

**KEFİR İLAVESİNİN YONCA SİLAJLARININ
FERMANTASYON
ÖZELLİKLERİ VE AEROBİK STABİLİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Bahattin KARAPINAR

**Yüksek Lisans Tezi
Zootekni Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Fisun KOÇ

Tekirdağ-2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KEFİR İLAVESİNİN YONCA SİLAJLARININ FERMANTASYON
ÖZELLİKLERİ VE AEROBİK STABİLİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Bahattin KARAPINAR

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Fisun KOÇ

TEKİRDAĞ – 2019

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Fisun KOÇ danışmanlığında, Bahattin KARAPINAR tarafından hazırlanan “**Kefir İlavesinin Yonca Silajlarının Fermantasyon Özellikleri ve Aerobik Stabilitesi Üzerine Etkileri**“ konulu bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından, Zootekni Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. M. Levent ÖZDÜVEN

İmza :

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Hande IŞIL AKBAĞ

İmza :

Üye: Prof. Dr. Fisun KOÇ (Danışman)

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

**BU TEZ TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA
PROJELERİ TARAFINDAN NKUBAP.03.YL.18.157 NOLU PROJE İLE
DESTEKLENMİŞTİR**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEFİR İLAVESİNİN YONCA SİLAJLARININ FERMANTASYON ÖZELLİKLERİ VE AEROBİK STABİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bahattin KARAPINAR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootečni Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fisun KOÇ

Bu araştırmada, farklı dozlarda kefir ilavesinin yonca silajlarında fermantasyon gelişimi ve aerobik stabilitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yonca, haziran ayında çiçeklenme başlangıcında hasad edilmiş ve yaklaşık 24 saat süreyle soldurulmuştur. Çalışmada katkı maddesi olarak ticari (MY starter KF) ve ev yapımı kefir kültürü kullanılmıştır. Araştırma, katkı maddesi ilave edilmeyen kontrol, 1×10^5 , 5×10^5 ve 1×10^6 kob/g düzeyinde kefir ilave edilerek oluşturulan 7 grupta yürütülmüştür. Kontrol ve katkı maddeleriyle muamele edilen yonca her uygulama için 10'ar tekerrür olarak 500 g kapasiteli plastik torbalara silolanmıştır. Silolamadan 45 gün sonra açılan tüm silajlarda kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Silolama döneminin sonunda (45. gün) tüm silajlara 7 gün süre ile aerobik stabilite testi uygulanmıştır. Sonuç olarak kefir yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini ve aerobik stabilitelerini geliştirmiştir.

Anahtar kelimeler: Kefir, laktik asit bakterilerinin tanımlaması, silaj

2019, 44 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

THE EFFECTS OF KEFIR ADDITION ON THE FERMENTATION CHARACTERISTICS AND AEROBIC STABILITY OF ALFALFA SILAGES

Bahattin KARAPINAR

Namık Kemal University in Tekirdağ
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Fisun KOC

In this study, the effects of different doses of kefir on the fermentation characteristics and aerobic stability of alfalfa silages were investigated. Alfalfa was harvested at early bloom stage in June and wilted for about 24hours. In the study, commercial (MY starter CF) and home made kefir culture were used as additives. The study was carried out in 7 groups formed by adding control, 1×10^5 , 5×10^5 and 1×10^6 kob/g kefir. control and additives applied alfalfa ensiled in 500 g capacity plastic bag as 10 replicates for each treatment. All silages were sampled for chemical and microbiological analyses on day 45 after ensiling. All silages were opened at the end of the ensiling period (45 days) and subjected to an aerobic stability test for 7 days. As a result, improved fermentation characteristics and aerobic stability of alfalfa silages.

Key Words; Kefir, lactic acid bacteria identification, silage

2019, 44 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2.1. Kefirin Tanımı ve Coğrafyası.....	3
2.2. Kefirin Tarihçesi.....	4
2.3. Kefir Tanesi ve Kefirin Mikrobiyal Florası.....	4
2.4. Kefir Üretimi	9
2.4.1. Geleneksel Kefir Üretimi.....	10
2.4.2. Endüstriyel Kefir Üretimi	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Deneme Materyallerinin Hazırlanması.....	14
3.2. Yöntem	16
3.2.1. Silaj Kalitesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler.....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	22
4.1. Başlangıç Materyaline İlişkin Analizler	22
4.2. Araştırma Yemlerinin Silolama Sonrası Değerleri.....	23
4.2.1. Yonca silajlarının fermantasyon özellikleri ile ilgili bulgular.....	23
4.2.2. Yonca silajlarının mikrobiyolojik özellikleri ile ilgili bulgular	28
4.3. Silajların Aerobik Stabiliteleri.....	30
4.4. LAB 16SrRNA Dizi Analizi sonuçları	32
5. SONUÇ	34
6. KAYNAKLAR	35
TEŞEKKÜR	43
ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kefir Tanesi.....	5
Şekil 2.2. Kefir Tanesinin İç Kısmı.....	7
Şekil 2.3. Kefir Tanesinin Dış Kısmı	7
Şekil 2.4. Kefirin Geleneksel Yöntemle Üretimi	11
Şekil 2.5. Kefirin Endüstriyel Yöntemle Üretimi	12
Şekil 3.1. Vakum makinesi.....	15
Şekil 3.2. Silaj başlangıç materyali	15

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Türk Gıda Kodeksi, fermente süt ürünleri Tebliği'ne göre kefirin bileşimi	4
Çizelge 2.2. Kadir ve kefir granüllerinin mikroflorası	6
Çizelge 2.3. Kefir tanesi, kefir kültürü ve kefirdeki mikroorganizmalar	9
Çizelge 4.1. Başlangıç mateyaline ilişkin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları	22
Çizelge 4.2. Fermantasyonun 45. gününde açılan silajların kimyasal analiz sonuçları	24
Çizelge 4.3. Fermantasyonun 45. gününde açılan silajların mikrobiyoloji analiz sonuçları (log ₁₀ kob/g)	29
Çizelge 4.4. Yonca silajlarının aerobik stabilite test sonuçları.....	30
Çizelge 4.5. Yonca silajlarının aerobik stabilite süresince sensör verilerine ilişkin ortalama değerler	31
Çizelge 4.6. Yonca silajlarında fermantasyonun 45. gününde tespit edilen LAB 16SrRNA dizi analizi sonuçları	33
Çizelge 4.7. Yonca silajlarında aerobik stabilitenin 7.gününde tespit edilen LAB 16SrRNA dizi analizi sonuçları	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Asetik asit
BA	: Bütirik asit
Bc	: Tampon Kapasitesi
KOB	: Koloni oluşturan birim
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
DK	: Doğal Kefir
HP	: Ham protein
KM	: Kuru madde
LA	: Laktik asit
LAB	: Laktik asit bakterileri
NH ₃ -N	: Amonyak azotu
°C	: Santigrat Derece
PA	: Propiyonik asit
SÇK	: Suda çözünebilir karbonhidratlar
TK	: Ticari Kefir
TM	: Taze materyal
µl	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Baklagillerin silolanmasındaki zorluklar 3 faktöre bağlanmaktadır. Bunlar; yeterli düzeyde suda çözünebilir karbonhidrat (SÇK) içermemesi, tampon kapasitelerinin (Bc) yüksek olması ve düşük kuru madde (KM) içeriğine sahip olmalarıdır. Bu yüzden de silolanmaları için katkı maddesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda silaj katkı maddesi olarak laktik asit bakteri (LAB) inokulantlarının kullanımı yaygınlaşmıştır. Laktik asit bakteri (LAB) inokulantlarının etkinliği konusunda çeşitli görüşler bulunmakta olup bunlar; silaj kalitesini artırdığı (Arriola ve ark. 2015, Ogunade ve ark. 2016, Silva ve ark. 2016) ya da yeterli düzeyde etki göstermedikleri yönündedir (Kleinschmit ve ark. 2005, Ogunade ve ark. 2016). LAB'nin yeterli düzeyde etki göstermemelerinin temel nedenlerinden biri olarak ticari inokulantlardaki LAB'ların kompozisyonundaki farklılıklar öne sürülmektedir (Weinberg and Muck 1996, Kung and Muck 1997, Muck and Kung 1997). Bu anlamda bakıldığında silaj fermantasyonunda etkili olan LAB türleri ve etkinlikleri daha da önem kazanmaktadır.

Kefir bileşiminde LAB ve mayaların bulunduğu, üretiminde kefir tanesi veya starter kültürlerin kullanıldığı fermente bir süt ürünü olarak tanımlanmaktadır (Özpinar 2012). Kefir tanesi bünyesinde LAB (*lactobacilli*, *lactococci* ve *leuconostoc*), asetik asit bakterileri (*acetobacter*) ve mayaları karışım halinde bulundurur. Bu mikrobiyel karışım içinde en çok laktobasiller yer alır (%65– 80). Kefirin içerdiği lactobasil ve diğer bakteri türleri arasında *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. lactis* ve *L. mesenteroides* bulunur. Kefir tanesinin içerdiği mayalar laktozu fermente eden (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Torula kefir*) ve laktozu fermente etmeyenler (*Saccharomyces cerevisiae*) olmak üzere iki çeşittir. Bu mayalar ürettikleri karbondioksit (CO₂) ve etanol ile kefir fermantasyonunda önemli rol oynarlar. Kefir ile ilgili yapılan çalışmalarda kefir tanelerindeki mikrobiyal floranın, coğrafi köken, tanelerin bulunduğu farklı iklim koşulları, kefir üretimindeki sıcaklık ve fermantasyon süresinin değişimine göre farklılık taşıdığı belirtilmektedir (Ötleş ve Çağındı 2003, Garofalo ve ark. 2015). Son yapılan araştırmalar, kefirin bakteriyel florasının en önemli kısmını oluşturan homofermantatif *L. kefir*'nin silaj fermantasyonu üzerinde özellikle besin madde kayıplarını azalttığı ve aerobik stabilite üzerinde olumlu etkilerinin olduğu yönündedir (EFSA 2013, Zwielehner ve ark. 2014, Daniel ve ark. 2015).

Bu çalışmanın amacı, yonca bitkisine doğal ve ticari formda kefir kültürü ilavesinin silaj fermantasyonu ve aerobik stabilite üzerine etkilerini ortaya koymaktır. Ayrıca araştırma kapsamında fermantasyon ve aerobik stabilite döneminde laktik asit bakterilerinin tanımlaması yapılarak mikrobiyal kompozisyon üzerindeki değişimleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŐTIRMASI

2.1. Kefirin Tanımı ve Coğrafyası

Kefir, kökeni Kuzey Kafkasya'ya ait olan, beyazımsı renkli, karnabahara benzeyen fındık büyüklüğünde kefir tanelerinin süt ile mayalanması sonucu elde edilen fermente bir süt ürünüdür (Sarkar 2008). LA fermantasyonu ve alkol fermantasyonu sonucu oluşan ürünler kefire özgü aromayı meydana getirmektedir (Rattray ve O'Connel 2011). Kefirin, ismini Türkçe'de içildikten sonra rahatlatıcı anlamında olan "keyif" sözcüğünden ve Kafkas dilinde "en iyi kalite" anlamına gelen "kef" sözcüklerinden aldığı tahmin edilmektedir. Ayrıca kephir, kiaphur, kefer, knapan, kepi ve kippe gibi pek çok ismi de kullanılmaktadır (Koroleva 1988, Ötleş ve Çağındı 2003). Kafkas dağlarından Orta Asya'ya kadar uzanan kefir günümüzde başta Almanya, Norveç, Macaristan, Polonya, Romanya gibi birçok Avrupa ülkesinde, Kuzey Amerika, Avustralya ve Kuzey Afrika'da orijinal ismiyle tanınmakta ve üretilmektedir (Irigoyen ve ark. 2005).

Türk Gıda Kodeksi 16.02.2009 tarih ve 27143 sayı, 2009/25 no'lu Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre kefir; fermantasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* bakteri cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da kefir tanelerinin kullanıldığı fermente bir süt ürünü olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2005). Türk Gıda Kodeksi, 2009/25 No'lu Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre kefirin bileşimi ve mikrobiyolojik kriterleri Çizelge 2.1'de verilmiştir (Anonim 2005).

Çizelge 2.1. Türk Gıda Kodeksi, Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre kefirin bileşimi.

Bileşen	Miktar
Süt Proteini (Ağırlıkça %)	En az 2,7
Süt Yağı (Ağırlıkça %)	En fazla 10
Titrasyon Asitliği (Laktik asit olarak ağırlıkça %)	En az 0,6
Etanol (% hacim/ağırlık)	-
Toplam Spesifik Mikroorganizma (kob/g)	En az 10^7
Etikette Belirtilen Toplam İlave Mikroorganizma (kob/g)	En az 10^6
Maya (kob/g)	En az 10^4

2.2. Kefirin Tarihçesi

Kafkas dağlarından Orta Asya'ya kadar uzanan ve binlerce yıllık tarihi olan kefir, Kafkasya'da yaşayan halkın ilk olarak keçi tulumu içinde sütü şirden ile pıhtılaştırılarak, tulumun iç yüzeyinde birkaç hafta içinde süngerimsi bir yapı oluşturması ve bu yapının kullanılması ile kefir elde ettikleri bildirilmektedir (Koçak ve Gürsel 1981). Dr. Podwysstzki'nin "Kefyr" isimli kitabı kefir üzerine bilinen en eski çalışmadır. 1884 yılında Moritz Schulz tarafından tercüme edilerek kefir tarihçesi, çeşitleri, nitelikleri ve Kuzey Avrupa'ya ve diğer bölgelere nasıl yayıldığı belirtilmektedir (Koroleva 1988).

