürünlerinin fermentasyonunda *Leu. mesenteroides*, *Lb. lactis* ile birlikte kullanılmaktadır [55].

Yapılan çalışmada yalnızca bir kefir örneğinde *Lb. casei* türüne rastlanmıştır. Xiao ve Dong [61] da süt ürünleri üzerine yaptıkları bir çalışmada *Lb. casei* ve *Lactobacillus sp.* grubu (*Lb. acidophilus* ile homolog) mikroorganizmaların, *Lb. lactis* ve *Leu. mesenteroides*'den sonra diğer dominant homofermentatif laktobasiller olduğunu bildirmişlerdir.. Bunlar, laktik asitten süt asiti üreten bu mikroorganizmalar probiyotiktir ve intestinal sistem üzerinde faydalı etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Garbes ve ark. [57] kefir tanelerindeki mikroorganizmaları PCR-DGGE yöntemi ile incelemiştir. Bakteriyel DGGE profilindeki bantlar *Lb. brevis*, *Lb. helveticus*, *Lb.*

fermentum, *Lb. Crispatus*, *Lb. Curvatus*, *Lb. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak *Lb. crispatus* ve *Lb. gallinarum* kefir tanelerinden izole edilmiştir [57]. Literatürde bu bakterilerle genotipik olarak farklılık göstermesine rağmen fenotipik testlerle ayrılması oldukça zor olan *Lb. acidophilus*'un, kefir tanelerinden yaygın olarak izole edildiği bildirmiştir. Bu durum geleneksel tanımlama metotlarıyla aslında kefir tanelerinde mevcut olan bu bakterilerin *Lb. acidophilus* olarak tanımlanmış olabileceği fikrini akıllara getirmiştir. Diğer taraftan araştırmacılar [57] V3 bölgesinin PCR tabanlı DGGE analizi ile hiçbir asetik asit bakterisinin gözlenemediğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da kültüre alınan örneklerin 16S rRNA tam sekans analizi ile *Acetobacter ghanensis*'in varlığı belirlendiği halde bu bakteri DGGE analiz ile tespit edilememiştir.

Çalışmada örneklerden anaerobik şartlarda MRS agara ve aerobik şartlarda M17 agara ekim yapılmıştır. Her iki ortamda da *Lc. lactis*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides* bakterileri tanımlanmıştır. Sadece M17 ortamında tanımlanan bakteriler *St. epidermidis*, *St. thermophilus*, *Lb. casei* iken sadece MRS ortamında gelişen bakteriler ise *Acetobacter ghanensis*, *Lb. kefir*, *Lb. diolivorans*'dır. Chen ve ark. [60], Tayvan orijinli kefir tanelerinden aerobik ve anaerobik şartlarda MRS agara ve aerobik şartlarda M17 agara ekim yapmışlardır. *Lb. kefiranofaciens* ve *Lc. lactis* her üç ortamda da geliştiği halde *Lb. kefir* ve *Leu. mesenteroides* yalnızca aerobik şartlarda inkübe edilen MRS agardan izole edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada 16S rRNA tam sekans analizi ile hem kefir hem de kefir tane örneklerinde *Leu.mesenteroides*, *Lc.lactis*, *Lc.casei*, *Lb.kefir* tanımlanırken *St.thermophilus*, *St.edidermis*, *Leu.pseudeomesenteroides*, *Lc.casei*, *Lb.acidophilus* yalnızca kefirde, *Lb.diolivarans*, *Acetobacter ghanensis*, *Pseudomonas sp* ise yalnızca tanelerde, tanımlanabilmiştir.

Kefir ve kefir tanelerinin PCR-DGGE ile yapılan analizinde ise; kefirlerde (*St. thermophilus* *Lc.lactis*, *Lb.jenseni*, *Lb.kefiranofaciens*, *Lb.kefir*, *Lc.raffinolactis*, *Aeromonas hydrophila*, *Lb.helveticus*), tanelerde (*Lc.lactis*, *Lb. kefiranofaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas media*, *Lb.bunchneri*, *Lb.sunki*, *Lb.kefir*, *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus sp.*) tespit edilmiştir.

