



**T.C.
Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKSPOLİSAKKARİT
(EPS) ÜRETİMİ ÜZERİNE KALSİYUMUN ETKİSİ**

MERYEM ÇOLAK

Mart 2011

Meryem ÇOLAK tarafından **Doç.Dr. Ayten ÖZTÜRK** danışmanlığında hazırlanan “**Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit (EPS) üretimi üzerine kalsiyumun etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Mustafa KARATEPE, Niğde Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Gazı GÖRÜR, Niğde Üniversitesi

Üye : Doç.Dr.Ayten ÖZTÜRK, Niğde Üniversitesi

Üye : Doç.Dr.Gökçen Y.ÇELİK, Erciyes Üniversitesi

Üye : Yrd.Doç.Dr. Dilşad ÖNBAŞILI, Erciyes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Nurettin ACIR
MÜDÜR

ÖZET

BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKSOPLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİ ÜZERİNE KALSİYUMUN ETKİSİ

ÇOLAK, Meryem

Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ayten ÖZTÜRK
İkinci Danışman : Doç. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

Mart 2011, 70 sayfa

Yoğurt, peynir gibi fermente süt ürünlerinin kalitesini arttırmak önemli bir çalışma alanıdır. Bu çalışmada daha önce hiç denenmemiş olan yumurta kabuğunun, yoğurt starteri olan Laktik asit bakterilerinin (*S. thermophilus* ATTC 14425 ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATTC 11842) ekzopolisakkarit üretimlerine ve oluşturdukları yoğurdun kalitesi üzerine etkisi çalışılmıştır. Denemelerde çeşitli miktarlarda (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 % w/v) yumurta kabuğu tozu kullanılmış ve her iki bakteri grubunun eps üretiminin % 1.0'lik yumurta kabuğu konsantrasyonunda daha iyi olduğu tespit edilmiştir. % 1.0'lik yumurta kabuğu konsantrasyonu kullanılarak yoğurt üretimi ve ürün kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Kontrol grup olarak yumurta kabuğunun kullanılmadığı yoğurt ve ticari kalsiyum karbonat kullanılarak üretilen yoğurtlar da üretilmiştir. Üç farklı şekilde hazırlanan yoğurt örnekleri arasındaki kıyaslamalar için 21 gün süreyle yoğurtların mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve duyuşal özelliklerine bakılmıştır. Elde edilen veriler ışığında yumurta kabuğunun kullanıldığı yoğurtların normal yoğurt örnekleriyle kıyaslandığında koku ve tat açısından farklı olmadıkları, hatta 21 günlük sürede normal yoğurtlarda görülen olumsuz duyuşal değişmelerin bu yoğurtlarda gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Yumurta kabuğu katılarak hazırlanan bu yoğurtlarda pH'nın fazla düşmediği, viskozite açısından daha iyi olduğu ve mikrobiyolojik kalitesinin azalmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgulardan yumurta kabuğunun bakterilerin eps üretimini ve yoğurt kalitesini artırdığı istatistik olarak da gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Laktik asit bakterileri, Ekzopolisakkarit, yoğurt, yumurta kabuğu, starter kültür

SUMMARY

EFFECT OF CALCIUM ON EXOPOLYSACCHARIDES (EPS) PRODUCTION of SOME LACTIC ACID BACTERIA

ÇOLAK, Meryem
Nigde University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Assoc. Professor Dr. Ayten ÖZTÜRK
Co-Advisor : Assoc. Professor Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

March 2011, 70 pages

The improvement of the quality of diary products such as yoghurt, cheese is an important field of study. In this research, the effect of egg shell powder on yoghurt quality and the production of exopolisaccharide of lactic acid bacteria (*S. thermophilus* ATTC 14425 and *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATTC 11842) which are yoghurt's starters have been studied. Various concentrations of egg shell powder (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 % w/v) have been used. The best concentration was found as 1.0% for both bacteria and this concentration was chosen for the production yoghurt. Three different type yoghurt samples were prepared in order to compare their quality. Two of the control yoghurt samples (normal yogurt without egg shell and commercial calcium carbonated yogurt) were compared with yogurt containing egg shell. The rheological, sensorial and microbiological properties of yogurt samples have been also examined for the period of 21 days. When the yoghurt samples containing egg shell powder were compared with normal yoghurt (without egg shell), no difference in the smell or taste was observed. Moreover negative sensorial changes which are normally observed in normal yoghurt were not detected in the yogurt samples containing egg shell powder. From these results we concluded that, the pH, viscosity and yogurt's microbiological quality were much better compared to the control yogurt samples. These results were also supported by our statistical studies.

Key words: Lactic acid bacteria, exopolysaccharide, yogurt, egg shell, starter culture

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca yönlendirici ve yol gösterici olan, değerli görüő, öneri ve deneyimlerini benden esirgemeyen, bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan tez danıőmanlarım Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü ğretim yesi Sayın Doç. Dr. Ayten ÖZTÜRK'e ve Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ğretim yesi Doç. Dr. Gökçen Yuvalı ÇELİK'e itina ve sabırla her zaman yanımda oldukları için sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi, tez çalıőmam boyunca da anlayıőları, sevgileri ve sabırlarıyla beni destekleyen değerli annem, babam, her zaman yanımda olan eőim Mehmet ÇOLAK ve canım oğlum Yusuf Furkan'a da özellikle sabrından dolayı teőekkrler bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xi
BÖLÜM I. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II. FERMENTE SÜT ÜRÜNLERİNİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLİ FAKTÖRLER	3
2.1 Laktik Asit Bakterileri	4
2.1.1 <i>Streptococcus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	4
2.1.2 <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	5
2.1.2.1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	6
2.1.2.2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	6
2.2 Ekzopolisakkaritler (EPS)	9
2.2.1 Polisakkaritlerin bileşimi ve yapısı	11
2.2.1.1 Homopolisakkaritler	11
2.2.1.2 Heteropolisakkaritler	12
2.2.2 Ekzopolisakkarit üretimi	12
2.3 EPS Üreten Mikroorganizmalar	13
2.3.1 Laktik asit bakterileri eksopolisakkaritleri ve özellikleri	14
2.4 Ekzopolisakkaritlerin Fonksiyonları	15
2.5 Ekzopolisakkaritlerin Önemi	16
2.6 EPS'lerin Fermente Süt Ürünlerinin Yapısı Üzerine Etkileri	18
2.6.1 Viskozite	18
2.6.2 Serum ayrılması	19
2.6.3 pH	20
2.6.4 Mikrobiyolojik analizler	20
2.6.5 Yapı-tekstür	21

2.6.6 Elastikiyet	22
2.7 EPS'nin Kullanım Alanları	27
2.8 Yumurta Kabuğunun Özellikleri	29
BÖLÜM III. MATERYAL VE METOT	30
3.1 Materyal	30
3.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipman	30
3.3 Bakterilerin Aktifleştirilmesi	30
3.4 Bakterilerin Hazırlanması ve Sayımı	32
3.5 Kalsiyum Kaynağı Olarak Yumurta Kabuğunun Hazırlanması	33
3.6 Bakterilerin Ürettiği EPS Miktarının Belirlenmesi	34
3.7 EPS Üretimlerinin Karşılaştırılması İçin Glikoz Standardının Hazırlanması ...	35
3.8 Yumurta Kabuğunun Kullanıldığı Yoğurtların Üretimi	36
3.9 Yoğurt Üretiminde Kullanılan Sütlerin Özellikleri	37
3.10 Yoğurt Örneklerinden Duyusal Analizler	37
3.11 Duyusal Değerlendirmelerde İstatistiksel Analizler.....	39
3.12 Yoğurt Örneklerinde Viskozite Tespiti	39
BÖLÜM IV. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1 EPS Standartının Hazırlanması	40
4.2 Bakterilerde EPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
4.3 Yumurta Kabuğu Kullanılarak Yoğurt Üretimi	45
4.4 Yoğurt Örneklerinde Bakteriyel Sayım	46
4.5 Yoğurt Örneklerinin Duyusal Özellikleri	48
4.6 Duyusal Değerlendirmelerde İstatistiksel Analizler	51
BÖLÜM V. SONUÇ	54
KAYNAKLAR	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Fermente sütlerin üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri.....	8
Çizelge 2.2	Laktik asit bakterileri tarafından üretilen homopolisakkaritler	11
Çizelge 2.3	Yumurta kabuğunun kimyasal bileşimi	29
Çizelge 3.1	Yoğurt üretiminde kullanılan pastörize ve homojenize sütünün bileşimi	37
Çizelge 3.2	TS 1330, Nisan 2006 – Yoğurtların duyuusal muayene değerlendirme puanları	38
Çizelge 4.1	Yoğurt örneklerinin fizikokimyasal özelliklerinin takibi	47
Çizelge 4.2	Yoğurt örneklerinden elde edilen bakteri sayım sonuçları (adet/mL).	47
Çizelge 4.3	Yoğurt örneklerinin duyuusal özelliklerinin takibi	49
Çizelge 4.4	Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin tat değerlendirmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	51
Çizelge 4.5	Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin koku değerlendirmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	52
Çizelge 4.6	Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin görünüş değerlendirmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	52
Çizelge 4.7	Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin kıvam değerlendirmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	Glikoz standardı	40
Şekil 4.2	<i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> için yumurta kabuğu olmadığında elde edilen bakteri konsantrasyonu ve EPS ilişkisi	42
Şekil 4.3	<i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> için 0.25 g/L yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi	42
Şekil 4.4	<i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> için 0.5 g/L yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi	43
Şekil 4.5	<i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> için 1.0 g/L yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi	43
Şekil 4.6	<i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> için 2.0 g/L yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi	44
Şekil 4.7	<i>S. thermophilus</i> ve <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> için farklı yumurta kabuğu konsantrasyonlarında eps miktarının (mg/ml) karşılaştırılması	44

FOTOĞRAF VB. MALZEMELER DİZİNİ

Fotoğraf 3.1	Bakterilerin inkübasyonunda kullanılan anaerobik Jar	33
Fotoğraf 3.2	400 mikron gözenekli elek	34
Fotoğraf 3.3	Elde edilen yumurta kabuğu tozu	34
Fotoğraf 3.4	Yumurta kabuğunun kullanıldığı yoğurtların üretimi	36
Fotoğraf 3.5	Duyusal değerlendirmelerin yapıldığı tadım odası.....	38
Fotoğraf 3.6	Viskozite ölçümünde kullanılan cihazlar	39
Fotoğraf 4.1	Yoğurtlarda görülen su bırakma problemi	45

KISALTMA VE SİMGELER

KISALTMA/SİMGE

CFU	Colony forming unit (koloni oluşturan birim)
EPS	Ekzopolisakkarit
TS	Türk Standardı
LAB	Laktik asit bakterileri
TCA	Triklorasetik asit
SPSS	Statistical Package for the Social Science
MRS	Man Rogosa and Sharpe
OD	Optik Dansite
rpm	Devir sayısı
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
L	Litre

BÖLÜM I

GİRİŞ

Yoğurt ve peynir gibi süt ürünlerinin tüketimi antik çağlara kadar uzanmaktadır. Süt ürünlerinin üretimi başlangıçta çiğ süte bulaşan, süt kaplarında kalan ya da süütün doğal florasını oluşturan bakterilerin fermentasyonu sonucunda oluşmuştur. Daha sonraları 19. yüzyıldan itibaren mikroorganizmaların keşfi ve mikrobiyoloji bilimindeki ilerlemeler sayesinde fermente süt ürünlerinin oluşumundan sorumlu bakteriler tespit edilerek ticari olarak üretimlerde kullanılan starter kültürler elde edilmiştir [1, 2, 3].

Starter kültürleri oluşturan laktik asit üreten bakteriler endüstriyel olarak fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılmakta ve fermente süt ürünlerinin kalitesi geliştirilmeye çalışılmaktadır. Dolayısıyla endüstriyel olarak süt ürünlerinin üretiminin artması, pazarlama ve rekabet edebilme başarısının artışı gerektirmiş, ayrıca müşterilerde geleneksel yöntemlerle üretilen ürünlerdeki kaliteyi yakalayabilme beklentisini de beraberinde getirmiştir.

Müşteri beklentileri dendiğinde, ilk akla gelen özellik ürünün duyuşal özellikleridir. Duyusal özellikler süütün bileşimiyle ve süte uygulanan teknolojik işlemler (ısı işlem v.b.), fermentasyon sıcaklığı, kullanılan kültür, inkübasyon ve depolama sıcaklığı gibi pek çok faktörün etkisi ile şekillenir. Bunların içerisinde ürüne karakteristik özelliklerini kazandıran en önemli unsur kullanılan starter kültürlerdir. Endüstriyel üretimde ürünlerin duyuşal özellikleri ile birlikte kar sağlanması da önemli bir husus olduğu için, kullanılan kültürün karakteristikleri büyük ölçüde önem kazanmıştır.

Yoğurt ve ayran üretiminde kullanılan temel laktik asit bakterileri *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* bakterileridir. Bu bakterilerin farklı suşlarından hazırlanan kültür kombinasyonları süt ürünlerinin yapısal ve duyuşal özelliklerinde oldukça etkilidir. Ürün kalitesini artırmak amacıyla Laktik asit bakterileri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Bunlar içerisinde ekzopolisakkarit (EPS) üretim yeteneği ve bu yeteneğin artırılmasına yönelik çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu tez çalışmasında ise, kalsiyum içeriği yüksek, doğal bir ürün ve aynı zamanda atık madde olarak görülen yumurta kabuğunun yoğurt starteri olan bakterilerin EPS üretim yeteneği üzerindeki etkisi ve fermente süt ürünü olan yoğurdun kalitesini değiştirip değiştirmediği araştırılmıştır.

BÖLÜM II

FERMENTE SÜT ÜRÜNLERİNİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLİ FAKTÖRLER

Yoğurt, tereyağı, peynir gibi süt ürünlerinin kendine özgü yapıları ile beğenilen tat ve aromalarının oluşmalarını sağlamak amacıyla kullanılan, istenen özelliklere sahip saf mikroorganizma kültürlerine saf kültür veya starter kültür denilmektedir [1]. Örneğin, yoğurt üretiminde en önemli basamak, laktozun laktik asit bakterileri tarafından fermente edilerek laktik aside dönüştürülmesidir. Laktik asit üretimine paralel bir dizi biyokimyasal tepkimenin sonucunda yoğurdun kendine has tekstür ve aroması oluşmaktadır [4].

Çiğ süte uygulanan fiziksel işlemler, sütün kimyasal kompozisyonu, fermantasyon koşulları, kullanılan starter kültürlerin tipi gibi faktörler yoğurdun fiziksel, kimyasal ve duyuşsal karakterlerinin oluşumunu etkilemektedir [5]. Fermente süt ürünlerinin yapısına etki eden faktörler; sütün kuru madde oranı, sütün mikrobiyolojik kalitesi, ısıl işlem sıcaklığı, inhibitör ya da koruyucu madde varlığı, kültürde kullanılan suş ve oranı, bakteriyofaj varlığı, inkübasyon sıcaklığı, depolama sıcaklığı, organik asitlerin üretimi, EPS ve proteinler arasındaki olası etkileşim, kıvam arttırıcı madde/stabilizatör katılması olarak sıralanabilir [6].

Yoğurt üretimi için genelde inek sütü, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile fermente edilir. Fermentasyon 40-42 °C' lerde 4- 6 saatte gerçekleştirilir. Sıcaklığın bu limitler dışına çıkması ürünün yapısal ve duyuşsal özelliklerinin değişmesine neden olur. Fermentasyon, asit konsantrasyonu % 1,2 - 1,4' e ulaştığında soğutma yoluyla sonlandırılarak asitliğinin istenen düzeyin üzerine çıkması önlenir. Ayrıca bakteriyofaj varlığı endüstriyel üretimde dikkat edilmesi gereken bir diğer husustur. Fermente ürünün kültüründe bulunan bakteriye özel fajın varlığı söz konusu olduğunda, faj bakteriye inhibe eder ve dolayısıyla fermentasyonun kısmen ya da tamamen gerçekleşmemesine sebep olur [7].

Fermentasyon boyunca üretilen laktik asit sütün pH' sını düşürür ve bunun sonucunda misellerdeki kalsiyum ve fosfatın çözünürlüğü artarak miselleri destabilize eder. Buna ilave olarak kazein misellerinin elektrik yükü izoelektrik noktasına düşer, kazein hidrofobik etkileşimler sebebiyle çöker ve içi serum ile dolu boşlukları olan bir ağ yapı oluşturur. Mekanik bir etki böyle bir jeli kırdığında, kazein ağı serum içinde dağılan jel parçalarına bölünür. Jel partiküllerinin dağılım viskozitesi serum fazının viskozitesine orantılıdır [8]. Bunun bir sonucu olarak; EPS üretmeyen bir kültür suyu ile fermente edilmiş, karıştırılmış tipte bir yoğurdun viskozitesi düşüktür ve tekstür granüllü olmaya yatkındır. EPS üretebilen kültürler ile yapılan yoğurtlar, EPS' in protein kompleksinde serumun kuvvetli tutulmasına imkân verdiği için, yüksek su tutma kapasitesine sahip olur [9].

EPS üreten laktik asit bakterileri sadece yoğurt ve yoğurt benzeri içecekler için değil, aynı zamanda peynir üretimi için de önemlidir. Örneğin bazı *Lactobacillus helveticus* suşlarının EPS üretmeleri ve bu yolla ürünün su tutma özelliğini arttırmaları sebebiyle Mozzarella peyniri üretiminde kullanıldığı bilinmektedir [10].

Yoğurt ve benzeri ürünler ile sert ve pıhtısı pişirilen peynirlerin yapımında yararlanılan termofilik laktik kültürler ise *Lactobacillus delbruecki spp. bulgaricus* ve *Lactobacillus delbruecki spp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* ile *Streptococcus salivarius spp. thermophilus*'tan oluşmaktadır [1].

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri prokaryot, heterotrof ve kemoorganotrof olan canlı grubu içinde yer alır [1]. Sitokromoksidaz enzimleri bulunmaz. Gram (+), hareketsiz, sporsuz, anaerob, fakat oksijene toleranslıdırlar. Katalaz enzimini taşımazlar (bazıları yalancı katalaz içerebilir), nitrata redükte etmezler. Hidrokarbonları fermente ederek laktikasit üretirler. Laktik asit bakterilerinin çoğu en az bir adet plazmid içerir. Plazmidler ekzopolisakkarit ve antimikrobiyal madde sentezi gibi koruma görevi üstlenmiştir [11].

2.1.1 *Streptococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Streptococcus cinsi bakteriler *Streptococcaceae* familyasına ait olup Laktik asit bakterileri grubundandır [12]. “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” kitabında *Streptococcus* cinsi, Piyogenik, Oral, Enterokok, Laktokok ve Diğer Streptokoklar gruplandırmasında sonuncusuna dahil edilmiştir. *Streptococcus thermophilus*, özellikle yoğurt üretimi ve İsviçre tipi ve İtalyan peyirlerinin üretiminde diğer starterler ile birlikte termofilik starter olarak kullanılır. Viridans gruptadır. Gram pozitif, fakültatif anaerobik, bazı türleri mikroaerofiliktirler. Homofermentatif bir bakteri olup L(+) laktik asit üretir. Minimum gelişme sıcaklığı 19 ila 21 °C iken optimum gelişme sıcaklığı 42 – 43 °C’ dir. Maksimum gelişme sıcaklığı (50 °C’ de gelişir fakat 53 °C’ de gelişmez) ve ısıya dayanımı (60 °C’ de 30 dakika canlı kalır) ayırıcı özelliğidir. [13, 6].

Bu cinsin temsilcisi *S. salivarius* ssp. *thermophilus*’ dur. Hücreler yuvarlaktan ovale kadar değişen şekilde olup 2µm çapta, ikili veya zincir şeklinde bulunurlar. Genellikle hareketsiz olan bu bakteriler kültür ortamında küçük ve renksiz koloniler oluştururlar [1]. Kemoorganotrof canlılardır. Bazı türleri malik ve sitrik asit gibi organik asitleri serin ve arginin gibi aminoasitleri fermente ederler [1]. Spesifik antijen içermezler, bu nedenle herhangi bir serolojik gruplandırması yapılamayan streptokoklardandır [14, 15]. *S.thermophilus* yoğurt dışında Mozzarella, Cheddar, Gruyère-tipi, Emmental, Grana-tipi, Provalone ve Gorgonzola gibi İsviçre, Fransız ve İtalyan tipi peynirlerin üretiminde de starter olarak kullanılmaktadır [16].