Rusya'da 1930'lu yıllarda cam şişeler içindeki süte kefir mayası inoküle edilip pıhtı oluşuncaya kadar bir termostat içinde tutularak, elde edilen kefirin soğutulması yoluyla endüstriyel düzeyde üretimine başlanmıştır. Günümüzde kefir başta Almanya, İsveç, Polonya, Romanya gibi birçok Avrupa ülkesinde, Amerika ve Avustralya'da ticari olarak üretilmektedir (Koroleva 1988).

2.3. Kefir Tanesi ve Kefirin Mikrobiyal Florası

Kefir taneleri sarımtırak renkli 3-30 mm çapında, jelatinimsi yapıda, küçük karnabahar veya patlamış mısıra benzer görünüme sahip, düzensiz partiküllerdir (Şekil 2.1). (Yaygın 1999, Libudzisz ve Piatkiewicz 1990).

Kefir taneleri bölünerek gelişip çoğalmakta ve özelliklerini bir sonraki generasyona aktarmaktadırlar (Farnworth ve Mainville 2008).



Şekil 2.1. Kefir Tanesi

Granüller LAB (özellikle *Lb. kefiranofaciens*), asetik asit (AA) bakterileri ve mayalar arasındaki kompleks bir simbiyosisten oluşur (Seiler 2003).

Yüzyıllardır Kafkasya bölgesinde miks kültür kullanılarak laktik asit (LA) ve alkol fermentasyon sonucu oluşturulan kefirin yapımında kullanılan granüller polisakkarit matriks tarafından karnabahara benzer şekilde bir arada tutulan mikroorganizma topluluğundan ibarettir. Bu topluluk içinde, simbiyotik şekilde bir arada yaşayan mayalar (*Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis* ve *Sacharomyces spp.*) lactobacilli (*L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. delbruecki*), streptococci (*Streptococcus salivarius*), LAB (*Lc. lactis ssp. thermophils*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *L. cremoris*) ve nadiren AA bakterileri gibi birçok mikroorganizma izole edilebilir (Simova ve ark. 2002). Homofermentatif LAB (*Lactobacillus kefir*) bakteriyel floranın en önemli bölümünü oluştururlar. Son yıllarda kefirde yeni bir LAB türü olan *L. kefiranofaciens* tanımlanmıştır. Kefir danesinin dış polisakkarit katmanının daha ziyade bu bakteri tarafından üretildiği bildirilmektedir. “Kefiran” olarak bilinen bu polimer, %30-34 kazein, %45-60 sakkarit, %3-4 yağ ile canlı ve ölü mikroorganizmadan oluşup, eşit düzeyde glukoz ve galaktoz içermektedir ve kefir danesinin en az %25’ini oluşturmaktadır (Goncu ve Alpkent 2005, Neve 1992). *L. kefir* yüzey tabakada küçük bir bölgede yoğunlaşmışken, *L. kefiranofaciens* ise granülün bütün üst bölgesinde ve merkezde bulunur (Arihara ve ark. 1990).

Kefir danesinde LAB' nden başka homofermentatif ve heterofermentatif LA streptokokları (*Lactococcus*, *Leuconostoc*) ve AA bakterileri ile laktozu fermente edebilen ve fermente edemeyen mayalar (*Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir* vb.) da bulunmaktadır (Neve 1992, Garrote ve ark. 1997).

Genel olarak LAB (homofermentatif, heterofermentatif; mezofil ya da termofil) granül mikroflorasının %65-80'ini oluşturur. Geri kalan kısmın %20'sini streptokoklar ve %5'ini mayalar oluşturur (Libudzisz ve Piatkiewicz 1990). LAB, LA, CO₂ ve etanol oluşumuna, AA bakterileri; kefir granüllerindeki simbiyoz yaşamın sürdürülmesine ve kefirin viskozitesinin arttırılmasına, mayalar ise simbiyoz yaşama, CO₂ oluşumuna ve karakteristik tat ve aroma gelişimine yardımcı olurlar (İnal 1990). Kefir ve kefir granüllerinin mikroflorası Çizelge 2.2'de gösterilmiştir (Marshall 1993).

Çizelge 2.2. Kefir ve kefir granüllerinin mikroflorası

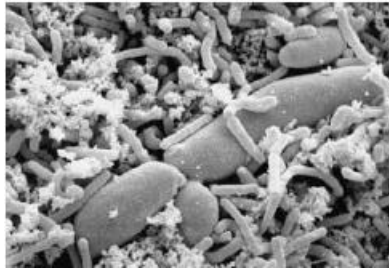
<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Lb. kefir</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lc. lactis ssp. Lactis</i>
<i>Lb. lactis</i>	<i>Lc. lactis var. diacetylactis</i>
<i>Lb. parakefir</i>	<i>Lc. lactis ssp. Cremoris</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	<i>L. cremoris</i>
<i>Lb. casei ssp. lactis</i>	<i>L. mesenteroides ssp. dextranicum</i>
<i>Lb. kefirgranum</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Lb. helveticus ssp. lactis</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	<i>Acetobacter</i>
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
Maya	
<i>Candida kefir</i>	
<i>C. pseudotropicalis</i>	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	
<i>K. fragilis / marxianus</i>	
<i>Saccharomyces ssp.</i>	
<i>Torulopsis holmii</i>	

Mikroskopik incelemede kefir tanesinin görünümü ağ gibi ince levhamsı bir yapı ile süngerimsi ve lifli bir yapıya sahip olduğu, ayrıca tanenin merkezinde lif kütesinin dallanma ve uzun bağlar gösterdiği belirlenmiştir. Tanelenin merkezindeki bakteriler ve mayaları birlikte tutan ağın mayalar tarafından üretildiği, laktokokların genellikle maya hücrelerinin yüzeyinde yer aldığı, laktobasillerin ise maya hücrelerinin aralarına yerleşmiş olduğu belirtilmiştir (Otsoa ve ark. 2006).

Duitschaeve ve ark. (1987) yaptıkları bir çalışmada kefir tanesinde yer alan mikroorganizmaların en fazla tanenin dış kısmında bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu kısımda çeşitli bakteriler ve mayalar varken, tanenin merkezine yakın kısımlarda maya sayısı azalmaktadır. Bu durumu mayaların aerob olmasına bağlamışlardır. Bu çalışmaya benzer olarak Güzel-Seydim ve ark. (2005), kefir tanelerini inceledikleri bir çalışmada kefir tanesinin dış kısmında laktobasiller, mayalar ve fibrillar madde gözlemlemişlerdir. Kefir tanesinin iç kısımlarında ise laktobasillerin bulunduğunu fakat mayaların olmadığını belirtmişlerdir (Şekil 2.2. ve Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Kefir Tanesinin İç Kısmı



Şekil 2.3. Kefir Tanesinin Dış Kısmı

Ergüllü ve Üçüncü (1983)' nin araştırmasında kefir mikroflorasının ana kaynağının, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinslerinden oluştuğu bildirilmiştir. Chen ve ark. (2008)'nin Tayvan'da elde ettikleri üç farklı kefir tanesi ile yaptıkları çalışmada, tanelerde en baskın

mikroorganizmanın birbirine benzer şekilde LAB olduğu, bunların içinde de en yaygın olanının *Lactobacillus kefir* olduğu bildirilmiştir.

Arjantin orjinli dört farklı kefir tanesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin mikrobiyolojik analiz sonuçlarında *L. plantarum*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *L. parakefir*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis biovar diacetylactis*, *Ln. mesenteroides*, *Acetobacter* bakterileri ve *Saccharomyces* ile *K. marxianus* mayaları tespit edilmiştir (Garrote ve ark 2001). Diosma ve ark. (2014), kefir tanelerinden *S. cerevisiae*, *S. unisporus*, *Issatchenkia occidentalis* ve *K. marxianus* maya suşları izole etmişlerdir.

İncelenen çalışmalarda gerek tanedeki gerekse kefirdeki mikroorganizmaların düzeyinin çok farklı olduğu ve sayılarının çok geniş sınırlar arasında değiştiği görülmüştür. Kefirin mikrobiyal florasında farklılıklara, üretim sırasında hijyene dikkat edilmemesi, tanenin maya ve küflerle kontamine olması, üretimde uygulanan farklı teknikler ve inkübasyon sıcaklığı gibi birçok faktörün etkili olduğu bildirilmiştir (Güzel-Seydim ve ark. 2005). Özellikle bakteri/maya oranı kefirin duyuşal özellikleri üzerinde etkilidir. Kefirde, kontamine mayalarla doğal mayaların birbirinden ayırt edilebilmesinin oldukça zor olduğu bildirilmektedir (Alvarez-Martin ve ark. 2008).

Yapılan bir çalışmada farklı ülkelerden elde edilen kefir tanelerinin *Lactobacillus* spp. içeriklerinin benzer olmasına rağmen, kefir mikroflorasında bulunma oranlarının farklı olduğu tespit edilmiştir (Ötleş ve Çağındı 2003). Bu çalışma sonucuna paralel olarak başka bir çalışmada kefir tanelerindeki mikrobiyal floranın, coğrafi köken, tanelerin bulunduğu farklı iklim koşulları, kefir üretimindeki sıcaklık ve fermantasyon süresinin değişimine göre farklılık taşıdığını belirtmektedir (Garofalo ve ark. 2015).

Setyawardani ve ark. (2014)'nın kefir tanesindeki mikrofloranın bölgelere göre farklılık taşıdığını, Brezilya'nın değişik bölgelerinden elde ettiği tanelerin, ortalama olarak %60,5 oranında LAB, %30,6 oranında maya ve %8,9 oranında asetik asit bakterileri içerdiğini tespit etmişlerdir.

Ergüllü ve Üçüncü (1983), Türkiye'nin 7 farklı bölgesinden aldıkları kefir tanelerinin mikroflorasını incelemişlerdir. Araştırmalarında kullandıkları 7 farklı kefir tanesindeki toplam mikroorganizma sayısının 6,42-9,42 log kob/mL arasında değiştiğini, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*'in tüm örneklerde bulunduğunu ancak bir örnekte *Streptococcus faecalis*'e rastlandığını bildirmişlerdir. Asitlik gelişimi ve proteolitik aktivitede

Lactobacillus casei'nin, CO₂ oluşumunda ise *Lactobacillus brevis*'in etkili olduğu belirtilmiştir. Tanelerde özellikle laktozu fermente eden ve laktozdan alkol ve CO₂ oluşturan türlerin florada baskın bir şekilde yer aldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak tanelerdeki mikroorganizmaların hem sayısal hem de oransal olarak çok büyük farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir.

Kefirin diğer fermente süt ürünlerinden farklı olan özelliği, doğal kefir tanelerinin uygun koşullarda mikrobiyolojik ve yapısal özelliklerini koruyarak, sürekli kendini arttırma özelliğidir (Seydim 2001). Farnworth (2005) yaptığı bir çalışmada kefir tanesi, kefir kültürü ve kefir içeceğindeki mikroorganizma düzeyinin birbirinden farklı olduğunu belirtmiştir (Çizelge 2.3). Buna bağlı olarak uygun tat, aroma ve mikrobiyal flora için kefir üretimi için kefir tanesinin kullanımının daha iyi olacağı belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Kefir tanesi, kefir kültürü ve kefirdeki mikroorganizmalar (log kob/mL)

	Kefir Tanesi	Kefir Kültürü	Kefir
<i>Lactococci</i>	10 ⁶	10 ⁸ -10 ⁹	10 ⁹
<i>Leuconostoc</i>	10 ⁶	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁷ -10 ⁸
Termofilik <i>lactobacilli</i>	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁶ -10 ⁸
Mezofilik <i>lactobacilli</i>	10 ⁶ -10 ⁹	10 ² -10 ³	-
Asetik asit bakterileri	10 ⁸	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁴ -10 ⁵
Mayalar	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁴ -10 ⁵

2.4. Kefir Üretimi

Kefir üretiminin ilk olarak Kafkas dağlarında koyun ve keçi sütünün hayvan derisinden yapılan çantalar ya da tahta kaplarda mezofilik şartların sağlanarak fermentasyona bırakılmasıyla gerçekleştirildiği bilinmektedir. Kefir, oluşumu tamamlandıkça alınıp yerine taze süt ilavesi yapılarak sürekli üretimi sağlanmaktadır.

Kaynaklara göre torbalara konulan taze süt ve kefir taneleri evin giriş kapısına asılmakta gün boyunca buradan eve giriş-çıkış yapılarak deri torbanın çalkalanması ile asitliği yüksek, içilebilir kıvamlı, köpüklü, hafif alkollü kefirin üretimi gerçekleştirilmektedir. Kefir üretiminde gerekli sütlerin fermentasyonu için fiçı ya da tulumun iç yüzeyinde dağınık halde bulunan jelatinimsi yapıdaki suda erimeyen özelliğe sahip, irili-ufaklı, karnabahar görünümündeki beyazımsı renkli taneler kullanılmıştır (Weis ve Burgbacher 1986). 1930'lu yıllarda Eski Sovyetler Birliği'nde kefir ticari olarak üretilmeye başlanmıştır. Ticari olarak üretil-

meye başlanan ilk kefir, set tipi bir üründür ve üretimi esnasında süte kefir tanesinin inokülasyonunu takiben şişelere doldurulması işlemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem süütün kefire dönüşümünün şişede gerçekleşmesini sağlamaktadır. Ardından ürün soğutulmuş olarak üretim tamamlanmış olur.