Gıdalardaki mikrobiyal toplulukların ön zenginleştirme adımları olmadan DGGE analizi ile belirlenmesi için farklı primerler dizayn edilmiştir [20]. 16S rRNA'nın V3 bölgesi kompleks mikrobiyal toplulukların tanımlanmasında oldukça yaygın kullanılan bir bölgedir. Birçok

mikrobiyolojik ekim prosedürünün kısmen seçici olması ve mikroorganizmaların bir kısmının bu besiyerlerinde gelişememesi nedeniyle, kefir tanelerindeki bakteri türlerinin direkt tanımlanmasında PCR-DGGE tekniği kullanılmaktadır [53]. Chen ve ark. [60] tarafından yapılan bir çalışmada İlan kefir örneğinde kültürel yöntemlerle saptanamayan *Lc. lactis* PCR-DGGE tekniği ile saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. buchneri*, *Lb. jenseni*, *Lc. raffinolactis*, *Lb. helveticus* türleri direk örnekten izole edilen DNA'ların PCR-DGGE sisteminde analiz ile tespit edilmiştir. Chen ve ark.[60] ayrıca laktik asit bakterisi olmayan olmayan *E. coli* ve *Pseudomonas* spp türlerini de kefirde tanımlamışlardır. Yaptığımız çalışmada benzer olarak *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus* sp, *Aeromonas media*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp olmak üzere beş farklı patojen mikroorganizma tanımlanmıştır. Bu durum araştırmacılar tarafından örneklerin çevreden kontamine olmasıyla açıklanmaktadır. Aynı şekilde Kourkoutas ve ark. [62] da feta tipi peynir üretiminde starter olarak kefir kullanımını araştırdıkları bir çalışmada *Pseudomonas* cinsine rastlamışlardır.

Wang ve ark. [49] kefir tanesi ve vili startedeki mayaları, PCR-DGGE yöntemi ile incelemişlerdir. Sonuçta 26S rRNA geni D1 domainin PCR-DGGE analizi ile *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces turicensis* ve *Pichia fermentans* türü mayalar başarılı bir şekilde tespit edildiği halde bazı mayalar bu yöntemle tespit edilememiştir. Bu durum bazı maya türlerinin hücre sayısının DGGE ile tespit edilen alt limitten daha az olduğu ya da ortamda aynı primer çiftine bağlanmak için rekabet edecek diğer türlere ait tampletelerin fazla miktarda olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Nitekim Cocolin ve ark.[68] DGGE yöntemi ile mayaların tespiti için deteksiyon limitini 10^3 hücre/ ml olarak bildirmişlerdir.

Van Beek ve Priest [67] *Lactobacillus* gen türleri sıralaması arasındaki yüksek heterojenlik sayesinde birçok türün çözünürlüğünü daha iyi ortaya koymuştur ve 16S rRNA'nın V6-V8 bölgelerini bir hedef olarak kabul ederek DGGE'deki *lactobacillus* ayrımını optimize etmişlerdir. Farklı yoğurt mayaları kullanarak mayalanan ekşi hamurları *Lactobacillus* cinsine özgü 16S rRNA primerleri kullanılarak PCR analizi, ardından da DGGE analizi ile izlenmişlerdir. Her bir hamurun mayalanması sırasında *Lactobacillus* popülasyonundaki değişiklikler tespit edilebilmiş ve süreç sonuna kadar baskın olan türler; *Lb. sanfanciscensis*, *Lb. pontis*, *Lb. mindensis*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. frumenti* ve *Lb. reuteri* olarak tanımlanmıştır.

16S rRNA'nın çoğaltılmış farklı V3 bölgelerinin analizi gıda da bulunan farklı LAB'nin tanımlanmasında ve ayrılmasında kullanılmaktadır. Farklılıklar *Enterococcus*, *Lactococcus*,

pediococcus ve *leuconostoc* türlerinin tanınması ve ayrılmasında daha önce kullanılmıştır. Birbirine yakın ayrılmış *Bacillus* türü üyleride son zamanlarda PCR-DGGE yoluyla tür düzeyinde ayrılabilmiştir [20]. Guerrini ve ark.[63] *Leuconostoc* türüne bağlı türlerinde *Oenococcus oeni*'nin PCR-DGGE yöntemiyle ayrılabilceğini göstermiştir. Ayrıca DGGE *Micrococcaceae*'nin fermente sosislerde ayrılmasında kullanılmıştır. Blaiotta[66] son zamanlarda fermente sosislerden staphylococci'nin tanımlanmasında aynı yöntemi kullanmıştır. Fakat *staphylococcal* türlerinin çoğunun 16S rRNA V3 bölgesi DGGE analizi yoluyla ayrılabilirken bazı türler ayırt edilememiştir. Böylece tüm farklı türlerin DGGE ile ayırt edilemeyebileceği görülmüştür.