2.1.2 *Lactobacillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Lactobacillus cinsi bakteriler, *Lactobacillaceae* familyasına aittir. *Lactobacillus* spp.’ ler anaerobik, gram (+), spor oluşturmeyen bakterilerdir. Çoğu *Lactobacillus* alt türleri basil ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir. Bu mikroorganizmalar gelişebilmeleri için aminoasit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar [17]. 10-30µ uzunluğunda 0,7-2µ kalınlığında, çubuk şeklinde tek tek veya zincirler şeklinde bulunur. Genç bakteriler genellikle zincir oluşturmaz. *Lactobacillus* spp. suşları 2-53 °C’ de (Optimum 30-40 °C) gelişirler, 70 °C’ nin üzerindeki sıcaklıklarda ölürler. Hafif asidik ortamda daha hızlı çoğalarak *Streptococcus*’ lardan daha fazla asit oluştururlar. Bu nedenle aside dayanıklıdırlar. Aynı zamanda, bu bakteriler % 1–3 oranında laktik asit

oluşturarak pH'yı 3,2–3,5'e kadar düşürürler. Ayrıca *Lactobacillus* cinsine ait türlerin proteolitik aktiviteleri de yüksektir [18, 19].

Çoğu türleri patojen değildir. *L. catenaforme*, plöropulmoner enfeksiyonlar ile ilişkili olduğu bulunmuştur [20]. Genelde hareketsiz olsalar da bazı türleri flagellalara sahiptirler. Çoğu *Lactobacillus* cinsi bakteriler çubuk (basil) şekillidirler ancak bazı türleri farklı uzunlukta ve zincir şekindedirler (kokobasil) [21].

2.1.2.1 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*

Bu bakteri ilk olarak 1905 yılında Bulgar Grigoroff tarafından tanımlanmıştır. Yoğurt, İsviçre tipi ve İtalyan peynirlerinin üretimi için diğer starter kültürler ile birlikte kullanılan termofilik bir starterdir. Metakromatik granülleri vardır. Argininden amonyak üretmez. *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ortamda laktozu hızla parçalar ve %1,8 oranında D(-) tipte laktik asit oluşturur. Optimum gelişme sıcaklığı 42-45 °C ' ler arasındadır. DNA ' da % G+C oranı 50,3 dolayındadır. Hücre duvarında peptidoglikan yapısı L-lisin, D-aspartat şeklindedir. Çiğ süt ve sert peynirlerde doğal olarak bulunması yanında sert, pıhtısı pişirilen peynirlerde kültür olarak kullanılmaktadır [22, 23]. *S. thermophilus*' tan farklı olarak *Lb. bulgaricus*' un proteolitik aktivitesi daha fazladır ve kazeini, özellikle de b-kazeini hücre duvarı proteinazları ile hidrolize ederek polipeptit oluşturabilir [16, 5]. Genom büyüklüğü 1.8–2.3 Mb arasındadır [1, 24]. Çiğ süt ve sert peynirlerde doğal olarak bulunurken Grana (Fransız tipi), Emmental (İsviçre tipi) ve Mozzarella, Taioggo (İtalyan tipi) gibi sert, pıhtısı pişirilen peynirlerde kültür olarak kullanılır [1, 24-26].

2.1.2.2 *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*

Yoğurt üretiminde *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ile birlikte bulunur. *Lb. delbrueckii ssp. lactis* başta Emmental peyniri olmak üzere, İsviçre tipi ve İtalyan peynirlerinin ve bazı sert peynirlerin üretiminde diğer starterler ile birlikte kullanılan termofilik starterdir. Kolonileri tırtıklı, 1- 3 mm çapında ve beyazdan açık griye kadar pigmentsizdir. Gram pozitif, genişliği 2 µm' den küçük olan çubuk şeklinde bir bakteridir. Arjininden amonyak üretmez. Salisilin, sakkaroz ve mannitolü fermente edebilir fakat amigdalin ya da sellobiyozu fermente edemez. Gelişme faktörü olarak

bazı vitaminlere ve aminoasitlere ihtiyaç duyar. Optimum gelişme sıcaklığı 40 - 43 °C' dir; ancak 15 - 52 °C' ler arasında da [13, 27] gelişme gösterir.

Dünyanın çeşitli bölgelerinde ayırana benzeyen, düşük viskoziteli yoğurt grubuna dahil ürünler üretilmektedir. Bu ürünler genel olarak "içilebilir yoğurt" ya da "laktik içecek" olarak adlandırılmaktadırlar [5, 28]. Sütün farklı laktik asit bakterileri (LAB) suşları ile fermentasyonu, farklı tekstür özelliklerine sahip son ürünlerin elde edilmesine neden olur. Bu durum fermentasyon süresince besin ortamında üretilen makromoleküllerin (Ekzopolisakkaritler (EPS)) varlığı ile açıklanmaktadır [6].

Laktik asit bakterileri süt gibi ortamlarda EPS sentezleyebilmektedirler [29-32] Özellikle yoğurt, içilebilir tipte yoğurt, peynir, fermente krema, sütlü tatlıların üretimi için EPS üreten laktik asit bakterileri oldukça önemlidir [33, 34]. EPS; son ürünün yapısı, duyu özellikleri ve stabilitesi üzerinde etkilidir. Fermente süt ürünlerinin üretiminde temel rol oynayan laktikasit bakterileri Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Kültürün özellikleri yapı ve stabilite üzerinde etkilidir. Ürün kalitesini iyileştirmek için en çok uygulanan işlemler sütün kuru maddesinin yağ, proteinler ya da şekerlerin (sakkaroz, fruktoz) ilavesi ile artırılması, yasalar izin verdiği takdirde veya mikarda pektin, nişasta, alginat, jelatin, gibi stabilizörlerin ilavesi şeklindedir. Ancak bu işlemler daha az gıda katkıları ile üretilmiş, daha ucuz, düşük yağ, düşük şeker içeren ürün beklentisi içinde olan müşteriler için sorun yaratmaktadır. Bu zorluğa karşı yapılabilecek uygulamalar; kültürü uygun gelişim sıcaklığında inkübe etmek ve/veya fermentasyonda starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin doğal olan EPS üretimini avantaj olarak kullanmak olabilir [35, 36].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS' lerin yapı ve kimyasal kompozisyonu, biyosentezi ve genetiği, mikrobiyal fizyolojisi ve üretimine dair çok sayıda inceleme yapılmıştır [29-32, 34, 37].

Ülkemizde en fazla tercih edilen fermente süt ürünleri yoğurt ve ayrandır. Bu nedenle bu ürünlerin ev tipi üretiminin dışında endüstriyel boyutta ve standart kalitede üretilmesi oldukça önemlidir. Bu standardın endüstriyel üretimde sağlanması ticari laktik asit kültürlerinin kullanımı ile olmaktadır. Fermente süt ürünlerinin kendilerine has görünüm, tat, koku, kıvamını kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri kazandırır. Laktik asit bakterilerinin fermente süt ürünlerine kendilerine has özellikleri

kazandırmaları sadece laktik asit ya da aroma maddeleri üretmeleriyle değil, ekzopolisakkarit üretim yetenekleri ile de ilgilidir.

Çizelge 2.1 Fermente sütlerin üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri [9]

Bakteri	Fermente süt örnekleri
Laktokoklar	
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	Fermente yağlı süt, kefir
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	Fermente yağlı süt, kefir, dahi
<i>Lactococcus. lactis biovar diacetylactis</i>	Fermente yağlı süt, kefir, dahi
Streptokoklar	
<i>S. thermophilus</i>	Yoğurt, dahi, mozzarella
Leuconostoc	
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	Kefir, Fermente krema
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>	Kefir, Fermente krema
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum</i>	Kefir, Fermente krema
Lactobacillus	
<i>L. delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	Fermente süt içecekleri, yoğurt
<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i>	Fermente süt içecekleri
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Yoğurt, Bulgar yağlı sütü, Mozzarella
<i>L. helveticus</i>	Kefir, kıymız, Mozzarella
<i>L. acidophilus</i>	Asidofilus sütü, kefir
<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	Fermente süt içecekleri
<i>L. johnsonii</i>	Probiyotik yoğurt, fermente süt içecekleri
<i>L. casei</i>	Probiyotik yoğurt
<i>L. paracasei</i>	Probiyotik yoğurt
<i>L. reuterii</i>	Probiyotik yoğurt
<i>L. rhamnosus</i>	Kefir
<i>L. plantarum</i>	Kefir
<i>L. kefir</i>	Kefir
<i>L. kefiranofasciens</i>	Kefir
<i>L. brevis</i>	Kefir
<i>L. Fermentum</i>	Kefir
Bifidobacterium	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Fermente sütler
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Yoğurt benzeri ürünler
<i>Bifidobacterium breve</i>	
<i>Bifidobacterium infantis</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i>	

EPS' ler ürün yapı özelliklerini geliştiren doğal stabilizörler olarak adlandırılabilir. Dolayısıyla farklı kaynaklardan elde edilmiş ve katkı maddesi olarak değerlendirilen stabilizörler (keçi boynuzu, guar gam vb.) yerine tamamen ürüne özel kültürler tarafından üretilen doğal stabilizörler yardımıyla ürün elde edilmesi tercih edilmelidir.

Bunun için de LAB' nin EPS üretim yetenekleri ve üretilen EPS özellikleri iyi bilinen bakteri suşlarının ve dolayısıyla kültürlerin belirlenmesi en önemli adımdır.

2.2 Ekzopolisakkaritler (EPS)

Diğer birçok mikroorganizma gibi laktik asit bakterileri de hücre içinde yerleşimlerine göre; İntraselüler (depo) polisakkaritler, yapısal formdaki polisakkaritler ve ekstraselüler (EPS) polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türü sentezlemektedirler. Bunların birincisi; sitozol içinde yer alır, karbon ve enerji kaynağı olarak işlev görür. İkincisi; peptidoglikanlar ve teikoik asitler gibi çeperde yer alırlar. Üçüncü grup ise, hücre içinde oluştuktan sonra dışına yani kültür ortamına salgılanır. Bazı durumlarda iki form aynı mikroorganizma tarafından oluşturabilir. Bu polimerlere kapsül ve mikrokapsül şeklinde polisakkarit adı verilmektedir [36, 29].

Hücre dışı polisakkaritler birçok laktik asit bakterisi tarafından üretilir. Bunlardan birincisi *Leuconostoc mesenteroides* ve *Streptococcus mutans* tarafından oluşturulan ve glukozun homopolimeri olan dekarboksilandır. İkinci grup *Streptococcus salivarius* tarafından üretilen ve fruktozun homopolimeri olan levanlardır. Üçüncü grup ise termofil ve mezofil laktik bakterilerin oluşturduğu heterojon polisakkaritten meydana gelen ve birçok yapıtaşını da bünyesinde bulunduran heteropolisakkaritlerdir [38].

EPS (ekzopolisakkaritler) formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır. İn vitro çalışmalarda EPS' lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir [39].

Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS kapsül veya slim formda olabilir. Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır [40, 41]. EPS'ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler [42]. EPS'ler glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarid yapıda, bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarid yapıdadır.

EPS'yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptir [43, 44].

Ayrıca polisakkaridler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların etkisiyle EPS üretimi etkilenmektedir [45]. EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır.

Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirlen, ancak mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar [46, 47]. EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Ortamdaki metalik iyonların tutulmasını sağlarlar ayrıca bitki, insan ve hayvan patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virulans faktörler oldukları da bilinmektedir [39, 48]. Aynı zamanda bitkilerle bakteriler arasında bir etkileşim aracıdır. Sonuç olarak yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır [49].

EPS'nin viskozite üzerindeki etkisi fizikokimyasal özelliklerine bağlı bulunmaktadır. Bu nedenle, bu biyopolimerlerin yapı-fonksiyon ilişkisine ait bilgiler, spesifik teknolojik uygulamalara uygun polimerlerin seçimi veya tasarlanmasında önemli bir noktadır [50, 36]. EPS'lerin teknolojik özelliklerine ilaveten, insan sağlığı üzerine olumlu fizyolojik etkilerinin de olduğu belirtilmekte, anti-tümör, anti-ülser, immun sistemi düzenleyici ve kolesterol düşürücü aktiviteleri ile birlikte probiyotik bir role sahip oldukları ileri sürülmektedir [51].

Ekzopolisakkaritler, buldukları ortamda koruyucu bir fonksiyona sahiptir, üretici mikroorganizma tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmamaktadır. Üretici suşun azalan su aktivitesine, faj ataklarına, fagositoza (bakteri ve diğer yabancı maddelerin fagositler tarafından içlerine alınarak yok edilmesi), protozoa yağmalamasına, toksik bileşiklere, antibiyotiklere ve ozmotik basınca karşı korunması bu faaliyetler arasındadır.

Hücrelerin tanınmasını, hücrenin yüzey ortamına tutunmasını ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşturulmasında da rol oynar [36].

Kırmızı et ve yağ tüketimi ile bağırsak kanseri arasında pozitif bir ilişkinin var olduğu kanıtlanmıştır. Ancak Finlandiya’ da, yüksek oranda yağ tüketimi olmasına rağmen kalın bağırsak kanseri oranı düşüktür. Bu durumun Finlilerin oldukça yüksek miktarda fermente süt ürünü tüketmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [52].

2.2.1 Polisakkaritlerin bileşimi ve yapısı

2.2.1.1 Homopolisakkaritler

Dekstran üreten temel mikroorganizma *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*’tir. Glukanlar ve fruktoz polimeri de *S. mutans*, *S. sobrinus* ve *S. sanguis* tarafından sentezlenir. Dekstranların çoğu yüksek moleküler ağırlığa sahiptir, düşük sıcaklıklarda yumak şeklinde 30 °C ise küresel ve yoğun bir durum gösterir. Polisakkaritlerin kimyasal bileşim ve yapılarındaki farklılıkları sakkarozdan hücre dışı sakkaritlerin sentezi sırasında gerçekleşen reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Ortamdaki sakkaroz konsantrasyonu, bakteri gelişme ortamı, inkübasyon süresi ile sakkarozu parçalayan enzimlerin varlığı gibi faktörler polimer molekül ağırlığı ve yapısını etkilemektedir [53].

Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen homopolisakkaritler [36]

Ekzopolisakkarit **α -D-glukanlar**

Dekstran

Mutan

Bakteri

Leuconostoc mesenteroides ssp. *mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides ssp. *dextranicum*

Streptococcus mutans

Streptococcus sobrinus

Alternan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<u>β-D-glukanlar</u>	
	<i>Pediococcus spp.</i>
	<i>Streptococcus. spp</i>
<u>Fruktanlar</u>	
Levanlar	<i>Streptococcus salivarius</i>
İnülin benzerleri	<i>Streptococcus mutans</i>
<u>Poligalaktanlar</u>	
	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>

2.2.1.2 Heteropolisakkaritler

Laktik bakteriler tarafından üretilen polimerlerin çoğu bu özelliindedir. Bir çalışmada *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ' un oluşturduğu polimerde glukoz ve fruktozun 1:1 oranında olduğu açıklanmıştır. Yoğurttan glukoz, galaktoz, ksiloz ve üronik asitleri bulduran bir polisakkarit izole etmişlerdir [54]. Bir diğer çalışmada *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* ve *St. salivarius* ssp. *thermophilus* bakterilerinin 24 saatlik inkübasyon sonucunda optimum gelişme sıcaklığı ile maksimum ekzopolisakkarit üretimi arasında ilişki tespit edilmiştir. *S. salivarius thermophilus* ' un 30 oC' de 24 saatin sonunda 2,5 kat daha fazla polimer ürettiği, viskoziteninde 1-20 kat attığı bildirilmiştir [29]. Bakterinin inkübasyon süresi artması ile ekzopolisakkarit üretiminin azaldığı bildirilmiştir [55].

2.2.2 Ekzopolisakkarit üretimi

Dekstran, glukan ve fruktan gibi homopolisakkaritlerin üretimi için substrat olarak sakkaroz ihtiyacı vardır. Dekstran, normal olarak *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ' in uygun besin maddeleri içeren, nötre yakın pH' da mineral tuz içeren sakkaroz çözeltisinde gerçekleştirildiğinde üretilir. Burada ortamın pH değeri, sakkaroz konsantrasyonu gibi faktörler, üretimi ve miktarı etkiler [53].

Termofilik ve mezofilik laktik bakteriler tarafından üretilen hücre dışı polisakkaritlerin kalitatif olarak belirlenmesi son yıllarda gerçekleştirilmiştir. Polisakkaritler, bakteri şuşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenir. Sentez olayı hücre dışında olduğu kadar membranda da meydana gelebilir [56].

EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır. EPS'lerin oluşumunda [57]; UDP-glukoz-dehidrogenaz,

glukozil-transferaz, galaktozil– transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır. Heteropolisakkaridler hücre içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulur. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaridlerin sentezinde de kullanılmaktadır. Nötral homopolisakkaridlerin sentezi farklıdır. Örneğin, nötral levan ve dekstran homopolisakkarid'in sentezi birbirinden farklıdır. Hücre dışında üretilen bu EPS'ler sukroz varlığında sırasıyla, levansukraz ve dekstransukraz enzimlerinin aktivitesi ile ekstraselüler olarak üretilmektedirler [40]. Sutherland, üretilen polimerin molekül ağırlığının, bakterinin çoğalma miktarının fonksiyonu olarak değiştiğini bildirmiştir [57]. EPS üretiminde bulunan yapısal genlerin keşfi, EPS üretiminin plasmid yeri için delil sağlamıştır [58, 59]. Bunun tersine termofilik yoğurt bakterileri için, EPS üretiminin kromozomlar tarafından kodlandığı bulunmuştur [60, 61].

2.3 EPS Üreten Mikroorganizmalar

Son yıllarda EPS'lerin araştırmasına oldukça önem verilmiş, mikroorganizmaların birçoğunun değişen kompozisyonlarda ekzopolisakkarit ürettikleri bildirilmiştir [62]. Bu EPS'lerin çoğunun ilginç ve faydalı özellikler içerip içermediği araştırılmıştır [63]. Mikrobiyal EPS'lerin, birçok bakteri ve maya cinsleri tarafından üretildikleri ve bu ürünlerin karbon kaynakları için yarışan metabolitler oldukları bildirilmektedir. EPS'ler toprak, deniz, tatlı su gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, *Bacillus*'lar, *Pseudomonas*'lar, *Lactobacillus*'lar ve *Azotobacter*'ler gibi daha birçok bakteri tarafından sentezlenmektedir [1]. Bitki patojeni olan cinslerin birçoğu (*Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Ralstonia* ve *Xanthomonas*) EPS üretimi gerçekleştirebilen bakterilerdir [64]. Yine *Xanthomonas campestris* tarafından ksantan zankı, *Sphingomonas paucimobilis* tarafından gellan, *Pseudomonas* türleri ve *Acetobacter chorococcum* tarafında alginatlar, *Acetobacter xylinium* bakterisi tarafından bakteriyel selülozlar, *Streptococcus equii*'tarafından hiyaluronik asit ve *Rhizobium* tarafından süksinoglikan sentezlenmektedir [65]. Alginat, amilovorana, selüloz, levan, marginalan, stevartan, süksinoglikan ve ksantan zankının tam yapıları bilinmektedir. Bu EPS'ler endüstriyel amaçla üretilip gıda sanayiinde ve diğer bazı alanlarda kullanılmaktadır [62, 67]. *Escherichia coli*'nin 80 adedin üzerinde farklı EPS sentezlediği, diğer birçok türün ise tek veya daha fazla sayıda EPS ürettikleri

bildirilmektedir [68]. Maugeri ve arkadaşları, halofilik, termotolerant bir *Bacillus* suşunu (B3-15) izole etmişler ve bu suşun %0,6 glikoz varlığında EPS (165 mg/L) ürettiğini bildirmişlerdir [69].

