

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKARİT (EPS)
ÜRETİMİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

Fazilet MIDİK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Fazilet MIDİK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 154 adet laktik asit bakteri suşundan sünme özelliklerine bağlı olarak seçilen 10 adet suşun Ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri incelenmiştir. EPS üretimini etkileyen fermantasyon koşullarından pH (5.0, 6.0, 7.0), sıcaklık (20°, 30°, 37°C), inkübasyon süresi (48, 120, 192 saat) ve farklı içeriğe sahip besiyerlerin de EPS üretim miktarlarına etkisi incelenmiştir.

Çalışma kapsamında incelenen laktik asit bakterisi suşlarından 4 tanesinin (E9, E10, E2, ve E7) yüksek EPS üretim yeteneklerine (sırasıyla, 515.48 mg/L, 512.81 mg/L, 445.65 mg/L ve 444.88 mg/L) sahip oldukları belirlenmiştir. EPS üretimi için en uygun pH 6.0, en uygun sıcaklık 30°C olarak belirlenmiş; en yüksek EPS üretimi için inkübasyon süresi suşlara göre değişiklik göstermiştir. Besi ortamına glikoz ilavesi tüm suşlarda, laktoz ilavesi E1, E6, E7, E8, E9, E10 suşlarında EPS üretimini teşvik etmiş; mineral katkıların önemli bir etkisi belirlenmemiştir.

Kasım 2011, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, ekzopolisakkaritler, üretim koşulları

ABSTRACT

EXAMINATION OF SOME LACTIC ACID BACTERIA FOR EXOPOLYSACCHARIDE (EPS) PRODUCTION

Master Thesis

Fazilet MIDIK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

In this study, 10 lactic acid bacteria strains's EPS production examined which are selected from 154 bacteria in Food Engineering Department of Ankara University collection about their ropiness properties. The fermentation conditions from that effect EPS production pH (5.0, 6.0, 7.0), temperature (20°, 30°, 37°C), incubation time (48, 120, 192 hours) and EPS production quantities of medium with different contents were investigated.

Lactic acid bacteria strains were examined within the scope of study, it was determined that in four of them (E9, E10, E2, and E7) have high EPS production capabilities (respectively, 515.48 mg/L, 512.81 mg/L, 445.65 mg/L ve 444.88 mg/L). For EPS production, it was determined that the optimum pH was 6.0, optimum temperature was 30°C. For the highest EPS production, incubation time varied according to strains. In medium the addition of glucose in all strains, the addition of lactose in E1, E6, E7, E8, E9, E10 strains encouraged the EPS production; mineral additives were not identified as an important effect.

November 2011, 60 pages

Key Words: Lactic acid bacteria, exopolysaccharides, production condition

TEŞEKKÜR

İlk olarak bana kendisi ile birlikte alıŐma Őansı tanıyan, yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gosteren, bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve geleceğin saygın hocalarından biri olacağına inandığım ArŐ. Gör. Mehmet TOKATLI'ya ve bu zorlu çalışma boyunca beni destekleyen çok sevdiğim aileme ve arkadaŐım Nehir ÇETİNTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Fazilet MIDİK

Ankara, Aralık 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Polisakkaritler.....	3
2.2 Mikrobiyal Polisakkaritler.....	4
2.3 Ekzopolisakkaritler.....	6
2.3.1 Ekzopolisakkaritlerin özellikleri.....	7
2.3.2 Ekzopolisakkaritlerin yapısı ve sınıflandırılması.....	8
2.3.3 Ekzopolisakkaritlerin biyosentezi.....	14
2.3.4 Laktik asit bakterilerinin ürettikleri ve diğer bazı önemli ekzopolisakkaritler.....	17
2.3.5 Ekzopolisakkaritlerin kullanıldığı alanlar	19
2.3.6 Ekzopolisakkarit Üretimini Etkileyen Faktörler.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1 Materyal.....	30
3.1.1 Bakteri Kültürleri.....	30
3.1.2 Besiyeri	31
3.2 Yöntem.....	31
3.2.1 EPS izolasyonu	31
3.2.2 İzole edilen EPS'lerde toplam şeker analizi.....	32
3.2.3 EPS üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi.....	33
3.2.3.1 Farklı inkübasyon sürelerinin EPS üretimine etkisi.....	33
3.2.3.2 Farklı sıcaklık değerlerinin EPS üretimine etkisi.....	33
3.2.3.3 Ortam pH 'sının EPS üretimine etkisi.....	34
3.2.3.4 Farklı NaCl konsantrasyonlarının EPS üretimine etkisi.....	34
3.2.3.5 Farklı şekerlerin EPS üretimine etkisi.....	35
3.2.3.6 Farklı azot kaynaklarının EPS üretimine etkisi.....	35
3.2.3.7 Farklı mineral kaynakların EPS üretimine etkisi.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1 Farklı İnkübasyon Sürelerinin EPS üretimine Etkisi.....	37
4.2 Farklı Sıcaklık Değerlerinin EPS Üretimine Etkisi.....	39
4.3 Ortam pH'sının EPS Üretimine Etkisi.....	41
4.4 Farklı NaCl Konsantrasyonlarının EPS Üretimine Etkisi.....	44
4.5 Farklı Şekerlerin EPS Üretimine Etkisi.....	45
4.6 Farklı Azot Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi.....	48
4.7 Farklı Minerallerin EPS Üretimine Etkisi.....	50
5. SONUÇ	53
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	60

SİMGELER DİZİNİ

A	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celcius
CaCO_3	Kalsiyum karbonat
BOD	Biyolojik oksijen gereksinimi
COD	Kimyasal oksijen gereksinimi
DNS	Dinitrosalisilik asit
dsrS	Dekstran sukraz sentezleyen gen kodu
dTDP	Timidin difosfat
EPS	Ekzopolisakkarit
FeCl_3	Demir klorür
FOS	Fruktoz oligosakkaritler
GRAS	Generally Recognized as Safe
HA	Hyaluronik asit
HasA	Hyaluronik asit sentaz enzimi
HCl	Hidroklorik asit
HePS	Heteropolisakkarit
HoPS	Homopolisakkarit
kDa	Kilodalton
LAB	Laktik asit bakterileri
MRS	Man Rogosa Sharpe
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
M	Molar
NaCl	Sodyum klorür
NaNO_3	Sodyum nitrat
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum sülfat
UDP	Üridin difosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Glukanların yapısı.....	11
Şekil 2.2 Fruktanların yapısı.....	12
Şekil 2.3 Laktoz, galaktoz ve glukozun EPS çevrimi ve glikolizisi.....	16
Şekil 3.1 Glikoz standardı eğrisi (mg/L).....	33
Şekil 4.1 Laktik asit bakterilerinin 30°C’de farklı sürelerde inkübasyonu sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	38
Şekil 4.2 Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	40
Şekil 4.3 Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	42
Şekil 4.4 Laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	44
Şekil 4.5 Laktik asit bakterilerinin farklı şekerler içeren besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları(mg/L).....	46
Şekil 4.6 Laktik asit bakterilerinin farklı azot kaynakları ilave edilmiş besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/ L).....	49
Şekil 4.7 Laktik asit bakterilerinin farklı mineral katkı besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Ekzopolisakkarit üretim yeteneğine sahip laktik asit bakterileri.....	7
Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen homopolisakkaritler	10
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri.....	30
Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin 30°C’de farklı sürelerde inkübasyonu sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	37
Çizelge 4.2 Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	39
Çizelge 4.3 Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	42
Çizelge 4.4 Laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	44
Çizelge 4.5 Laktik asit bakterilerinin farklı şekerler içeren besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	46
Çizelge 4.6 Laktik asit bakterilerinin farklı azot kaynakları ilave edilmiş besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	49
Çizelge 4.7 Laktik asit bakterilerinin farklı mineral katkılı besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L).....	51

1. GİRİŞ

Son yıllarda pek çok çeşit endüstriyel uygulamada doğal polimerlere olan talebin artması mikroorganizmaların ürettiği ekzopolisakkaritlere olan ilgiyi de artmıştır. Pek çok mikroorganizma ekstraselüler polisakkarit sentezleme yeteneğine sahip olup, suda çözünebilir veya suda çözünmeyen polimerleri hücre dışına salgılamaktadır.

Bakteriler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler eşsiz fiziksel özelliklere sahip suda çözünebilir gıdalar olarak bilinmektedir. Gıda, ilaç ve diğer endüstriyel alanlarda geniş kapsamlı uygulamalarda kullanılmaktadır. Pek çok gram negatif ve gram pozitif bakteri çeşidi, bazı mantarlar ve algler ekzopolisakkarit üretebilme yeteneğine sahiptir.

Endüstriyel polimerik materyaller olarak, piyasada deniz algleri ve bitkilerden elde edilen doğal gıdalar ile bakteriyel polisakkaritler arasında başa baş giden bu mücadelede bakteriyel polisakkaritler her geçen gün daha da önem kazanmaktadır.

Endüstriyel olarak önemli mikrobiyal EPS'lere örnek olarak; dekstran, ksantan, gellan, pullulan ve alginat örnek verilebilir.

Bakteriyel polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemelerde ortaya konulmuştur. Ancak, EPS'lerin varlığı sadece virulent karakterli bakterilere özgü değildir.