Ampe ve ark. [47] bir tür fermente mısır hamurundaki mikrobiyal dağılım üzerinde çalışmalarda bulunmuşlardır. Laktik asit bakterileri örneklerin DNA'nın izole edilmesi ve 16S rDNA'nın değişken bölgelerinin çoğaltılmasından sonra elde edilen DGGE profilindeki DNA bantlarının saflaştırılması ve sıralanmasıyla elde edilmiştir. DGGE analizi ile Ampe ve arkadaşları mikroorganizmaların mısır hamurundaki biyolojik rolleri ve fermentasyondaki gelişimleri ile ilgili çeşitli bilgiler edinmişlerdir. Ayrıca bakteriyel florayı DGGE analizinden elde edilen sonuçlar ve geleneksel mikrobiyolojik analizlerden elde edilen sonuçları kıyaslayan yazarlar, kültürel olmayan metotların fermente gıdaların geleneksel olarak incelenmesine yönelik metotlardan daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır. Omar ve Ampe fermentasyonu sağlayan mikroflorayı da araştırmışlardır. Yazarlar, fermentasyon sırasındaki baskın olan türü de tespit etmişler ve fermentasyon sürecini daha az türe indirgemişlerdir. *Streptococcus* spp. fermentasyon süreci boyunca baskın gelmiştir. *Lactobacillus* gibi heterofermentatif laktik asit türleri fermentasyon başında mevcutken, ancak sonrasında homofermentatif laktik asit bakterileri bunların yerini almıştır.

16S rRNA'nın PCR ile çoğaltılan V3 bölgelerinin analizi gıdalarda bulunan laktik asit bakterilerinin ayrılması ve tanınmasında kullanılır. Bizde çalışmamızda kültürel olmayan tekniklerle tanımladığımız bakterileri V3 bölgelerine göre PCR-DGGE analizine tabi tuttuk. Randazzo ve ark. [64] *Lactobacillus* için özel primerler kullanıp V1-V3 bölgelerini tarayarak Sicilya peyniri üretimi boyunca ki baskın mikroflorayı incelemişlerdir. Stilton peynirindeki mikrobiyal topluluk ve 16S rDNA dizisinin V3, V4 ve V5 bölgelerine göre PCR-DGGE analizi ile incelenmiştir. Geleneksel İngiliz peynirlerini *Lb. plantarum*, *Lb.curvatus*, *Lc.lactis*, *Sc.equorum*, *Enterococcus faecalis*, and *Leu.mesenteroides* içeren karışık bir mikrofloraya

sahip olduğu gözlenmişlerdir. Ayrıca 16S rDNA'nın değışken V6-V8 bölgelerini toplam mikroflorayı bulmaya yönelik yapılan DGGE analizinde kullanılmışlardır.

Genel olarak 16SrRNA sekans analizi ile birlikte kullanıldığında DGGE kefir tanelerinin mikroflora çeşitliliği analizinde etkilidir. PCR-DGGE fermentasyonu izleyebilir bu sırada gerçek zamanlı bilgi ve starter gelişimi için bir teori zemini sunar.

Bu çalışmadan çıkarılan önemli noktalar şu şekilde özetlenebilir: PCR-DGGE analizi, kesinlikle gıda mikrobiyolojisi için iyi bir potansiyele sahiptir. Gıdadaki mikroorganizmaların bulunması amacıyla kullanılan mevcut analiz metotları pahalı çok zaman alan ve bazen de kesin olmayan sonuçlar veren metotlardır. Moleküler metotların gittikçe artan bir şekilde daha hızlı ve güvenilir sonuçlar ortaya koyduğu düşünülmektedir [20].