Laktik asit bakterilerinin bulunduğu sıvı ortamlarda zamanla viskozitenin artması, oluşan polimer miktarına, polimerin tipi ile diğer oluşan metabolik ürünlere bağlıdır. Polisakkarit üretimi ve miktarlarının inkübasyon süresine ve bakteri suşuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*' le yapılan çalışmada ortaya konmuştur. Kefir üretiminde kullanılan (*Lb. hilgardii*' nin) bazı suşları da polisakkarit üretmektedir.

2.3.1 Laktik asit bakterileri eksopolisakkaritleri ve özellikleri

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS miktar ve kompozisyonlarının tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiği ve birçok etkenin EPS üretimini etkilediği açıklanmıştır. Pek çok diğer bakteri gibi laktik asit bakterileri hücredeki yerlerine bağlı olarak sınıflandırılan farklı tipte polisakkaritler üretebilme yeteneğindedirler. Bunlardan hücre duvarı dışından salgılananlar ekzoselüler (hücre dışı) polisakkaritler ya da EPS' ler diye adlandırılırlar. Bunlar yapışkan tutucu bir tabaka oluşturabilirler ve kapsül polisakkaritleri olarak adlandırılırlar. EPS' ler aynı zamanda hafifçe yapışabilir ya da salgı olarak ortama salgılanabilir [37]. EPS biyosentezi, nükleotid şekerlerin üretimi ve birincil karbonhidrat metabolizma enerjisi ile bağlantılıdır[30]. Çeşitli çalışmalarda EPS üretiminin gelişim ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda; *Lactobacillus sakei* 0-1 (van den Berg ve ark., 1995), *L. rhamnosus* C83 (Gamar ve ark., 1997), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 (Grobben ve ark., [70]) ve *S. thermophilus* (De Vuyst ve ark., 1998) bakteri suşları ile yapılan çalışmalarda heteropolisakkarit üretimi ile biyokütle oluşumunun paralel olduğu tespit edilmiştir. EPS üretimi için optimum pH, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un sürekli kültürlerindeki gelişme için optimum olan pH' ya yakın (pH 6,5 civarı) bulunmuştur. Sıcaklık ile ilgili olarak da; bakteri gelişimi için kısmen uygun olan sıcaklık şartlarının çoğu zaman EPS sentezi için en uygun olduğu tespit edilmiştir [38] Gancel ve Novel [71] ile Grobben ve ark. [70] da benzer şekilde *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un EPS üretimi için optimum sıcaklığı, gelişim için optimum olan sıcaklığa yakın bulmuşlardır. Bouzar ve ark. [33], fermentasyon parametrelerinin, EPS üretimi ve viskozite için karışık suşlu kültürlerde kullanılan *L.*

delbrueckii ssp. *bulgaricus* fenotipinde olduğundan daha az önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Ekzopolisakkarit üretme yeteneğine sahip starter kültürlerin kullanımı ile yoğurdun tekstüründe iyileşme ve serum ayrılmasında azalma sağlamak, mozzarella peynirinde su tutma kabiliyetini artırarak erime özelliğini iyileştirmek ve yumuşak peynirlerin reolojik özelliklerini geliştirmek mümkündür. Bu nedenle ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri süt ürünlerinde viskoziteyi artırıcı, yapıyı kalınlaştırıcı, stabilize edici ve su bağlayıcı gibi özellikleri nedeni ile ticari stabilizatörlere alternatif olarak kullanılabilir. Teknolojik özelliklerinin yanı sıra laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan ekzopolisakkaritler tüketici sağlığı üzerine de yaralı etkide bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucunda ekzopolisakkaritlerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü, antitümör ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bakteriyel polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemede ortaya konmuştur. Ancak; EPS'lerin varlığı yalnızca virulent karakterli bakterilere özgül değildir. Yapılan çalışmalarda; su, toprak gibi çok farklı kaynaklarda yaşayan birçok bakterinin de kapsül içerdiğini ortaya konmuştur. Fiziksel ve kimyasal yöntemler ile giderilen polisakkaritin üretimi bakterilerin çoğalmasını etkilemeksizin, tekrar bakteriler tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir.

2.4 Ekzopolisakkaritlerin Fonksiyonları

1. Polisakkaritler üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler.
2. Mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya uygun olmayan bir ortamdan uzaklaştırılır
3. Ortamdaki metalik iyonların tutulmasını sağlar.
4. Bakteri-faj ilişkilerinde ajan olarak rol oynar. [1].

Dekstranlar, petrol işleme, kağıt endüstrisi, tekstil ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılır. 40 000-70 000 Da gibi düşük moleküler ağırlıklı olanlar tıpta en çok kullanılanlardır; dekstransulfatlar kandaki yağ oranını ayarlayıcı, pıhtılaşmayı ve ülseri önleyici özelliğe sahiptir. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran-kalsiyum ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılır. Ağ yapılı sifadeks

dekstranlar ise, biyolojik maddelerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında devreye kullanılır. Karıştırılarak hazırlanan aromalı, meyveli gibi benzer yoğurtların ve süt içeceklerin yapımı sırasında uygulanan mekanik işlemlerle bozulan dokunun sağlanması için kimyasal kökenli maddelerden yararlanır.

Son yıllarda bitkisel kökenli hidrokolloidlere alternatif olarak laktik bakterilerinin koyulaştırıcı suşlarından yararlanma yoluna gidilmektedir. Bu amaçla ekzopolisakkarit üreten *S. salivarius* ssp. *thermophilus* ve *Lb. delbruecki* ssp. *bulgaricus* suşları yoğurt yapımında mezofil laktik bakteriler ise birçok fermente süt üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca bazı araştırmacılar antitümör etkinliğinin bir laktobasil ve bir streptokok tarafından üretilen polisakkarite bağlandığını da gösterilmiştir [72].

2.5 Ekzopolisakkaritlerin Önemi

Son dönemlerde tüketiciye, katkı maddesi içermeyen daha sağlıklı ve kaliteli ürünleri sunmak amacıyla süt endüstrisinde eksopolisakkarit (EPS) üreten laktik asit bakterilerinden yararlanma yoluna gidilmiştir [73, 74]. EPS üreten laktik asit bakterileri genel olarak “ropy” kültür adıyla anılmaktadır [75].

Yoğurt veya diğer fermente süt üretiminde kullanılan bazı bakteri suşlarının, hücre duvarı dışında polisakkaritler ürettikleri bilinmektedir. Bu polisakkaritler, EPS olarak adlandırılmakta ve bunlar fermente süt ürünlerinin bazı fiziksel özelliklerini iyileştirmede kullanılmaktadır [33, 76, 77].

Son yıllarda besinlerdeki laktik asit bakterileri tarafından üretilen eksopolisakkaritlere artan bir ilgi gözlenmektedir. Bu polisakkaritler, fermente süt ürünlerinin reoloji, tekstür ve lezzetinde önemli rol oynamaktadır [32]. EPS, birçok laktik asit bakteri suşu tarafından üretilen ve hücre dışına salgılanan, bileşiminde daha çok monosakkaritleri bulunduran bir organik madde olarak tarif edilmektedir [1]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır [78]. EPS üreten laktik asit bakterileri, fermente süt ürünlerinin konsistens ve reolojisi üzerinde olumlu etkilerinden dolayı süt endüstrisinde büyük önem arz etmektedir [75]. Bu bakteriler asit gelişiminden ötürü mikrobiyal bozulmalara karşı gıdaları koruduğu gibi, gıdalarda aroma gelişimi, tekstür oluşumunun düzenlenmesi gibi birçok yararından dolayı gıda endüstrisinde kullanımı

yaygınlaşmaktadır [79]. Son yapılan bilimsel çalışmalara göre, bu bakterilerin EPS üreten bazı suşlarının insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinden dolayı özellikle yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde fonksiyonel starter kültür olarak kullanıldığı bildirilmektedir [80].

Sentezlenen EPS miktarı ve karakteri, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi ortam koşullarından etkilenmekte, ortamdaki substrat miktarı ve kompozisyonuna göre de değişkenlik gösterebilmektedir [36, 55, 73, 81]. EPS'lerin bileşiminde en fazla galaktoz ve glikoz bulunmakta, çoğu kez de ramnoz bu yapıda yer almaktadır [29].

Tüketiciler tarafından süt ürünlerinde önem verilen duyuşal özellikler, pıhtı sıklığıyla beraber iyi bir tat ve aromadır. Yoğurt tüketiminde de tüketici kitlesinin istekleri genelde, duyuşal olarak taze bir tat ve çoğunlukla tipik yoğurt aroması ile beraber viskoz ve koyu kıvamlı yapısıyla pürüzsüz bir görünüşe sahip olması yönündedir. Yoğurt üretiminde bu kriterler göz önünde bulundurularak kültür seçimi yapılmaktadır. Son zamanlarda diyet ürünlerinin tüketimine olan talep artmaktadır. Ancak, süt ürünlerinde yağ içeriği azaldıkça yapısal kusurlar ortaya çıkmaktadır.

EPS üreten kültürlerin ürünün yapısını iyileştirici yönde etki gösterdiği ve bu kültürlerin kullanımıyla, tüketici isteklerine uygun nitelikte (görünüş, tat ve viskozite) ve sağlıklı süt ürünleri üretilebildiği bildirilmektedir [9]. EPS, gıdalarda viskoziteyi artırma, stabilizasyonu sağlama ve su bağlama gibi fonksiyonel özellikler sağladığı için bu polimerleri üreten bakterilerin kullanımı bazı durumlarda ticari stabilizörlere ve yağ ikame maddelerine karşı bir alternatif oluşturabilmektedir [36, 78, 82]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen eksopolisakkaritler ile yapılan yoğurtların reolojik karakterlerinde düzelme olduğu belirtilmiştir [83, 84].

EPS'ler genellikle monosakkarit kompozisyonu, elektrik yükü, üniteler arası bağlar (bunun sonucunda molekülün sıklığı) ve tekrarlanan yan zincirlerin varlığına bağlı olarak farklılık göstermektedirler. Ayrıca, zincir uzunluğu ve zincir dallanmasının sıklığı EPS'nin kompakt yapısını etkilediği için reolojik özellikleri güçlü şekilde etkilemektedir [9, 82, 85, 86]. Dikkat çekici bir diğer husus, yoğurtta tekstürel farklılıkların eksopolisakkarit konsantrasyonundan çok, eksopolisakkaritlerin moleküler kütle ve sertlikleriyle ilişkilendirilmesidir [87, 88]. Ayrıca jel içinde eksopolisakkaritlerin yeri de viskoziteyi etkileyen önemli bir faktördür [89]. Buradan şu sonuca varılabilir ki, serumdaki protein kolloidal partikülleri ile kazein misellerinin,

eksopolisakkaritler tarafından bir arada tutulması da viskozite üzerine etkili olmaktadır [90]. Bilindiği gibi, reolojik karakterler, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde duyuşal olarak tüketici açısından çekici bir görünüş ve ağızda iyi hissedilebilir bir kıvamın oluşmasında çok önemlidir [91].

EPS'lerin yoğurt tekstürü üzerinde iki önemli fonksiyonu vardır. Birincisi hidrofilik karakterleri nedeniyle suyu absorbe etmek, ikincisi ise protein matriksindeki serbest su hareketini önlemektir. Bunun yanı sıra EPS'ler, protein matriksiyle interaksiyona girerek onların da su bağlama kapasitelerini artırmaktadır [83, 92]. EPS'ler sadece yukarıda belirtilen fonksiyonlara sahip değildir. Bunların yanı sıra, EPS üreten suşun kendisini de azalan su aktivitesine, faj ataklarına, protozoa yağmalamasına, toksik bileşiklere, antibiyotiklere ve ozmotik stres gibi doğal ortam tehlikelerine karşı korumakta, ayrıca hücrenin yüzey ortamına tutunmasına ve koloni oluşturmaya yardımcı olmaktadır [29]. Ayrıca bazı eksopolisakkarit sınıfları da prebiyotikler gibi etki göstererek sindirim sistemi mikroflorasına pozitif etkide bulunurlar ve insan sağlığına katkıda bulunurlar. Bunlara ilaveten eksopolisakkaritler antitümör, antiülser, bağışıklık sistemini düzenleyici veya kolesterol düşürücü aktivite göstererek insan sağlığına olumlu katkıda bulunabilmektedirler [36].

2.6 EPS'lerin Fermente Süt Ürünlerinin Yapısı Üzerine Etkileri

Kaliteli bir yoğurt üretimi için tat-aromannın yanı sıra reolojik özellikler olarak adlandırılan viskozite, konsistens (pıhtı sıklığı) ve serum ayrılması gibi özelliklerin de optimum düzeyde olması gerekir.

Yoğurtlarda kıvamı artırmak ve yapıyı iyileştirmek amacıyla karragenan gibi bazı gıamlar, selüloz, pektin ve nişasta gibi polisakkaritler kullanılabilir. Ancak bazı ülkelerde bu tür katkıların kullanımı sınırlıdır veya yasaktır. Örneğin, İngiltere'de yoğurt üretiminde %1 oranında nişasta kullanımına izin verilirken, diğer stabilizörlerin kullanımı % 0.5 ile sınırlandırılmıştır [75].

2.6.1 Viskozite

Bu özellik maddenin bozulmaya karşı dayanımıdır. Fermente süt ürünleri açısından bu özellik yapışkanlık ya da akıcılık olarak tanımlanabilmektedir.

Fajardo-Lira ve ark. [81], üç farklı starter olarak EPS üreten (ropy) kültür, bakteri hücre duvarının yüzeyine bağlı duran polisakkarit üreten kültür (kapsüler) ve ropy olmayan üç farklı starter kültürle yaptığı yoğurtlarda, en yüksek viskozite ropy starterinin kullanıldığı kültürden elde edilen yoğurtlarda saptamıştır.

Amatayakul ve ark. [93], yaptıkları çalışmada; ropy, kapsül formda ve ropy olmayan starter kültürleri kullanarak ürettikleri stirred tip yoğurtlarda en yüksek viskozitenin ropy kültürle üretilen örneklerde görüldüğünü belirlemişlerdir.

Ayrıca, depolama süresi (28 gün) boyunca pıhtı sıklığı değerlerinin, ropy kültürün kullanıldığı yoğurtlarda genel olarak arttığı görülmüştür. Kapsüler kültürle üretilen yoğurtlarda ise depolamanın 21.gününe kadar arttığı ve daha sonra da düşme göstermesine karşı ropy olmayan kültürle üretilen örneklerde depolamanın 14. gününe kadar bu değer arttığı ve daha sonra da düştüğünü görülmüştür.

Güzel-Seydim ve ark. [94], ropy ve ropy olmayan kültürleri kullanarak elde ettiği set tip yoğurtlarda ropy kültürün daha fazla viskoz özellik gösterdiği ve depolama süresince bütün örneklerin viskozite değerlerinin yükseldiğini bulmuşlardır.

Akalın ve Gönç [95], viskoz özellik göstermeyen bir kültür tipi ile iki viskoz kültür tipini yoğurt üretiminde ayrı ayrı kullandığında viskoz olmayan kültürün diğer ikisine göre düşük viskozite sergilediğini bulmuşlardır

2.6.2 Serum ayrılması

Akalın ve Gönç [95], iki farklı viskoz kültür ve viskoz olmayan bir kültür çeşidini kullanarak ürettiği yoğurtlarda serum ayrılması değerinin viskoz olmayan kültürün kullanıldığı yoğurtlarda daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Fajardo-Lira ve ark. [81], üç farklı starter olarak EPS üreten (ropy) kültür, bakteri hücre duvarının yüzeyine bağlı duran polisakkarit üreten kültür (kapsüler) ve ropy olmayan üç farklı starter kültürle yaptığı yoğurtlarda, en düşük serum ayrılması miktarlarını (sineresiz), ropy starterinin kullanıldığı kültürden elde edilen yoğurtlarda

saptamıştır.

Amatayakul ve ark. [93], EPS üreten ropy ve kapsüler starter kültürler ve EPS üretmeyen starterlerle ürettikleri yoğurtlarda, EPS üretmeyen kültürlerden elde edilen yoğurtların diğer iki örneğe göre daha fazla miktarda serum saldıgını göstermişlerdir. Laws ve Marshall [96], *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* bakterilerinin ropy (LY03, SY102) ve ropy olmayan (LY58, SY60) ikişer suşundan her seferinde üç farklı starter kültür (LY03 + SY60, LY58 + SY102 ve LY03 + SY102) kombinasyonlarının kullanılarak üretilen yoğurtlarda, ropy ve ropy olmayan (LY03 + SY60) suşlarının birlikte kullanımı durumunda serum ayrılması değeri starter kültürün iki suşunun da ropy olması (LY03 + SY102) durumuna göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

2.6.3 pH

Akalın ve Gönç [95], viskoz ve viskoz olmayan kültürle elde ettikleri yoğurtlarda pH değerlerinin depolama süresince bütün örneklerde düştüğü ve viskoz kültürle üretilen yoğurtlarda pH değerinin daha düşük olduğunu bulmuşlardır.

Güzel-Seydim ve ark. [94], ropy ve ropy olmayan kültürler elde ettikleri set tip yoğurtlarda, pH değerinin ropy kültürlerde ropy olmayan kültürlerle göre daha düşük olduğunu bildirmiştir.

Özer ve Atasoy [97], yaptıkları çalışmada viskoz ve viskoz olmayan kültürlerle üretilen yoğurtlarda pH değeri üzerinde kültür tipinin önemli olmadığını saptamışlardır.

2.6.4 Mikrobiyolojik analizler

Akalın ve Gönç [95], viskoz ve viskoz olmayan kültürlerle ürettikleri yoğurtlarda *L. bulgaricus* sayılarının viskoz kültürle üretilen yoğurtta daha fazla olduğunu ve depolamanın birinci haftasından sonra bu sayının sürekli azaldığını bildirmişlerdir.

Amatayakul ve ark. [93], viskoz ve viskoz olmayan kültürleri kullanarak elde ettiği yoğurtlarda *L. bulgaricus* sayıları bakımından yoğurtlarda kültür tipinin çok önemli bir fark oluşturmadığını ve *L. bulgaricus* sayılarının depolamanın 14. gününe kadar bir artış gösterdiğini daha sonra asitlik gelişiminden dolayı bu sayıların sürekli bir düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir.

Özer ve Atasoy [97], viskoz ve viskoz olmayan kültürleri kullanarak ürettikleri yoğurtlarda toplam canlı bakteri sayıları bakımından yoğurtlarda önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

Akalın ve Gönç [95], viskoz ve viskoz olmayan kültürlerle ürettikleri yoğurtlarda *S. thermophilus* sayılarının genel olarak viskoz kültürle üretilen yoğurtta daha yüksek olduğunu ve depolamanın birinci haftasından sonra bu sayının sürekli azaldığını bildirmişlerdir.

Amatayakul ve ark. [93], viskoz ve viskoz olmayan kültürleri kullanarak elde ettiği yoğurtlarda *S. thermophilus* sayıları bakımından yoğurtlarda kültür tipinin çok önemli bir fark oluşturmadığını ve *S. thermophilus* sayılarının depolamanın 7. gününe kadar bir artış gösterdiğini daha sonra asitlik gelişiminden dolayı bu sayıların sürekli bir düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.6.5 Yapı-Tekstür

Folkenberg ve ark. [74], ropy ve ropy olmayan farklı kültürlerle ürettiği yoğurt örneklerinde yaptığı duyuşal değerlendirmede, ropy özellik gösteren örneklerin tekstürel yönden daha yüksek puanlar aldığını belirlemişlerdir.

Akalın ve Gönç [95], viskoz kültürlerle üretilen yoğurtların yapı ve tekstürünün viskoz olmayan kültürlerle üretilen yoğurtlara göre duyuşal olarak daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Güzel-Seydim ve ark. [94], ropy özellik gösteren kültürler ile üretilen yoğurt örneklerinin, ropy olmayan kültürle üretilen örneğe göre tekstürel yönden daha yüksek puanlar aldığını bildirmişlerdir.