Laktik asit bakterileri gıdalarda güvenilir olarak kullanılabilen mikroorganizmalardır ve tüm dünyada süt, et ve sebze gibi pek çok çeşit ürünün korunması, duyusal özellikleri ve beslenme değerini geliştirmek için kullanılmaktadır.

Laktik asit bakterileri hücrelerin tutunması ve korunması için çok çeşitli ekzopolisakkaritler üretmektedir. Endüstride, bugüne kadar ekzopolisakkaritlerin fiziko-kimyasal özellikleri ile ilgilenilirken, bugünlerde beslenme ve sağlık uygulamalarındaki potansiyelleri üzerine ilgi artmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin oluşturdukları EPS'nin, insan bağırsağındaki epitelyum doku ile bakteriler arasında gerçek bir bağı meydana getirdiğı ve böylece EPS üretimine sahip suşların yüksek bir tutunma kapasitesine sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, bu yapışkan polimer sayesinde *Lactobacillus bulgaricus*'lar birbirine bağlanabilir. Bu zellikler de EPS nin probiyotik ürünlerin üretimi açısından önemini artırmaktadır.

Son yıllarda, EPS üreten laktik asit bakterileri üzerindeki ilgi artmakta ve bu bakteriler üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Fakat, EPS reten LAB bakterileri ile ilgili temel sorun EPS retim miktarlarının (25-500 mg/L) ok düşük düzeylerde olmasıdır. Gıda sanayi uygulamalarında ticari olarak kullanılabilir olması için, EPS konsantrasyonun 10-15 g/L olması gereklidir. Bu yüzden EPS verimliliğini artırmak amacıyla genetik mhendisliğı uygulamaları ile suş geliştirmeye ve fermantasyon koşullarının optimizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliğı Bölümü Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 154 adet laktik asit bakterisi suşundan snme özelliklerine bağlı olarak EPS reticisi olarak seçilen 10 suşun EPS retim koşullarını optimize etmektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Polisakkaritler

Doğada, karbonhidratların büyük bir kısmı yüksek molekül ağırlıktaki polisakkaritler (glukanlar) halinde bulunmaktadır. Polisakkaritlerin asit veya spesifik enzimlerle tam hidrolizi çeşitli monosakkaritleri veya bunların çeşitli türevlerini verir. Diğer bir deyimle, polisakkaritler monosakkarit ve monosakkarit türevlerinin polimerleridir. Moleküler ağırlık ve yapıları bakımından farklı bir çok polisakkarit mevcut olup bir kısmının yapısı düz zincir şeklinde olduğu halde bazıları dallı-polimerler şeklindedir (Gökalp vd. 2002).

Polisakkaritlerin yapısında en yaygın bulunan monosakkarit D-glukozdur. Bunun yanında D-ksiloz, D-fruktoz, D-mannoz, D-galaktoz, L-galaktoz ve D-arabinoz da yaygın olarak bulunabilmektedir. Monosakkarit türevlerinden ise D-glukozamin, D-galaktozamin, D-glukuronik asit, N-asetil muramik asit ve N-asetil neuraminik asit yaygın olarak bulunmaktadır. Polisakkaritlerin hepsinde monosakkarit ve monosakkarit türevleri glikozidik bağlarla bağlanmış olarak bulunmaktadır (Pigman ve Horton 1972).

Yalnız bir çeşit monosakkarit veya türevinden oluşan polisakkaritler homopolisakkarit, farklı monosakkarit birimlerinden oluşmuş polisakkaritler de heteropolisakkarit olarak isimlendirilmektedir. Başlıca homopolisakkaritlere nişasta, glikojen, dekstran, selüloz, inulin ve kitin; heteropolisakkaritlere ise hiyaluronik asit, kondrotin sülfatlar, heparin, kan gurubu polisakkaritleri, pektin ve alginik asitler örnek olarak verilebilmektedir (Varki vd. 2008).

Polisakkaritlere, içerdiği monosakkarit birimlerine göre de isim verilmektedir. Örneğin; glukoz birimlerinden oluşan nişasta ve glikojen glukonlar, mannoz birimlerinden oluşanlar da mannanlar diye isimlendirilir. Önemli polisakkaritler biyolojik aktivitelerine göre belirlenir ve önemleri bu aktiviteden kaynaklanır (Gökalp vd. 2002).

Bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklı polimerler gıda formülasyonlarında önemli rollere sahiptir. Suda çözünerek veya disperse olarak tekstür oluşumunu sağlayan gıda polimerleri yüksek molekül ağırlıklı ve uzun zincirli moleküllerdir. Gıda endüstrisi tarafından en çok kullanılan biyopolimerler; bitki (nişasta, pektin, keçi boynuzu gamı, guar gamı), algler (karragenan, alginat) veya hayvansal proteinli hidrokolloid (kazeinat ve jelatin) kaynaklı olabilmektedir. Bitkisel karbonhidratların fonksiyonel özellikleri yapısal karakteristikleriyle tam olarak tanımlanmış olup, endüstriyel uygulamalar için modifiye edilmiştir. Bu ürünlerin kullanımı Avrupa Birliği'nde kısıtlanmıştır ve bütün bu gıda polimerleri E-numarası taşımak zorundadır. Mikrobiyal polisakkaritler ise alternatif biyokıvamaştırıcılardandır (De Vuyst vd. 2001).

2.2 Mikrobiyal Polisakkaritler

Mikrobiyal polisakkaritler suda çözünebilir, iyonik veya iyonik olmayan biyopolimerlerdir. Tekrarlanan üniteleri glikozit bağları ile birleştirilmiş, düzenli, dallanmış veya dallanmamış yapıdadırlar (Kumar vd. 2007).

Mikrobiyal polisakkaritler, ilk kez 19. Yüzyıl ortalarında Louis Pasteur tarafından ortaya konulmuş, şarapta bulunan dekstran, mikrobiyal bir ürün olarak keşfedilmiştir. Van Tiegham tarafından, dekstran oluşumunda *Leuconostoc mesenteroides* bakterisinin sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bu keşfi, 1886 yılında, bakteri tarafından selüloz üretildiğinin bulunması takip etmiştir. Bu ekzopolisakkaritlerin keşfinden çok kısa bir zaman sonra, ilk intraselüler depo polimer keşfedilmiştir. İntraselüler depo polimerlere siyanobakterlerin ürettiği siyanofisin ve kırk yıl sonra da *Bacillus megaterium* tarafından üretilen polihidroksibutirat örnek olarak verilmektedir. Yirminci yüzyıl başından ortasına kadar endüstriyel ve medikal olarak önde gelen alginat, ksantan ve polifosfat gibi diğer bakteriyel polimerler bulunmuştur. Bu çeşitli biyopolimerlerin keşfinden kısa süre sonra, biyosentez enzimlerinin aktiviteleri tanımlanmış ve öncü maddeler kullanılarak, biyopolimer oluşumu için metabolik yollar hakkında bazı bilgiler açığa kavuşturulmuştur (Rehm 2010).

1878 yılında, şeker pancarında ve şeker kamışı şurubunda kıvamlaşma ve jelleşmeden sorumlu olan *Leuconostoc mesenteroides* bulunmuştur. Gıda ürünlerinde kullanımına izin verilen ilk mikrobiyal polisakkarit ise *Xanthomonas campestris* tarafından üretilen ksantandır. Ksantan, 1969 yılında US Food and Drug Administration tarafından onaylanmıştır. *Saccharomyces elodea* tarafından üretilen gellan da son zamanlarda ticarileşmiştir. GRAS bakterilerden olan laktik asit bakterileri de yeni nesil biyokıvamlaştırıcıları oluşturmaktadır (De Vuyst ve Deegest 1999).

Mikrobiyal polisakkaritlerin gıda katkı maddesi olarak kullanılması için izin verilmesi gıdanın nerede üretildiğine ve nerede satıldığına bağlıdır. Ksantan gam, jellan gam, kurdlan ve pullulan Birleşik Devletler'de GRAS olarak belirlenmiştir. Bu dört gıda katkısı, Kore Gıda Katkıları Kodu ve Codex Alimentarius Genel Standartları'nda da izin verilenler listesinde yer almaktadır. Avrupa Birliği'nde ksantan, gellan ve pullulan gamlarına izin verilmekteyken, Kanada, Avusturalya ve Yeni Zellanda yürürlükteki gıda yönetmeliklerinde sadece ksantan ve gellan gamlarına izin verilmektedir. Japonya gıda yönetmeliklerinde, Birleşik Devletler'de izin verilmiş bu dört mikrobiyal polisakkaritin yanında agrobakteri suksinoglikan, levan ve basillus natto, makrofomopsis, rhamsan, sklero ve welan gamlarının kullanımlarına da izin verilmektedir (Auld 2010).

Polisakkarit üretim yeteneği, özellikle prokaryotlar olmak üzere, mikrobiyal türler arasında yaygın olarak bulunmaktadır. Çok sayıda bakteriyel polisakkarit bu potansiyele sahiptir, fakat bakteriyel polisakkaritlerin oldukça az bir kısmı ticari ürün olarak benimsenmiştir. Bu durumun nedenleri; bakterilerin patojenik olabilmesi, EPS üretim masraflarının çok yüksek olması, üretim verimliliğinin düşük olması, muhafazasının zor olması ya da ruhsatlandırılması konusundaki sorunlardır. Tüm bu nedenlerle birlikte, en yaygın neden hala yeterli piyasa talebinin olmamasıdır. EPS üretimi için *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes* cinslerinin üyesi suşlar kullanılmaktadır (Sutherland 2001; Bejar vd. 1998).