1950’li yıllarda geliştirilen diğer bir yöntemde stirred tipi kefir üretimi yapılmakta ve süt büyük bir kaptan mayalanarak, fermentasyon ve kefir oluşumunun sonrasında ürünün soğutulması ile kefirin üretimi gerçekleştirilmektedir (Koroleva 1982). Kefir üretiminde geleneksel ve endüstriyel üretim olmak üzere iki yöntem bulunmaktadır (Ötleş ve Çağındı 2003). Geleneksel kefir üretimi laktik asit bakterileri, mayalar ve ayrıca probiyotik bakterileri de kapsayan kefir tanelerinin süte ilave edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel kefir üretiminde ise kefir tanelerinin muhafazasında hijyenik açıdan karşılaşılan güçlüklerden dolayı sınırlı miktarda mikroorganizma içeren hazır starter kültürler kullanılmaktadır (Bozkurt ve ark. 2010). Kefir ticari olarak; dondurulmuş kefir starter kültürü ile, geleneksel olarak kefir tanesi kullanılarak ya da kefir tanesi ile üretilen kefirin süte aşılamaıyla üretilmektedir (Bensmira ve ark. 2010). Dondurularak kurutulmuş starter kültür kullanılarak üretilen kefirlerin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri çoğu zaman benzerlik gösterse de her kefir granülünün mikrobiyal yükü sayısal ve oransal olarak farklılık gösterdiği için farklı tat ve aromada kefir elde edilmektedir (Hafliger ve ark. 1991).

2.4.1. Geleneksel Kefir Üretimi

Geleneksel yöntemle ev şartlarında kefir üretimi kaynatılmış ve soğutulmuş süte doğrudan kefir tanesi ilave edilerek yapılmaktadır (Koroleva 1982). Bu yöntemde ilk olarak kullanılacak olan çiğ süt kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuş olarak %3-7 oranında kefir tanesi ilave edilmekte ve karanlık bir ortamda, aynı sıcaklıkta 18-24 saat fermentasyona bırakılmaktadır. Mayalanma süresinin sonunda metal olmayan temiz bir süzgeçten geçirilerek içilebilir kefir elde edilmektedir. İşlem sonunda taneler temiz su ile yıkanarak bir sonraki kullanım için buzdolabında 4°C’de muhafaza edilmektedir (Şekil 2.4.) (Güngör 2007).



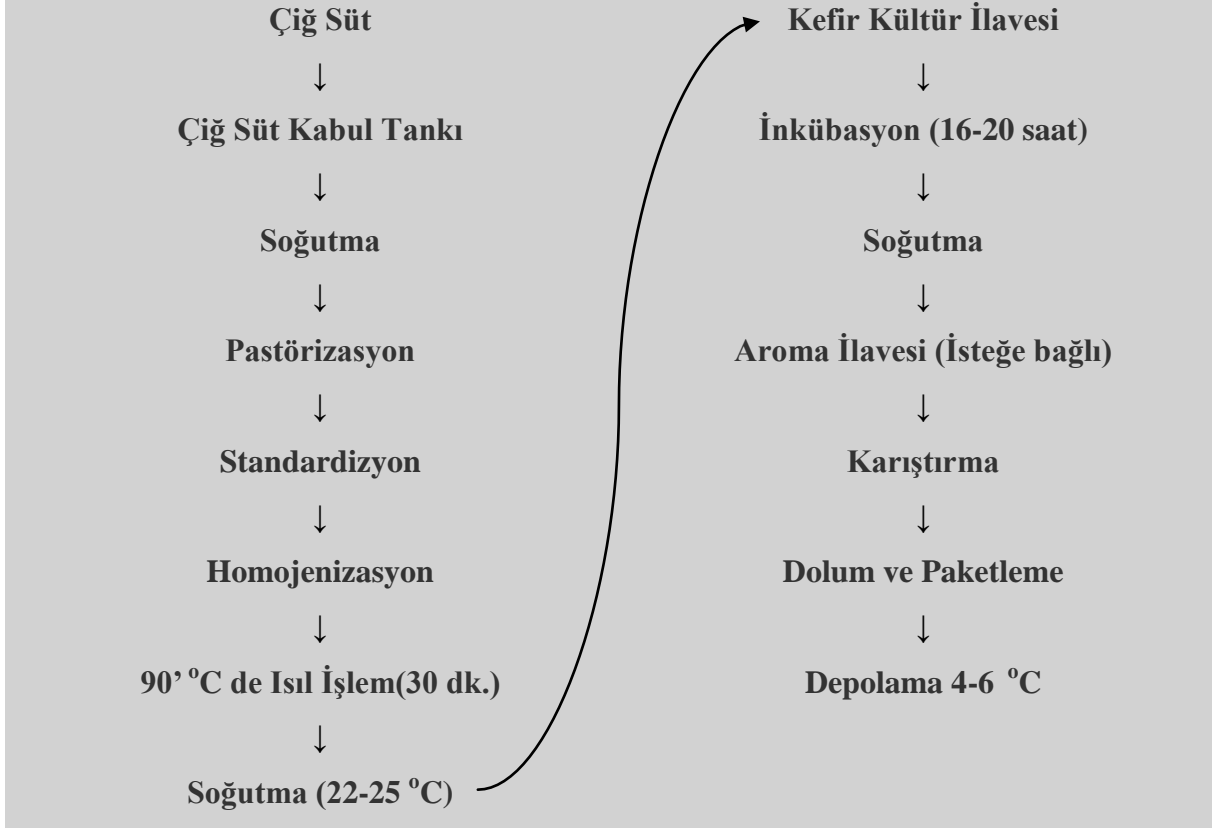
Şekil 2.4. Kefirin Geleneksel Yöntemle Üretimi

2.4.2. Endüstriyel Kefir Üretimi

Endüstriyel kefir üretimi farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilse de esası geleneksel yöntemle aynı prensibe dayanmaktadır. Endüstriyel kefir üretiminde ise istenilen kalitede ürün eldesi için gerekirse süte yağ ve kurumadde standardizasyonu yapılabilmektedir. Kefirde istenilen kıvam, tat, aroma ve pıhtı sertliği sütün homojenizasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Kefire işlenecek süt homojenizasyon sıcaklığına (60-65°C) getirilmekte bu sıcaklıkta yüksek basınçta (200- 220 atm) altında homojenize edilmektedir. Bu işlem kefirin daha iyi bir kıvam, tat ve aromaya sahip olmasını ve yüksek viskozite göstermesini sağlamaktadır.

Hojenizasyondan sonra süt 95°C’de 5 dakika süreyle pastörize edilmektedir. Isıl işlemlerden sonra süt, son üründe iyi bir aroma, iyi bir kıvam, maksimum seviyede alkol ve uçucu yağ asitlerinin oluşumu için 22-25°C’ye soğutulmuş kültür ilave edilmektedir ve 16-20 saat inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon işlemine pıhtının pH’sı 4.5-4.6 olduğunda son verilmektedir. İnkübasyon sonunda hızlı asitlik artışını engellemek için 4-6°C’ye soğutma işlemi gerçekleştirilmekte ve soğutma işleminden sonra ürün olgunlaştırma işlemi için tanklara alınmaktadır. Olgunlaşma esnasında denatüre olan serum proteinleri suyu absorbe ederek ürünün kıvam ve viskozitesini artırmaktadır. Olgunlaşma esnasında ürünün pH’sı 4.5-4.6’dan 4.3-4.4’e kadar düşmektedir. Olgunlaştırma sonucunda elde edilen kefir steril ve hijyenik bir

şekilde paketlenmekte ve 4-6°C sıcaklıkta muhafaza edilmek üzere soğuk hava depolarına alınarak satışa hazır hale getirilmektedir (Şekil 2.5) (Güngör 2007).



Şekil 2.5. Kefirin Endüstriyel Yöntemle Üretimi

İnokülasyon miktarı ve starter mikroorganizmanın tipi son ürünün duyuşal karakteristiği için önem taşımaktadır. Genel olarak kefir kaymaksı (kremş) yapıda ve pürüzsüz tekstüre sahip, hafif ekşi ve az köpüğü olan, maya fermentasyonundan kaynaklanan hafif sert ama baskın olmayan tat-aromaya sahip bir fermente süt ürünüdür (Hafliger ve ark. 1991). Figler ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada ekzopolisakkarit üreten termofilik suşlardan oluşan probiyotik LAB içeren Rus tipi kefir ile geleneksel Rus tipi kefirin dışkı mikroflorası üzerine etkisini araştırmıştır. 120 kişilik gönüllü grup üzerine yapılan denemelerde probiyotik kefirin kalın bağırsakta probiyotik mikroflorayı arttırabildiği fakat geleneksel kefirin bu konuda yetersiz kaldığını tespit etmiştir.

Alpkent ve Küçükçetin (2000), kefir tanesi ile yapılan ve farklı sıcaklıklarda 21 gün süreyle depolanan kefirlerde meydana gelen değişimleri incelemiştir. Taneden elde edilen kültür ile kefir yapmışlar ve bu kefirleri üç gruba ayırmışlardır. Birinci grup 1°C, ikinci grup 5°C ve üçüncü grup 10°C'de 21 gün boyunca depolanmıştır. Depolama süresine bağlı olarak,

5°C’de depolanan kefir örneğinin toplam bakteri miktarı 1., 9. ve 15. günlerde sırasıyla; 8,75 log kob/mL, 8,48 log kob/mL ve 7,62 log kob/mL; maya miktarı ise 5,34 log kob/mL, 5,85 log kob/mL, 5,68 log kob/mL olarak bulunmuştur. Araştırma sonucuna göre; 1°C’de 3 hafta süreyle depolanan kefirlerin kalite özelliklerinin korunduğu ancak 10°C’de depolanan kefirlerde 6 günden sonra oluşan aşırı gaz ve serum ayrılması ile asidik tadın ürünü tüketilemeyecek hale getirdiği görülmüştür.

Kılıç ve ark. (1999), kefir tanesi ve starter kültürle üretilen kefirlerin olgunlaşması sırasında değişimlerini 5 günlük depolama süresince incelemişler ve kefirin mikroorganizma içeriği ve duyu özellikleri açısından üretimden sonra 3 gün içerisinde tüketilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır.

Günlük kefir tanesi kütle artışını en üst düzeye çıkarmak için ayrıca toplam biyokütle konsantrasyonunun ve pH profilinin tekrarlanabilirliğini sağlamak için en iyi şekilde aktif kefir tanelerinin kullanılması gerektiği belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada; kefir tanelerinin en iyi aktiviteyi sağlayabilmesi için en az 11 ardışık gün, mikroorganizmalarla hazırlanmış karışık kültürler (Lifeway Foods, Inc.) ticari kültür olarak kullanılmaktadır. Bu karışık kültür *S. lactis*, *L. plantarum*, *S. cremoris*, *L. casei*, *S. diacetylactis*, *L. cremoris* ve *S. florentinus* içermektedir (Hertzler ve Clancy 2003). Ticari olarak mevcut olan kefir tanelerinden izole edilen maya ve LAB içeren kuru/soğuk depolanan starter kültürler bulunmaktadır. Ancak kefir tanesine özgü mikrofloranın şimdiye kadar sağlanamadığı da literatürden anlaşılmaktadır.

Yaman ve ark. (2010), inek, koyun ve keçi sütü ile yapılan kefirlerde fermantasyon süresince ve soğukta muhafazada LAB ve maya popülasyonundaki değişimi araştırdıkları çalışmalarında, 4°C’de 7 gün süreyle muhafaza edilen kefirlerde maya sayısında azalmalar olduğunu gözlemlemişlerdir. Fermantasyon sırasında pH düşerken, 7 günlük depolama süresi boyunca pH değişmeden kalmıştır. Çalışma sonucuna göre farklı sütlerin kefir mikroflorasının popülasyon gelişimini etkileyebileceği, diğer bir ifadeyle kefirin kalitesi üzerine etkili olabileceği vurgulanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırma materyalini, haziran ayının ikinci haftasında çiçeklenme başlangıcında hasad edilen (1.biçim) yonca (*Medicago sativa L.*) oluşturmuştur.

3.1.1. Deneme Materyallerinin Hazırlanması

Hasad edilerek 24 saat süreyle soldurulan yonca, silaj makinesiyle yaklaşık 1.5-2.0 cm boyutlarında parçalanmıştır. Katkı maddesi olarak,

1. Ticari kefir kültürü (TK): Biyolojik kompozisyonunda *Lactococcus lactis* subsp, *Lactis biovar diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc spp.mesenteroides* ve *Saccharomoyces cerevisiae* içeren (MYStarter KF).
2. Doğal kefir kültürü (DK): Doğal kefir kültürünün biyolojik kompozisyonuna ilişkin tanımlama yapılmıştır. Tanımlama sonrasında *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis* ve *Micrococcus luteus* içerdiği tespit edilmiştir.
3. Doğal ve ticari kefir uygulamalarında doz 1×10^5 , 5×10^5 ve 1×10^6 seviyesinde olacak şekilde hesaplanmıştır.