Potanin ve Uriev [98], ropy olmayan kültürden üretilen yoğurt jelinin tekstürel yönden granüler yapı gösterdiğini ve ropy kültürlerden üretilen yoğurtlara göre daha zayıf tekstürel özelliklere sahip olduğunu saptamışlardır.

2.6.6 Elastikiyet

Bu, bir bozulma meydana geldikten sonra maddenin kendisini tekrar toparlaması özelliğidir. Bu özellik sıkı bir yapı ve kıvamlı bir fermente ürün anlamına gelmektedir. Yapı özellikleri açısından bilhassa viskozite ve elastikiyet bir ürünün organoleptik kalitesi ve çekici görünümü ve ağızda bıraktığı his açısından önemlidir [99]. Ürün yapısı; sıvı fazdaki (serum) biyo-koyulaştırıcı varlığı, temel olarak kazeinlerden oluşan bir protein jelinin varlığı, proteinler ve polisakkaritler arasındaki etkileşim, bakteri hücreleri ve EPS' lerin bakterilere bağlandığı bağların bulunması, serbest su moleküllerinin miktarını azaltan suyun bağlanmasından etkilenir ve sonuç olarak da serum fazındaki EPS konsantrasyonu artar [9].

EPS, doğal biyo-koyulaştırıcı özelliği ile fermente bir ürünün reolojisini geliştiren önemli bir fonksiyona sahiptir ve fiziksel bir stabilizatör olarak suyu bağlayarak su salmayı azaltır. Bunun yanında fonksiyonel etki EPS' in bileşimi, yapısı ve başta iyon ve proteinler olmak üzere süt bileşenleri ile etkileşimine bağlıdır [9]. Belirtilen bu özellikler sebebiyle saflaştırılmış bir EPS' in yapı özelliklerinin fermente bir üründe görülen EPS yapısından farklı olacağı beklenebilir. Her iki sebeple de fermentasyon boyunca ortaya çıkan jel oluşumu ve EPS biyosentezi büyük ölçüde çapraz bağlar içeren bir ağ yapı oluşumu ile sonuçlanır [9]. Nötral EPS içeren ürünün viskozitesinin zamanla arttığını ve polisakkarit üretmeyen bir suş ile elde edilen ürünün viskozitesinden 10 misli daha fazla değerlere ulaştığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada nötral EPS' in viskoziteye katkısı olduğu, fakat elastikiyete katkısı olmadığı görülmüştür. Sadece polisakkaritler serum fazında iyi çözüldüğü zaman pozitif yüklü proteinler ile zayıf etkileşime girmiştir. Diğer taraftan; negatif yüklü polisakkaritler, elektrostatik etkileşim yoluyla pozitif yüklü kazeinler ile etkileşime girerek ağı kuvvetlendirdikleri için elastikiyete katkıda bulunmuş fakat viskoziteye katkıda bulunmamışlardır.

Bu durumun, negatif yüklü polisakkaritlerin serum fazında çok zayıf dağılması sonucunda viskoziteye çok küçük bir katkıda bulunmuş olmasıyla açıklanmıştır.

Laktik asit bakterilerinin farklı türlerinden oluşan saf suşlu kültürleri içeren sütlerin EPS miktarları ve viskoziteleri oldukça değişir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un proteolitik suşunun ABT starter kültürlerine ilavesi yoğurt yapımı için fermentasyon süresini düşürmüştür ve yapıyı geliştirmiştir. Üzerinde çalışılan tüm kültür kombinasyonları EPS üretmiştir, fakat viskozitedeki farklılıklar üretilen EPS miktarları ile ilişkili olmamıştır. EPS üretimine etki etmeyen *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un proteolitik suşlarının kullanımı ile EPS üretimi arasında belirgin bir farklılık olmamıştır. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un proteolitik suşları proteinleri hidrolize etme yeteneğindedirler ve bu yoğurtların viskozitesinin düşmesine sebep olmuş olabilir. Burada yoğurdun viskozitesi ile fermentasyon süresi arasında bir ilişki ortaya çıkmıştır: fermentasyon süresi uzadığında viskozite artmıştır. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un proteolitik suşlarının ilavesi üzerine viskozite düşmüştür. Bu görüşlere göre *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un proteolitik suşlarının ilavesi ile fermentasyon süresinin kısaltılabileceği ancak bunun ürün viskozitesi üzerine ters bir etkisinin olabileceğini düşündürmüştür [9].

Çeşitli kültürler ile yapılan yoğurtlardan izole edilen EPS miktarları ile ürün viskoziteleri arasında direkt ilişki bulunamamıştır. Bu; ürün viskozitesinin artan sünme özelliği ile arttığı, ancak EPS konsantrasyonu ile bir ilişki bulunamaması ile benzerdir [87]. Bununla birlikte, Cerning ve ark., [39, 100] viskozite ve üretilen EPS miktarı arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Fakat bu ilişki her zaman çok açık değildir. Bakteri suşlarının EPS üretim özelliğinin stabil olmaması sebebiyle, viskozite ve EPS verimindeki sonuçların tekrar elde edilmesi zordur [33]. EPS üretim yeteneğinin stabil olmaması ve bununla ilişkili olarak yapıyı daha az etkileme özelliği, farklı laktik asit bakterileri üzerinde de incelenmiştir [100]. Bu çalışmalarda daha düşük viskoziteler daha az EPS üretimi ile ilişkili olmuştur.

Bouzar ve ark. [33] yaptıkları çalışmada sütü; EPS üretebilen ve üretemeyen, tek bakteri suşu ve farklı bakteri suşları içeren kültürler ile fermente ederek ve glukano-lakton ilavesi ile süte jel yapısı kazandırarak örnekler elde etmişlerdir. Elde ettikleri örneklerin viskozitelerini, örnek yapılarını bozmadan ve karıştırarak yapılarını bozduktan sonra ölçmüşlerdir. Karıştırma sonrasında ölçülen viskozite değerleri karıştırma öncesinde ölçülenlerden daha düşük olmuştur.

Bununla birlikte karıştırma sonrasında dahi EPS üreten suşlarla elde edilen viskozite değerleri, EPS üretmeyen suşlarla fermente edilmiş sütlerde ya da glukono-lakton ile asitlendirilerek elde edilen jelde ölçülenlerden daha yüksek (170 ila 230 mPa.s arasında) olmuştur. Karışık suşlu kültürlerde protokooperasyonun EPS üretimi, EPS kompozisyonu ve tekstür gelişimi üzerine etkisi hakkında bilgi az olmakla birlikte, yapılan bir çalışmada; *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187' nin heterojen hücre yapısının, tek suşlu kültürlerde EPS üretimi ve tekstür geliştirme yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [101].

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* ve iki koloni varyantını içeren tek suşlu kültürler üzerine yapılan bir çalışmada; EPS verimi ve viskozite arasındaki ilişkinin paralel olduğu ve en yüksek EPS üretiminin en yüksek viskoziteye tekabül etmiş olduğu belirlenmiştir [102].

Başka bir çalışmada; üç karışık suşlu kültürün hepsi tek suşlu kültürlerin oluşturduğu viskoziteden daha yüksek viskozite oluşturmuşlardır. Karışık suşlu kültürler ile yapılan bu çalışmada, farklı bir sonuç elde edilmiştir; çünkü burada EPS verimi viskozite ile ilişkili olmamıştır [33]. Bu ilişki farkı, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un ana suşu ve W varyantını içeren karışık suşlu kültürler ile elde edilen sonuçlar dikkate alındığında çok açıktır. İlk üretilen 110 mg EPS/ L için 390 mPa.s viskozite ve ikinci üretilen 240 mg EPS/ L için 220 mPa.s viskozite elde edilmiştir. Bu sonuçlar üretilen EPS miktarının dikkat alınması gereken tek unsur olmadığını göstermiştir. pH' nın süt proteinleri tarafından oluşturulan pıhtının yapısı üzerine oldukça etkili olduğu ve EPS miktarlarının fermente sütlerin viskozite ve yapısını etkileyen tek faktör olmadığı çok iyi bilinmektedir.

Bununla birlikte Bouzar ve ark. [33]' nin yaptıkları bir çalışmada; fermentasyonun 6. saatinde viskozite (St/ Lb W, St/ Lb P ve St/ Lb 1187 için sırasıyla 170, 270 ve 350 mPa.s) ve buna karşılık gelen pH (4,1, 4,0 ve 4,1) değerlerini karşılaştırmışlardır. Buna göre tespit edilen viskozitelerin daha çok salgılanan EPS' lerden etkilendiği açıktır. pH 4,0 de kimyasal olarak asitlendirilmiş jelin viskozitesi 90 mPa.s ve EPS üretmeyen kültürlerin viskozitesi yaklaşık 100 mPa.s olmuştur. Karıştırma öncesi en yüksek EPS verimi ve en düşük viskoziteye sahip olan fermente süt ürününün, karıştırmaya karşı diğerlerinden çok daha dayanıklı olması, karıştırılmış tipte yoğurtların üretiminde EPS üreten suşların kullanımının avantaj olduğunu göstermiştir. Bu kültürü oluşturan laktik

asit bakterilerinin farklı fizikokimyasal özelliğe sahip bir EPS üretmiş olabileceğinin de bir göstergesidir. Kırılan/yapısı bozulan yoğurtlar için mekanik uygulama etkisi daha çok pıhtının yapısı (reolojisi) ve serum ayrılması üzerine olur. Serumun viskozitesi kırılan/yapısı bozulan yoğurdun yapısını (reolojisini) etkiler ki bu da serum EPS' leri üzerine çalışılmasını önemli kılar. Bu yüzden EPS üretemeyen bir suş ile üretilmiş bir set yoğurdun viskozitesi zayıftır ve tekstür granüllü yapıda olmaya meyillidir [9].

Bouzar ve ark. [33]; *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* P' nin EPS üretiminin duraklama fazı boyunca devam ettiği ve daha sonra fermentasyonun 10,5 ve 24. saatleri arasında viskozite düşüşü ile birlikte keskin bir şekilde düştüğünü tespit etmişlerdir. Bu sonuç, *S. thermophilus* gibi diğer laktik asit bakterileri için de ileri sürülmüş olduğu gibi, EPSyi parçalayabilen enzimlerin varlığını gösterebilir [100]. Bir EPS uygulamasının başarısı; su bağlama yeteneği, proteinler ile etkileşim ve süt serum fazı viskozitesini arttırmak olarak tanımlanabilir.

EPS, yapı ve kıvam arttırıcı etki gösterebilir ve bunun sonucunda da gıda katkılarının kullanımını engeller. Fermente ürünlerde süt bileşenleri ve EPS arasındaki etkileşim mekanizması çok iyi anlaşılammış olmasına rağmen, viskozite ve EPS miktarı son ürünün fiziksel özelliklerini geniş ölçüde belirlemiştir. LAB' nin ürettiği EPS' lerin tadı yoktur. Fakat bir fermente ürün çok daha viskoz hale geldiği zaman, ağızda kalma ve damak ile temas süresi ve tat algısı artar. Amaç, bir ürüne hoş bir görünüm sağlamak, su salmayı önlemek, kremi ve sıkı bir yapı sağlamak ve iyi bir damak tadı kazandırmaktır. Bununla birlikte tek tip EPS' in üretimi tüm yapı özellikleri için yeterli olmayabileceği için bir ya da daha fazla starter kültür tarafından çeşitli EPS' lerin üretilmesi gerekebilir. Böylece bir son ürünün yapısını kesin olarak belirlemek ve bir ülkeden diğerine değişebilen müşteri tercihlerini karşılamak mümkün olur.

Farklı laktikasit bakterilerinden elde edilen polisakkaritler kompozisyonlarında, fonksiyonlarında, molekül yapılarında, kararlılıklarında ve proteinlerle etkileşim yeteneklerinde büyük farklılıklar gösterdikleri için EPS konsantrasyonları ve viskozite arasında net bir ilişki tanımlanmamıştır [103]. Daha önce de belirtildiği gibi fermente süt ürünlerinin kalitesine etki eden pek çok unsur vardır. Bunların başta geleni, elde edilmek istenen ürüne uygun kültür ve bakteri suşlarının seçilmesidir. Bunu destekleyen inkübasyon süresi, sıcaklığı, kullanılan besin ortamının bileşimi gibi diğer unsurlar viskozite ve yapı özelliklerinin oluşumunda belirleyici olmaktadır. Viskozite yanında

yapıya çok etkili olan sünme özelliği; kültürdeki suşlar ve belirtilen diğer tüm etkenlerden etkilenmektedir. Viskozite de sünme de laktikasit bakterilerinin EPS üretimi ile alakalıdır.

Mårtenson ve ark. [104] tarafından yapılan çalışmada; iki farklı LAB' nin süt olmayan, yulaf bazlı besin ortamındaki glikoz tüketimleri farklı olmuş (besin ortamındaki glikozun % 30 ve % 40' ı tüketilmiş) olmasına rağmen viskozitedeki artış her iki suş için de hemen hemen aynı olmuştur. Her ne kadar bu iki parametre de EPS üretimi ile ilişkili ise de bu durum iki parametrenin EPS üretim aşamalarıyla ilişkili farklı tipte etkileşimde olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmada; fermentasyon süresinin son aşamasında her iki suş için de viskozite düşmüştür. Bu şekildeki bir azalmanın büyük olasılıkla fermentasyon süresi boyunca karıştırma olmamasından kaynaklanan besin ortamındaki homojen olmayan yapıya bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Viskozitedeki düşüşün de EPS' in kısmi hidrolizinden kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir. Benzer tespitler daha önceki bazı çalışmalarda diğer EPS üreten LAB suşları için de tespit edilmiştir [30]. Farklı iki çalışmada ise; sünme özelliği gösteren suşlar ile yapılan yoğurtların yapı oluşumu ve kıvamının, EPS miktarındaki artış ile azaldığı tespit edilmiştir [76]. Bununla birlikte yine Hassan ve ark. [76]' nın çalışmasında; sünme özelliği gösteren kültürlerle üretilen yoğurtların su salma eğiliminin azaldığını ve en yüksek su tutma kapasitesini gösterdikleri tespit edilmiştir.

Van Marle ve Zoon [105], sünme özelliği olmayan LL yoğurt kültürünün (90 mg/ L) sünme özelliği olan RR kültürü (101 mg/ L) ile hemen hemen aynı miktarda polimer ürettiğini göstermişlerdir. Oysa bu iki tip yoğurdun viskozitesinde büyük bir farklılık gözlenmiştir.

Güzel-Seydim ve ark. [94], sünme özelliği gösteren kültürlerin ürün viskozitesinde gelişmeyi sağlayan yüksek molekül kütleli EPS sentezleyebildiklerini ve sünme özelliği gösteren EPS üretme yeteneğindeki kültür ile (B- 3) inoküle edilmiş süttten elde edilen yoğurt viskozitesinin arttığını gözlemlemişlerdir.

De Vuyst ve ark. [106], sünme özelliği gösteren *S. thermophilus* LY03' ün yüksek miktarda yüksek molekül kütleli EPS ürettiği ve fermente sütte yüksek viskozite oluşturduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte bazı araştırmacılar tarafından EPS üretimi ve viskozite arasında bir ilişki gözlenmediği bildirilmiştir [87, 91, 107].

Beal ve ark. [108], en viskoz yoğurtları, fermentasyonu uzun olan bir *S. thermophilus* suşu kullandıklarında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu suşun düşük sıcaklık ve asitlik aktivitesinde EPS üretebildiği bulunmuştur. EPS üretiminin genetik olarak kararlı olmaması da endüstriyel uygulamalarda ciddi bir problemdir. Çeşitli çalışmalar üretimde kayıp ya da düşüş, ya da EPS kompozisyonunda değişiklik olduğunu bildirmektedir [33]. Yüksek inkübasyon sıcaklığı, inokülasyon oranı, kültürlerin birçok kere zenginleştirilerek tekrar kültürünün alınması gibi faktörlere göre EPS üretim stabilitesi farklılık göstermektedir. Bu amaçla bu bakterilerden istenilen sonucu alabilmek için tüm üretim basamaklarında standarda bağlı kalınmalıdır [109].

Pekçok çalışma *S. thermophilus*' un uzayan inkübasyon sonrasında EPS miktarlarının düştüğünü göstermiştir [30, 109]. Fermentasyon boyunca gerçekleşen bu düşüşün fiziksel ya da kimyasal faktörlerdeki bir değişiklik ile ilişkili olduğu ancak glikohidrolazların aktivitesi ile ilgili olmadığı ileri sürülmüştür. Örneğin EPS düşüşü daha yüksek fermentasyon sıcaklıklarında daha az belirgin olmuştur ve *S. thermophilus* LY03 fermentasyonları için pH 4,9' da son derece dikkat çekici olmuştur [30]. EPS veriminin, *Lactobacillus rhamnosus* R hücreleri laktozda geliştiğinde, glukozda geliştiğinden daha belirgin şekilde düştüğünü tespit etmişlerdir. Cerning ve ark. [100] bu EPS düşüşünün polimeri hızla parçalayan bir enzim sebebiyle olduğunu ve bu enzimin muhtemelen bir glukohidrolaz olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

2.7 EPS'nin Kullanım Alanları

Polisakkaritler petrol işleme, kağıt endüstrisi, tekstil, ilaç ve kozmetik endüstrisinde de kullanılır. Bakteriyel polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemede ortaya konmuş ve daha sonraki çalışmalarda laktik asit bakterileri ile birlikte birçok farklı gruptaki mikroorganizmaların EPS ürettikleri tespit edilmiştir. Fermente gıdaların üretiminde kullanılan laktik asit bakterilerin EPS üretimleri insan sağlığı yönünden olumlu etkileri bildirilmiştir. Bunlardan; anti tümör, antiülser, immün sistemi uyarıcı ve kolesterol düşürücü aktivitelerinin koruyucu etkileri de gösterilmiştir [1]. Pek çok mikroorganizma, ekstraselüler polimerik araçların biyosentezi tarafından fonksiyonel bir konsorsiyum oluştururlar ve biofilm olarak isimlendirilen EPS'ler sentezlerler. Bu ürün bakterilerin koloniler olarak büyümelerine yardım eden,

besleyiciler ile konuşlanmış sert yüzeylere tutunmalarını sağlayan yapılardır [110, 111]. Bu EPS'ler ya bakteri yüzeyine tutulu olarak kalırlar yada yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda serbest olarak bulunurlar. Jel formasyonu flokulasyon, emülsiyon, absorpsiyon, film formasyonu ve koruma gibi pekçok rolü sahip bu polimerler biyolojik aktif biyofilm matriksinin yapı materyalidir [112].

EPS'ler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve rehological (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı yeni biyomateryaller gibi hareket ederler ve tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler [112, 113]. Ayrıca biyofilm özelliği gösteren EPS'ler bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler [114, 115]. Yine biyofilm bakteriyi yalnızca dış ortamdan koruyarak yaşayabilmesi için değil aynı zamanda genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar hazırlamaktadır [116]. Bu polimerleri sadece bakteriyi saran bir biyofilm tabakası olarak fonksiyon göstermeyip ticari amaçla da kullanılmaktadır.

EPS'ler aynı zamanda insanoğlu üzerinde anti-tümör [117], antivirüs, ve ateş düşürücü etmen olarak, ilaç sanayisinde de kaplama materyali olarak pek çok fizyolojik aktivitelere katkıda bulunurlar ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için teşvil edici olarak kullanılırlar. 40.000-70.000 Da gibi düşük mol ağırlıklı olanlar tıpta en çok kullanılanlardır. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstrankalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılır. Ağ yapılı sephadeks dekstranlar ise, biyolojik maddelerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında devreye girerler [43, 65].