Biyolojik kıvamlaştırıcılara alternatif bir grup da mikrobiyal ekzopolisakkaritlerdir (De Vuyst ve Deegest 1999).

2.3 Ekzopolisakkaritler

Son yıllarda, genel olarak güvenilir kabul edilen (GRAS) laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen ekzopolisakkaritlere (EPS) olan ilgi artmaktadır (De Vuyst ve Marshall 2001). Ekzopolisakkarit genel terimi Sutherland (1972) tarafından önerilmiş olup, hücre duvarı dışında bulunan bütün bakteriyel polisakkarit yapıları için kullanılmaktadır. EPS, tekrar eden şeker ve şeker türevi ünitelerinin dallanmış, uzun zincirli polisakkaritlerden oluşmaktadır. Bu şeker birimleri farklı oranlarda bulunan, çoğunlukla glikoz olmak üzere galaktoz ve ramnozdur (Welman ve Maddox 2003). Bunun yanında az miktarda fruktoz, mannoz ve galaktozaminden oluşmaktadır (Yang 2000).

EPS, salgılanan iki tür polisakkarit türünü tanımlamak için kullanılmaktadır. Birinci tür mikroskobik olarak tanımlanmış hücre duvarına kovalent bağlarla (genelde fosfodiester veya lipit bağlı) kapsül halinde iken (kapsüller polisakkaritler, CPS, K-antigenleri), ikinci tür ise gevşek serbest bir materyal şeklinde olup, sırasıyla, kapsüller ve yapışkan (slime) ekzopolisakkaritler olarak adlandırılmaktadırlar. Bunlara ek olarak, hücre duvarı bileşeni olan polisakkaritler de mevcuttur. Hücre duvarı bileşeni polisakkaritleri ve kapsüller polisakkaritler, genellikle, üretici bakterilerin patojenitesini belirlemektedir. Ekzopolisakkaritlerin gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Ancak; LAB gibi GRAS mikroorganizmalardaki kapsüller ve yapışkan ekzopolisakkaritler, üretiminde rol aldıkları gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadır. Bazı türler iki EPS çeşidini de üretirken, bazıları sadece tek çeşit EPS üretmektedir (De Vuyst ve Deegest 1999; Deegest vd. 2001; Tok 2007). *Xanthomonas campestris* gibi bazı mikroorganizmalarda kapsül veya yapışkan arasında ayırım çok net değildir ve hücre yüzeyine gevşek bağlanan EPS, bakteriden kolay ayrılır (Sutherland 2001). Ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* cinsleri aşağıdaki çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Ekzopolisakkarit üretim yeteneğine sahip laktik asit bakterileri (Hayaloğlu ve Erginkaya 2001)

Laktik Asit Bakterileri			
Lactobacillus Cinsi	Streptococcus Cinsi	Lactococcus Cinsi	Leuconostoc Cinsi
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>		
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>			
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>			

2.3.1 Ekzopolisakkaritlerin özellikleri

Ekzopolisakkarit üreten bakteriler buldukları doğal ortama dayanan farklı ekolojik yaşam alanlarında kusursuz bir role sahiptirler. Ekzopolisakkaritlerin fonksiyonlarının çoğu koruyucu doğalarına bağlanmaktadır. Mikroorganizmalar kendilerini yüksek derecede hidratlanmış ekzopolisakkarit tabakasıyla sararak kuruma ve tek hücreliler tarafından yenmelerine karşı korunmalarını sağlamaktadır. Ayrıca, hücre etrafındaki jel polisakkarit tabakasının varlığı difüzyon özellikleri üzerinde hem hücre içine hem hücre dışına olacak şekilde üstün etkiler sağlamaktadır. Örnek olarak; polimer matriks içine gömülü hücreler antibiyotikler tarafından ulaşılamazdır. Anyonik ekzopolisakkaritler toksik metal iyonlarına bağlanarak hücre yüzeyinden geçişine engel olurlar. Bu tip etkileşimler metalik yüzeylerdeki korozyonlar açısından pratikte önemli kabul edilmektedir. Patojenik bakterilerde kapsul formunda ekzopolisakkarit üretimi yüksektir, patojen bakterilerin ekzopolisakkarit sentezleme oranı ve miktarı mikroorganizmanın patojenitesine bağlı olmaktadır. Kapsüller, mikroorganizmayı fagositoza karşı korumaktadır. Dikkate değer bir durum da, kapsüller polisakkaritlerin konakçı hücre yüzeyini taklit ederek immun sistemini aktive etmemesidir. Lektinler (bitkiler tarafından salgılanan proteinleri bağlayıcı polisakkaritler, örneğin, Trifolin A)

baklagiller ve *Rhizobium* spp arasındaki simbiyotik ilişkinin kurulumunda önemli bir role sahiptir (Kumar 2007).

Kitazawa vd. (1998), EPS'nin probiyotik açıdan önemli bir kriter olabileceğini gündeme getirmişlerdir ve EPS'lerin antitümör aktivitesi, antimitagenik aktivitesi, makrofaj aktivitesi gibi bazı immunolojik etkileri olduğu belirtmişlerdir. Ayrıca, laktik asit bakterilerinin hücre duvarında bulunan peptidoglikan ve polisakkaritlerin nitrozamin gibi kansorejen etkili maddelerle kimyasal bağlar oluşturarak onları etkisiz hale getirdiği ileri sürmektedir.

EPS'nin bakterinin yüzeye tutunmasında yapıştırıcı özelliğe sahip olması biyofilm oluşturmasında etkili olmaktadır. Bu sayede, EPS üreten bakteri baskın olarak kolonize olur ve bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilir. Ayrıca; mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS molekülleri faj ataklarına, organizmadan sitokin salgılanmasına, antibiyotiklere karşı koruyucudur (Aslım vd. 2005a).

Ekzopolisakkaritler, hücre topakları formunda, floklaşmanın başlamasında ve benzer proseslerde esas rol oynarlar. Bu özellik atık su işlemlerinde ve toprak yığılmasında hayati önem taşımakta, toprakta oluşan erezyonu engellemektedir. Bazı durumlarda inert ve biyolojik yüzeylerdeki yapışkan biyofilmlerdeki ekzopolisakkaritlerin varlığı teşhis edilmiştir. Ticari olarak faydalı olabilen bu biyofilmler boru hatlarının kirlenmesi ve dış çürüklerinin nedeni olabilmektedir (Kumar 2007).

2.3.2 Ekzopolisakkaritlerin yapısı ve sınıflandırılması

Gram negatif bakterilerin çoğunun polisakkarit yapısı nispeten basit olup, homopolisakkaritleri ya da heteropolisakkaritleri kapsamaktadır. Heteropolisakkaritler 2-4 farklı monosakkarit türünün düzenli tekrar eden dizilimiyle disakkaritlerden oligosakkaritlere değişen boyutlarda açıl grupların ilave düzenlemeleriyle oluşmaktadır. En yaygın açıl bileşikler olan asetat esterleri ve pruvat ketalleridir. Ketallerin veya uronik asitlerin varlığı, doğrusal polianyonik makromoleküllerin sonucudur. Sadece

bakteriyal aljinatlar düzenli bir yapıdan yoksundur. Bu polimerlerden, D-mannuronosil ve L-guluronosil birimleri rastgele dizilimlerde bulunurlar ve çoğunlukla mannuronosil gruplarına kuvvetli bir şekilde asetillenmektedir. Bazı polisakkaritler çok daha büyük tekrar eden ünitelere ve diğer açıl yapılarına sahiptir. Bunlar *Rhizobium* ve *Agrobacterium* spp. tarafından üretilen suksinoglikanları içermektedir. Oktasakkarit tekrar eden birimlerinde D-gulukoza, D-galaktozdan oluşur ve O-asetil grupları, O-suksinil yarı esterleri ve pruvat ketallerinden taşımaktadır. Yine tekrarlanan oligosakkarit birimlerinden oluşmuş diğer *Rhizobium* izolatları, D-glukuronik asit, D-riboz ve D-riburonik asit gibi ilave monosakkaritleri içermektedir. Heptasakkarit tekrarlanan üniteler içeren polisakkaritler yine bu cinsler içinde bulunmaktadır (Sutherland 2001).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS, homopolisakkaritler (HoPS) ve heteropolisakkaritler (HePS) olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır.

Homopolisakkaritler:

HoPS tek tip monosakkaritlerden (D-glukopiranoz ve D-fruktofuranosil) oluşmaktadır. HoPS'e selüloz, dekstran, pullulan, levan ve kurdlan polisakkaritleri örnek olarak verilebilir. HoPS ya tek tip bağlantı (örn. 1-2 veya 1-4) ile veya sınırlı sayıda bağlantı (örn. 1-2 veya 1-4) kombinasyonları ile oluşturulmaktadır (Laws vd. 2001). Pek çok LAB türü özel şeker olarak sakarozdan yararlanarak dekstran, levan ve mutan üretmektedir (Sutherland 1972).