PCR-DGGE analizi, gıdaların olgunlaşması sürecinde mikrobiyal fermentasyonun hızlı bir şekilde gözlemlenmesini, gıda ürünlerinde mikrobiyal toplulukların değerlendirilmesini ve çevresel değışikliklere cevaben gıdadaki mikrobiyal toplulukların analizini sağlamaktadır. Bilim adamları elbette mikrobiyal fermentasyonlar üzerinde çalışmaya ve çalışmalarında fermente ürünlerin analizini, gıda ürünlerinin yapısını ve aromasını incelemek için bu tekniği kullanmaya devam edecektir. Böylelikle bizlerde fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaların gerçek rolleri hakkında bilgi sahibi olabileceğiz. Bu teknikle gıdaki mikrobiyal topluluklar ile ilgili tam ve daha güvenilir bilgi verebilmek için daha birçok çalışmanın yapılması gerekmektedir [20].

PCR-DGGE tekniğini başka tekniklerle birlikte kullanmak birçok çalışmada avantaj sağlayabilmektedir. Yaptığımız çalışmada PCR-DGGE tekniği kültür bağımsız bir teknik olmasına rağmen kültüre aldığımız mikroorganizmaları da 16S rRNA tam sekans analizi ile tanımladık. PCR-DGGE tekniğini başka bir teknikle kombine halde kullanarak daha fazla bakteriyi tanımlayabildiğimizi gözlemlemiş olduk [20].

PCR_DGGE yöntemi gıda sanayinde bileşenlerin ve nihai ürünlerin kalite değerlendirmesinde uygulanabilir. Analiz metotları değıştirilerek üretim zinciri daha hızlı ve daha doğru bir şekilde kontrol edilebilir. Ayrıca tekniğin protokolleri geliştirilerek üretim araçları yüzeyleri ve donanımlarındaki mikrobiyolojik analizi için de kullanılabilir. Ancak mevcut durumda PCR-DGGE tekniği henüz sanayi ölçeğinde kontrol aracı olarak kullanılmaya hazır değildir. Çünkü teknik henüz yenidir ve üretimdeki rutin analizlere cevap

verebilecek nitelikte değildir. Elde edilen deneyim hala yetersizdir. Büyük ölçekli üretime uyarlanabilen ve çok sayıdaki örneklerin rutin analizlerine uygun protokoller henüz geliştirilememiştir [20].

Aslında teknik gıda ürününü mikrobiyolojik kalitesinin kontrol edilmesinde ve gıda ürününde bulunan ve etikete göre var olan, arasındaki farkın bulunmasında kullanılabilir. Ayrıca PCR-DGGE, gıda fermentasyonu sürecinde hızlı bir şekilde starter kültürlerin verimliliğini ve dinamiklerinin kontrol edilmesinde kullanılabilir [20].

PCR-DGGE ile bazı gıda ürünlerinin mikrobiyal kompozisyonu analiz edilerek, bunların coğrafi kökenlerinin de bulunmasının mümkün olduğu ortaya konmuştur. Bu durum, özellikle sahtekarlığı önleyerek, gıda ürünlerinin kalitesi, üretim koşulları ve kökenlerini tanıma ve onaylamada da kullanılabilir [20].

Sonuç ve öneriler:

- Bu çalışmada PCR-DGGE yöntemi ile 16S rRNA'nın V3 bölgesine göre ve 16S rRNA tam sekans analizi ile kefir tanesi ve kefir içeceğindeki farklı bakteriler tanımlanmıştır.
- Kefir tanesinde *Lc.lactis*, *Leu.mesenteroides*, *Lb.kefiri*, *Pseudomonas sp*, *Acetobacter ghanensis*, , *Lb.diolorans*, *Lb.kefiranofaciens*, *Aeromonas media*, *Aeromonas hydrophila*, *Lb.buchneri* türleri tanımlandı. Kefir içeceğinde *St.epidermidis*, *St.thermophilus*, *Leu.mesenteroides*, *Lc.lactis*, *Lb.casei*, *Lb.acidophilus*, *Leu.pseudomesenteroides*, *Lb.amylovorus*, *Lc.raffinolactis*, *Paenibacillus apiarius*, *Bacillus sp.*, *Aeromonas hydrophila* türleri tanımlandı.
- Bu bakterilerden *Lb. kefiranofaciens*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. Kefiri*, *Lc. Lactis*, *Sc.thermophilus*, *Lb.delbrueckii*, *Lb.helveticus*, *Lb.casei*, *Pseudoplatarum* *Lb.brevis* daha önce farklı kültüre alma teknikleri ile kefir tanesinde tanımlanabilmiştir.
- İlk kez bu çalışmada *Acetobacter ghanensis*, kültüre aldığımız örneklerde 16S rRNA tam sekans analizi ile tanımlanmıştır.
- 16S rRNA tam sekans analizi ile *Lc. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Pseudomonas sp*, *Acetobacter ghanensis*, *Lactobacillus diolorans*, *Lactobacillus acidophilus* bakterileri tanımlanmıştır.
- PCR-DGGE ile tespit edilen; *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Aeromonas media*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus amylovorus* *Lc. raffinolactis* *Paenibacillus*