Katkı maddesinin uygulama şekli: 10 kg parçalanmış taze materyal 1x4 m temiz bir alana yayılmıştır. 1. grup kontrol grubu olup katkı maddesi içermemektedir. 2. grupta, doğal ve ticari kefir kültüründen 0,0375 g tartılarak üzerine 20 ml çeşme suyu konarak iyice karışması sağlandıktan sonra taze materyal üzerine homojen bir şekilde el pülverizatörü ile püskürtülmüştür. 3. grupta 0,1875 g, 4. grupta 0,375 g 2. grupta açıklandığı gibi taze materyale uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise diğer muamele gruplarına eşdeğer 20 ml çeşme suyu ilave edilmiştir. Katkı maddelerinin ilavesinden sonra, yaklaşık 500 g örnek plastik torbalara konularak sıkıştırılmış ve vakumla içindeki havası alınmıştır. Örneklerin vakumlanarak paketlenmesi amacıyla Şekil 3.1' de gösterilen CAS CVP 260 PD marka vakum makinesi kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Vakum makinesi

Başlangıç materyaline ilişkin örnekler Şekil 3.2' de görülmektedir. Her grup için 10'ar tane olmak üzere toplam 40 paket silaj laboratuvar şartlarında (25-30 °C) 45. gün fermantasyona bırakılmıştır. Kırk beşinci gün açılan silajlara 7 gün süre ile aerobik stabilite testi uygulanmıştır.



Şekil 3.2. Silaj başlangıç materyali

3.2. Yöntem

3.2.1. Silaj Kalitesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler

Araştırmada kullanılan yemlerin silolama öncesinde pH, Bc, SÇK, mikrobiyolojik analizler, silolama sonrası örneklerde pH, SÇK, NH₃-N, organik asitler (LA, AA, BA, PA) ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. pH ve Bc (Tampon kapasitesi) Analizleri

Silolama öncesi taze materyalde ve açım sonrası elde edilen örneklerde pH ölçümleri için 50 g'lık örnekler 125 ml saf su ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat süre ile zaman zaman karıştırılarak tutulmuştur. Daha sonra örnekler süzülmüş ve elde edilen süzükte pH metre aracılığı ile okuma gerçekleştirilmiştir (Anonymous 1986).

Silolama öncesi alınan örnekte Bc'nin saptanabilmesi için 20 gram örneğe, 250 ml saf su ilave edilerek mekanik karıştırıcı aracılığı ile 1 dakika süre ile karıştırılmıştır. Karışım dört katlı gazlı bezden geçirilerek elde edilen süzüğün pH'sı 0.1 N HCl ile 3,00'e ayarlanmıştır. Daha sonra 0.1 N NaOH kullanılarak süzüğün pH'sı 4.00'e standardize edilmiştir. Süzük aynı yoğunluğa sahip NaOH ile karışımın pH'sı 4.00'den 6.00'ya çıkıncaya kadar işleme tabi tutulmuştur. pH'nın 4.00'den 6.00'ya yükselmesi için gerekli alkali miktarı meq/kg KM olarak kaydedilmiştir (Playne ve Mc Donald 1966).

3.2.1.2. SÇK Analizi

Başlangıç ve silaj örneklerinde SÇK analizi Anonymous (1986)'a göre yapılmıştır. Analize tabi tutulacak örnek 102°C sıcaklıkta 2 saat süre ile kurutulmuştur. Kurutulup öğütülmüş örnekten 0,2 g tartılarak bir şişe içerisine konulmuş, üzerine 200 ml saf su ilave edilerek 1 saat süre ile çalkalanmıştır. Örneklerin ilk birkaç damlası ihmal edilecek şekilde süzülerek 50 ml'lik berrak ekstrakt elde edilmiştir. Standart eğrilerin hazırlanmasından sonra 2 ml ekstrakt alınarak 150x25 mm'lik borosilikat test tüplerine konulmuştur. Ön hazırlığı takiben absorbans değeri 620 nm'de 30 dakika içerisinde spektrofotometre aracılığı ile okunmuştur. Örnek ve kör denemeler sonrası tespit edilen absorbans değerlerine denk gelen mg glikoz değerleri arasındaki farklılık 500 katsayısı ile çarpılmıştır. Sonuç, örnek içerisinde yer alan g/kg SÇK miktarı olarak kaydedilmiştir.

3.2.1.3. Amonyak Azotu (NH₃-N) Analizi

Silaj örneklerinde NH₃-N, silaj örneklerinden elde edilen ekstraktlarda mikro distilasyon metotlarına (Anonim 1986) göre gerçekleştirilmiştir. Kırk beş günlük süre sonrasında günlük elde edilen örneklerde NH₃-N tespiti için 20 g'lık taze örnek üzerine 100 ml saf su ilave edilerek çalkalama makinesinde 1 saat süre ile çalkalanmıştır. Daha sonra süzülerek elde edilen ekstrakte mikro distilasyon metodu aracılığı ile söz konusu parametre saptanmıştır.

3.2.1.4. Laktik Asit Analizi

Laktik asit miktarlarının tespitinde Koç ve Coşkuntuna (2003)'nın bildirdikleri spektrofotometrik yöntemine göre saptanmıştır.

Derin dondurucuda -20 °C'de saklanan örnekler analizin yapılacağı gün çıkartılarak çözülünceye kadar oda sıcaklığında bir süre bekletilmişlerdir. Çözündürülen örnekler daha sonra 1:100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Seyreltilen örneklerden otomatik pipet yardımıyla 1 ml sıvı tüplere aktarılmış üzerine 0.1 ml bakır sülfat (5g CuSO₄/100 ml saf su) ile 6 ml %98'lik sülfürik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan tüpler 30 saniye vortekste karıştırıldıktan sonra 5 dakika soğuk banyoda tutularak soğumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplere 0.1 ml parahidroxy biphenol (%0,5 NaOH/1000 ml saf su +2,5 g PHBP) eklenerek, tüpler 30 saniye tekrar vortekste karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 90 saniye kaynar su içerisine daldırılıp çıkartılmış ve soğuması beklendikten sonra 565 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okunmuştur.

3.2.1.4.1. Standart eğrinin oluşturulması

213 mg lityum laktat 500 ml saf su içerisinde çözündürülmüş ve üzerine 0.5 ml %98'lik sülfürik asit ilave edilmiştir (400 µg/ml). Elde edilen çözelti, önce 1:9 (40 µg/ml) daha sonra 1:1 (20 µg/ml, stok çözelti) oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Daha sonra stok çözeltden 2,5, 5,0, 10,0,15,0 µg/ml lityum laktat içerecek şekilde yeni karışımlar elde edilmiştir. 1 ml seyreltik bulunan tüplerin içerisine 0,1 ml bakır sülfat ile 6 ml %98'lik sülfürik asit ilave edilmiş, 30 sn vortekste karıştırılmış ve 5 dakika soğuk banyoda tutularak soğumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplere 0.1 ml parahidroxy biphenol eklenerek, tüpler 30 sn tekrar vortekste karıştırılmış ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 90 sn kaynar su içerisine daldırılıp çıkartılmış ve soğuması beklendikten sonra 565 nm dalga bo-

yunda spektrofotometre cihazında okunmuş ve standart eğri Microsoft Excel bilgisayar programında oluşturulmuştur.

3.2.1.4.2. Hesaplama

Standart eğriden, örneklerin $\mu\text{g/ml}$ ' leri okunarak saptanmıştır. Elde edilen örneklerin KM miktarlarına bölünmüş ve silajların %KM'de % LA içerikleri saptanmıştır.

3.2.1.4.3. Asetik, Bütirik ve Propiyonik Asit Analizleri

Asetik asit (AA), Bütirik asit (BA) ve Propiyonik asit (PA) düzeyleri ise 1/5 (hacim/hacim) oranında %25'lik metafosforik asit katılmış silaj süzütüsünde gaz kromatografisi (GC-15A, Shimadzu, Japonya) ile belirlenmiştir (Supelco 1998).

3.2.1.5. Mikrobiyolojik Analizler

Çalışmada silaj örneklerinde LAB, maya ve küf yoğunluklarının saptanmasına yönelik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10 g'lık örnekler peptonlu su aracılığı ile 2 dakikadan az olmamak koşulu ile karıştırılıp mikroorganizmaların mümkün olduğu ölçüde materyalden ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen stok materyalden logaritmik seride dilüsyonlar hazırlanarak 1 saati aşmayan zaman zarfında ekim işlemi yapılmıştır. LAB için besi ortamı olarak MRS Agar, maya ve küfler için Malt Ekstrakt Agar kullanılmıştır. Örnekler için LAB sayımları 30 °C 3 günlük, maya ve küfler için 30 °C de 5 günlük sıcaklıkta inkübasyon dönemlerini takiben gerçekleştirilmiştir (Seal ve ark. 1990).

Örneklerde saptanan LAB, maya ve küf sayıları logaritma koliform üniteye (kob/g) çevrilmiştir.

3.2.1.6. Silaj Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Dizi Analizleri

Tür ayrımı RAPD-PCR analizi ile 25 µl reaksiyon solusyonunda yapılmış ve primer olarak M13 (5'GAGGGTGGCGGTTCT3') primeri kullanılmıştır (Settani ve ark. 2011). M13 primeri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu Zapparoli ve ark' nın (1998) yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır Amplifikasyon işlemi sırasında kullanılan PCR programı; 94 °C'de 2 dk başlangıç denatürasyon aşaması, 40 döngüden oluşan 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 42 °C'de 20 sn bağlanma ve 72 °C'de 2 dk uzama aşamasından oluşmaktadır.

RAPD-PCR işleminden sonra çoğaltılan DNA bölgeleri agaroz jel elektroforezinden faydalanılarak boyutlarına göre gruplara ayrılmıştır ve her grubu temsilen 1 veya 2 örnekte 16S rRNA bölgesi sekanslanmıştır.

16S rRNA bölge çoğaltımı Weisburg ve ark. (1991)' na göre yapılmıştır. 16S rRNA dizi bölgeleri, rD1 ve (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3') ve fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCT 3') primerleri kullanılarak PCR' da çoğaltılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde tüplere steril distile su, DNA (1 µl), 20 mM MgCl₂ içeren tampon (3 µl), dNTP (0,3 µl), Primer rD1 (0,06 µl), Primer fD1 (0,06 µl) ve Taq (0,3 µl) konmuştur.

Amplifikasyon işlemi sırasında kullanılan PCR programı; 95 °C'de 3 dk başlangıç denatürasyon aşaması, 30 döngüden oluşan 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 54 °C' de 45 sn bağlanma ve 72 °C' de 2 dk uzama aşamasından oluşmaktadır.

Elde edilen PCR ürünleri, 1X TBE tamponu ile hazırlanmış ve SYBR Safe DNA Gel (INVITROGEN) eklenmiş % 1,5 (w/v)'lik agaroz jelinde elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işleminden sonra jel, "Kodak EDAS 290" marka UV Transilluminatör altında görüntülenmiş ve DNA bantları analiz edilmiştir. DNA bantlarının boyutlarını hesaplama da standart olarak 100 baz çiftlik DNA marker (Fermentas) kullanılmıştır.

Baz sırası belirlendikten sonra, bu sıra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) adlı internet sayfasında bulunan program kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Tarama sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ile birlikte belirlenmiştir.

3.2.1.7. Aerobik Bozulmaya Dirence İlişkin Analizler

Ashbell ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak silajların silolamanın 45. gününde açılarak 7. gün aerobik stabilite testine tabi tutulmuşlardır. Aerobik stabilitenin 7. günündeki silaj örneklerinin pH'ları ölçülmüş ve CO₂ üretimleri saptanmıştır. Araştırmada, aerobik stabilite testinin uygulanması için 1 atm ve 25 °C de 24 saatteki CO₂ geçirgenlik oranı 15-25 ml /mil/254 m olan stabil, aşınmaya dirençli gaz sızdırmaz özellikteki 1.5 L' lik polietilen (PET) şişeler kullanılmıştır. Bir test ünitesinin oluşturulması için pet şişe 1L ve 0.5L olmak üzere ikiye kesilmiştir. 1L'lik PET şişenin kapak kısmına hava sirkülasyonunu sağlamak için 1 cm çapında delik açılıp üzeri telle kapatılmıştır. Daha sonra 0.5 L' lik kesilen kısmın üzerine yerleştirilmiştir. 250-300 g arasında taze silaj örnekleri, ünitenin üst kısmına sıkıştırılmadan yerleştirilmiş ve %20'lik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinden 100 ml ünitenin alt kısmına konulmuştur. Hazırlanan söz konusu ünite 5 gün 20 °C, 30 °C ve 37 °C'de bekletilmiştir. Bu sayede aerobik aktivite sonucu silaj örneklerinde oluşan ve havadan 1.5 kat daha yoğun olan CO₂ gazı altta çökerek tabanda tutulmuştur. Çözeltiden 10 ml alınarak 1N'lik %37'lik hidroklorik asit çözeltisiyle titre edilmiştir. pH'nın 8.1-3.6 arasında harcanan HCl miktarı saptanmış ve CO₂ gazı miktarı aşağıda belirtilen denkleme göre hesaplanmıştır.

$$CO_2 = 0.044 \times T \times V / (A \times TM \times KM)$$

T= titrasyonda harcanan 1 N HCl asit miktarı (ml) V= %25 KOH çözeltisinin toplam hacmi (ml) A= ünitenin alt kısmına ilave edilen KOH miktarı (ml) TM= taze materyalin ağırlığı (kg) KM= taze materyalin kuru madde miktarı(g/kg)

Aerobik stabilite döneminde silaj örneklerindeki sıcaklık değişimleri ve ortam sıcaklığı 30 dakikada bir 15 gün süreyle (hobo pentant data logger) takip edilmiştir (Chen ve ark. 1994).