Genellikle HoPS moleküler ağırlıkları 4.0×10^4 ile 6.0×10^6 Da aralığındadır. *Lactobacillus* suşları tarafından salgılanan yegane monosakkarit olarak glukoz ve fruktoz içeren HoPS, sırasıyla, glukanlar ve fruktanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu 2 alt familya spesifik bağlanma tipleri, moleküler ağırlık, uzunluk ve kimyasal yapısına göre çok çeşitli polisakkaritler içermektedir (Badel vd. 2011).

Alfa-glukanlar α -1,6 ve α -1,3 bağlı glikozidik birimlerinden oluşmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ve *Leuconostoc mesenteroides dextranicum*

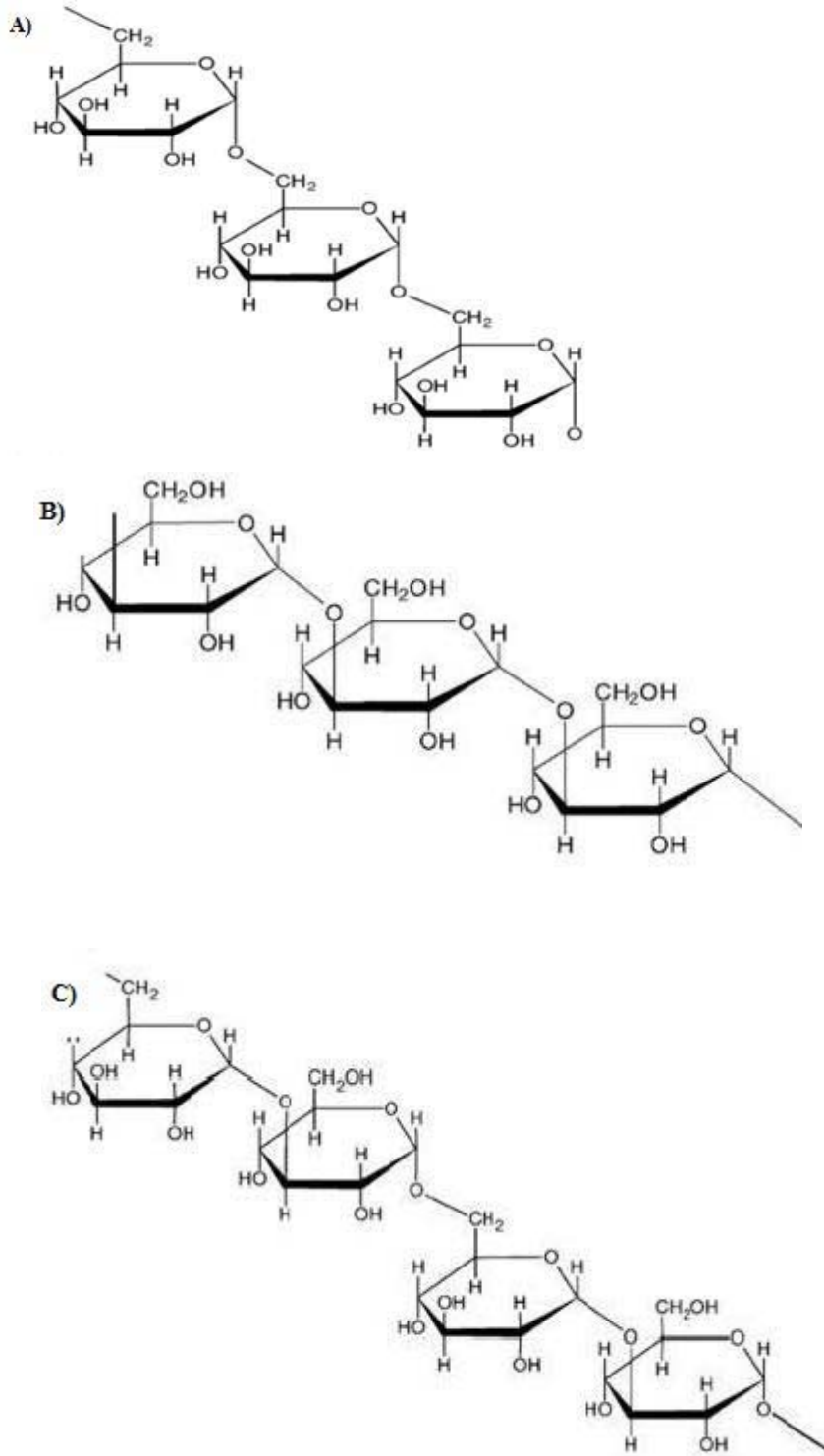
tarafından üretilen dekstranlar, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* tarafından üretilen mutanlar bu gruba dahildir (De Vuyst vd. 1998).

Fruktanlar ise β -2,6 bağlı fruktoz moleküllerinden oluşmaktadır. *Streptococcus salivarius* tarafından üretilen levan bu grupta yer almaktadır (De Vuyst vd. 1998).

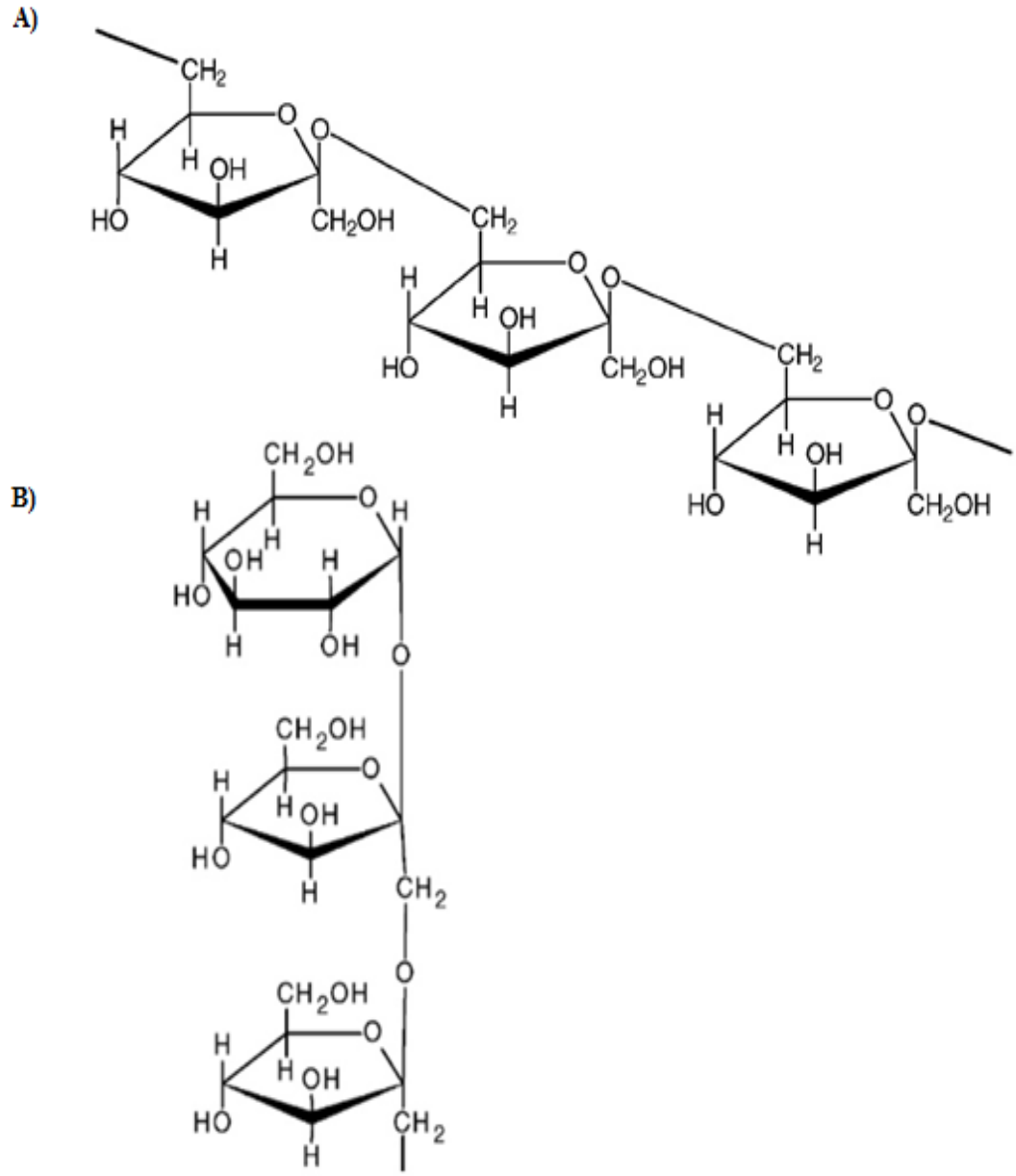
şekil 2.1’de glukanlara ve şekil 2.2’de fruktanlara ait kimyasal yapıları verilmiştir. Ayrıca çizelge 2.2’de laktik asit bakterileri tarafından üretilen homopolisakkaritlere yer verilmiştir.

Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen homopolisakkaritler (Ruas-Madeido vd. 2002)

Ekzopolisakkarit	Laktik asit bakterileri
α-D-glukanlar	
Dekstran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>
Mutan	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>
Alternan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
β-D-glukanlar	<i>Pediococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.
Fruktanlar	
Levanlar	<i>Streptococcus salivarius</i>
İnülin benzerleri	<i>Streptococcus mutans</i>
Poligalaktanlar	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> H414



Şekil 2.1 Glukanların yapısı (Monsan vd. 2001)
a.Dekstran, b.Mutan, c. Alternan



Şekil 2.2 Fruktanların yapısı (Monsan vd. 2001)
a. Levan, b. İnülin tipi fruktan

Heteropolisakkaritler:

HePS tekrar eden alt birimleri temelinde, dallanmış (C2, C3, C4 veya C6 pozisyonlarından) veya dallanmamış, üç ila sekiz monosakkarit, monosakkarit türevleri veya monosakkarit ikamelerinden meydana gelmektedir. Doco vd., *Streptococcus thermophilus* tarafından üretilen, HePS' in tekrar eden ünite yapısı ilk kez 1990 yılında belirlenmiştir (De Vuyst vd. 2001). Homopolisakkaritler ile kıyaslandığında LAB heteropolisakkaritleri çok daha az miktarlarda (60 ile 400 mg L⁻¹) üretilmektedir (Yang 2000).

HePS'e gellan ve ksantan polisakkaritleri örnek olarak verilebilir. Heteropolisakkaritler bir oligosakkaritin çok sayıda kopyasından oluşmaktadır. Oligosakkaritler, üç ila yedi birimden oluşmakta olup iki veya daha fazla farklı monosakkarit çeşitlerine sahiptir ve çoğunlukla farklı bağlanma modelleri göstermektedir (Laws vd. 2001).

Mikrobiyal ekstraselüler heteropolisakkaritler, düzenli aralıklarla uzunluk ve kompleksliği çeşitli olan ve yan zincirlerle bağlanmış, esasen doğrusal moleküllerdir. Mikrobiyal ekzopolisakkarit yapılarının yakından incelenmesi, yapıdaki minor (veya major) değişikliklerin bu makromoleküllerin fiziksel özelliklerine etkisini belirlenmesinde önemlidir. Bu değişiklikler polisakkaritlerin enzimlere duyarlılık, lektinler ve antikorlarla etkileşimler ve iyonlara bağlanma özelliği ve kapasitesi gibi bazı biyolojik özelliklerinde de görülmüştür. Asetil grupları çoğu kez mikrobiyal polisakkaritlerin özellikleri üzerinde oldukça belirli etkiler ortaya koymaktadır. Her bir oligosakkaritin tekrar eden ünitesinde O-asetil ve pruvat (ketal) gruplarının varlığı veya eksikliği çok sayıda polisakkaritin özelliklerini geniş ölçüde değiştirebilmektedir (Sutherland 1997).

LAB heteropolisakkaritleri, mezofilik *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; termofilik *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterileri tarafından üretilmektedir (De Vuyst vd. 1998).

2.3.3 Ekzopolisakkaritlerin biyosentezi

Bakteriyel EPS biyosentezi komplekstir ve çok sayıda gen ürününün birlikte hareket etmesini içermektedir. EPS sentezi için gerekli enzimler ve düzenleyici proteinler *Lactococcus* gibi mezofilik laktik asit bakteri suşlarının plazmid kaynaklı genleri ve *Streptococcus*, *Lactobacillus* gibi termofilik suşların kromozoma dayalı genleri tarafından kodlanmaktadır. LAB suşlarının EPS üretebilme yeteneği kararsız olarak kabul edilmiştir. Mezofilik LAB suşları için, EPS sentezinin kararsız yapısı bağlı plazmitte olan EPS sentezi genleri ile bağıntılıdır. Termofilik LAB suşlarının EPS üretim karakterinin kaybolmasının, genetik değişkenliklerden kaynaklı kopmalar ve yeniden düzenlemelerden dolayı oluştuğu ileri sürülmektedir. EPS özel gen ürünlerine ilaveten, biyosentetik izyolu şeker nükleotidlerinin hazırlanmasında olduğu gibi gerekli birtakım referans enzimlerine dayanmaktadır (Laws vd. 2001).

Biyosentetik izyol 4 ayrı reaksiyon bölümüne ayrılabilir. Bunlar; sitoplazma içinde şeker transferi ile ilgili reaksiyonları, şeker-1-fosfatların sentezini, şekerlerin aktifleştirilmesi ve eşleştirilmesini ve EPS molekülünün dışarı aktarılması işlemini içermektedir (Laws vd. 2001).

Hücre dışı veya hücre duvarına bağlı glikansukrazlar substrat olarak sakkaroz kullanarak HoPS sentezler. Glikoziltransferazlar D-glikozilpironozil birimlerinin sakkarozlardan alıcı moleküllere transferini katalizlerler. HoPS senteziyle kıyaslandığında HePS biyosentez mekanizması daha komplekstir. HePS oluşturan tekrarlanan birimler, sitoplazma içinde şeker nükleotidlerinin öncü moleküller gibi kullanılmasıyla sentezlenir. Bunlar glikoziltransferazlar tarafından lipid taşıyıcı üzerinde sabitlenen uzayan zincirlere şeker nükleotidlerinin ardışık dizilimiyle polimerizasyonun meydana geldiği hücre zarının diğer tarafına yer değişimini sağlar ve en sonunda EPS ortama serbest bırakılır (Patel vd. 2011).

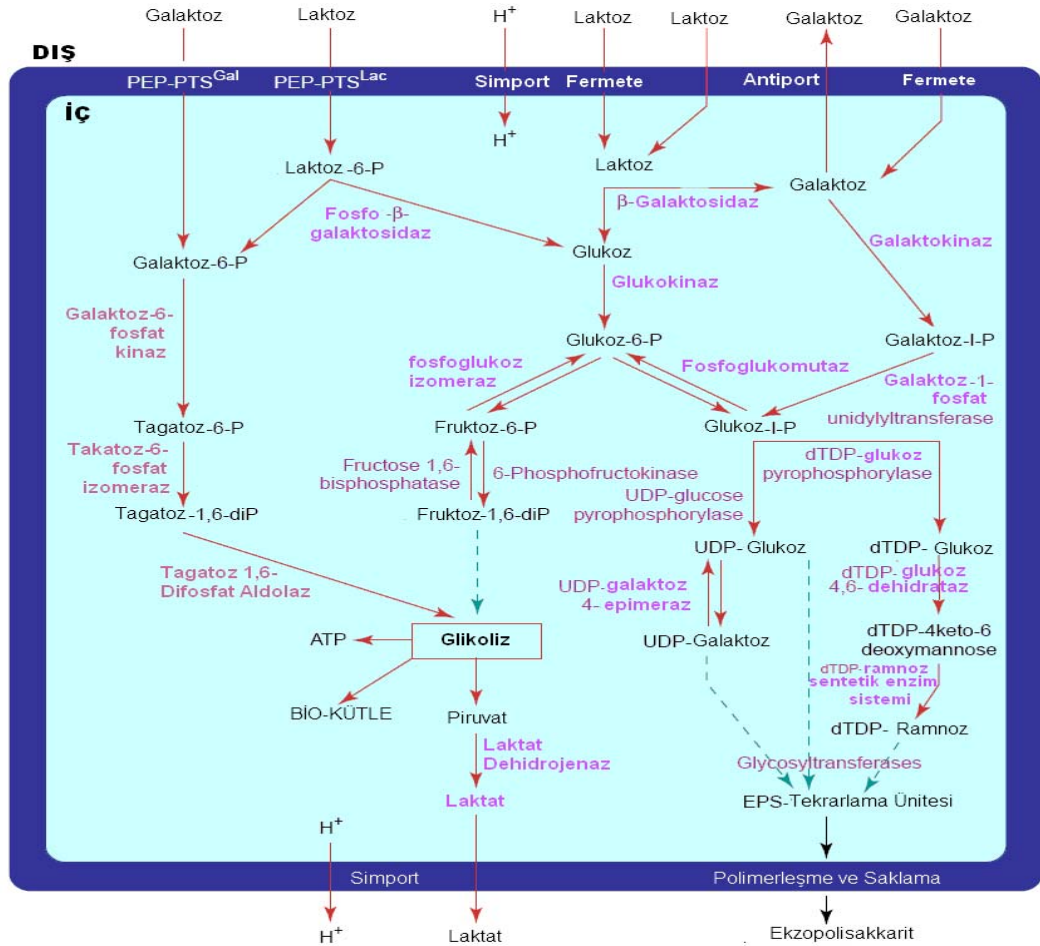
Dekstran, alternan, mutan ve levan gibi çok az sayıdaki homopolisakkaritlerde, özel şeker olarak sakkaroz gerektiren ekstraselüler (hücre dışı) biyosentez prosesi

görülmektedir. Özel glikozil transferaz enzimleri (sırasıyla, dekstran ve levan biyosentezi için dekstran ve levan sukraz enzimleri) polimerizasyon reaksiyonlarında yer alır. Polimerizasyon için gerekli enerji sakarozun hidrolizinden gelmektedir.