Yapılan çalışmalar sonucunda EPS'lerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir [40, 118]. Aynı zamanda kimya alanında inceltici olarak ve farmokolojinin bir çok alanında da EPS'den yararlanılmaktadır [119]. Yoğun çalışmaların konusu olan ve günümüzde ticaret ürünü olarak pazarlanan farklı biyopolimerler şunlardır; *Xanthomonas campestris* tarafında sentezlenen ksantan zankı, *Sphingomonas paucimobilis* tarafından sentezlenen gellan, *Pseudomonas türleri* ve *Acetobacter chorococcum* tarafında sentezlenen alginatlar,

Acetobacter xylinum bakterisi tarafından sentezlenen bakteriyal selülozlar, *Streptococcus equii* tarafından sentezlenen hiyaluronik asit ve *Rhizobium* tarafından sentezlenen süksinoglikan gibi ürünler yaygın bir kullanım alanına sahiptir [65].

Bakteriler haricinde pek çok mantarda gelişimi boyunca glikoz ile ekstraselüler homopolimer sentezi yapmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen bu polimerlerde gıda, kozmetik ve ecza endüstrilerinde ticari kullanım alanları bulurlar. EPS'ler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziksel, kimyasal ve reolojik (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı, yeni uygulamaya konan pekçok diğer biyomateryaller gibi hareket ederler ve tekstil, deterjan, yapıştırıcı, petrol ve atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme süreci, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi uygulamalarında oldukça geniş kullanım potansiyeli sunmaktadırlar [120, 121].

2.8 Yumurta Kabuğunun Özellikleri

Yumurtanın büyüklüğüne göre % 7,8-13,6' sını yumurta kabuğu oluşturur. Kabuk mineral ve organik maddeler ile sudan ibaret olup % 3-4 oranında bir protein ağı ve % 95-96 oranında birikerek yerleşmiş anorganik tuzlardan oluşmuştur. Çizelge 2.3'te yumurta kabuğunun kimyasal bileşimi görülmektedir.

Çizelge 2.3 Yumurta kabuğunun kimyasal bileşimi

Unsur	Miktar (%)
Kalsiyum Karbonat	93,7
Magnezyum Karbonat	1,0
Kalsiyum Fosfat	1,0
Organik Maddeler	3,3
Su	0,1

Yumurtayı dış etkenlerden koruyan yumurta kabuğu 0,2-0,4 mm. kalınlığında ve oldukça sert, sayısı 7000-17000 arasında bulunan gözenek (por)' li bir yapıdır. Ortalama olarak kabuk ağırlığı 5-6 gr ve kabuk kalınlığı 300-350 mikrometredir. Bu yapı, yumurta içeriğinin korunmasında, su ve gaz alışverişinde çok önemli bir role sahiptir. Kabuğun kalsiyum içeriği yaklaşık olarak 1,7-2,5 gr'dır [122].

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Araştırmada 2 adet laktik asit (*S. thermophilus* ATTC 14425 ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATTC 11842) bakterisi kullanılmıştır. Bu bakteriler Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipman

Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü ve SÜTAŞ laboratuvarlarında bulunan cihazlar kullanılmıştır. Bunlar: Hassas Terazi (0.1, 1, 10 mg) (Sartorius), Manyetik Karıştırıcı (Heidoph), Otoklav (H+P Varioklav), Güvenlik Kabini (H+P), Santrifüj, Etüv (Heraeus), Mikrodalga Fırın (Arçelik), Çalkalamalı Su Banyosu (GFL), Su Banyosu (GFL), Vorteks, pH metre (WTW), Buzdolabı (Arçelik), Spektrofotometre (Shimadzu), Distile Su Cihazı (TK60), Otomatik Pipetler (Ependorf), Dijital refraktometre, Viskozimetre (Gerber Bostwickmetre).

3.3 Bakterilerin Aktifleştirilmesi

Çalışmada kullanılan tüm test bakterileri uygun sıvı besi ortamı ve sıcaklıkta 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* zenginleştirmesi ve çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan kültürlerin fermentasyon için zenginleştirilmesinde MRS Broth (Merck) ve M17 Broth (Merck) besiyeri kullanılmıştır. EPS çalışmalarında da *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* türüne ait suşlar için MRS sıvı besiyeri ve agarı, *S. thermophilus* suşları için M17 sıvı besiyeri ve agarı kullanılmıştır.

Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler şu şekilde hazırlanıp kullanılmıştır:

MRS (Man Rogosa and Sharpe) (Merck) Sıvı Besiortamı

Lactobacillus zenginleştirmesinde M17 Broth (Merck) besiyeri kullanılmıştır. M17 broth toz besiyerinden 52,2 g tartılarak 1 L distile su içinde çözündürülmüştür. Besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le $5,7\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Kullanım amacına uygun olarak deney tüplerine ve/veya numune kaplarına uygun hacimlerde (10 ila 100 ml) dağıtılarak 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Kullanılacak besiyerleri oda sıcaklığına kadar soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonra kullanılması gerektiğinde buzdolabı sıcaklığında en fazla bir hafta muhafaza edilmiştir.

MRS (Man Rogosa and Sharpe) (Oxoid CM361) Katı Besiortamı

Lactobacillus izolasyonu ve sayımı için MRS Agar kullanılmıştır. MRS Agar (Oxoid CM361)' dan 62 g tartılmış, tartılan miktar 1000 ml distile suda çözündürülmüştür. Çözelti, sürekli karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve besiyerinin tamamen berrak şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş besiyeri 50°C civarına soğutulmuştur. Besiyeri şişelere dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le $6,2\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C' ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

M17 (Merck) Sıvı Besiortamı

Streptococcus zenginleştirmesinde M17 Broth (Merck) besiyeri kullanılmıştır. M17 broth toz besiyerinden 42,5 g tartılarak 1 L distile su içinde çözündürülmüştür. Besiortamının pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH' le $7,2\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Kullanım amacına uygun olarak deney tüplerine ve/veya numune kaplarına uygun hacimlerde (10 ila 100 ml) dağıtılarak 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Kullanılacak besiyerleri oda sıcaklığına kadar soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonra kullanılması gerektiğinde buzdolabı sıcaklığında en fazla 1 hafta muhafaza edilmiştir.

M17 (Oxoid CM 785) Katı Besiortamı Bileşen Miktarı (g/L)

M 17 Agar (Oxoid CM785)' dan 48,25 g tartılmış, tartılan miktar 950 ml distile suda çözündürülmüştür. Çözelti, sürekli karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve besiyerinin tamamen berrak şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş besiyeri 50°C civarına soğutulmuştur. Soğutulan besiyerine, % 10' luk laktoz çözeltisinden 50 ml ilave

edilerek karıştırılmıştır. Besiyeri şişelere dağıtılarak 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Besiortamının pH’ sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH’ le 6,9±0,2’ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C’ ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

% 10’ luk Laktoz çözeltisi hazırlanması

Streptococcus izolasyonunda kullanılan M17 Agar (Oxoid CM 785)’ in hazırlanmasında % 10’ luk laktoz çözeltisi kullanılmıştır. Laktoz çözeltisi hazırlanırken; laktoz (Oxoid L70)’ dan 10 g tartılmış ve 100 ml suda çözündürülmüştür. 121 °C’ de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

Ringer çözeltisi (Steril dilüsyon) ¼

Mikrobiyolojik analizler için seyreltilmelerde steril ringer çözeltisi kullanılmıştır. Ringer çözeltisi hazırlanırken 2 adet oxoid ringer tablet 1000 ml distile suda çözündürülmüştür. Elde edilen çözeltinin 25 °C’ deki pH’ sı kontrol edilmiştir. pH 7,00 olması gerektiği için, eğer pH 7,00 değil ise sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ilavesi ile pH 7,00’ e ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti deney tüplerine 9,0 ml’ lik miktarlarda dağıtılmış ve 121 °C’ de 20 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Çözeltiler, buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Ringer tüpleri kullanılmadan önce 100 ± 2 °C’de 20 ± 5 dakika süreyle su banyosunda bekletilmiş, ortam sıcaklığına soğutulmuştur. Homojen hale getirmek için de vortex ile karıştırılmıştır.

Gliserol

Ticari olarak satılan gliserol alınarak distile su ile %20 lik olarak hazırlanmış ve 121 °C’ de 15 dakika süre ile otoklavda steril edildikten sonra araştırmada kullanılmıştır.

3.4 Bakterilerin Hazırlanması ve Sayımı

Mikroorganizmalar için önceden hazırlanmış petri kutularına, hazırlanan dilüsyonlardan 1 ml alınarak dökme ekim yöntemi uygulanmıştır. Ekimler 3 paralelli olarak 6 değişik dilüsyonda yapılmış, petri kutularında oluşan koloniler sayılarak örneklerde canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir.

***L. bulgaricus* sayımı:** Yoğurt örneklerinde *L. bulgaricus* sayısının belirlenmesinde MRS agar besiyeri kullanılmıştır. Petriler anaerobik olarak 37 °C’de 72 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılmıştır. Fotoğraf 3.1’de görüldüğü gibi anaerobik koşulların yaratılması için anaerobik jar içerisinde Anaerogen (oxoid) kit kullanılmıştır [123].



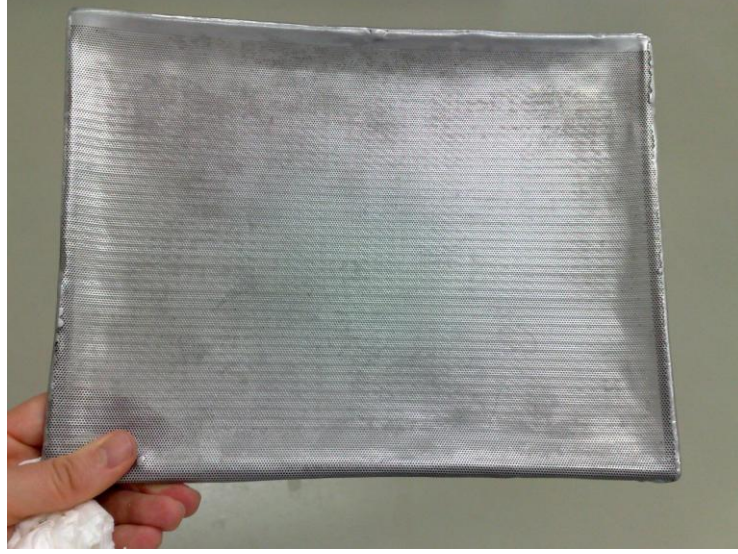
Fotoğraf 3.1 Bakterilerin inkübasyonunda kullanılan anaerobik Jar

***S. thermophilus* sayımı:** Yoğurt örneklerinde *S. thermophilus* sayısının belirlenmesinde M17 besiyeri kullanılmıştır. %5 oranında M17 agar içerisine %10 luk steril laktoz ilave edilmiştir. Petriler aerobik olarak 37 °C’de 72 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılmıştır [124].

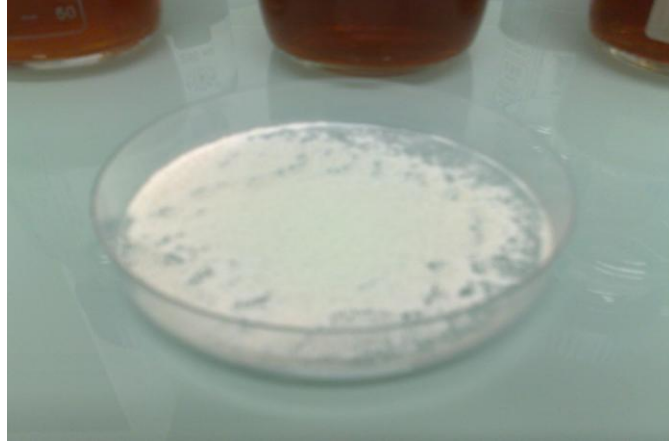
İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra MRS, M17 agar içeren petriyelerden; tek düşen, morfolojik olarak birbirinden farklı olan ve laktik asit bakterisi olduğu tahmin edilen koloniler (mat, krem rengi, beyaz, küçük ve özellikle petrinin alt yüzeyinde bulunan koloniler) öze yardımıyla alınarak başka bir petriye çizgi ekim yöntemiyle aktarılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen izolatlar 2 kez pasajlanmıştır; [125-127]. Safaştırılan izolatlar MRS ve M17 Brothlara alınarak %15’lik gliserolde -20°C’de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir.

3.5 Kalsiyum Kaynağı Olarak Yumurta Kabuğunun Hazırlanması

Ticari olarak alınan yumurtalar su içerisinde haşlanarak kabukları soyulmuştur. Soyulan yumurta kabukları, içlerindeki zarlarından ayrılarak mikrodalga fırında kurutulduktan sonra blender, havan ve merdane yardımıyla ezilerek toz haline getirilmiştir. Toz hale getirilen yumurta kabukları Fotoğraf 3.2’de görüldüğü gibi, 400 mikron büyüklüğünde gözeneklere sahip elekten geçirilerek otoklavlanabilir şişeye alınmış 121°C, 1.06 atm basınçta 15 dak. steril edilmiştir.



Fotoğraf 3.2 400 mikron gözenekli elek



Fotoğraf 3.3 Elde edilen yumurta kabuğu tozu

3.6 Bakterilerin Ürettiği EPS Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan bakterilerin oluşturduğu EPS miktarı Frengova ve arkadaşlarının metoduna göre belirlenmiştir. Çalışma için LAB izolatları MRS Broth ve M17 Broth

besiyerinde geliştirilerek yine MRS Broth ve M17 Broth besiyerine inoküle edilmiştir. Kalsiyum kaynağı olarak yumurta kabuğu tozu kullanılmış olup kültür dozajlanmış M17 ve MRS Brothlara farklı yüzdelerde (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g/100 mL) yumurta kabuğu tozu eklenip 30 °C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak her iki bakterinin yumurta kabuğu kullanılmamış kültürleri hazırlanmış ve bunlardan da EPS izolasyonu yapılmış ve kıyaslamada kullanılmıştır.

İnkübasyon sonrasında bakterilerin oluşturduğu EPS miktarı Frengova ve arkadaşlarının metoduna göre belirlenmiştir [66].

Bu metotdaki işlem sırası şu şekilde gerçekleşmiştir:

1- *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *delbrueckii* suşları MRS Broth sıvı besi ortamında, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşları M17 Broth sıvı besi ortamında 42° C’de 24 saat olacak şekilde 2 kez aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden katı besiyerinde dökme plak yöntemine göre bakteri sayımı yapılmıştır.

2- Aktifleştirilen kültürler 100 mL’lik M17 ve MRS sıvı besi ortamına aşılansak, steril yumurta kabuğu tozu ilave edildikten sonra (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g/100mL) 30 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Referans olarak birer adet M17 Broth ve MRS Broth ise kültür dozajı yapıldıktan sonra yumurta kabuğu tozu ilavesi yapılmadan ayrılmış ve 30°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3-İnkübasyon sonunda hücre kültürleri steril vida kapaklı tüplere 7,5 mL alınmış ve 20 dk. 100°C’de kaynatılmıştır.

4- Kaynayan kültürler soğuduktan sonra üzerine %80’lik triklorasetik asit solüsyonundan (TCA) 2,5 ml ilave edildikten sonra 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

5- Santrifüj sonunda oluşan süpernatantlar ependroflara alınmış ve üzerlerine %95 lik etanol konulup +4°C’de 1 gece bekletilmiştir. Bekleyen süpernatantlar tekrar 10.000 rpm’de 10dk. santrifüj edilmiş ve peletler ayrılmıştır.

6-Peletler 1 ml distile suda çözüldükten sonra total EPS (mg/L) fenol-sülfürik asit metoduna [67], göre standart olarak glikoz kullanılarak [68], belirlenmiştir.

3.7 EPS Üretimlerinin Karşılaştırılması İçin Glikoz Standardının Hazırlanması

Glikoz standardı Dubois ve ark. [128] metoduna göre hazırlanmıştır. 0,01g glikoz 100 ml suda çözdürüldükten sonra deney tüplerine farklı miktarlarda alınarak saf su ile 1.0 ml'ye tamamlanır. 5 µg ile 100 µg arasında glikoz dilüsyonları oluşturulduktan sonra üzerine 0,5ml %80 ağırlık/hacim(w/v) fenol ve 5 ml derişik sülfirikasit ilave edilerek önce 10 dakika oda sıcaklığında, daha sonra 20 dakika 30°C' lik su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örneklerin spektrofotometrede (490 nm dalga boyunda) absorbans değerleri alınmıştır. Ölçümlerde kör olarak, 1ml distile H₂O'nun 0,5 ml fenol (%80 w/v) ve 5 ml derişik H₂SO₄ ile muamele edilmesiyle elde edilen çözelti kullanılmıştır. Okunan absorbans değerlerinden yararlanılarak standart grafik oluşturulmuştur.

3.8 Yumurta Kabuğunun Kullanıldığı Yoğurtların Üretimi

Hazırlanan yumurta kokuğu tozu starter kültür içeren sütlere %1 oranında ilave edilerek 42 ± 2 °C' de inkübasyona bırakılmış. pH 4,60 ± 0,5 olduğunda inkübasyon sonlandırılarak soğutmaya alınmıştır. Buzdolabında (+4 °C) raf ömrü sonuna kadar bekletilerek 1., 7., 14. ve 21. günlerinde duysal (orgenoleptik) özellikleri bakımından değerlendirilmiştir.



Fotoğraf 3.4 Yumurta kabuğunun kullanıldığı yoğurtların üretimi

(a: Yumurta kabuğu ilave edilmiş sütler; b: Yoğurt sütlerinin 42 °C'de inkübasyonları)

Ayrıca kontrol grubu olarak, aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip starter kültürlü sütler de yumurta kabuğu tozu ilavesi olmadan aynı şartlar altında inkübasyona

birakılarak yoğurt elde edilmiştir. Bu yoğurtlar raf ömrü boyunca yumurta kabuğu tozu ilave edilerek üretilen yoğurtlarla kıyaslamak için kullanılmıştır.

Toplam 30 adet normal, 30 adet %1 yumurta kabuğu tozu ilaveli ve 30 adet %1 toz kalsiyum ilaveli yoğurt hazırlanmış ve üç grup yoğurt 1. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 3. hafta olmak üzere normal yoğurdun raf ömrü kadar (21 gün) izlenmiştir.

3.9 Yoğurt Üretiminde Kullanılan Sütlerin Özellikleri

Çalışmada kullanılan pastörize ve homojenize yoğurt sütlerin bileşimlerine ait bazı değerler çizelgede verilmiştir. Türk Standartları Enstitüsü TS 1330-Yoğurt Standardı'na göre yoğurdun yağsız kurumadde oranı en az % 12 olmalıdır.

Çizelge 3.1 Yoğurt üretiminde kullanılan pastörize ve homojenize sütünün bileşimi

Tekerrür	pH	Kurumadde(%)	Yağ(%)	Protein (%)	Laktöz (%)
1.	6.32	12.09	3,96	4,41	6,49
2.	6.31	12.13	3,96	4,41	6,44
Ortalama	6,31	12,11	3,96	4,41	6,46

3.10 Yoğurt Örneklerinden Duyusal Analizler

Yoğurt örneklerinin duyusal analizi, bu konuda eğitimli ve tecrübeli Gıda mühendisleri ve gıda teknikerleri tarafından oluşturulmuş 15 kişilik bir grupla yapılmıştır.

Yoğurt örneklerinin değerlendirme ve puanlanmasında Türk Standartları Enstitüsü / Yoğurt Standardı TS 1330 5.2.2 referans olarak alınmıştır (Çizelge 3.2.).

Yoğurt örnekleri görünüş, kıvam, koku, tat-aroma kriterleri esas alınarak değerlendirilmiştir. Her bir panelist hazırlanan yoğurt örneklerini duyusal değerlendirmeler için özel olarak hazırlanmış tadım odalarında (Fotoğraf 3.5) yoğurtların raf ömrü süresi içerisinde 1.gün, 1. hafta, 2. hafta ve 3. hafta olmak üzere test etmiştir. Puanlama 0-5 puan aralığındadır.