apiarius, *Bacillus* sp, *Aeromonas hydrophila* bakterileri 16S rRNA ile tespit edilememiştir. Bu bakterilerin kültüre alınamamış olabileceğine hükmedilmiştir.

- 16S rRNA ile tespit edilen *Leu.mesenteroides*, *St.epidermidis*, *Leu.pseudomesenteroides*, *Lb.casei*, *Pseudomonas ssp*, *Acetobacter ghanensis*, *Lb.diolorans*, *Lb. acidophilus* bakterileri PCR-DGGE ile tespit edilememiştir. Bu durumun DGGE yönteminin deteksiyon limitinin nisbeten yüksek olmasından ileri gelebileceği gibi tüm bakteriler için tek bir lysis protokünün uygulanmasının da neden olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, kefir ve kefir tanelerinin bakteriyel florası, 16S rRNA'nın V3 bölgesinin PCR-DGGE ve 16S rRNA tam sekans analizi ile incelenmiştir. Bu bölge, laktik asit bakterileri türleri için değişken diziler içermekle birlikte, nisbeten kısa olması (yaklaşık 160 bp) nedeniyle bazen farklı bakteriler aynı sonucu vermişlerdir. Bu durum DGGE ile tanımlanan toplam laktik asit bakterilerinin yalnızca %7'si için gerçekleşmiştir. Bunun dışında geriye kalan bakterilerin kültüre almasına gerek duyulmadan çok kısa sürede ve yüksek güvenilirlikle tespiti mümkün olmuştur. Bildirilen bu olumsuzluğun ortadan kaldırılması için yapılan çalışmalarda birden fazla değişken bölgenin taranması tavsiye edilmektedir. Ayrıca 16S rRNA tam sekans analizi ile tanımlanan bazı bakterilerin DGGE ile tespit edilememesi DGGE'nin diğer moleküler tekniklerle desteklenmesi gerektiğini göstermiştir. Nitekim son yıllarda yapılan araştırmalarda da moleküler tekniklerin kombine uygulanması tavsiye edilmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Anonim. Muhafaza Süresince Kefirin Kimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Niteliklerindeki Değişmeler. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Dergisi, Sayı:137. 2001
2. Mumcu, Z.N. Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 1997.
3. Etöz, D. Kefirden İzole Edilen Maya ve Bakterilerin Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerine İnhibitör Etkisi. Yüksek Lisans Tezi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 2006.
4. Sezer, Ç. Kefirde Laktik Asit Bakterilerinin Tür Düzeyinde Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003.
5. Güzel-Seydim, Z.B., Seydim, A.C., Grene, A.K. ve Bodine, A.B. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. J Food Comp. and Anal. 13, 1, 35-43. 2000.
6. Ünlütürk, A., Turantaş, F. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Mengi Tan Basımevi. İstanbul. 433-445. 1998
7. Şahan, N. İnek ve Koyun Sütlerinden Üretilen Kefirin Özellikleri ve Bu Özelliklere Olgunlaştırma Süresinin Etkisi Üzerinde Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Tarım Ürünleri Teknolojisi ABD. Adana, 1987
8. Anonim.<http://kediliyasam.blogspot.com/2009/06/saglikl-yasam-dosyas-kefir.html>. 2009
9. Akkuzu, S. Kefir Mikroflorası İçerisinde Çeşitli Patojenlerin Yaşam Süreleri. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 124-127. 2005
10. Ergüllü, E. Üçüncü, M. Kefir Mikroflorası Üzerine Bir Araştırma. Gıda Teknolojisi. 8,1, 3-10. 1983.