Heteropolisakkaritler, sitoplazma içinde tekrarlanan polimerize olmuş öncü madde birimlerinden oluşturulmaktadır. Özellikle EPS oluşumuna özgü olmayan çok sayıda enzim ve/veya protein, heterotip EPS üretimi ve salgılanmasına katılmaktadır. Şeker-1-fosfatlardan elde edilen şeker nükleotidleri, monosakkarit polimerizasyonunda gerekli şeker ara çevrimlerinde (epimerizasyon, dekarboksilasyon, dehidrojenasyon) olduğu gibi şeker aktivasyonundaki rolleriyle heteropolisakkaritlerin biyosentezinde elzem bir role sahiptirler. Şeker aktive edilmesi ve modifikasyon enzimleri birlikte, temel yapıların oluşumunda ve bu sayede son EPS oluşumunda kritik bir rol oynamaktadırlar. Örnek verecek olursak, glukozda gelişen *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 kültürlerinde UDP-glukoz ve UDP-galaktoz biyosentezinde ileri gelen UDP-glukoz pirofosforilaz aktivitesi, fruktozda gelişen kültürlere göre daha yüksektir ve aynı zamanda dTP-ramnoz biyosentezinden ileri gelen hiçbir enzim aktivitesi bulunmaktadır. *S. thermophilus* sünme yapan suşlarında EPS üretimi gözlenirken sünme yapmayan suşlarda gözlenmemesi, UDP-glukoz fosforilaz ile ayrıca ilişkilendirilmiştir (De vuyst ve Deegest 1999).

Dekstran sukraz, dekstran sentezinde anahtar enzim olan, glikozid hidrolaz süperfamiliyasına ait bir glukansukrazdır. Ortalama 160 kDa ağırlığa sahiptir ve salgılanıp hücre duvarına bağlanır. Katalitik mekanizmanın daha iyi anlaşılması adına glukansukraz ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılmaktadır. Bu enzim sakkaroz glikozidik bağının hidrolizini ve aynı aktif taraftaki iki ayrı katalitik tarafa dayanan eklenme mekanizması yoluyla gelişen kovalent bağlı glukoz zincirinin indirgen ucuna glukoz transferini katalizlemektedir. Glikozidik bağ hidrolizi glukoz transfer reaksiyonu için gerekli enerjiyi üretmektedir. Sukroz varlığının teşvikiyle *dsrS* tarafından dekstransukraz kodlanmasını ifade etmektedir (Rehm 2010).

Hiyaluronik asit üretimi polimerizasyonu ve salgılanması için sadece tek bir protein HA sentaz (HasA) gerekmektedir; oysaki, çoğu ekzopolisakkaritin polimerizasyonu ve salgılanması membranı saran multi-protein kompleksi tarafından yapılmaktadır. Bu kompleksle gelişen biyosentetik prosesler iki genel metabolik izyolu olarak alt sınıflara ayrılmaktadır. Birinci metabolik yol için, ksantan biyosentezinde de kullanılan Wzy-bağlı polimerizasyon ve salgılanma mekanizması örnek olarak gösterilmiştir. Bu metabolik yol tekrarlanan oligosakkarit ünitelerinin sitoplazmik membrandan taşınması için taşıyıcı lipitlere dayanmaktadır. İkinci metabolik yolun ise hem Wzy hem de taşıyıcı lipitten bağımsız ve tekrarlanan ünitelerden oluşmayan alginat ve selüloz gibi ekzopolisakkaritlerin üretiminde görüldüğü ileri sürülmektedir (Rehm 2010).



Şekil 2.3 Laktoz, galaktoz ve glukozun EPS'ye çevrimi ve glikolizisi (Welman ve Maddox 2003)

2.3.4 Laktik asit bakterilerinin ürettikleri ve diğer bazı önemli ekzopolisakkaritler

Gıdalarda genel olarak güvenilir kabul edilen (GRAS) laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler son zamanlarda gittikçe önem kazanmaktadır. Bu ekzopolisakkaritler hakkında genel bazı bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

Dekstran: Laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides* ve *Streptococcus mutans* suşları tarafından üretilen dekstranlar suda çözünebilir. Dekstran çözeltileri Newtonian akışkanlar gibi davranırlar ve viskoziteleri konsantrasyon, sıcaklık ve ortalama moleküler ağırlık fonksiyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Doğal dekstranlar polidispers özelliğe sahip olup, moleküler ağırlıkları 10^6 ile 10^9 dalton aralığında değişmektedir. Bu özellik, düşük bağışıklık sağlayıcılığa ilaveten, çok sayıda klinik ve farmakolojik uygulamalara yol açar. Örneğin, dekstranlar kan plazma dolgu maddesi ve kromatografi ortamı olarak kullanılabilir. Düz zincirleri glikoz molekülleri arasında α -1,6 glikozidik bağlantıları içermekte, dallanmalar ise α -1,3 bağlantısından başlamaktadır. Dekstran sakkaroz substrat olarak kullanılarak sentezlenmektedir. Diş plakları dekstranca zengindir. Dekstran, ayrıca *Lactobacillus brevis* tarafından tibicos kristallerinin veya sağlık için yararlı olduğu düşünülen fermente kefir içeceğinin oluşturulmasından sorumludur. Dekstran ilk kez Louis Pasteur tarafından mikrobiyal bir ürün olan şarapta keşfedilmiştir (Rehm 2010).

Levan: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus reuteri* gibi LAB suşları tarafından üretilmektedir. Levansukraz, fruktozdan levanı karakterize eden β -2,6-glikozidik bağlarla D-fruktozil birimlerinin transferini kataliz eder. Levansukraz, laktik asit bakterileri arasında ağız flora suşlarından olan *Streptococcus salivarius* ve *Streptococcus mutans* tarafından üretilmektedir. *S. salivarius* enzimlerinin moleküler ağırlığı 140 kDa'dır. Hücre duvarına bağlı olup, sakkaroz varlığında kısmi olarak kültür ortamına bırakılır (Monsan vd. 2001).

İnülin türleri: *Lactobacillus johnsonii*, *Leuconostoc citreum* ve *Lactobacillus reuteri* LAB suşları tarafından üretilmektedir. β -2,1 glikozidik bağlar içeren

fruktooligosakkaritler sindirilemez ve hem insanlar hem de hayvanlar için ilgi çekici probiyotik özelliklere sahiptir. Fungal fruktoziltransferaz kullanılarak sukrozdan enzimatik sentez ile ya da inulin polimerlerinin hidrolizinin kontrolü yoluyla elde edilmektedir (Monsan 2001).

Alternan: *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1335, NRRL B-1501 ve NRRL B-1498 alternansukraz üreten suşlardır. Bazı α -1,3 dallanma dereceleriyle birlikte çeşitli alfa-1,6 ve α -1,3 glikozidik bağlarını içeren alternansukraz tarafından ekzopolisakkarit alternan üretilmektedir. Bu özgün yapıya bağlı olarak alternan, yüksek çözünürlük, düşük viskozite ve enzimatik hidrolize karşı dikkate değer dayanıklılığa sahiptir. Alternan, gıda ve kozmetikte düşük viskozitesiyle hacim artırıcı olarak ticari amaçla kullanılmaktadır. Hücre dışı alternanaz enzimleri, alternanı oligosakkaritlere depolimerize eder. Şekerlemeler ve probiyotiklerde bu alternan oligosakkaritleri glisemik indeksi düşük tatlandırıcılar olarak kullanılmaktadır (Patel 2011).

Reuteran: *Lactobacillus reuteri* suşları tarafından üretilmektedir. α -1,6 glikozid bağlarının α -1,4 bağlanmasıyla oluşmaktadır. Daha çok fırıncılıkta kullanılmaktadır. Reutaran, sakkarozdan üretilen suda çözünebilir bir glukran çeşididir (Patel 2011).

Alginat: Endüstriyel ve medikal uygulamaları stabilize edici, viskozifiye edici, jelleştirici özellikleri ve su tutma kapasiteleri ile ilgilidir. Alginatlar ticari olarak algler tarafından üretilmesine rağmen *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi alginat üreten bakteriler genetik olarak değiştirilebilir ve talebe özgü olarak yüksek kalitede alginat üretebilme yetenekleri ile büyük umut vaat etmektedir (Rehm 2010).

Ksantan: *Xanthomonas campestris*'in tüm suşları tarafından sentezlenen polisakkaritler bakteriyel ekzopolisakkaritler arasında en çok çalışılan polisakkarittir. Asıl ticari ürün, açılmış modellerle değişen çeşitleriyle birlikte, sırasıyla, terminal β -bağlı mannosil yan zincir birimleri ve internal α -bağlı birimler üzerindeki pruvat ketaller olup, O-asetil gruplarının rolünün incelenmesi için mükemmel modeller sağlamaktadırlar (Sutherland 1997).

2.3.5 Ekzopolisakkaritlerin kullanıldığı alanlar

Mikrobiyal polisakkaritler, endüstriyel taleplere uygun reolojik özelliklere sahiptir ve yüksek miktarlarda yüksek saflıkta üretilmektedir. 1940 yılından beri dekstran ve levan çok sayıda farmasötik ve gıda uygulamasında yer almaktadır. Fruktoz-oligosakkaritler (FOS) sakkaroza oranla glisemik indeksinin daha düşük olması, özellikle kalorisiz ve karsinojenik olmaması nedeniyle gıda uygulamaları için ilgi çekici özelliklere sahiptir. FOS ve inülinin gıda uygulamaları, prebiyotik özelliklerine dayanmaktadır (Tieking ve Gänzle 2005).

Yapılarındaki çeşitlilik ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle mikrobiyal gıdalar, gıda, farmasötik ve diğer endüstri uygulama alanlarında kalınlaştırıcı, stabilize edici, emülsüfiye edici, tekstür ve jelleşme ajanı olarak geniş bir uygulama alanına sahiptir (Demirci ve Arıcı 2008).