Çizelge 3.2 TS 1330, Nisan 2006 Yoğurtların duyuusal muayene değerlendirme puanları

ICS 67.100.99	TÜRK STANDARDI	TS 1330/Nisan 2006
Çizelge 4 - Yoğurtların duyuusal muayene değerlendirme puanları		
Görünüş		Puan
- Temiz, parlak, süt renginde, serum ayrılması olmamış, çatlak ve gaz kabarcığı bulunmayan, homojen,		5
- Temiz, süt renginde, serum ayrılması olmamış, çatlak ve gaz kabarcığı bulunmayan,		4
- Temiz, mat, grimsi, az sayıda çatlak ve az miktarda serum ayrılmış,		3
- Süt renginden farklı değişik renk meydana gelmesi, çok sayıda çatlak, gaz kabarcığı bulunan, serumu ayrılmış, gözle görülebilen her türlü yabancı madde bulunan		1-2
Kıvam		
- Kaşıkla alınan kesitte dolgun kıvamda, düzgün yapıda, homojen, karıştırıldıktan sonra koyu bir akıcılık, serumu hemen ayrılmayan, dille damak arasında kolay dağılmayan		5
- Alınan kesitte dolgun kıvamda, düzgün yapıda, homojen, karıştırıldıktan sonra koyu bir akıcılık, serumu az ayrılan, dille damak arasında en az dağılan, dolgun yapıda homojen		4
- Alınan kesitte akıcılığı az, hafif pütürlü yapıda, karıştırıldıktan sonra akıcı ve serumu hemen ayrılan, ağıza alındığında dağılan, hafif pütürlü		3
- Alınan kesitte çok akıcı, homojen olmayan ve pütürlü, karıştırıldıktan sonra çok akıcı hemen ve fazla miktarda serumu ayrılan, dipte tortu bulunduran, dille damak arasında tutulamayan, akıcı, homojen olmayan		1-2
Koku		
- Kendine has hoş kokuda		4-5
- Kendine has olmayan veya yabancı koku ihtiva eden		3
- Kendine has olmayan, alkolsü, yanık veya yabancı koku ihtiva eden		1-2
Tat		
- Kendine has hafif ekşimsi tatta olan		5
- Hafif ekşimsi veya hafif tatlımsı		4
- Ekşimsi, hafif acımsı, hafif küfümsü, hafif sabunumsu ya da hafif yanık tatta olan ve benzeri yabancı tad içeren		3
- Aşırı derecede ekşimsi, acımsı, küfümsü, sabunumsu yanık tatta olan ve benzeri yabancı tat içeren		1-2



Fotoğraf 3.5 Duyusal değerlendirmelerin yapıldığı tadım odası

3.11 Duyusal Değerlendirmelerde İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS programına göre yapılmış, SPSS X 17.00 istatistik paket programı kullanılmıştır.

3.12 Yoğurt Örneklerinde Viskozite Tespiti

Yoğurt örneklerinde viskozitenin tayini, konsistrometre (Gerber Instruments Bostwick Consistometer) ile yapılmıştır. Temiz ve kuru olduğu kontrol edildikten sonra bostwickmetrenin ürün koyulacak haznesi kısıkaç yardımıyla kapatılmıştır. Aletin üzerindeki su terazisi ayarlanarak, 20 °C ye getirilmiş ve 30 sn torakslanmış yoğurt örneği hazneye doldurulmuştur (Fotoğraf 3.6.). Kısıkaç kaldırıldığında kronometre çalıştırılmış ve ürünün 30 sn içinde aldığı yol cm olarak kaydedilmiştir. Yapısı daha viskoz olan yoğurtlar bostwichmetre'de daha az yol almıştır.



a



b

Fotoğraf 3.6. Viskozite ölçümünde kullanılan cihazlar

(a: Torakslama işleminde kullanılan karıştırıcı b: Bostwick konsistometre)

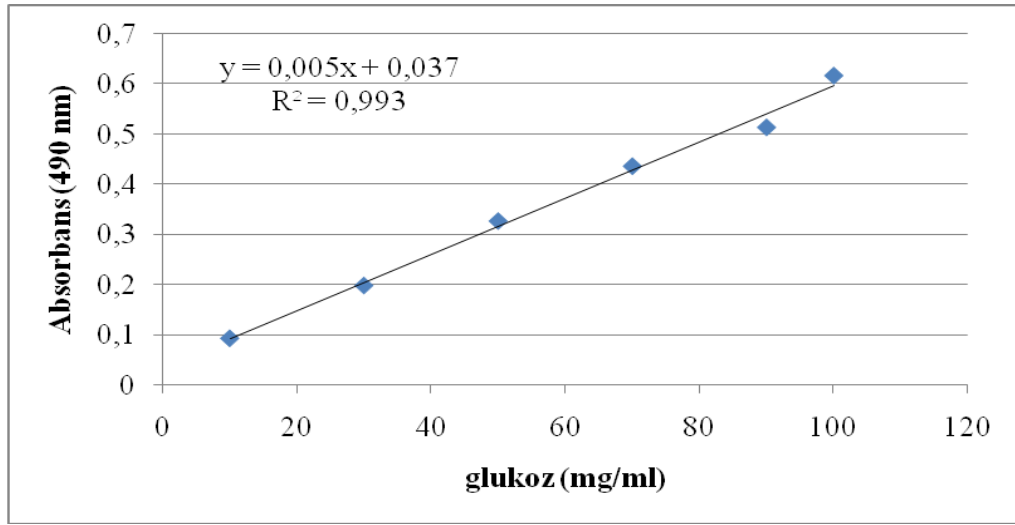
BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bazı mikroorganizmaların kapsül veya şlaym şeklinde ekzopolisakkaritler ürettiği bilinmektedir. Mikrobiyal polisakkaritler gıda ve diğer sektörler için potansiyel biyopolimer kaynağıdır [129] Özellikle süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterileri yoğun olarak ekzopolisakkarit üretebilmektedir [38] Bir çalışmada *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*'un 2100 mg/L olacak şekilde ekzopolisakkarit ürettiği ve pH 6,5'da optimum olduğu bulunmuştur [130]. Bu çalışmada yoğurt starteri olarak kullanılan iki bakteri için de optimum gelişme ortamında yumurta kabuğunun EPS üretimini ne şekilde etkilediği araştırılmış ve her iki bakteri türü için EPS üretiminin arttığı uygun konsantrasyon kullanılmıştır. EPS üretimlerinin karşılaştırılmasında Glikoz standartından yararlanılmıştır.

4.1 EPS Standartının Hazırlanması

Bakterilerin EPS üretimlerinin sağlıklı olarak belirlenebilmesi için literatürde belirtildiği şekilde bir glikoz standardı hazırlanmıştır. Bu standart için değişen miktarlarda (5-100 µg/mL) glikoz kullanılmıştır. Bakterilerin EPS üretimi, Şekil 4.1’de gösterilen standart eğri ile karşılaştırılarak, mg/L olarak da saptanabilmektedir.



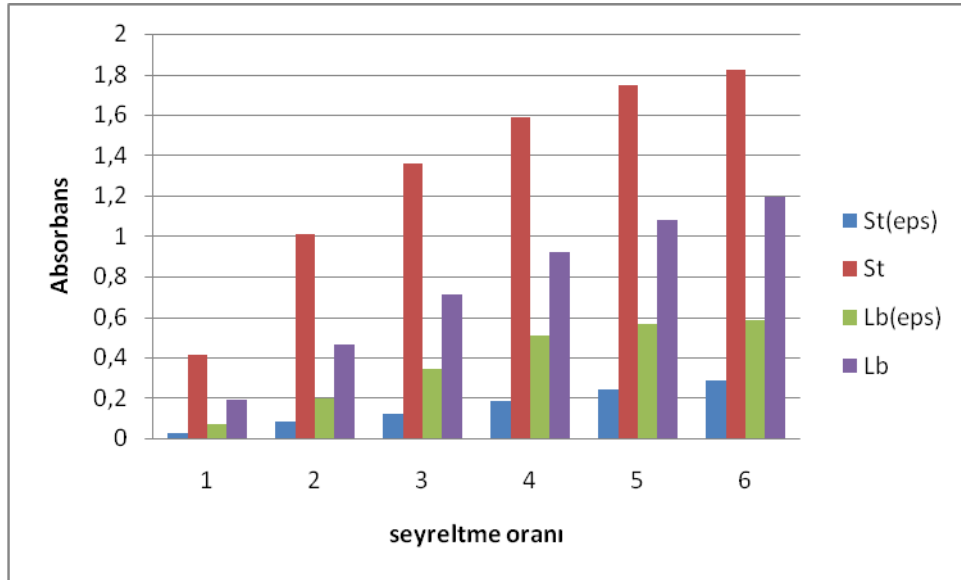
Şekil 4.1 Glikoz standardı

4.2 Bakterilerde EPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi

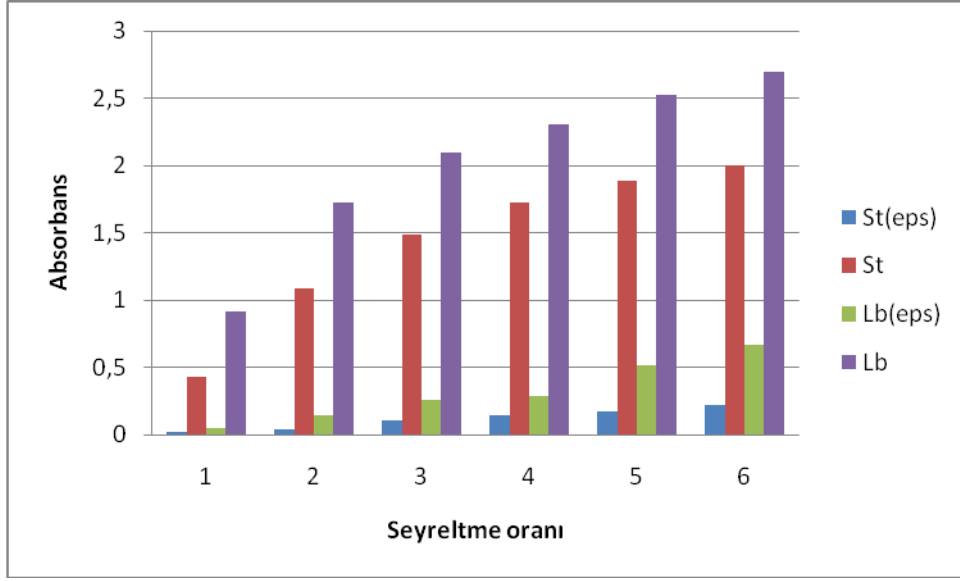
Serbest metil eter ve indirgen gruplar içeren oligosakkaritler, polisakkaritler ve onların türevleri, fenol ve konsantre sülfirik asit ile muamele edildikleri zaman turuncu-sarı renk verirler. Fenol, sülfirik asit varlığında şekerlerin ve onların metil türevlerinin, oligosakkaritlerin ve polisakkaritlerin kolorimetrik kantitatif mikrodeterminasyonunda kullanılabilir. Bu nedenle izolatların EPS üretimlerinin belirlenmesinde oldukça duyarlı bir metot olan Dubois fenol-sülfirik asit metodu kullanılmaktadır [128].

Buna göre, distile suda çözülmüş EPS çözeltisinden alınan 1ml örnek sırasıyla 0,5ml fenol (%80 w/v) ve 5 ml derişik H₂SO₄ ile karıştırılır. Önce 10 dak. oda sıcaklığında, daha sonra 20 dak. 30°C' lik su banyosunda inkübe edilen örneklerin, spektrofotometrede (490 nm) absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçümler alınırken kör olarak 1ml dH₂O'nun 0,5 ml fenol (%80 w/v) ve 5 ml derişik H₂SO₄ ile muamele edilmesiyle elde edilen çözelti kullanılmıştır.

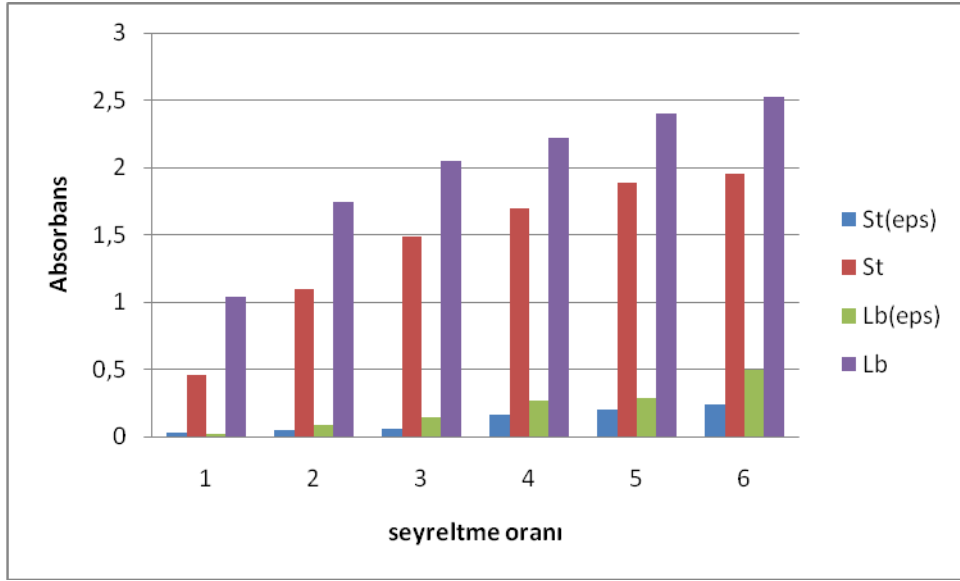
Okunan absorbans değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafiği üzerinden EPS üretim miktarları hesaplanmıştır. Her iki bakteri için de farklı miktarlarda yumurta kabuğu içeren ortamlar ile yumurta kabuğu içermeyen ortam kıyaslandığında EPS üretimlerinin değıştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2; Şekil 4.3., Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



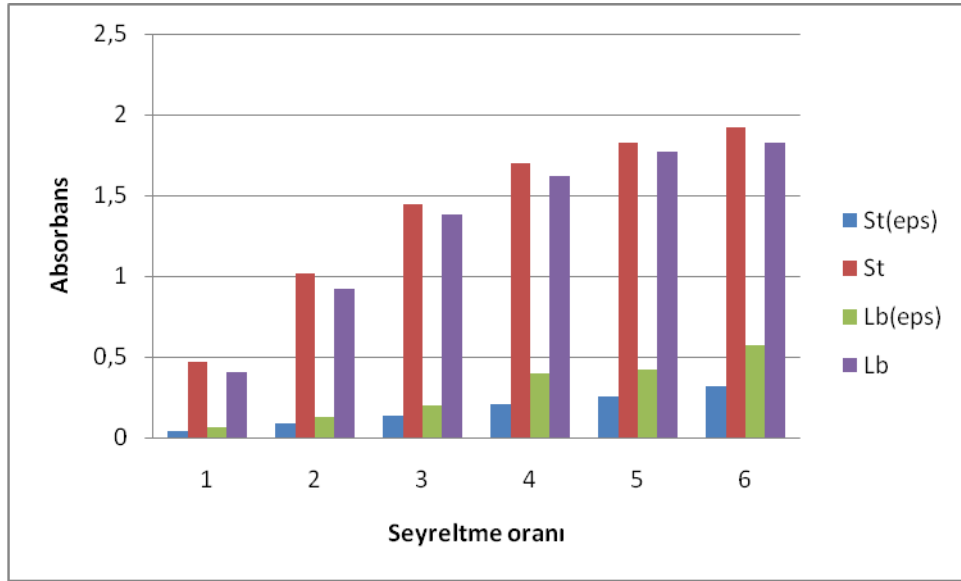
Şekil 4.2 *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* için yumurta kabuğu olmadığında elde edilen bakteri konsantrasyonu ve EPS ilişkisi



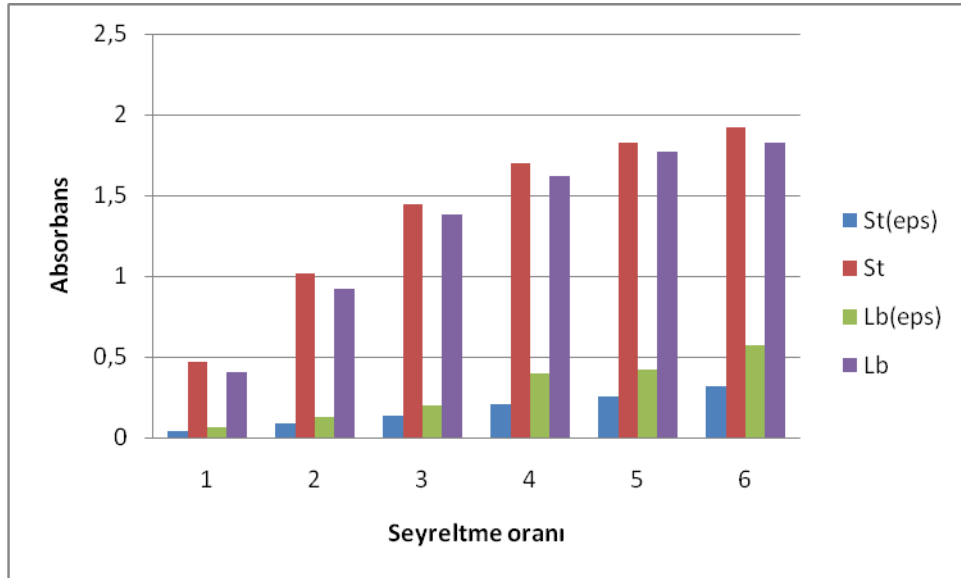
Şekil 4.3 *S.thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* için % 0.25 (w/v) yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi



Şekil 4.4 *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* için % 0.5 (w/v) yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi



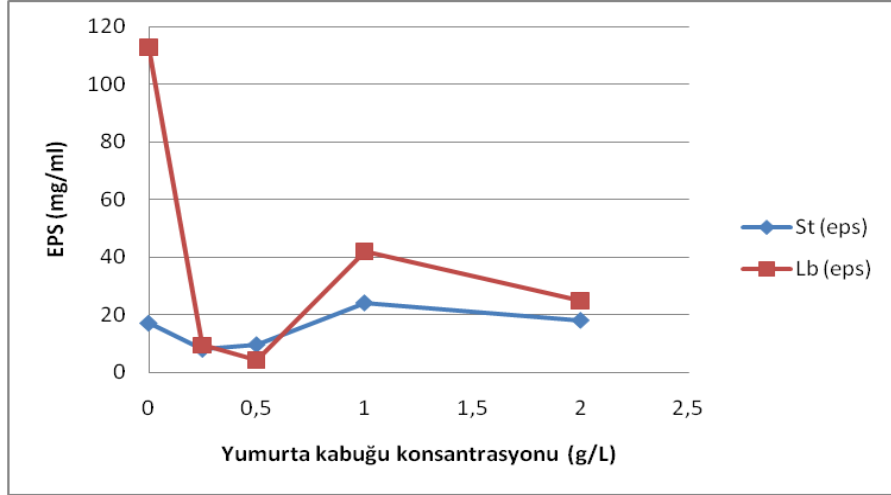
Şekil 4.5 *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* için % 1.0 (w/v) yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi



Şekil 4.6 *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* için % 2.0 (w/v) yumurta kabuğu içeren besiyerlerinden elde edilen bakterilerin konsantrasyonu ve EPS ilişkisi

Denemede elde edilen Absorbans değerlerinden OD₄₉₀: 1.0 olduğu durumda (Şekil 4.2-şekil 4.6), eps miktarı Şekil 4.1'deki standart kullanılarak mg/ml cinsine dönüştürülmüştür (Şekil 4.7). Şekil 4.7'de denemelerde kullanılan yumurta kabuğu konsantrasyonları içinde her iki bakteri için % 1.0 (w/v)'lik konsantrasyonun eps

üretimini artırması açısından en uygun konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Yoğurt starterleri içerisinde % 1.0'lik yumurta kabuğu konsantrasyonu kullanılarak yoğurt örnekleri hazırlanmıştır.