Silajlardaki görsel küflenmenin saptanmasında ise Filya ve ark. (2000) tarafından geliştirilen değerlendirme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem silajların küflenme durumlarını görsel olarak 1'den 5'e kadar olan sayılarla değerlendirilmesidir. 1: hiç küf içermeyen bir silaj. 2: noktalar halinde çok az düzeyde küf içeren bir silaj. 3: noktalar halinde yüzeye yayılmış bir şekilde küf içeren bir silaj. 4: yüzeyi kısmen küf ile kaplı, bölge bölge küflenmiş yüzeyleri olan silaj. 5 yüzeyi tamamen küf ile kaplı, ağır bir kokuya sahip ve partikülleri birbirine yapışmış bir silaj. Bu değerlendirmeler üç kişi tarafından yapılmakta ve daha sonra üçünün ortalaması alınmaktadır.

3.2.1.8. Silajların Kuru Madde Kayıplarının Belirlenmesi

Silajların kuru madde kayıpları, 45. günlerde torbalarında hesaplanan silaj KM'si ağırlığının, torbalara konulan taze materyalin KM ağırlığına oranlanması ile hesap edilmiştir (Kleinschmit ve Kung 2006).

3.2.1.9. İstatiksel Analizler

Araştırma sonunda elde edilen veriler SPSS v.16 istatistik paket programının (SPSS Inc. 2007) GLM prosedüründe değerlendirilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılmıştır (Efe ve ark. 2000).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Başlangıç Materyaline İlişkin Analizler

Taze yonca silajına ait kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Uygun saklama koşullarının gerçekleşmesi sonrasında elde edilecek silo yeminde besleme değeri üzerinde etkili olan temel faktörler silajı yapılacak olan materyalin pH, KM ve SÇK içeriği ile epifitik mikroorganizma yoğunluğu gibi özellikler bakımından sahip olduğu değerlere bağlıdır.

Çizelge 4. 1. Başlangıç materyaline ilişkin kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

İçerik	Miktar
pH	7.50
Bc (Tampon kapasitesi), Meq NaOH kg/KM	445
KM, % TM	30.46
HP, % KM	20,21
SÇK g/kg KM	15.45
LAB, log ₁₀ kob/g	5.30
Maya, log ₁₀ kob/g	8.08
Küf, log ₁₀ kob/g	0.00

Bc: Tampon kapasitesi, KM: Kuru madde, TM: Taze materyal, HP: Ham protein, SÇK: suda çözünebilir karbonhidrat, LAB: Laktik asit bakterileri, kob: koloni oluşturan birim.

Çizelgede 4.1’de de verildiği gibi, yonca bitkisinin pH, Bc değeri, KM, içinde ki HP, SÇK, LAB ve maya içerikleri sırasıyla 7.50, 445 meq NaOH/kg KM, % 30.46 , %20.21, 15.45 g/kg, 5.30 log₁₀ kob/g, 8.08 log₁₀ kob/g arasında bulunmuştur.

Yonca silajlarının başlangıç materyalinin pH değerine ilişkin veriler değerlendirildiğinde, Filya ve ark. (2001) pH değerini 6.50, Moravkova ve ark. (2003) pH değerlerini 5.78 - 5.94 arasında, Koç ve ark. (2017) ise pH değerini 5.75 olarak bildirmişlerdir. Canbolat ve ark. (2010) üzüm posasının yonca silajlarında karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmaları olanaklarını araştırdıkları çalışmalarında başlangıç materyaline ilişkin KM içeriğini %25.10, SÇK %1.34 ve HP %19.35 olarak bildirilmiştir. Kent ve ark. (1988) bakteriyel inokulantların yonca silajı-

na etkilerini araştırdıkları çalışmalarında başlangıç materyaline ilişkin pH değerini ve HP düzeyini sırasıyla 6.39 ve %19.90 KM olarak bildirmişlerdir. Araştırmamızda saptanan başlangıç materyaline ilişkin değerlerin, diğer araştırmalardan elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Hasat döneminde yeşil materyalde yer alan epifitik LAB'lar doğal silaj fermentasyonu için esas mikroflorayı teşkil etmektedir. Bu grup bakteri cinsleri canlı bitki üzerinde direk güneş işığına maruz kalmayacağı bölgelerde (gövde veya yaprak altlarında) bulunabilirler ve hasatla birlikte silo ortamına katılabilirler (Blakeman 1981). Fakat yeşil materyal üzerinde doğal olarak bulunan bu bakteriler bitki türüne ve olgunluk zamanına göre bir bitki üzerinde çok geniş aralıkta bulunmaktadırlar (Pahlow ve ark. 2003). Koç ve ark. (2017) yonca silajlarına farklı katkı maddesi ilavesinin etkilerini araştırdıkları çalışmada, LAB ve maya değerini sırası ile 3.52, 2.47 kob/g TM olarak bildirmişlerdir. Araştırmada yonca silajlarında tespit edilen epifitik LAB ve maya yoğunluğunun söz konusu sınırlardan daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür.

4.2. Araştırma Yemlerinin Silolama Sonrası Değerleri

4.2.1. Yonca silajlarının fermentasyon özellikleri ile ilgili bulgular

Fermentasyonun 45. gününde açılan yonca silajlarına ait kimyasal analiz sonuçları izelge 4.2 verilmiştir. Silaj fermentasyonu sırasında oluşan pH, NH₃-N ve LA miktarı fermentasyonun kalitesini belirlemektedir. Özellikle pH ve NH₃-N miktarları düşük, LA/AA oranları yüksek silajlar iyi fermente olmuş silajlar olarak kabul edilebilirler (Filya 2007).

Çizelge 4.2. Fermantasyonun 45. gününde açılan silajların kimyasal analiz sonuçları

KATKI	DOZ	KM, %	pH	NH ₃ -N, g/kg KM	SÇK, g/kg KM	LA, g/kg KM	AA, g/kg KM	BA, g/kg KM	PA, g/kg KM	KM KAYBI, %
KONTROL		27.25±0.53 ^e	5.90±0.00 ^a	4.51±0.21 ^a	8.00±0.29 ^{bc}	6.77±1.43 ^e	19.52±3.31 ^a	17.21±5.63 ^a	3.34±1.04 ^a	2.64±0.04 ^a
	1x10 ⁵	28.45±0.57 ^{c-e}	5.60±0.00 ^{bc}	2.91±0.03 ^{cd}	8.90±1.29 ^b	13.65±0.29 ^d	12.69±6.27 ^{bc}	14.88±4.75 ^a	2.75±0.97 ^{ab}	2.09±0.01 ^d
DOĞAL KEFİR	5x10 ⁵	27.95±0.01 ^{de}	5.45±0.05 ^c	3.83±0.48 ^{ab}	11.30±0.63 ^a	26.63±2.15 ^c	6.84±0.69 ^{de}	12.18±0.32 ^{ab}	2.99±1.28 ^{ab}	2.56±0.02 ^b
	1x10 ⁶	31.54±1.87 ^a	5.55±0.05 ^{bc}	2.68±0.88 ^d	7.92±0.22 ^{bc}	47.84±4.71 ^a	3.64±0.55 ^e	4.31±1.22 ^c	0.41±0.09 ^c	2.62±0.02 ^a
	1x10 ⁵	30.52±0.87 ^{ab}	5.70±0.00 ^b	3.49±0.04 ^{bc}	6.62±2.13 ^c	39.63±4.54 ^b	5.41±1.04 ^{de}	11.07±1.16 ^{ab}	0.74±0.03 ^c	2.62±0.00 ^a
TİCARİ KEFİR	5x10 ⁵	29.23±1.09 ^{b-d}	5.85±0.05 ^a	4.06±0.25 ^{ab}	11.68±0.85 ^a	23.38±1.17 ^c	9.37±0.77 ^{cd}	7.36±3.19 ^{bc}	1.63±0.66 ^{bc}	2.10±0.03 ^d
	1x10 ⁶	29.94±0.95 ^{a-c}	5.50±0.20 ^c	2.83±0.01 ^{cd}	7.67±1.12 ^{bc}	25.30±1.69 ^c	14.55±1.38 ^b	3.07±3.07 ^c	2.79±0.13 ^{ab}	2.31±0.01 ^c
p		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

¹ log₁₀kob/g TM; KM. Kuru madde, NH₃-N: Amonyaga bağlı nitrojen, SÇK: Suda çözünebilir karbonidrat; LA: laktik asit, AA: asetik asit, BA: bütrik asit, PA: propiyonik asit.

:^{abc}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler önemlidir (P<0.001).

Yonca bitkisine farklı düzeylerde doğal ve ticari kefir kültürü ilave edilmesi genel olarak yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini olumlu yönde etkilemiştir. Kontrol grubu ile kefir kullanılan gruplar arasında önemli farklılıklar oluşmuştur.

4.2.1.1. KM

Taze yoncanın KM içeriğinin %30.46 olarak saptandığı bu çalışmada, fermantasyon sonunda KM içerikleri 27.25-31.54 arasında değişmiştir. KM içeriklerine bakıldığında silajların tümünde başlangıç materyaline göre bir kayıp söz konusu olmaktadır. Çalışmada, fermantasyonun 45. gününde en yüksek KM içeriği DK (1×10^6) ve TK (1×10^5) uygulamalarında tespit edilmiştir. En düşük KM düzeyi kontrol grubu silajlarda belirlenmiştir ($P < 0.001$). Kır ve Soya (2008), vejetasyonun %10-25 çiçeklenme döneminde hasat ettikleri yonca bitkisinin KM içeriklerini %19.15 - 21.52 arasında saptamışlardır. Akbari ve Avcıoğlu (1992) ise farklı yonca çeşitlerinin KM içeriklerinin %19.8-25.1 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Açıkgöz (1995), yoncanın çok genç biçim devresinde KM içerikleri %15.0; genç devrede %18.9; tam çiçeklenme devresinde ise %24.0; bakla bağlama devresinde ise %28.0 içerdiğini tespit etmiştir. Araştırmamızdan elde edilen KM değerleri ile diğer araştırmalardan elde edilen değerlerden daha yüksek bulunmuştur. KM değerlerinin yüksek olmasının sebebi yonca silajlarının silanmadan önce 24 saat soldurma yapılmasından kaynaklanmaktadır.

4.2.1.2. pH

Anaerobik fermantasyonun ilk aşamalarında, amaca uygun LA fermantasyonunun gelişebilmesi bakımından önem taşıyan taze materyalinin pH'sındaki değişimlerin yanı sıra, son ürünün sahip olduğu pH değeri de silaj KM tüketimi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Yonca bitkisine kefir ilave edilmesi silajların pH'sını önemli düzeyde azaltmıştır. pH değeri bakımından muamele grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). En düşük pH içeriğine ise 5.45 olarak DK (5×10^5) grubu silajlarda belirlenmiştir. Stallings ve ark. (1981)'nin bildirdiğine göre yonca silajlarında silaj yapılmadan önce 5.8 ve 6.0 oranlarında tespit edilen pH değerinin silaj yapıldığı durumda 4.5 – 4.7 arasında değişim göstermesi beklenmektedir. Araştırmamızdan elde edilen pH değerleri diğer araştırmalardan elde edilen değerlerden daha yüksek bulunmuştur.

4.2.1.3. NH₃-N

Silajı yapılacak kitlenin kapatılması sonrasında da, proteinlerin bitkisel enzimler aracılığı ile parçalanımı devam eder. Proteolitik aktivitenin boyutları ve bu bağlamda da proteinlerin yıkım miktarı ortamdaki asidik koşullarla ilişkili olup, silolamanın başlangıcındaki kritik dönemde pH değerindeki düşüşün hızı önemli bir faktördür (Pettersen 1988, McDonald ve ark. 1991, Davies ve ark. 1998, Filya 2001). Araştırmada NH₃-N miktarlarının 2.68-4.51g/kg KM arasında değiştiği bulunmuştur. En düşük NH₃-N miktarı DK grubunda 1x10⁶ kefir ilavesiyle sağlanmıştır (P<0.001). En yüksek NH₃-N miktarları ise kontrol grubu silajlarda tespit edilmiştir.

4.2.1.4. SÇK

SÇK içerikleri kontrol 8.00 g/kg KM, DK gruplarında sırasıyla 8.90 g/kg KM, 11.30 g/kg KM, 7.32 g/kg KM ve TK gruplarında 6.62 g/kg KM, 11.68 g/kg KM, 7.67 g/kg KM olarak bulunmuştur. Muamele gruplarında en düşük SÇK içeriğine 1x10⁶ g/kg KM gruplarında, en yüksek değerlere 5x10⁵g/kg KM grubu silajlarda tespit edilmiştir (P<0.001). Silolanan materyalin bozulmaması için ortamda mutlaka LAB ve bunların LA üretebilmeleri için yeterli miktarda SÇK bulunmalıdır (Filya 2000, Özdüven ve ark. 2005). SÇK miktarları için elde edilen bulgular literatür bildirişleriyle karşılaştırıldığında; araştırmanın gerek başlangıç materyaline ilişkin veriler, gerekse fermantasyon dönemi sonrası elde edilen SÇK değerleri bu konuda yapılan çalışmalardan daha düşük tespit edilmiştir (Filya ve ark. 2001, Vatansever ve ark. 2009).

4.2.1.5. Organik asitler (LA, AA, BA ve PA)

Araştırmada yonca silajlarının LA düzeyleri DK (doğal kefir) olan gruplarda doza bağlı olarak artış gösterirken TK (ticari kefir) uygulamalarında ise doz miktarı arttıkça düşüş olduğu gözlenmiştir. En yüksek LA içeriği DK grubunda 1x10⁶ grubunda 47.84 g/kg KM olarak belirlenirken en düşük ise kontrol grubunda 6.77 g/kg KM olarak belirlenmiştir (P<0.001).