Günümüzde birçok fermente süt ürününün üretiminde kullanılan laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit ürettikleri bilinmektedir. Ekzopolisakkaritler; viskoziteyi artırıcı, yapıyı düzenleyici, su bağlayıcı, stabilize edici ve emülsifiye edici özelliklerinden dolayı süt ürünlerinin yapısını olumlu şekilde etkilemektedir. Bu nedenle, başta yoğurt olmak üzere pek çok çeşit fermente süt ürününde ve düşük yağlı peynirlerde arzu edilen yapının oluşması için ekzopolisakkarit üreten suşlardan yararlanılmaktadır (Milci ve Yaygın 2005).

Yoğurtlarda istenen tekstür ve tat hissini oluşturmak için süt tozu ve peynir tozu ilavesi ekstra ürün maliyetine yol açarken, diğer bir alternatif de bitki, hayvan veya mikrobiyal kaynaklı polisakkaritlerin ilavesidir. Polisakkaritler viskoziteyi artırır, tekstürü güçlendirir, sinerisise yatkınlığı azaltırken az yağlı ürünlerin tat hissini desteklemektedir (Leroy ve De Vuyst 2004).

Dekstranlar glikosid bağlarının farklı tipi ve oranları ile, D-glukopiranosil birimlerinden oluşan mikrobiyal gumlardır. Genellikle, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Leuconostoc dextranum* glikoz fermantasyonuyla dekstran biyosentezinden sorumlu olan

mikroorganizmalardır. Sıvı solüsyon veya dispersiyon şeklinde uygulanan dekstran kaplamaların soyulmamış karides, soyulmuş karides, balık ve jambon, sosis ve pastırma gibi kırmızı et ürünlerinin buzdolabında veya dondurarak depolanmaları sırasında flavorunu, rengini ve tazeliğini korumak, su kaybını önlemek, iyon ve vitamin gibi kararma tepkimelerini durdurucu ürünlerin tutulmasını sağlamak gibi faydaları bulunmaktadır (Dursun ve Erkan 2009).

Bakteriyel selüloz gıda sanayiinde, özellikle düşük kalorili tatlı, cips ve şekerlemelerin üretiminde; dolgunluk verici olarak tatlı, dondurma ve salata soslarının bileşiminde; ayrıca, sosis ve etlerin kaplanmasında güvenilir ve geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Bitkisel selüloz ve bakteriyel selülozun kimyasal olarak aynı yapıda olmalarına rağmen, bakteriyel selülozun serum lipitleri ve kolesterol düşürme etkisinin bitkisel selülozdan daha yüksek olduğu da vurgulanmaktadır (Akoğlu vd 2010).

2.3.6 Ekzopolisakkarit üretimini etkileyen faktörler

Bakteriler tarafından üretilen EPS'lerin teknolojik olarak olumsuz tarafı düşük miktarlarda üretilmesidir. EPS üretimini etkileyen faktörlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda EPS üretimini artırmak amacıyla EPS üretimini etkileyen faktörler değiştirilerek optimize edilmesi amaçlanmıştır. EPS üretimi bakteri suşuna bağlı olduğu kadar gelişim koşullarından da etkilenmektedir. EPS üretimi üzerine etki eden en önemli faktörler inkübasyon sıcaklığı ve süresidir. Ortam pH'sı, mineral maddelerinin (fosfatlar, CaCl₂, MnSO₄) çeşit ve miktarı, oksijen, karıştırma hızı, karbonhidrat kaynağı, azot kaynağı, C/N oranı ve bazı bileşenler (tuzlar, vitaminler) ise diğer etkili faktörlerdir (Gamar vd. 1998, Gorret vd. 2001, Duboc ve Mollet 2001, Deegest 2002, Hoa vd. 2003, Aslım vd. 2005a, Velasco vd. 2006, Yılmaz 2006, Wu vd. 2008, Kuntiya vd. 2010).

Wu vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, % 2.5 yeast extract içeren besiyeri bileşimine fruktoz, galaktoz, glikoz, laktoz ve sakkaroz gibi karbon kaynakları farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek *Pleurotus citrinopileatus* üzerinden EPS üretimini

artırmak amaçlanmıştır. Monosakkaritler (fruktoz, galaktoz ve glikoz) ve disakkaritler (laktoz ve sakkaroz) olmak üzere farklı karbon kaynaklarının hücre kütlesi ve EPS üretimine etkisi incelenmiş olup, monosakkaritlerin disakkaritlerden daha yüksek hücre oluşum verimi sağladığı belirtilmiştir. Bu denemelerin sonucunda, en yüksek biyokütle ve EPS verimi fruktoz besiyeri ile elde edilmiştir. Fruktozun optimum konsantrasyonu % 4 olduğunda en yüksek biyokütle % 45.25±2.00 ve EPS 1.87 g L⁻¹ olarak belirtilmiştir. Karbon kaynaklarının yüksek EPS verimi için optimum konsantrasyonları, sırasıyla, % 4 fruktoz, % 5 galaktoz , % 4 glikoz, % 5 laktoz ve % 2 sakkaroz şeklindedir. EPS kompozisyonunun ise bakteri suşuna ve karbon kaynaklarına göre değiştiği belirtilmiştir. Aynı zamanda, karbon kaynağının konsantrasyonu da EPS içeriğinde etkili bulunmuştur.

Ayrıca; antitümör aktivitesine sahip, suda çözünebilen bir EPS çeşidinin mannoz, glukoz, arabinoz ve galaktozdan oluştuğu ve mannoz oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fruktoz içeriğinin % 3-4 arasında tutulduğu besiyerinden elde edilen EPS'nin kimyasal kompozisyonundaki mannoz içeriğinin en yüksek değerlere ulaştığı belirtilmiştir. Yine farklı azot kaynaklarının denenmesi amacıyla % 4 fruktoz, % 0.1 yeast extract, % 0.02 KH₂PO₄, % 0.04 K₂HPO₄, % 0.01 MGSO₄.7H₂O içeren temel besiyerine yeast pepton, keramine HD, hidrolize sebze proteini, bacto pepton, NaNO₃ ve (NH₄)₂SO₄ ilave edilmiştir. Yüksek biyokütle ve EPS üretimi için azot kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla organik ve inorganik azot kaynakları denenmiş, bunlar arasında en yüksek verimin yeast pepton içeren besiyerinde sağlandığı belirtilmiştir. Organik azot kaynaklarından (yeast pepton, keramine HD, hidrolize sebze proteini, bacto pepton), inorganik azot kaynaklarına (NaNO₃, (NH₄)₂SO₄) kıyasla daha yüksek verim alındığı belirtilmiştir. En yüksek EPS verimi karbon kaynağı % 4 fruktoz olan besiyerinde, azot kaynağı olarak % 2.5 yeast pepton seçildiğinde, 1.87±0.05 g L⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, en yüksek EPS veriminin alındığı bu değerlerde mannoz oranının en yüksek olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeninin ise, organik azotların sentez için gerekli esansiyel aminoasitler içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı azot kaynaklarının da EPS karbonhidrat kompozisyonunu değiştirdiği belirtilmiştir (Wu vd. 2008).

Yapılan bir çalışmada, atık su arıtımında kullanılan aktif çamur prosesindeki çamur özelliklerini EPS üretiminin kontrolüyle geliştirmek için besin oranlarının optimize edilmesi amaçlanmıştır. Azot ve fosfor kombinasyonlarının EPS üretimine ve aktif çamur özelliklerine etkisi incelenmiş olup, kimyasal oksijen gereksinimini(COD) biyolojik oksijen gereksinimi (BOD) yardımıyla azaltmak amaçlanmıştır. Aktif çamurun özellikleri üzerinde, EPS karbonhidrat ve protein bileşenlerinin daha çok etkili olduğu görülmüştür. Her iki EPS bileşeninden protein bileşeninin aktif çamur özelliklerinde daha etkili olduğu bildirilmiştir. Besiyerindeki azot ilavesinin, hem EPS protein hem de karbonhidrat bileşeninde etkili olurken, fosfor ilavesinin sadece karbonhidrat bileşeninde etkili olduğu belirtilmiştir. Azot eksikliği veya fazlalığının da aktif çamur özelliklerini değiştirdiği bildirilmiştir. EPS karbonhidrat içeriğinde, azot ve fosfor ters orantılı iken, fosforun azota oranla daha etkili olduğu ileri sürülmüştür. Protein ve karbonhidrat içeriği EPS içeriği ile doğru orantılı olarak bulunmuştur (Hoa vd. 2003).