Şekil 4.7 *S.thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* için farklı yumurta kabuğu konsantrasyonlarında eps miktarının (mg/ml) karşılaştırılması (OD₄₉₀: 1.0)

4.3 Yumurta Kabuğu Kullanılarak Yoğurt Üretimi

Yoğurt üretiminde en sık rastlanan sorunun yoğurtlarda su bırakma olduğu bilinir (Fotoğraf 4.1). Yoğurt üretiminde sıkça karşılaşılan su salınımı ve gevşek yapı problemi hem üretici hem de tüketici açısından arzu edilmeyen bir durum olup, bu problemlerin giderimiyle ilgili çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bunların başında da yoğurdun üretimi aşamasında çeşitli katkı maddelerinin katılmasıdır. Şlaym üreten starter kültürlerde EPS' nin üretilmesi ürünün viskozitesi üzerinde etkili olduğu ve viskoziteyi artırdığı ve % 100 doğal yoğurt elde edilmesini sağladığı belirtilmiştir [30].

Ancak tüketici tercihlerinin katkı içermeyen gıdalar yönünde olması nedeniyle bu problemlerin doğal yollardan gerçekleşmesini zorunlu kılmış, ve bu nedenle de ropy kültürlerin yani daha az su bırakan kültürlerin elde edilmesi önemli olmuştur. Bu konuda yapılan çalışmaların bazıları EPS üretimlerini artırarak ropy kültür elde etmek yönünde gerçekleşmektedir. Ancak üreticiler genellikle su bırakma olayını azaltmak için kıvam artırıcı maddeler kullanmaktadır [130]. Doğal olması nedeniyle bu çalışmada

daha önce hiç denenmemiş olan yumurta kabuğu tozu kullanılarak ürün kalitesi incelenmiştir.



a

b

Fotoğraf 4.1 Yoğurtlarda görülen su bırakma problemi

(a: Normal yoğurt b: Yumurta kabuğu ilaveli yoğurt)

Bu çalışmada hazırlanan normal yani yumurta kabuğu tozu içermeyen, %1 yumurta kabuğu tozu ilaveli ve %1 toz kalsiyum ilaveli yoğurtlar 1. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 3. hafta olmak üzere normal yoğurdun raf ömrü kadar (21 gün) izlenmiştir. Konsistometre ile yapılan ölçümlerde diğer yoğurtlar 11-13 cm ye 30sn de ulaşırken; ticari toz kalsiyum katılan yoğurt örneklerinde viskozite 1sn de 23cm ye ulaşmıştır (Çizelge 4.1).

4.4 Yoğurt Örneklerinde Bakteriyel Sayım

Mikroorganizma sayımı yönünden yoğurtlarda bariz bir fark belirlenmemiştir (Çizelge 4.2). Sayım sonuçları başlangıçta birbirine yakın bulunmuş, ilerleyen zamanlarda yumurta kabuğu ilavesi yapılanlarda canlı bakteri sayısının daha fazla olduğu göze çarpmıştır.

Çizelge 4.1 Yoğurt örneklerinin fizikokimyasal özelliklerinin takibi

Fizikokimyasal Özellikler	1.gün			1.hafta			2.hafta			3.hafta		
	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli
pH	4,59	4,47	4,56	4,56	4,47	4,55	4,4	4,45	4,5	4,36	4,42	4,5
Viskozite (cm/30sn)	13,7	11	23	13,5	11	23	14	11	23	14,5	11,3	23

Çizelge 4.2 Yoğurt örneklerinden elde edilen bakteri sayım sonuçları (adet/mL)

Mikrobiyolojik Özellikler	1.gün			1.hafta			2.hafta			3.hafta		
	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli
<i>St. thermophilus</i>	45.10 ⁷	56.10 ⁷	43.10 ⁷	43.10 ⁷	61.10 ⁷	yapılmadı	37.10 ⁷	65.10 ⁷	yapılmadı	35.10 ⁷	63.10 ⁷	yapılmadı
<i>Lb. bulgaricus</i>	23.10 ⁶	20.10 ⁶	31.10 ⁷	28.10 ⁶	16.10 ⁶	yapılmadı	45.10 ⁶	56.10 ⁶	yapılmadı	49.10 ⁷	55.10 ⁷	yapılmadı

4.5 Yoğurt Örneklerinin Duyusal Özellikleri

Panelistler tarafından ticari toz kalsiyum katılanlar bariz kimyasal kokuya ve kötü tada sahip bulunmuştur (Çizelge 4.3.). Duyusal olarak tadım yapan panelistlerden bazıları kokusundan dolayı tadına dahi bakamamışlar, tadına bakan panelistler ise yutamamışlardır.

Yapının ilk bakışta oldukça sert ve güzel görünmesine rağmen kaşık ile alındığında ayran kıvamında sulu bir forma dönüşmüştür.

Yumurta kabuğu ilavesi yapılan yoğurt örneklerinde ise, yumurta kabuğu ilave edilmemiş normal yoğurttan duyusal özellikler açısından bir fark görülmemiş olmakla beraber, raf ömrü sonuna doğru normal yoğurttan pH düşerken, yumurta kabuğu ilavelilerde hızlı pH düşüşü olmadığı için ekşime olmamış ve daha çok beğenilmiştir (Çizelge 4.1). Bu durumun yumurta kabuğunun içeriğinin büyük oranda kalsiyum olması nedeniyle pH üzerinde tampon etkisi olduğunu düşündürmüştür. Çünkü tadı kötü bile olsa ticari toz kalsiyum ilaveli yoğurtlarda bakılan pH raf ömrü sonuna kadar aynı kalmıştır.

Yapı anlamında kalsiyumun ve yumurta kabuğunun farkı bariz olup, katılımların tamamı yumurta kabuğu katılan yoğurt örneklerinde yapınlının daha iyi olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 4.3 Yoğurt örneklerinin duysal özelliklerinin takibi

Duyusal Özellikler	1.gün			1.hafta			2.hafta			3.hafta		
	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli
Görünüş	3	4	5	4	5	5	3	5	5	3	4	5
	2	5	5	4	5	5	3	5	5	3	4	5
	3	5	5	4	5	5	2	5	5	3	4	5
	3	5	5	4	5	5	3	5	5	3	5	5
	3	5	5	4	5	5	2	4	4	3	4	5
	3	5	5	4	5	5	3	4	5	3	5	5
	3	5	5	4	4	5	3	5	5	2	5	4
	3	5	5	4	4	5	3	5	5	3	5	4
	3	5	5	4	4	5	3	5	5	3	5	5
	3	5	5	4	5	5	3	5	5	2	4	5
	3	5	5	4	5	5	3	5	5	2	5	5
	3	5	5	4	5	5	3	5	5	3	5	4
	3	5	5	4	5	5	3	5	5	2	5	5
	2	4	5	4	5	5	3	5	5	2	5	5
	3	5	5	3	5	5	3	5	5	2	5	5
Kıvam	5	4	1	5	5	2	4	5	1	4	4	1
	5	5	1	5	5	1	4	5	1	4	4	1
	5	5	1	5	5	1	4	3	1	4	4	1
	5	5	1	5	5	1	4	5	1	3	5	1
	5	5	1	5	5	1	5	5	1	3	4	1
	4	5	1	5	5	1	5	5	1	4	4	2
	4	5	1	5	5	1	4	4	1	3	5	1
	4	5	1	5	5	1	3	5	2	4	4	1
	4	5	1	5	5	2	5	5	1	3	3	1
	5	5	1	5	4	1	4	5	1	5	5	2
	5	5	2	5	5	1	4	5	1	4	3	1
	5	5	1	5	5	1	3	4	1	3	5	1
	5	4	1	4	5	1	5	4	1	5	4	1
	5	4	2	4	4	1	4	5	1	3	4	1
	4	5	1	5	5	1	4	5	2	5	5	1

Çizelge 4.3 Yoğurt örneklerinin duysal özelliklerinin takibi (devamı)

Duyusal Özellikler	1.gün			1.hafta			2.hafta			3.hafta		
	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli	Normal Yoğurt	Yumurta Kabuğu İlaveli	Kalsiyum İlaveli
Koku	5	5	1	5	5	1	5	5	1	5	5	1
	5	5	1	5	5	2	5	5	1	5	5	1
	5	5	1	5	5	1	5	5	2	4	4	2
	5	5	1	5	5	1	5	5	1	4	5	1
	5	5	1	5	5	1	5	5	1	5	5	1
	5	5	1	5	5	1	5	5	1	4	4	1
	5	5	1	5	5	2	5	5	1	4	5	1
	5	5	2	5	5	1	5	5	2	5	5	1
	5	5	2	5	5	1	5	5	1	5	5	1
	5	5	1	5	4	1	5	5	1	5	5	1
	5	5	1	5	5	1	4	5	1	5	5	1
	5	5	2	5	5	1	5	5	1	4	4	1
	5	5	1	5	5	1	4	5	1	5	5	1
	5	5	1	5	5	1	5	5	1	5	5	1
	Tat	5	5	1	5	5	1	4	5	1	4	5
5		5	1	5	5	1	4	5	1	4	5	1
5		5	1	4	4	1	4	5	1	4	5	1
4		5	1	5	5	1	4	5	1	4	5	1
5		5	1	5	5	1	4	5	1	4	5	1
5		5	1	4	5	1	4	5	1	4	4	1
5		5	1	5	5	1	4	5	1	4	5	1
5		5	1	5	5	1	5	5	1	4	4	1
5		5	1	4	5	1	5	5	1	4	5	1
5		5	1	5	5	1	4	5	1	4	5	1
5		5	1	5	5	1	5	5	1	4	5	1
5		5	1	5	5	1	4	5	1	4	5	1
5		4	1	5	4	1	5	5	1	4	5	1
5		5	1	5	5	1	4	5	1	4	5	1
4		5	1	4	5	1	4	4	1	4	5	1

4.6 Duyusal Değerlendirmelerde İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS programına göre yapılmış, SPSS X 17.00 istatistik paket programı kullanılmıştır.

Normal yoğurt, yumurta kabuğu ilaveli yoğurt ve Ca ilaveli yoğurt grupları arasındaki farkı test etmek için SPSS ile ANOVA analizi kullanılmış, ve gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. İstatistik olarak tat açısından ($F(2, 42) = 1198,05$; $p < 0,0001$), koku açısından ($F(2, 177) = 2854,348$; $p < 0,0001$), kıvam açısından ($F(2, 177) = 709,731$; $p < 0,0001$), görünüş açısından ise ($F(2, 177) = 310,705$; $p < 0,0001$) şeklinde sonuçlara ulaşılmıştır. Tek yönlü varyans analizinde Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.4-4.5-4.6-4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin tat değerlendirmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Yoğurt örneği çeşidi	n	Depolama süresi (gün)				Ortalama
		1	7	14	21	
A1*	15	4,86±0,35 ^b	4,73±0,45 ^b	4,26±0,45 ^b	4,00±0,00 ^b	4,46±0,50 ^b
B1	15	4,93±0,25 ^b	4,86±0,35 ^b	4,93±0,2 ^c	4,86±0,35 ^c	4,90±0,30 ^c
C1	15	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a

A1*; Normal yoğurt, B1; %1 Yumurta kabuğu ilaveli yoğurt, C1; %1 kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerini ifade etmektedir. İstatistiksel olarak farklı gruplar farklı harflerle belirtilmiş, önemlilik değeri $P < 0,05$ alınmıştır.

Çizelge 4.4 incelendiğinde, tat bakımından yumurta kabuğu ilaveli yoğurdun en iyi, ticari kalsiyum karbonat ilaveli yoğurdun en kötü olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5 Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin koku değerlendirmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Yoğurt örneği	Depolama süresi (gün)					Ortalama	
	çeşidi	n	1	7	14		21
A2	15		5,00±0,00 ^b	5,00±0,00 ^b	4,80±0,41 ^b	4,66±0,48 ^b	4,86±0,34 ^b
B2	15		5,00±0,00 ^b	4,93±0,25 ^b	5,00±0,00 ^b	4,80±0,41 ^b	4,93±0,25 ^b
C2	15		1,20±0,41 ^a	1,13±0,35 ^a	1,13±0,25 ^a	1,06±0,25 ^a	1,13±0,34 ^a

A2; Normal yoğurt, B2; %1 Yumurta kabuğu ilaveli yoğurt, C2; %1 kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerini ifade etmektedir. İstatistiksel olarak farklı gruplar farklı harflerle belirtilmiş, önemlilik değeri $P < 0,05$ alınmıştır.

Çizelge 4.5 incelendiğinde koku bakımından yumurta kabuğu ilaveli yoğurdun en iyi, ticari kalsiyum karbonat ilaveli yoğurdun en kötü olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.6 Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin görünüş değerlendirmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Yoğurt örneği	Depolama süresi (gün)					Ortalama	
	çeşidi	n	1	7	14		21
A3	15		2,86±0,35 ^a	3,93±0,25 ^a	2,86±0,35 ^a	2,60±0,50 ^a	3,06±0,63 ^a
B3	15		4,86±0,35 ^b	4,80±0,41 ^b	4,86±0,35 ^b	4,66±0,48 ^b	4,80±0,40 ^b
C3	15		5,00±0,00 ^b	5,00±0,00 ^b	4,93±0,25 ^b	4,80±0,41 ^b	4,93±0,25 ^b

A3; Normal yoğurt, B3; %1 Yumurta kabuğu ilaveli yoğurt, C3; %1 kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerini ifade etmektedir. İstatistiksel olarak farklı gruplar farklı harflerle belirtilmiş, önemlilik değeri $P < 0,05$ alınmıştır.

Çizelge 4.6 incelendiğinde, görünüş bakımından yumurta kabuğu ilaveli yoğurdun iyi, ticari kalsiyum karbonat ilaveli yoğurdun en iyi, normal yoğurdun ortalama bir değerde olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7 Normal, yumurta kabuğu ilaveli ve kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerinin kıvam değerlendirilmesi açısından Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Yoğurt örneği çeşidi	n	Depolama süresi (gün)				Ortalama
		1	7	14	21	
A4	15	4,66±0,48 ^b	4,86±0,35 ^b	4,13±0,63 ^b	3,80±0,77 ^b	4,36±0,71 ^b
B4	15	4,80±0,41 ^b	4,86±0,35 ^b	4,66±0,61 ^c	4,20±0,67 ^b	4,63±0,58 ^c
C4	15	1,13±0,35 ^a	1,13±0,35 ^a	1,13±0,35 ^a	1,13±0,35 ^a	1,13±0,34 ^a

A4; Normal yoğurt, B4; %1 Yumurta kabuğu ilaveli yoğurt, C4; %1 kalsiyum karbonat ilaveli yoğurt örneklerini ifade etmektedir. İstatistiksel olarak farklı gruplar farklı harflerle belirtilmiş, önemlilik değeri $P < 0,05$ alınmıştır.

Çizelge 4.7 incelendiğinde, kıvam bakımından yumurta kabuğu ilaveli yoğurdun en iyi, ticari kalsiyum karbonat ilaveli yoğurdun en kötü olduğu görülmektedir.

BÖLÜM V

SONUÇ

Endüstriyel olarak süt ürünlerinin üretiminin artması, pazarlama ve rekabet edebilme başarısının artışı gerektirmiş, ayrıca müşterilerde geleneksel yöntemlerle üretilen ürünlerdeki kaliteyi yakalayabilme beklentisini de beraberinde getirmiştir.

Müşteri beklentileri dendiğinde, ilk akla gelen özellik ürünün duyuşal özellikleridir. Duyusal özellikler sütün bileşimiyle ve süte uygulanan teknolojik işlemler (ısıtım işlem v.b.), fermentasyon sıcaklığı, kullanılan kültür, inkübasyon ve depolama sıcaklığı gibi pek çok faktörün etkisi ile şekillenir. Bunların içerisinde ürüne karakteristik özelliklerini kazandıran en önemli unsur kullanılan starter kültürlerdir. Endüstriyel üretimde ürünlerin duyuşal özellikleri ile birlikte kar sağlanması da önemli bir husus olduğu için, kullanılan kültürün karakteristikleri büyük ölçüde önem kazanmıştır. Yoğurt ve ayran üretiminde kullanılan temel laktik asit bakterileri *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* bakterileridir. Bu bakterilerin farklı suşlarından hazırlanan kültür kombinasyonları süt ürünlerinin yapısal ve duyuşal özelliklerinde oldukça etkilidir. Ürün kalitesini artırmak amacıyla Laktik asit bakterileri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar içerisinde ekzopolisakkarit (EPS) üretim yeteneği ve bu yeteneğin artırılmasına yönelik çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Yoğurtlarda kıvamı artırmak ve yapıyı iyileştirmek amacıyla karragenan gibi bazı gımlar, selüloz, pektin ve nişasta gibi polisakkaritler kullanılabilir. Ancak bazı ülkelerde bu tür katkıların kullanımı sınırlıdır veya yasaktır. Örneğin, İngiltere’de yoğurt üretiminde %1 oranında nişasta kullanımına izin verilirken, diğer stabilizörlerin kullanımı % 0.5 ile sınırlandırılmıştır [75].

Bu tez çalışmasında ise, kalsiyum içeriği yüksek, doğal bir ürün ve aynı zamanda atık madde olarak görülen yumurta kabuğunun yoğurt starteri olan bakterilerin EPS üretim yeteneği üzerindeki etkisi ve fermente süt ürünü olan yoğurdun kalitesini değiştirip değiştirmediği araştırılmış ve her iki bakteri için de farklı miktarlarda yumurta kabuğu içeren ortamlar ile yumurta kabuğu içermeyen ortam kıyaslandığında EPS üretimlerinin değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2; Şekil 4.3., Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

Şekiller incelendiğinde her iki bakteri için en uygun konsantrasyonun % 1.0 yumurta kabuğu olduğu tespit edilmiş ve yoğurt starterleri içerisinde bu miktar kullanılarak yoğurtlar hazırlanmıştır. Hazırlanan normal, yani yumurta kabuğu tozu içermeyen, %1 yumurta kabuğu tozu ilaveli ve %1 toz kalsiyum ilaveli yoğurtlar 1. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 3. hafta olmak üzere normal yoğurdun raf ömrü kadar (21 gün) izlenmiştir. Panelistler tarafından ticari toz kalsiyum katılanlar bariz kimyasal kokuya ve kötü tada sahip bulunmuştur (Çizelge 4.3.). Yapının ilk bakışta oldukça sert ve güzel görünmesine rağmen kaşık ile alındığında ayran kıvamında sulu bir forma dönüşmüştür.

Yumurta kabuğu ilavesi yapılan yoğurt örneklerinde ise, yumurta kabuğu ilave edilmemiş normal yoğurttan duyusal özellikler açısından bir fark görülmemiş olmakla beraber, raf ömrü sonuna doğru normal yoğurtta pH düşerken, yumurta kabuğu ilavelilerde hızlı pH düşüşü olmadığı için ekşime olmamış ve daha çok beğenilmiştir (Çizelge 4.1). Bu durumun yumurta kabuğunun içeriğinin büyük oranda kalsiyum olması nedeniyle pH üzerinde tampon etkisi olduğunu düşündürmüştür. Çünkü tadı kötü bile olsa ticari toz kalsiyum ilaveli yoğurtlarda bakılan pH raf ömrü sonuna kadar aynı kalmıştır.

Yapı ve kıvam anlamında kalsiyumun ve yumurta kabuğunun farkı bariz olup, katı lı mcl ları n tamamı yumurta kabuğu katılan yoğurt örneklerinde yapı nı n daha iyi olduğunu belirtmişlerdir.

KAYNAKLAR

- [1] Kılıç, S., Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, No: 542, 451 s., 2001.
- [2] Erdemir, A.,. The Importance of Milk From The Point Of View Of The History Of Turkish Child Care. Jishim, 2004
- [3] Aslım, B., Beyatlı, Y. ve Halkman, K., Yoğurt starter kültür metabolitlerinin inhibisyon etkisi, Turk J. Biol., 24, 65-78, 2000.
- [4] Ray, B., Probiotics of Lactic Acid Bacteria: Science or Myth? In “Lactic Acid Bacteria, Eds. T. F. Bozoğlu, B. Ray pp. 101-136 ”. Nato, ASI Series, Series H: Cell Biology, Vol. 98, Springer, Berlin, 1996.
- [5] Tamime, A. Y., Robinson, R. K., Yoghurt Sci. and Tech.. Cambridge, GB: CRCPress, 1999.
- [6] Raviart, A., Danone Vitapole. Caractérisation des Exopolysaccharides de *Streptococcus thermophilus*, Ensia, 1- 53, 2003.
- [7] Anonymous, Ferment Formation, Danone Grup eğitim notları, Lüleburgaz, (1999).
- [8] Potanin, A., On the mechanism of aggregation in the shear flow suspensions.J. Colloid and Interface Sci., 145, 140- 157, 1991.
- [9] Duboc, P., Mollet B., Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, International Dairy J., 11, 759- 768. 2001.
- [10] Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Broadbent, J. R., Role of *Streptococcus thermophilus* MR- 1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2147- 2151, 1998.