Asetik asit miktarları ise LA miktarının tam tersi şekilde DK (doğal kefir) olan gruplarda doza miktarına bağlı olarak düşüş gösterirken TK (ticari kefir) uygulamalarında ise doz miktarın bağlı olarak yükselmiştir. En yüksek AA içeriği kontrol grubunda 19.52 g/kg KM olarak belirlenirken en düşük ise DK grubunda 1x10⁶ uygulamasında 3.64 g/kg KM olarak

belirlenmiştir. Yonca silajlarında, AA içerikleri kontrol grubu silajlara oranla daha düşük tespit edilmiştir ($P<0.001$).

Filya ve ark. (2007), yapmış oldukları çalışmada yoncanın kontrol ve 14 farklı LAB katkısı gruplarında LA içeriklerini sırasıyla 40.5 ve 45.9-83.5 g/kg KM, AA içeriklerini 14.2 ve 5.5-36.8 g/kg KM arasında olduğunu bildirmektedirler. Yonca silajların fermantasyon kalitesini belirleyen LA miktarları için farklı literatürlerden elde edilen sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyum içerisindedir. Asetik asit silajın aerobik bozulmasını engelleyen bir özellik taşımasına karşın, KM kaybına, hayvan performansında azalmaya ve yem tüketiminin düşmesine yol açtığından, silaj içerisinde fazla miktarda bulunması arzu edilmez. Etanol ve CO₂ üretimi ise çoğu zaman doğrudan doğruya KM kaybı olarak değerlendirilmektedir (Filya 2001).

Yonca silajlarının BA içerikleri 17.21-3.07 g/kg KM arasında değişmiştir. Yonca silajlarında doz miktarına bağlı olarak silajların, BA içerikleri kontrol grubu silajlara oranla daha düşük tespit edilmiştir ($P<0.001$).

İyi kaliteli bir silo yeminde LA, AA ve BA oranları ile silaj kalitesi arasında önemli düzeyde bir ilişki mevcuttur. Nitekim kaliteli bir silo yeminde süt asidi oranı % 2'nin üzerindedir. Buna karşın AA oranı için % 0.3-0.7 arasında en ideal düzeydir. İyi kalitede bir silo yeminde BA hiç istenmez ve genellikle % 0.1-0.6 arasında ortalama bir değer söz konusudur (Kılıç 1986). Silo içerisinde cereyan eden fermantasyon sürecinin istenmeyen bir yönde seyretmesi durumunda gerek LA gerekse AA ve BA değerlerinde önemli değişimler gözlenmektedir (Koç ve Coşkuntuna 2003).

Propiyoniik asit içerikleri kontrol 3.34 g/kg KM, DK gruplarında sırasıyla 2.75 g/kg KM, 2.99 g/kg KM, 0.41 g/kg KM ve TK gruplarında 0.74 g/kg KM, 1.63 g/kg KM, 2.69 g/kg KM olarak bulunmuştur. Muamele gruplarının PA içeriği kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur ($P<0.001$).

4.2.1.6. Kuru madde kaybı %

Yonca silajlarının KM kaybı %2.64-2.09 arasında değişmiştir. Yonca silajlarına kefir ilavesi silajların, KM kaybını kontrol grubu silajlara oranla daha düşük olmasına sebep olmuştur ($P<0.001$). Kuru madde kayıpları solunum sonucu artan CO₂ üretimi ile doğrudan iliş-

kilidir (Kurtoğlu 2011). Aynı grupta KM kaybının düşük olması bu durumu desteklemektedir.

4.2.2. Yonca silajlarının mikrobiyolojik özellikleri ile ilgili bulgular

Yonca silajlarının mikrobiyolojik analiz sonuçları Çizelge 4.3’de verilmiştir. Silajlarda LAB sayısı başlangıç materyaline oranla tüm gruplarda artmıştır. Kontrol grubunda 5.50 log₁₀ kob/g bulunurken, DK gruplarında sırasıyla 5.68 log₁₀ kob/g, 5.86 log₁₀ kob/g, 5.98 log₁₀ kob/g, ve TK gruplarında 6.08 log₁₀ kob/g, 6.07 log₁₀ kob/g, 6.19 log₁₀ kob/g olarak bulunmuştur (P<0.001). Kızılišimşek ve ark. (2007)’nin çiçeklenme başlangıcı döneminde hasat ettiği yoncaya farklı dozlarda LAB kullandıkları çalışmalarında, kontrol ve LAB grubu silajlarında LAB sayılarını 8.62 ve 8.65-8.91 log₁₀ kob/g KM olarak saptamışlardır. Özdüven ve Çelebi Çam (2017)’in çiçeklenme başlangıcı döneminde hasat edilen yonca bitkisine LAB, E ve LAB+E inokulantı ilavesinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında LAB sayılarını kontrol, LAB, E ve LAB+E silajlarında sırasıyla 5.47, 6.06, 5.06 ve 5.59 log₁₀ kob/g KM olarak bildirdikleri sonuçlar ile çalışmamızdan elde edilen LAB sayılarının uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Uygun ve sağlıklı bir silolama sürecinin gerçekleşebilmesi için bitkilerin doğal florasında ki taşıdıkları LAB sayısı yüksek olması istenmektedir. LAB, fermantasyon döneminde silo içerisindeki en önemli mikrofloradır. Çünkü silolanan ürün LA tarafından korunur. İyi bir silaj fermantasyonu için yeterli düzeyde LAB popülasyonuna gereksinim vardır (Bolsen ve ark. 1996).

Çizelge 4.3. Fermantasyonun 45. gününde açılan silajların mikrobiyoloji analiz sonuçları (log₁₀ kob/g)

KATKI	DOZ	LAB	MAYA	KÜF
KONTROL		5.55±0.12 ^e	5.73±0.01 ^e	2.66±1.34 ^a
	1x10 ⁵	5.60±0.00 ^e	6.24±0.03 ^a	0.00±0.00 ^b
DOĞAL KEFİR	5x10 ⁵	5.86±0.02 ^d	5.82±0.03 ^d	0.00±0.00 ^b
	1x10 ⁶	5.98±0.06 ^c	5.91±0.01 ^c	0.00±0.00 ^b
	1x10 ⁵	6.08±0.00 ^b	5.94±0.01 ^c	0.00±0.00 ^b
TİCARİ KEFİR	5x10 ⁵	6.07±0.02 ^{bc}	6.11±0.02 ^b	0.00±0.00 ^b
	1x10 ⁶	6.19±0.02 ^a	6.10±0.02 ^b	0.00±0.00 ^b
P		<0.001	<0.001	<0.001

^{abc}: Aynı sütunda bulunan farklı harfler önemlidir (P<0.001).

Yonca silajlarında kefir uygulamasına bağlı olarak silajların maya sayıları artış göstermiştir. En yüksek maya sayısı 6.24 log₁₀ kob/g olarak DK (1x10⁵) grubunda en düşük ise kontrol (5.73 log₁₀ kob/g) tespit edilmiştir (P<0.001). Araştırmada AA içerikleri yüksek olan silajların maya sayılarının daha düşük olduğu, bunun AA'in koruyucu özelliğinden kaynaklandığını söylenebilir. Kızılsimşek ve ark. (2016), fermantasyon süresi ilerledikçe maya sayılarında önemli azalmalar görülebildiğini, silajın depolama evresinde mayaların varlığını sürdürmesi anaerobik şartların devamlılığına, silajın pH değerine, organik asitlerin yoğunluğuna ve maya türüne bağlı olarak değiştiğini bildirmektedirler. Nitekim taze materyal ile karşılaştırıldığında fermantasyon süresince tüm silajların maya sayılarında azalma gözlenmiştir.

Silajlardaki aerobik bozulmanın baş sorumluları maya ve küfler olup, silaj açıldıktan sonra sayıları hızla artar ve yaklaşık 7.0-8.0 log₁₀ kob/g KM düzeyine ulaşırlar. Maya ve küfler silajda kuru madde kaybına ve sindirilebilir besin maddelerinin azalmasına sebep olmakla beraber ayrıca bazı küf türleri, mikotoksinler ve diğer bazı toksik bileşikler üretirler. Bunun sonucunda hayvan sağlığında ve performansında kayıplara neden olur. Ayrıca hayvansal ürünlerin tüketicisi olarakta insan sağlığını büyük bir risk altına sokar (Filya 2005).

Yonca silajlarında en yüksek oranda küf gelişimi kontrol grubunda 2.66 log₁₀ kob/g düzeyinde tespit edilmiştir (P<0.001). Silo ortamında küflerin üremesi istenmez. Küflerin

siloda bulunması yem alımının azalmasına, gebe hayvanlarda düşük yapmaya ve hormonal dengesizliklere yol açabilir (Kızıllı ve ark. 2016).

4.3. Silajların Aerobik Stabiliteleri

Yonca silajlarının 7 günlük aerobik stabilite analiz sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Yonca silajlarının aerobik stabilite test sonuçları

KATKI	DOZ	KM, %	pH	CO ₂ g/kg KM	MAYA, log ₁₀ kob/g	KÜF, log ₁₀ kob/g
KONTROL		30.27±0.41 ^{ab}	6.40±0.30 ^b	16.12±1.57 ^b	6.58±0.09 ^{bc}	6.63±0.02 ^a
	1x10 ⁵	28.95±0.70 ^b	5.65±0.15 ^c	13.32±3.18 ^c	6.28±0.13 ^{cd}	0.00±0.00 ^b
DOĞAL KEFİR	5x10 ⁵	30.47±0.62 ^a	7.75±0.05 ^a	47.24±0.02 ^a	6.67±0.10 ^b	0.00±0.00 ^b
	1x10 ⁶	31.15±0.10 ^a	5.50±0.00 ^{cd}	10.67±1.19 ^{cd}	5.24±0.24 ^f	0.00±0.00 ^b
	1x10 ⁵	30.09±1.28 ^{ab}	5.35±0.05 ^d	9.08±0.18 ^d	5.63±0.15 ^e	0.00±0.00 ^b
TİCARİ KEFİR	5x10 ⁵	30.70±0.46 ^a	7.90±0.20 ^a	49.13±1.53 ^a	7.34±0.45 ^a	0.00±0.00 ^b
	1x10 ⁶	31.25±0.91 ^a	5.45±0.05 ^{cd}	8.53±0.03 ^d	6.00±0.04 ^{de}	0.00±0.00 ^b
<i>p</i>		<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

abc: Aynı sütunda bulunan farklı harfler önemlidir (P<0.05).

Fermantasyon sürecini takiben silaj kitlesi açıldığında, anaerobik koşullar aerobik koşullara dönüşür. Aerobik koşullar altında, açım öncesi oksijen yokluğu nedeni ile inaktif durumda olan mayalar ve küfler çoğalmaya başlar. Sonuç olarak silajın bozulması söz konusudur. Özellikle yemleme döneminde söz konusu mikroorganizmalar ortamdaki SÇK, LA ve AA gibi fermantasyon ürünlerini tüketerek büyük miktarlarda besin madde kaybına neden olur. Bunun sonucunda silo içerisinde karbondioksit ve su açığa çıkarak sıcaklık artar. Bu da silajın bozulmasına neden olur. Bu şekilde bozulmuş silajlarla yemlenen hayvanların yem tüketimi olumsuz yönde etkilendiğinden verimleri düşer. Ayrıca bozulmuş silajlarda oluşan küfler, hayvanların sağlığını tehdit ederek ölümcül olabilecek mikotoksinler üretebilmektedir. Söz konusu mikotoksinler hayvansal ürünler ile birlikte insanlara da geçerek sağlık açısından risk oluşturabilmektedirler (Çayıroğlu ve ark. 2016).

Yonca silajlarında aerobik stabilitenin 7. gününde KM içerikleri kontrol, DK (1x10⁵, 5x10⁵, 1x10⁶ ve TK (1x10⁵, 5x10⁵, 1x10⁶) gruplarında sırasıyla % 30.27, 28.95, 30.47, 31.15, 30.09, 30.70 ve 31.25 olarak bulunmuştur (P<0.05). pH değerleri ise kontrol grubunda 6.40,

DK gruplarında sırasıyla 5.65, 7.75, 5.50, ve TK gruplarında 5.35, 7.90 ve 5.45 olarak bulunmuştur ($P<0.001$).

Yonca silajlarının CO_2 %8.83-49.13 g/kg KM arasında değişmiştir. En yüksek CO_2 miktarı DK ve TK 5×10^5 uygulamalarında tespit edilmiştir ($P<0.001$). Silajlarda CO_2 üretimi ise çoğu zaman doğrudan doğruya KM kaybı olarak değerlendirilmektedir (Kurtoğlu 2011).

Aerobik stabilitenin 7. günlerinde maya içerikleri kontrol $6.58 \log_{10}$ kob/g, DK (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 ve TK (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6) gruplarında sırasıyla 6.28, 6.67 ve 5.24 \log_{10} kob/g; 5.63, 7.34 ve 6.00 \log_{10} kob/g olarak bulunmuştur ($P<0.001$). Araştırma sonuçlarında en yüksek CO_2 miktarına sahip DK ve TK 5×10^5 gruplarının maya içerikleride buna paralel olarak daha yüksek tespit edilmiştir. Silajların aerobik bozulmasında birçok mikroorganizma rol almakla birlikte başlıca sorumlu olan mikroorganizmalar mayalar ve küflerdir. Mayalar organik asitleri tüketip ortam sıcaklığını arttırarak bozulmayı başlatırlar ve böylece silajın korunma özelliğini azaltırlar (Kurtoğlu 2011).