11. Karagözlü, C. Farklı ışıl ışlemi Uygulanmış İnek Sütünden Kefir Kùltürü ve Tanesi ile Üretilen Kefirin Dayanıklılığı ve Nitelikleri Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir. 67-75. 1990.
12. Koçak, C. ve Gürsel,A. Kefir, Gıda,6, 4, 11-14. 1981
13. Ünlütürk, A. Turantaş, F. Gıda Mikrobiyolojisi. Düzeltilmiş Üçüncü Baskı. Meta Basım Matbacılık Hizmetleri. ISBN: 975-483-383-4. Bornova, İzmir, 2003.
14. Yemni, E. Kefirin Antibakteriyel Antifungal ve Antitümoral Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.65-70. 1986.
15. E. Simova, D. Beshkova, A. Angelov, T. Hristozova, G. Frengova and Z. Spasov. Lactic Acid Bacteria and Yeasts In Kefir Grains and Kefir Made From Them. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28, 1–6. 2002.
16. Akçelik, M. Ayhan, K. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbacılık. Ankara. 357-363. 2000.
17. Sezginer, A. Kefirin Hikayesi. Bilim Teknik Dergisi. 13, 151, 37-39. 1986.
18. Tavlař, B. Kefir Tanesi ve Kùltürü Kullanılarak Üretilen Kefirlerin Kalitesi Üzerine Olgunlaştırma Koşullarının Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakùltesi Gıda Mühendisliği Bölümü İzmir, 1986.
19. Singh,S., Goswami, P., Singh,R., Heler,K., Application of molecular identification tools for Lactobacillus, with a focus on discrimination between closely related species: A review. LWT - Food Science and Technology 42 448–457. 2009.
20. Ercolini, D. PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies For Detection Of Microbes In Food. J. Microbiol. Methods 56, 297–314. 2004.
21. Ünal,N., İstanbulluoğlu,E., İnsan ve sığır kökenli Staphylococcus aureus izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg, 56: 119-126. 2009.

22. Özçelik, S., Gıda Mikrobiyolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitapları. Yayın No:6. 2004.
23. Tekeli,A., Ustaçelebi,Ş., PCR Amplifikasyon temelli mikrobiyal tiplendirme. Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamaları. 2006.
24. Muyanja, C., Narvhus, J. A., Treimo, J., Langsrud, T. Isolation characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. International. Journal of Food Microbiology, 80, 201–210. 2003
25. Muyzer,G., DGGE/TGGE a method for identfyng genes from natural ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 2, 317–322. 1999.
26. Muyzer,G., Smalla, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek. 73, 127–141. 1998.
27. Aman, RI., Ludwig, W., Schleifer, KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143–169. 1995.
28. Cecilia F., Graciela V., Pier Sandro C., PCR–DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. J Microbiol Methods. 63,3,254-63. 2005
29. Kesmen,Z.,Taze ve İşlenmiş Model Et Ürünlerinde Farklı Hayvan Türlerine Ait Etlerin PCR Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı. Erzurum. 2005.
30. Mannu, L., Riu, G., Comunian, R., Fozzi, M. C., Scintu, M. F. A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter cultureand industrial Pecorino Sardo ewes' milk cheese: PCR identificationand evolution during ripening. International Dairy Journal, 12: 17–26. 2002.
31. Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., Yuen, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in

- clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology & Infection*, 14, 908-934, 27. 2008.
32. Gurtler, V., Stanisich, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology Reviews*, 142, 3–16. 1996.
33. Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Anovel Cantoni, C., Comi, G., A novel polymerase chain reaction (PCR) — denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science*. 58, 1, 59-64. 2001.
34. Eroğlu, C., Tüberküloz Tanısında PCR. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu (Haziran 2003, Samsun) Kitabı, 311-316. 2003.
35. Rachman, C. N., Kabadjova, P., Pre' vost, H., & Dousset, X. Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S–23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1207–1216. 2003.
36. O'Sullivan, D. J. Methods for analysis of the intestinal microflora. In G. W. Tannock (Ed.), *Probiotics. A critical review* (pp. 23–44). Norfolk, UK: Horizon Scientific Pres. 1999.
37. Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A., & Grappin, R. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte' cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal*, 11, 293–305. 2001.
38. Aydın, S., RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* sayı:6. 2004
39. Sarıkaya, R., *Cryptosporidium* Türlerinin Tanımlanmasında Yeni Bir Yaklaşım: Ribotiplendirme. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi*, Cilt 5, Sayı 2, 13-26. 2004
40. McCartney, A. L., Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 (Suppl. 1), 29–37. 2002.