- [11] Wendakoon, ve Ozimek., Inhibition of *Helicobacter pylori*, growth by *Lactobacillus casei* in fermented milk, pp. 506-509, 2002.
- [12] Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Holt, J.G., Bergey' s Manual of Systemic Bact., Volume 2, Willims & Wilkins, London, 1208-1304, 1986.
- [13] Robinson, R. K., Dairy Microbiol. Volume 1 The Microbiology of Milk, 51- 59, 1985.
- [14] Kaleli, D., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* virulent fajlarının izolasyonu ve yoğurt starter kültürleri üzerine litik etkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 78 p., Ankara, 2001.
- [15] Acar, E., Yoğurt starter kültür fajlarının elektron mikroskobu ile morfolojik karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, Ankara, 2002.
- [16] Rajagopal, and Sandine, Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk, *Journal of dairy science A*. 1990, pp. 894-899, 1990.
- [17] Yetişmeyen, A., Süt Teknolojisi, 1214, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara, 229. 1995.
- [18] Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier successful strains and future challenge, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 347-358, 1996.
- [19] Marteau, P.R., Vrese, M., Cellier, J.C., Schrezenmeir, J., Protection from gastrointestinal diseases with use of probiotics, *Am. J. Clin. Nutr*, 73, 430- 436, 2001.
- [20] Rolfe, R.D., The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health, *Journal of Nutrition*, 130, 3965-4025, 2000.

- [21] Zubillago, M., Weill, R., Postaine, E., Goldman, C., Caro, R., Boccio, J., Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases, *Nutrition Research*, 21: 569-579, 2001.
- [22] Dellaglio F., Dicks, L.M.T.; Du Toit, M.; S.,. *Int J.Sys.Bacteriol* .41: 340, 1991.
- [23] Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Eight edition, The Willams and Wilkins Company, Baltimore xxxvi +1268, 1974.
- [24] Klaenhammer, *Discovering lactic acid bacteria by genomics*, pp. 29-58, 2002.
- [25] Cluzel, P.-J., Serio, J. and Accolas, J.-P. Interaction of *Lactobacillus bulgaricus* temperate bacteriophage 0448 with host strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(8); 1850-1854, 1987(a).
- [26] Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Welker, D. L., Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve functionality of low fat cheese, *Int. Dairy J.*, 11: 433-439, 2001.
- [27] Metin, A., *Süt Teknolojisi.1.Bölüm: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi*, E.Ü. Müh Fak. Yayın No:33, Genişletilmiş 3 Baskı, E.Ü. Rektörlüğü Basımevi, Bornova, 1999.
- [28] Penna, A. L. B., Sivieri, K., Oliveria, M. N., Relation between quality and rheological properties of lactic beverages, *J. Food Engin.*, 49, 4- 13, 2001.
- [29] Cerning, J., Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 113- 130, 1990.
- [30] Degeest, B., De Vuyst, L., Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2863-2870, 1999.

- [31] Ricciardi, A., Clementi, F., Exopolysaccharides from lactic acid bacteria Structure, production and technological applications, *Italian J. Food Sci.*, 1, 23- 45, 2000.
- [32] Sikkema, J., Oba, T., Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria, *Snow Brand R& D Reports*, 107, 1- 31, 1998.
- [33] Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., Exopolysaccharide production and texture promoting abilities of mixed strain starter cultures in yogurt production, *J. Dairy Sci.*, 80, 2310- 2317, 1997.
- [34] Cerning, J., Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75, 463- 472, 1995.
- [35] Rohm, H., Kovac, A., Effects of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yogurt gels, *J. Texture Studies*, 25, 311- 329, 1994.
- [36] Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P., An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Int. Dairy J.*, 12, 163- 171, 2002.
- [37] Cerning, J., Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. In H. de Roissart, F. M. Luquet, *Bactéries Lactiques. Aspects Fondamentaux et Technologiques*, Vol. I, 309- 329, France, Loriga, 1994.
- [38] Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. J., Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime forming mesophilic lactic acid bacteria, *J. Dairy Sci.*, 75, 692-699, 1992.
- [39] Gugliandola, C., Maugeri, TL., Cacamo, D., Stackebrandt, E., *Bacillus aeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine Bacillus Species from Eolian Islands (Italy), *Systematic and Applied Microbiology*, 26/2, 172-176, 2003.
- [40] Sutherland, I.W., *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.

- [41] Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G., Biofilms the Customized Microniche, *J. Bacteriol*, 176, 2137-2142, 1994.
- [42] Wasser, S. P., Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 258-274, 2002.
- [43] Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima, R. M. O. C., de Franc, FP., Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains, *Biotechnol Lett*, 19, 19-21, 1997.
- [44] Kenne, L., and Lindberg, B., in Aspinall, G.O., ed., *The Polysaccharides*, vol. 2, Academic Press, New York, 287-363, 1983.
- [45] Shankar, S, Ye RW., Schlichtman, D., Chakrabarty, AM., Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, 70, 221–255, 1995.
- [46] Moriello, VS., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, TL., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Production of Exopolysaccharides from a Thermophilic Microorganism Isolated from a Marine Hot Spring in Flegrean Areas, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30/2, 95-101, 2003.
- [47] Ophir, T., and Gutnick, D. L., A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 740-745, 1994.
- [48] Denny, T. P., Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 173-197, 1995.
- [49] <http://www.bioline.org.br/request?bf98002>, 08 Haziran 2010
- [50] Kimmel, S.A. and Roberts, R.F., Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *Int. J. Food Microbiol.*, 40; 87-92, 1998.

- [51] Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Daito, T., Kaneko, T. and Itoh, T., Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *International Journal of Food Microbiology*, 40, 169-175, 1998.
- [52] Ozer, D., ve Akalın, M.S., Probiyotik fermente sut urunleri ve probiyotikler, VI. Sut ve Sut Urunleri Sempozyumu (Ed: Demirci, M.), Tekirdağ, 273-277, 2000.
- [53] Sutherland, I. W., Bacterial Exopolysaccharides, *Adv. Micro. Physiol.*8: 143-213, 1972.
- [54] Marshall, M., Fermented milk and their Future Trends .I., Microbiological aspects, *J. Dairy Res.* 54:559-574, 1987.
- [55] Mozzi, F, Oliver, G, De Giori, GS., and De Valdez, GF., Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria, *Milchwissenschaft*, 50(2):80-82, 1995a.
- [56] <http://gidadernegi.org/docgoster.asp?dosya=703302008>, 15 Mayıs 2010.
- [57] Sutherland, I. W., Microbial Exopolysaccharide synthesis, In *Extracellular Microbiya Polysaccharide* (eds Sanford, P. A. and Laskin, Am. Chem. Soc., Washington., 40-57, 1977.
- [58] Van Kranenburg, R., J. D. Marugg, I. I., Van Swam., N. J. Willem, and W. M. de Vos., Molecular Characterization of the Plasmid-Encoded EPS gene cluster Essential for Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, 24, 387-397, 1997.
- [59] Van Kranenburg, R., H. R. Vos. I. I., Van Swam, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos., Functional Analysis of Glycosyltransferase Genes from *Lactococcus lactis* and other Gram-Positive Cocci: Complementation, Expression, and Diversity. *J. Bacteriol.*, 181, 6347-6353, 1999a

- [60] Lamothe, G. T., Molecular Characterization of Exopolysaccharide Biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. PhD thesis, L'Universite de Lausanne, Lausanne, Switzerland, 2000.
- [61] Stingele, F., R. R. Neeser., and B. Mollet, Identification and Characterization of the EPS (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol*, 178, 1680-1690, 1996.
- [62] Lee, I.Y., Seo, W. T., Kim, G. J., Kim, M. K., Ahn, S. G., Kwon, G. S., Park, Y. H., Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16/2, 71-75, 1997.
- [63] Yalpani, M., Sandford, P. A., Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, *Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35, 1987.
- [64] Fett, W. F., Bacterial Exopolysaccharides their Nature Regulation and Role in Host-Pathogen Interactions, *Curr. Top. Bot. Res*, 1, 367-390, 1993.
- [65] Margaritis, A., Pace, G. W., Microbial Polysaccharides. In: Blanch H. W., Drew S., Wang D. I. C., *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. *The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products*. Oxford: Pergamon Pres.,. 1005-44, 1985.
- [66] Frengova G., E. Simova, D. Beshkova, Z.I. Simov, 2000. Production and Monomer Composition of Exopolysaccharides by Yogurt Starter Cultures. *Canadian J. Microbiol.*, 46, 1-5
- [67] Sutherland, I.W., in Swings, J.G., and Civerolo, E.L., eds., *Xanthomonas*, Chapman & Hall, London, 363-388, 1993.
- [68] Roberts, I. S., The Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide Production in Bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 50, 285-315, 1996.

- [69] Maugeri, TL., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Panico, A., Lama, L., Gamb, A., Halophilic Thermotolerant Bacillus Isolated from a Marina Hot Spring, *Biotechnology Letters*, 24/7, 515-519, 2002.
- [70] Grobber, G. J., Sikkema, J., Smith, M. R., de Bont, J. A. M. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *J. Appl. Bacteriology*, 79, 103-107, 1995.
- [71] Gancel, F and Novel, G., Exopolysaccharide Production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures 1. conditions of production, *J. Dairy Sci.* 77: 685-688, 1994.
- [72] Doco, T., Wieruszelski, J.M., Furnet, B. et al., Structure of an Exocellular Polysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus*, *Carbohydr. Res.* 12 :198-313, 1990.
- [73] Garti, N., Reichman, D., Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers, *Food Structure*, 12: 411-426, 1993.
- [74] Folkenberg, D. M., Dejmak, P., Skriver, A., Guldager, H. S., Ipsen, R., Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strain of bacterial yoghurt cultures, *International Dairy Journal*, 46: 279-284, 2005.
- [75] Marshall, V. M., Dunn, H., Elvin, M., McLay, N., Gu, Y., Laws, A. P. Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. *Carbohydrate Research*, 331, 413-422, 2001.
- [76] Hassan, A. N., Frank, J. F., Schmidt, K. A., Shalabi, S. I. Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *J. Dairy Sci.*, 79, 2098-2103, 1996.
- [77] Hassan, AN., Corredig, M., and Frank JF., Viscoelastic properties of yogurt made with ropy and non-ropy exopolysaccharides producing cultures. *Milchwissenschaft*, 56 (12): 684-687, 2001.

- [78] Şimşek, O. ve Çon, AH., Laktik asit bakterilerinde ekzopolisakkarit üretimi ve ekzopolisakkaritlerin süt ürünlerindeki fonksiyonları. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 87-94 s, İzmir, 2003.
- [79] Wood, B. J. B., Microbiology of Fermented Foods. Blackie Academic and Professional, London, 124-130, 1997.
- [80] Degeest, B., Vaningelgem, F., Laws, A. P., De Vuyst, L., “UDP NAcetylglucosamine 4-Epimerase Activity Indicates the Presence of NAcetylgalactosamine in Exopolysaccharides of Streptococcus thermophilus Strains”, Appl. Environ. Microbiol. 67: 3976-3984, 2003
- [81] Fajardo-Lira, C., Garibay, M. G., Rodarte, C. V., Farres, A., Marshall, V. M., Influence water activity on the fermentation of yoghurt made with exacellular polysaccharide-producing or non-producing starter. International Dairy Journal, 7: 279-281, 1997.
- [82] Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Oberg, C.J. and Welker, D.L. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve functionality of low fat cheese, Int. Dairy J., 11; 433-439, 2001.
- [83] Hess, S. J., Roberts, R. F., Ziegler, G. R., Rheological properties of non fat yoghurt stabilized using Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus producing exopolysaccharides or using commercial stabilizer system. J. Dairy Sci., 80, 252- 263, 1997.
- [84] Rawson, H. L., Marshall, V. M., Effect of ‘ropy’ strains of Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus and Streptococcus thermophilus on rheology of stirred yoghurt. International Journal of Food Science and Technology, 32: 213-220, 1997.
- [85] Perry, D.B., McMahon, D.J. and Oberg, C.J., Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat Mozzarella cheese. J. Dairy Sci., 80; 799-805, 1997.

- [86] Perry, D.B., McMahon, D.J. and Oberg, C.J., Manufacture of low fat Mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing cultures, *J. Dairy Sci.*, 81; 563-566, 1998.
- [87] Faber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P., & Vliegenthart, J. F. G., The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research*, 310, 269–276, 1998.
- [88] Looijesteijn, P.J., Boels, I., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., Regulation of Exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* by the sugar sources, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(11): 5003-5008, 1999.
- [89] Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G., The relative effect of milk base, starter and process on yoghurt texture: A review, *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrit.*, 44, 113- 137, 2004.
- [90] Tuinier, R., Zoon, P., Olieman, C., Stuart, M. A. C., Fler, G. J., de Kruif, C. G., Isolation and physical characterization of an exocellular polysaccharide, *Biopolymers*, 49: 1-9, 1999.
- [91] Sebastiani, H., Zelger, G., Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 53, 15- 20, 1998.
- [92] Hansen, P. M. T., Nishinari, K., Doi, E., *Food Hydrocolloids in Dairy Industry- Food Hydrocolloids Structure Properties and Functions*, Plenum Press, New York, 211-224, 1994.
- [93] Amatayakul, T., Halmas, A.L., Sherkat, F., and Shah, N. P., Physical Characteristics of Yoghurt Made Using Exopolysaccharide-Producing Starter Cultures and Varying Casein to Whey Protein Ratios, *International Dairy Journal*, 1:1-11, 2005.
- [94] Güzel-Seydim Z. B., Sezgin E., ve Seydim, A. C., Influences of Exopolysaccharide Producing Cultures on the Quality of Plain Set Type Yoghurt, *Food Control*, 16: 205-209 2004.

- [95] Akalın, S. A., ve Gönç, S., Katı Kıvamlı Yoğurdun Reolojik ve Duyusal Özellikleri, Aroma Maddeleri ve Starter Bakteri Sayıları Üzerine Viskoz Kültürlerin Etkisi, Gıda , 24: 319-325, 1999.
- [96] Laws P. A., and Marshall, V. V., The Relevance of Exopolysaccharidess to Reological Properties in Milk Fermented With Ropy Strains of Lactic Acid Bacteria, International Dairy Journal, 11:709-721, 2001
- [97] Ozer, B., and Atasoy, F., Effect of Addition of Amino Acid Treatments With Galactosidase and Use of Shocked cultures on Acetaldehyde Level in Yoghurt, International Journal of Dairy Technology, 55 (4): 1-5. 2002.
- [98] Potann, A. A., and Urnew, N.B., Microrheological Models of Aggregated Suspension in Shear Flow. Journal of Colloid and Interface Science, 142: 385, 1991.
- [99] Skriver, A., Roemer, H., and Ovist, K. B., Rheological of Stirred Yoghurt Viskometry. Journal of Texture Studies, 24: 185-198. 1993.
- [100] Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., Landon, M. Exocellular polysaccharide production by Streptococcus thermophilus, Biotech. Letters 10, 255-260, 1988.
- [101] Bouzar, F., Cerning, J. ve Desmazeaud, M. Exopolysaccharide production in milk by Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus CNRZ 1187 and by two kolonial variants, J. of Dairy Sci., 79 (2), 205-211, 1996.
- [102] Cerning, J. Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., Landon, M., Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by Lactobacillus bulgaricus. Biotech. Letters, 8, 625- 628, 1986.
- [103] Welman, A., D., Maddox, I. S., Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges, Trends in Biotech. 21, 269- 274, 2003.

- [104] Mårtenson, O., Dueñas- Chasco M., Irastorza, A., Öste, R., Holst, A. Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. *Lebensm.- Wiss. U.- Technol.*, 36, 353- 357, 2003.
- [105] Van Marle, M. E., Zoon, P., Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim milk gels. *Netherlands Milk and Dairy J.*, 49, 47- 65, 1995.
- [106] De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V., Degeest, B., and Vaningelgem, F., Exopolysaccharide- Producing *Streptococcus thermophilus* Strains as Starter Cultures in The Production of Fermented Milks. *International Dairy Journal*, 1:1-11, 2003.
- [107] Shihata, A., Shah, N. P., Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 765- 772, 2002.
- [108] Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N., Corrieu, G., Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt, *J. Dairy Sci.*, 82, 673- 681, 1999.
- [109] Kılıç, S., Karagözlü, C., Akbulut, N. ve Mater, Y., *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*' un ekzopolisakkarit oluşturma özellikleri. *Dünya Gıda*, 8, 64-68, 2003.
- [110] Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., et al., Bacterial Biofilms in Nature and Disease, *Annu RevMicrobiol.*, 41, 435-64, 1987.
- [111] Kumar, C. G., Anand, S. K., Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: a Review., *Int J Food Microbiol*, 42, 9-27, 1998.

- [112] Yalpani, M., Sandford, P. A.. Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, *Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35, 1987.
- [113] Becker, A., Katzen, A., Pühler, and L., Jelpie. Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145-152, 1998.
- [114] Wolfaardt, G., Lawrence, J., Robarts, R., Caldwell, S., Caldwell, D., *Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community*, *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 434-446, 1994.
- [115] Krylova, T., Popova, L., Pechurkin, N., Kashperova, T., Belyavskaya, V., *Population Heterogeneity of Plasmidbearing and Plasmid-Free Bacillus subtilis Strains Under Different Environmental Conditions*, *Microbiologia*, 69, 220-224, 2000.
- [116] Moller, S., Sternberg, C., Andersen, J., Christensen, B., Ramos, J., Givskov, M., Molin, S., *In situ expression in Mixed-Culture Biofilms: Evidence of Metabolic Interactions Between Community Members*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 721-732, 1998.
- [117] Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., and Yamaguchi, T., *Antitumoral Activity of Slime-Forming, Encapsulated Lactococcus lactis subsp. cremoris Isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk, "viili"*, *Animal Sci. Technol.*, 62, 277-283, 1991.
- [118] Nakajima, H., Suzuki, H., Kaizu, and T. Hirota., *Cholesterol Lowering Activity Of Ropy Fermented Milk*. *J. Food. Sci.*, 57, 1327-1329, 1992a.
- [119] Farina, J., I., Sineriz F., Molina O.E., and Perotti N. I., *High Scleroglucan Production by Sclerotium rolfsii: Influence of Medium Composition*, *Biotechnol. Lett.*, 20, 825-831, 1998.

- [120] Yalpani, M., Sandford, P. A., Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani M., editor, Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35, 1987.
- [121] Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., and Ielpie, L., Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145-152, 1998.
- [122] (Jacqueline P. Jacob, Richard D. Miles and F. Ben Mather; Egg Quality University of Florida)
- [123] Dave, A. M., and Shah, N. P., Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, 79: 1529-1536. 1996.
- [124] Rybka, S., and Kailaphaty, K., Media for Enumeration of Yoghurt Bacteria. *International Dairy Journal*, 6: 839-847, 1996.
- [125] Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. ve Williams, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567, 2000.
- [126] Halkman, A.K. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Basak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Sti. Ankara, 73-89, 250, 2005.
- [127] Castele, S.V., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Assche, V.P., Swings, J. ve Huys, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters, *Int. Dairy J.*, 16, 1470-1476, 2006.
- [128] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356, 1956.

[129] Gasse, M. A., Schmidt K. A., and Frank. J. F., Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus. J. Food Sci. 62:171-173, 207, 1997.

[130] Milci, S., ve yaygın H., Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları, Gıda, 30,2, 123-129, 2005.