Küf içerikleri ise sadece kontrol grubunda $6.63 \log_{10}$ kob/g olarak belirlenmiştir. Yonca silajlarına kefir ilave edilmesi küf oluşumunu engellemiştir ($P<0.001$).

Yonca silajlarının 7 günlük aerobik stabilite dönemi süresince sensör verilerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir. Sensör verilerine ilişkin veriler değerlendirildiğine aerobik bozulma en geç DK uygulamalarında (5×10^5 ve 1×10^6) TK gruplarında ise (5×10^5) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Yonca silajlarının aerobik stabilite süresince sensör verilerine ilişkin ortalama değerler

KATKI	DOZ	Aerobik bozulma (saat)	Sıcaklık Max	Sıcaklık Min	Sıcaklık Ort
KONTROL		28	29.35	26.39	27.71
	1×10^5	17	30.25	26.68	28.35
	5×10^5	30	29.15	26	27.61
DOĞAL KEFİR	1×10^6	30	29.15	26	27.61
	1×10^5	17	29.55	26.48	28.06
	5×10^5	30	28.95	26.09	30.63
TİCARİ KEFİR	1×10^6	26	29.25	26.19	27.75

4.4. LAB 16SrRNA Dizi Analizi sonuçları

16SrRNA Dizi Analizi ile yapılan sonuçlarına göre popülasyon çeşitliliği fermantasyon dönemi açım sonrası *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis* olarak belirlenmiştir. Silaj içerisinde anaerobik mikroorganizmalardan olan *Lactobacillus brevis* veya *Lactobacillus buchneri* gibi LAB etkin olması istenirken, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae*, *Bacilli* ve *Listeria* gibi bakteriler, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Issatchenkia* ve *Saccharomyces* türü mayalar, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Pencillium* türü küf mantarları istenmemektedir. Bu tür bakteri, maya ve küflerin gelişimi silajın pH'sını arttırarak silaj kalitesinin düşmesine ve dolayısıyla da stabilitenin azalmasına neden olmaktadır (Basmacıoğlu ve Ergül 2002, Danner ve ark. 2003).

Silajlarda yapılan çalışmalarda, en çok rastlanan LAB, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinslerine ait türlerdir ve silajda LAB fermentasyonu çoğunlukla bu türler tarafından gerçekleştirilir. *Streptococcus faecium* bakterileri hızlı çoğalmakta ve pH değerini kısa sürede düşürmektedir. *Lactobacillus plantarum* diğer bakteri türlerine göre daha yavaş çoğalır fakat çok fazla sayıda LAB oluşturur. Ayrıca çok düşük pH değerinde sadece *Lactobacillus plantarum* yaşayabilir (Pitt 1986).

Cai ve ark. (2001), Japonya, Nishinasuno, Tochigi şehrindeki Milli Mera Araştırma Kurumu'ndaki araştırma alanından elde ettikleri, çiçeklenme başlangıcı evresindeki yoncadan hazırladıkları silajları 3 tekerrürlü olmak üzere 30 gün boyunca 25°C de silolamışlardır. Araştırma sonucunda mikrobiyolojik ve kimyasal analizler yapmışlardır. Bu çalışmalarında, silaj ortamındaki fermentasyon kalitesinin yükselmesinde ve LA üretiminde *P. acidilactici*, *L. plantarum* ve *L. casei* bakterilerinin *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. pseudomesenteroides* ve *W. paramesenteroides* bakterilerine göre daha da etkili olduklarını tespit etmişlerdir.

Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde bu konuda yapılan çalışmalara benzer LAB izole edildiğini söyleyebiliriz. Kontrol, Doğal kefir uygulamalarında izole edilen LAB heterofermantatif özellikte bulunurken, Ticari kefir uygulamalarında ise homofermantatif özellikte LAB izole edilmiştir.

Çizelge 4. 6. Yonca silajlarında fermantasyonun 45. gününde izole edilen LAB kültürlerin sekans sonuçları

Örnek Adı	DOZ	Tür ya da Alttür	Erişim no ^a	Toplam uzunluk ^b
KONTROL		<i>L. brevis</i>	KX057568	1500bp
	1x10 ⁵	<i>L. brevis, E. faecium</i>	KX057568 MH473255	1500bp 1483bp
DOĞAL KEFİR	5x10 ⁵	<i>P. pentosaceus E. faecium</i>	MH473223 MH473255	1208bp 1483bp
	1x10 ⁶	<i>L.brevis</i>	KX057568	1460bp 1500bp
	1x10 ⁵	<i>P. pentosaceus, E. faecium</i>	MH473223 MH473255	1208bp 1483bp
TİCARİ KEFİR	5x10 ⁵	<i>P. pentosaceus, E. faecium</i>	MH473223 KY992877	1208bp 1511bp
	1x10 ⁶	<i>E. faecium</i>	KY992877	1511bp

^a Üyelik numaraları ve ilgili nükleotid dizileri National Center for Biotechnology Information ‘dan alınmıştır.

^b Nükleotidlerin uzunlukları

Aerobik stabilite döneminde izole edilen LAB ise ağırlıklı olarak *Lactobacillus plantarum* bunun dışında *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Weissella paramesenteroides* *Enterococcus faecalis*, *Weissella paramesenteroides*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus brevis* olarak belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifementans*, *Lactobacillus slivarius*, *Lactobacillus coryniformis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecium*, *Pedicoccus pentosaceus* ve *Enterococcus faecalis* gibi bakteriler homofermentatif türlere *Lactobacillus brevis* *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bunchneri*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Leucnostonc mesenteroides*, *Leucnostonc paramesenteroides* *Leucnostonc dextarnicum* gibi bakteriler de heterofermentatif türlere örnek olarak verilebilir.

Çizelge 4. 7. Yonca silajlarında arobik stabilitenin 7. gününde izole edilen LAB kültürlerin sekans sonuçları

Örnek Adı	Tür ya da Alttür	Erişim no ^a	Toplam uzunluk ^b
KONTROL	<i>E. gallinarum, E. casseliflavus,</i>	MH532489 MG871248	1521bp 1521bp
	<i>Weissella paramesenteroides</i>	AB775181	1542bp
DOĞAL KEFİR	<i>Weissella paramesenteroides,</i>	AB775181	1542bp
	<i>Bacillus sp., L. plantarum,</i>	MH558376 MH478188	1518bp 1505bp
	<i>L. brevis</i>	KX057568	1500bp
TİCARİ KEFİR	<i>L. plantarum, E. faecalis</i>	MH478188	1505bp

^a Üyelik numaraları ve ilgili nükleotid dizileri National Center for Biotechnology Information ‘dan alınmıştır.

^b Nükleotidlerin uzunlukları

5. SONUÇ

Bu araştırmada farklı oranlarda ticari ve doğal kefir kültürü katkı maddesi olarak yonca silajlarına ilave edilmiştir. Araştırmada katkı maddelerinin yonca silajlarının kimyasal, mikrobiyolojik özellikleri ve aerobik stabilite üzerine etkileri belirlenmiştir.

Uygulanan katkı maddeleri silajların fermantasyon ve aerobik stabilite özelliklerini olumlu yönde etkilemişlerdir.

Araştırma sonucunda, kefir kullanımını yonca silajlarının fermantasyon ve mikrobiyolojik kompozisyon özelliklerini olumlu yönde etkilemişdir. Aerobik stabiliteye ilişkin değerlendirme sonuçları dikkate alındığında; kefirli silajların CO₂ retimi, maya ve değerlerinin az olması dikkat çekicidir. Bu çalışmada doğal kefir kültürü uygulamalarında izole edilen LAB heterofermantatif özellikte bulunurken, ticari kefir kültürü uygulamalarında ise homofermantatif özellikte LAB'lar izole edilmiştir. Bu anlamda kefirin LAB kaynağı olarak kullanılabileceği ancak konuya ilişkin gerek sahada gerekse hayvan materyali üzerinde yapılacak çalışmalarla desteklenmesinin gerekli olduğu söylenbilir.

6. KAYNAKLAR

- Açıkgöz E (1995). Yem bitkileri (II. Baskı). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Basımevi No: 7-025-0210, Bursa.
- Akbari N, Avcıoğlu R (1992). Ege Bölgesine Uygun Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinin Agronomik Özellikleri ile Yem Kaliteleri Üzerinde Araştırma, Doktora Tezi, Bornova-İzmir.
- Alpkent Z, Küçükçetin A (2000). Farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen Kefirlerin duyuşal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinde meydana gelen değişimler. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Editör: Mehmet Demirci; s.363-373, Tekirdağ.
- Alvarez-Martin P, Florez AB, Hernandez-Barranco A, Mayo B (2008). Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*, 19:62-70.
- Anonim (2005). Türk Gıda Kodeksi, Fermente Süt Ürünleri Tebliği, Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı Tebliğ No:2009/25, Ankara.
- Anonymous (1986). *The Analysis of Agricultural Material*, Reference Book: 427, 428 p, London.
- Arihara K, Toba, T, Adachi S (1990). Immunofluorescence Microscopic Studies on Distribution of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus Kefir* in Kefir Grains, *Int. J. Food Microbiol*, 11, 127-134.
- Arriola KG, OCM Queiroz, JJ Romero, D Casper, E Muniz, J Hamie, AT Adesogan (2015). Effect of microbial inoculants on the quality and aerobic stability of bermudagrass round-bale haylage. *J. Dairy Sci.* 98:478–485.
- Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B (1991). A Simple System to Determine the Aerobic Determination of Silages. *Can. Agric. Eng.* 33: 391–395.
- Basmacıoğlu H, Ergül M (2002). Silaj Mikrobiyolojisi. *Hayvansal Üretim Dergisi* 43(1): 12-24.
- Bensmira M, Nsabimana C, Jiang B (2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of kefir. *Food Science and Technology*. 43:1180-84.

- Blakeman JP (1981). Microbial Ecology of the Phylloplane. Academic Press London, pp. 502.
- Bolsen KK, Laytimi A and Schirhammer J (1988). Effect of Enzyme and Inoculant Additives on Preservation and Feeding Value of Sorghum Silages. J. Anim. Sci. 66 (Suppl. 1):367.
- Bolsen KK, Bonilla DR, Huck GL, Young MA, Hartthakur RA, Joyeaux A (1996). Effect of a Propionic Acid, Bacterial Inoculant on Fermentation and Aerobic Stability of Whole-Palnt Corn Silage. J. Anim. Sci. 74 (Suppl. 1): 274.
- Bozkurt P, Köktaş T, Güzel-Seydim Z (2010). Geleneksel ve ticari olarak üretilen kefirlerin mikrobiyal içeriklerinin belirlenmesi. I.Uluslar arası Adryatik'ten Kafkaslar'a Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, s.330, 15-17 Nisan, Tekirdağ.
- Cai, Y., Uegaki, R., Fujita, Y. 2001. Lactic acid bacteria isolated from forage crops and silage fermentation. Teknik rapor, National Grassland Research Institute, Nishinasuno, Tochi-gi 329-2793, Japan.
- Canbolat Ö, Kalkan H, Karaman Ş, Filya İ (2010). Üzüm Posasının Yonca Silajlarında Karbonhidrat Kaynağı Olarak Kullanılma Olanakları. Kafkas Univ Vet Fak Derg 16 (2): 269-276.
- Chen HC, Wang SY, Chen MJ (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. Food Microbiology. 25:492-501.
- Chen J, Stokes MR, Wallace CR (1994). Effects of Enzyme-Inoculant Systems on Preservation and Nutritive Value of Hay Crop and Corn Silages, J. Dairy Sci., 77: 501-512.
- Çayroğlu H, Coşkun İ, Şahin A (2016). Silajın Aerobik Stabilitesini Etkileyen Faktörler ve İyileştirme Stratejileri. Alinteri Dergisi, 31(B): 91-97.
- Daniela JLP, Checolib M, Zwieler J, Jungesa D, Fernandes J, Nussio LG (2015). The effects of *Lactobacillus kefir* and *L. brevis* on the fermentation and aerobic stability of sugarcane silage. Animal Feed Science and Technology 205 2015 69–74.
- Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, Braun R (2003). Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 69: 562–567.
- Davies DR, Merry RJ, Williams AP, Bakewell EL, Leemans DK, Tweed JKS (1998). Proteolysis During Ensilage of Forages Varying in Soluble Sugar Content, J. Dairy Sci, 81, 444-453.

- Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:43-53.
- Duitschaeffer CL, Kemp N, Emmons D (1987). Pure Culture Formulation and Procedure for the Production of Kefir. *Milchwiss.* 42, 80-82.
- Efe E, Bek Y, Şahin M (2000). SPSS’te Çözümleri ile İstatistik Yöntemler II. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları, Kahramanmaraş, 223s.
- EFSA (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Lactobacillus kefir* (DSM 19455) as a silage additive for all animal species. *EFSA J.* 4, 1–10, <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3177>, Available online: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3177.pdf>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Ergüllü E, Üçüncü M (1983). Kefir mikroflorası üzerine bir araştırma. *Gıda.* 8(1); 3- 10.
- Farnworth ER (2005). Kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods.* 2(1):1-17.
- Farnworth ER, Mainville I (2008). Kefir - A Fermented Milk Product. In: Farnworth ER, editor. *Handbook of Fermented Functional Foods*; p.89-127, 2th ed. CRC Press Taylor & Francis Group; Boca Raton, London, New York.
- Figler M, Mozsik G, Schaffer B, Gazstonyi B, Szili PAB, Rab R (2006). Effect of special hungarian probiotic kefir on faecal microflora. *World J Gastroenterol.* 12(7);1129-32.
- Filya İ (2000). Bazı Silaj Katkı Maddelerinin Ruminantların Performansları Üzerindeki Etkileri *Hayvansal Üretim* 41: 76–83.
- Filya İ (2001). *Silaj Teknolojisi*. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, 16059, Görükle, Bursa.
- Filya İ (2007). Ülkemizde Silaj Yapımı ve Silaj Kalitesinin Artırılma Yolları. *Yem Magazin*, Mart, 2007, 47:37-44.
- Filya İ, Ashbell G, Hen Y, Weinberg ZG (2000). The Effect of Bacterial Inoculants on The Fermentation and Aerobic Stability of Whole Crop Wheat Silage. *Animal Feed Sci. Technology*, 88:39-46.

- Filya İ, Ashbell G, Weinberg ZG, Hen Y (2001). Hücre Duvarını Parçalayıcı Enzimlerin Yonca Silajlarının Fermantasyon Özellikleri, Hücre Duvarı Kapsamı ve Aerobik Stabiliteleri Üzerine Etkileri. Ankara Üniv. Zir. Fak. Tarım Bil. Dergisi 7 (3): 81-87.
- Filya İ, Muck RE, Contreras-Govea FE (2007). Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. J Dairy Sci, 90(11): 5108-5114.
- Filya İ, Sucu E (2005). Formik asitin düşük kuru maddeli mısır silajlarının aerobik stabilite ve besleme değeri üzerine etkileri. III. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi, 7-10 Eylül 2005, Adana.
- Garofalo C, Osimani A, Milanovic V, Aquilanti L, Filippis F (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir strains from different Italian regions. Elsevier Food Microbiology. 49:123-33, 2015.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL (1997). Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. Lebensm.-Wiss. u.- Technol. 30, 77-84.
- Garrote GL, Abraham AG, De-Antoni GL (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. J Dairy Res. 68:639-52.
- Goncu A, AlpKent Z (2005). Sensory and Chemical Properties of White Pickled Cheese Produced Using Kefir, Yogurt or a Commercial Cheese Culture as a Starter. I. Dairy Journal 15, 771-776.
- Güngör Ö (2007). Meyve Suyu İlaveli Kefirin Depolama Süresince Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Afyon.
- Güzel-Seydim ZB, Wyffels JT, Seydim AC, Greene AK (2005). Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. Int J Dairy Technol. 58(1); 25-9.
- Hafliger M, Spillmann H, Puhan Z (1991). Kefir- a fascinating cultured milk product. Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft. 112(13); 370-75.
- Hertzler SR, Clancy SM (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. J Am Diet Assoc. 103:582-87.
- Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibáñez FC (2005). Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristic of Kefir During Storage. Food Chemistry 90, 613-620.

- İnal T (1990). Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi Final Ofset, İstanbul
- Kent BA, Arambel MJ, Walters JL (1988). Effect Of Bacterial Inoculant on Alfalfa Haylage: Ensiling Characteristics and Milk Production Responses When Fed to Dairy Cows in Early Lactation. *J Dairy Sci* 71:2457-2561.
- Kılıç A (1986). Silo Yemi (Öğretim, Öğrenim ve Uygulama Önerileri). 327 s., İzmir.
- Kılıç S, Uysal H, Akbulut N, Kavas G, Kesenkaş H (1999). Chemical, microbiological and sensory changes in ripening kefir produced from starters and grains. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 36:111-18.
- Kır B, Soya H (2008). Kimi Mer'a Tipi Yonca Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 45 (1): 11-19.
- Kızılsimşek M, Erol A, Ertekin İ, Dönmez R, Katrancı B (2016). Silaj Mikro Florasının Birbirleri İle İlişkileri, Silaj Fermentasyonu ve Kalitesi Üzerine Etkileri. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 19 (2),136-140.
- Kizilsimsek M, RJ Schmidt, Kung L Jr (2007). Effects of a mixture of lactic acid bacteria applied as a freeze-dried or fresh culture on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 90 (12). 5698-5705.
- Kleinschmit DH, Kung L JR (2006). The Effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the Fermentation of Corn Silage. *J. Dairy Sci*. 89: 3999–4004.
- Kleinschmit DH, RJ Schmidt, L Kung (2005). The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci*. 88:2130–2139.
- Koc F, Ozturk Aksoy S, Agma Okur A, Celikyurt G, Korucu D, Ozduven ML (2017). "Effect of Pre-Fermented Juice, *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Buchneri* on The Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of High Dry Matter Alfalfa Bale Silage". *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(5):1426-1431
- Koç F, Coşkuntuna L (2003). Silo Yemlerinde Organik Asit Belirlemede İki Farklı Metodun Karşılaştırılması. *Journal of Animal Production*. 44(2): 37-47.
- Koçak C, Gürsel A (1981). Kefir. *Gıda*. 4:11-4.
- Koroleva NS. (1982). Special products (kefir, koumyss, etc.). *International Dairy Congress*, s.146-152.

- Koroleva NS (1988). Technology of Kefir and Kumys. Science and Technology of Fermented Milks. Bulletin of IDF 227.
- Kung L Jr, RE Muck (1997). Animal Response to Silage Additives. Pages 200–210 in Proc. Silage: Field to Feedbunk North American Conference. NRAES-99. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY.
- Kurtoğlu V (2011). Silaj ve Silaj Katkıları. Aybil Yayınevi Konya.
- Libudzisz Z, Piatkiewicz A (1990). Kefir production in Poland. Dairy Industries International. 55:31-33.
- Marshall V (1993). Starter Cultures for Milk Fermentation and Their Characteristics, J. of the Soci. Of Dairy Technol., 46(2):49-56.
- McDonald P, Henderson AR, Heron SJE (1991). The Biochemistry of Silage. Second Edition. 340 p., Chalcombe Publication, Marlow, England.
- Muck RE, L Kung Jr (1997). Effects of silage additives on ensiling. Pages 187–199 in Proc. Silage: Field to Feedbunk North American Conference. NRAES-99. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY.
- Neve H (1992). Analysis of Kefir Grain Starter Cultures by Scanning Electron Microscopy, Milchwissenschaft, 47(5): 275-278.
- Ogunade IM, DH Kim, Y Jiang, ZG Weinberg, KC Jeong, AT Adesogan (2016). Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. J. Dairy Sci. 99:4427–4436.
- Otsoa FL, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J (2006). Kefir: A Symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. Revista Iberoamericana de Micologia. 23:67-74.
- Ozduven ML, Coşkuntuna L, Koc F (2005). Determination of fermentation and feed value characteristics of grape pomace silage. Trakya Univ. J. Sci, 6(1):45-50.
- Ozduven ML, Celebi Cam A (2017). The Effects of Bacterial Inoculants and/or Enzymes on the Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of Alfalfa Ensiled at Different Stages of Maturity. International Journal of Current Research, 9(02):45983-45988.
- Ötleş S, Çağındı O (2003). Kefir: A probiotic dairy- composition, nutritional and therapeutic aspects. Pakistan Journal of Nutrition. 2(2);54-9.

- Özpinar A. (2012) Kefir ve Bozanın *in vitro* Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. Fen Bilimleri Ens . Yüksek Lisans Tezi.
- Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, SJWH Oude-Elferink, Spoelstra SF (2003). Microbiology of Ensiling. In: Silage Science and Technology. DR Buxton, R.E. Muck, J.H Harrison (eds). Crop Sci. Soc. Am., Madison, WI. pp. 31–93
- Petterson K (1988). Ensiling of Forages: Factors Affecting Silage Fermentation and Quality, Sveriges Lantbruksuniversitet, 46 p, Uppsala, Sweden.
- Pitt R (1986). Microbial and enzymatic additives for ensiling. 54th, (pp. 137–147). Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Proc Cornell Nutr Conf Feed Manuf 199.
- Playne MJ, McDonald P (1966). The Buffering Constituent of Herbage and of Silage, J. Sci. Food. Agric, 17:264-268.
- Ratray FP, O’Connell MJ (2011). Fermented Milks Kefir. In: Fukay JW, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences; p.518-524, 2th ed. Academic Press; San Diego, USA.
- Sarkar S (2008). Biotechnological innovations in kefir production: a review. BritishFood Journal. 110(3);283-95.
- Seale DR, Pahlow G, Spoelstra SF, Lindgren S, Dellaglio F, Lowe JF (1990). Methods for The Microbiological Analysis of Silage, Proceeding of The Eurobac Conference, 147. Uppsala.
- Seiler H (2003). A Review: Yeast in Kefir and Kumiss. Milchwissenschaft 58, 392-396.
- Settanni L, Tanguler H, Moschetti G, Reale S, Gargano V, Erten H (2011). Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions, Food Microbiol. 28, 1367-1373.
- Setyawardani T, Rahardjo AHD, Sulistyowati M, Wasito S (2014). Physiochemical and organoleptic features of goat milk kefir made of different kefir grain concentration on controlled fermentation. Animal Production. 16(1);48-54.
- Seydim ZB (2001). Studies on fermentative, microbiological and biochemical properties of kefir and kefir grains. Ph.D. Dissertation, Clemson University, Clemson, SC.
- Silva VP, OG Pereira, E Leandro, T Da Silva, K Ribeiro, H Mantovani, S Santos (2016). Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on the fermentation profile

- and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions. J. Dairy Sci. 99:1895–1902.
- Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristova T, Frengova G, Spasov Z (2002). Lactic Acid Bacteria and Yeast in Kefir Grain and Kefir Made from Them. Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology, 28(1):1-6.
- Stallings CC, Townes R, Jasse BW, Thomas JW (1981). Changes in Alfalfa Haylage During Wilting and Ensiling with and without Additives. J. Animal Sci. 1981 53: 765-773.
- Supelco (1998). Analyzing fatty acids by packed column gas chromatography, Sigma-Aldrich Corp, Bulletin 856, Bellefonte, PA.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Femente Süt Ürünleri Tebliği R.Gazete: 16.02.2009-27143
Tebliğ No: 2009/25
- Vatansever M, Polat C, Koç F, Özdüven ML (2009). Yonca Balya Silajlarında Farklı Katkı Maddesi Kullanımının Silaj Fermantasyonu ve Aerobik Stabilité Üzerine Etkileri. VI. Ulusal Besleme Kongresi (Uluslararası katılımlı), 30 Haziran-1 Temmuz 2009 Samsun.
- Weinberg ZG, RE Muck (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiol. Rev. 19:53–68.
- Weis W, Burgbacher G (1986). 100 Jahre kefir in Deutschland-Nach wie vor ein aktuelles thema. Untersuchung von kefir aus Molkereien und Handel sowie dessen problematik. Deutsche Milchwissenschaft. 37:81-4.
- Yaman H, Elmalı M, Kamber U (2010). Observation of Lactic Acid Bacteria and Yeast Populations During Fermentation and Cold Storage in Cow's, Ewe's and Goat's Milk Kefirs Kafkas Univ Vet Fak Derg 16 (Suppl-A): S-113-118.
- Yaygın H (1999). Kefir ve Özellikleri. III. Milli Süt ve Süt ürünleri sempozyumu: Yoğurt. Milli Produktivite Yayınları no:548, s.246-52, Ankara.
- Zapparoli G, Torriani S, Dellaglio F (1998). Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* Strains by Randomly Amplified Polymorphic DNA and Pulsed-field Gel Electrophoresis. FEMS Microbiology Letters, 166:324-332.
- Zwielehner JC, Schoendorfer K, Schatzmayr G (2014). A meta-analysis of *Lactobacillus kefir* DSM 19544 and *Lactobacillus brevis* DSM 23231 as silage inoculant in whole plant maize silage. In: Proc. Int. Sci. Conf. Probiotics and Prebiotics, Budapest, Hungary, p.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenim ve tez aşamalarında benden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, öğrencilerine bir eğitmen olmanın yanında anne şefkati ile yaklaşabilen ve her daim onların yanında olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fisun KOÇ'a ve bu süreç içerisinde her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, araştırmalarımın kaynaklarıyla ve bilgileriyle destek çıkan aynı zamanda derslerimide almış olduğum hocalarım Sayın Prof. Dr. Levent ÖZDÜVEN ve Sayın Doç. Dr. Levent COŞKUNTUNA'ya teşekkürlerimi sunar saygılar dilerim.

Ayrıca bu süreç içerisinde özellikle laboratuvar çalışmalarımın daima yanımda olan, kıymetli vaktini benden esirgemeyen arkadaşım Yük. Ziraat Mühendisi Sayın Berrin OKUYUCU'ya ve çalışmada kullanmış olduğumuz kuru kefir mayasının (MY starter KF) temin edilmesinde yardımcı olan Maysa GIDA Şirketi Pazarlama Sorumlusu Sayın Aslıhan TANGI hanımefendiye teşekkürlerimi borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul'un Avcılar ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğretimini Mustafa Kemal Paşa İ.Ö.Okulu'nda, lise öğrenimini Avcılar Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında başladığı Ege Üniversitesi Ziraat Mühendisliğinden 2014 yılında mezun oldu. Mezuniyet sonrası çeşitli işlerde görev aldı. 2015-2016 döneminde Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Mühendisliği Zootekni Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.