41. Basım,E., Basım,H., Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its Use in Molecular Biology. Turk J Biol 25, 405-418. 2001
42. Diarrassouba F. Ly. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): An Overview. The Sceince Creative Quarterly. Issue 6. 2011.
43. Anonim. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) Laboratory for Microbial Ecology. Laboratory for Microbial Ecology Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences University of Toledo. 12. 2004.
44. Wilson, I.G., Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3741– 3751. 1997.
45. Ünsal, B., Phylogenetic Analysis of Bacterialcommunities In Kefir By Metagenomics Yüksek Lisans Tezi İzmir Yüksek Teknojoji Enstitüsü. Moleküler Biyoloji ve Genetik. İzmir, 2008
46. Anonim.[http-www.campus.skelleftea.se-biomine-molecular-images-pic012.gif](http://www.campus.skelleftea.se/biomine-molecular-images-pic012.gif). 2009.
47. Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C.,Wacher, C., Guyot, J. P., Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the needfor cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5464– 5473. 1999.
48. Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri G., Osimani, A., Petruzzelli, A., Clementi F., The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. Int. J. of Food Microbiol. 136-145. 2007.
49. Wang, S., Chen, H., Liu, J., Lin, Y., Chen, M., Identification of Yeasts and Evaluation of their Distribution in Taiwanese Kefir and Viili starters . Dairy Sci. 91, 3798-3805. 2008.
50. Anonim. Fermented Foods and Healthy Digestive Functions. Nutrition and Health Collection. Danone Research Fort Worth, John Libbey Eurotext, 2001.

51. Temizkan, G., Arda, N., Moleküler Biyolojide Kullanılın Yöntemler. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji Ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulamam Merkezi BİYOGEİM. 2008.
52. Halkman, A.K., Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Merck, Ankara, 2005.
53. Coccolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*. 12, 407–411. 2002.
54. Silvestri, G., Santarelli, S., Aquilanti, L., Beccaceci, A., Osimani, A., Tonucci, F., Clementi, F., Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat Science* 77, 413–423. 2007.
55. Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 2009.
56. Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., Behavior of Variable V3 Region From 16S rDNA of Lactic Acid Bacteria in Denaturing Gradient Gelelectrophoresis. *Current Microbiology*. 42, 199–202. 2001.
57. Garbers, I.M., Britz, T.J., Witthuhn, R.C. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20, 687–693. 2004
58. Rossiv et al., F. Rossiv, S. Torriani and F. Dellaglio, Genus-, and species-specific PCR-based detection of dairy propionibacteria in environmental samples by using primers targeted to the genes encoding 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4241–4244. 1999.
59. Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques, *Food Microbiology*. 23, 341–350. 2006.

60. Chena, H., Wang, S., Chena, M. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 25 492–501. 2008.
61. Xiao, L.L., Dong, M.S., Screening and cholesterol-degrading activity of *Lactobacillus casei* KM-16. *China Dairy Industry* 31, 7-10. 2003.
62. Kourkoutas, Y., Kandylis, P., Panas, P., Dooley, J.S.G., Nigam, P., Koutinas, A.A., Evaluation of freeze-dried kefir coculture as starter in feta-type cheese production. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6124–6135. 2006.
63. Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P., Vincenzini, M., Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 1 – 14. 2003.
64. Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., Vaughan, E.E., Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1882–1892. 2002.
65. Neve, H., Analysis of Kefir Grain Starter Cultures by Scanning Electron Microscopy *Milchwissenschaft.* 47, 5, 275-278. 1992.
66. Blaiotta, G., Pennacchia, C., Ercolini, D., Moschetti, G., Villani, F., Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S–23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 423–433. 2003.
67. Van Beek, S., Priest, F.G., Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 297-305 2002.
68. Cocolin L, Bisson LF, Mills DA. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 189, 81-87. 2000.

69. Patrick C. Y. Woo, Ami M. Y. Fung, Susanna K. P. Lau, and Kwok-Yung Yuen.
Identification by 16S rRNA Gene Sequencing of *Lactobacillus salivarius* Bacteremic
Cholecystitis. Journal of Clinical Microbiology P. 265–267. 2002