Yapılan bir araştırmada karbon ve nitrojen kaynaklarının *Hahella chejuensis* bakterisinin EPS üretiminde etkisi incelenmiş olup, bu EPS çeşidi EPS-R olarak isimlendirilmiştir. Karbon kaynakları % 2 olacak şekilde glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, sakkaroz ve nişasta olarak kullanılmış; en yüksek EPS-R üretimi (yaklaşık 8.5 g/L) sakkaroz karbon kaynağı olarak seçildiğinde gerçekleşmiştir. En düşük EPS-R üretimi ise laktoz karbon kaynağı seçildiğinde gerçekleşmiştir. Azot kaynakları olarak her biri % 0.5 olacak şekilde pepton, yeast extract, malt extract, tripton, soytone, kazein, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ denenmiştir. En yüksek EPS-R üretimi (yaklaşık 8 g/L) azot kaynağı olarak tripton seçildiğinde görülmüştür. Triptonu takip eden en yüksek EPS-R üretimleri, sırasıyla, pepton, yeast extract, soytone, kazein ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ olacak şekilde belirlenmiştir. En düşük EPS-R üretimi ise azot kaynağı NH_4Cl seçildiğinde tespit edilmiştir. EPS verimliliği, inorganik azot kaynaklarına oranla organik azot kaynaklarında daha yüksek bulunmuştur. Sakkaroz miktarı % 2 olacak şekilde çeşitli karbon azot oranları denenmiş, optimum C/N(sakkaroz /tripton) oranı 2:1 olarak bulunduğu bildirilmiştir. C/N 3:1 oranından yüksek olduğunda verim (P/S) ve verimlilik (EPS/biyokütle) azalmış olup C/N 10:1 oranından yüksek olduğunda ise verim ve verimliliğin şiddetli bir şekilde düştüğü belirtilmiştir. Farklı çalışmalarla

birlikte değerlendirildiğinde, EPS üretimi için en iyi karbon kaynağı, azot kaynağı ve C/N oranı gibi değerlerin mikrobiyal tür ve EPS çeşidine bağlı olarak değiştiği ileri sürülmüştür. NaCl'ün EPS üretimine etkisini incelemek amacıyla, % 0-20(w/v) konsantrasyonlar denenmiş olup en yüksek EPS-R verimi (9 g/L) tuz oranı % 1 olduğunda bulunmuştur. MgSO₄ % 0.5, CaCl₂ ise % 0.01 ilave edildiğinde en yüksek EPS-R miktarının elde edildiği bildirilmiştir. Fosfat ilavesi ile EPS-R miktarının arttığı gözlenmiş olup, 0.1 ile 50 mM arasında çeşitli fosfat konsantrasyonlarında hemen hemen benzer sonuçlar görülürken, en yüksek verimlilik 1mM fosfat eklendiğinde ölçülmüştür. NaCl, MgSO₄ ve CaCl₂'ün optimum değerlerin üzerindeki ilavelerinin EPS-R miktarını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Yüksek EPS-R verimliliği pH 6.0 ile 8.0 arasında özellikle pH 7.0 (9.19 g/L) de elde edilirken EPS-R veriminin pH 5.0' in altında ve pH 9.0'un üzerinde düştüğü belirtilmiştir. EPS-R için en yüksek verimlilik 20-25 °C'de tespit edilirken, 30°C üzeri sıcaklıklarda EPS-R veriminin düştüğü belirtilmiştir (Ko vd. 2000).

Gorret vd. (2001), yüzey tepki yöntemi kullanarak süt mikrofiltratı üzerinde sıcaklık, pH ve maya ekstraktının (YE) *Propionibacterium acidi-propionici*'nin gelişimi ve EPS üretimine etkileri üzerine çalışmışlardır. Bütün pH değerlerinde organik asit üretimi ve biyokütle oluşumu gözlenirken, EPS üretiminin sadece pH 5.3-6.5 arasında mümkün olduğu belirtmiştir. Bu sonuçlar ışığında, EPS üretimi ve optimum büyüme için farklı optimum koşulların gerektiği bildirilmiştir. YE'nin mikroorganizma gelişimini artırıcı etkisinin yanında EPS üretimine de direk bir etkisi olduğu bildirilmiştir. EPS üretiminde sıcaklık önemli bir rol oynamakta olup, sıcaklıktaki düşüşün hem organik asit üretimini hem de gelişimi yavaşlatırken, EPS biyosentezindeki öncü maddelerin ve besiyeri için esansiyel faktörlerin oluşumunu sağladığı ve bu sayede EPS üretiminde artışa yol açtığı belirtilmiştir. En yüksek EPS üretimi için optimum değerler; sıcaklık 23°C, pH 6.0 ve YE konsantrasyonu 3 g/L olarak bildirilmiştir.

Bacillus suşlarının LB (Luria Bertani) sıvı besiyerinde EPS üretimleri ile ilgili yapılan bir çalışmada farklı inkübasyon sürelerinin, farklı karbon kaynaklarının, farklı fruktoz konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. 8 suş arasından 48 saatlik inkübasyon sonucu en yüksek EPS üretiminin *B.sphaericus* 7055 (67 mg/L) ve *B.subtilus* 1404 (66 mg/L)

suşları tarafından gerçekleştirildiği, en düşük EPS üretiminin ise *B.subtilis* ve *B.megaterium* RSKK 17 suşlarında 6 mg/L olarak belirlendiği rapor edilmiştir. En yüksek EPS üretimi görülen iki suş olan *B.sphaericus* 7055 ve *B.subtilis* 1404' ün 24, 48, 72 saatlik farklı inkübasyon süreleri sonunda EPS üretimleri incelenmiştir. Her iki suşun da en yüksek EPS üretiminin 48. saatte (sırasıyla, 67 ve 66 mg/L), en düşük EPS üretiminin ise 72. saatte (sırasıyla, 22 ve 14 mg/L) gerçekleştirdikleri bildirilmiştir. Yine en yüksek EPS üretimine sahip *B.sphaericus* 7055 ve *B.subtilis* 1404 suşları %1 oranında farklı karbon kaynakları (glikoz, sakkaroz, fruktoz ve maltoz) içeren besiyerlerinde geliştirilmiş, en yüksek EPS üretiminin 48. saatte fruktozda (sırasıyla, 1038 ve 884 mg/L) gerçekleştiği bildirilmiştir. *B.sphaericus* 7055 ve *B.subtilis* 1404 suşları fruktoz karbon kaynağının farklı konsantrasyonlarında (% 0.1, %0.5, %1, %1.5, % 2, % 2.5 ve % 3) geliştirildiğinde, en yüksek EPS üretimlerinin % 2.5' luk fruktoz konsantrasyonunda (sırasıyla, 1170 mg/L ve 1133 mg/L) gerçekleştiği rapor edilmiştir (Yılmaz 2006).

Kuntiya vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada *Lactobacillus confusus* CMU 198 suşu için fermantasyon besiyeri geliştirmek amacıyla, azaltma ve tek tek ilave metodu olmak üzere iki metot denenmiştir. Öncelikle azaltma tekniği kullanılarak maliyeti yüksek üç MRS bileşeni pepton, yeast extract ve beef extract giderek azalan konsantrasyonlarda denenmiştir. En yüksek EPS konsantrasyonu (12.05 g/L) pepton 5.0 g/L, yeast extract 2.5 g/L ve beef extract 2.5 g/L ilave edilmiş modifiye MRS besiyerinde bulunmuştur. En yüksek biyokütle konsantrasyonu (2.16 g/L) pepton 7.5 g/L, yeast extract 3.75 g/L ve beef extract 3.75 g/L ilave edilmiş modifiye MRS besiyerinde bulunmuştur. EPS üretimini, yetersiz veya fazla azot konsantrasyonunun olumsuz yönde etkilediği, düşük azot konsantrasyonlarının EPS üretimi için daha uygun olduğu öne sürülmüştür. Bunlara ek olarak, yüksek EPS üretimi için optimum C:N oranı gerektiği rapor edilmiştir. Azot kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla modifiye MRS besiyerine tek tek ekleme metodu kullanılarak (pepton, yeast extract ve beef extract) farklı konsantrasyonlarda denenmiş, yüksek EPS üretimi için gerekli optimum pepton, yeast extract ve beef extract konsantrasyonları, sırasıyla, 7.5 g/L, 3.0 g/L ve 5.0 g/L olarak belirlenmiştir. Elde edilen optimum konsantrasyonlarla hazırlanan modifiye besiyerinde EPS üretim miktarının 7.95 mg/L olarak tespit edildiği belirtilmiştir. Yeast extract ve

beef extract eksikliğinde gelişmede zayıflama ve EPS üretiminde düşme gözlemlenmiştir.

Genel olarak, hücreler tarafından protein, nukleik asitler ve hücre duvarı polimerleri oluşturmak için gerekli azot ve proteinazın eksikliği sonucu yetersiz proteolitik aktivite nedeniyle peptid veya amino asitler açısından eksiklik olduğu ve bu durumun gelişimi durdurucu sonuçlar gösterdiği ileri sürülmüştür. Azaltma metoduyla elde edilen EPS miktarının (12.05 mg/L) daha yüksek olduğu belirtilmiştir. *Lb. confusus* CMU 198 ile en yüksek EPS konsantrasyonu (12.95 g/L) pH 5.5'de, 24 saat sürede, optimum fermantasyon koşullarında elde edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonununda en yüksek biyokütle konsantrasyonu pH 6.0'dan (3.71 g/L) çok da farklı olmayarak pH 5.5' de (3.58 g/L) bulunmuştur. 35°C'de pH 5.5' de 30 saat inkübasyon sonunda başlangıç toplam şeker konsantrasyonları sırasıyla, 40, 60, 80, 100 ve 120 g/L olan besiyerleri hazırlanılmıştır (Kuntiya vd. 2010).

EPS üretimi, şeker konsantrasyonu 40-100 g/L aralığında olduğunda artış gösterirken 120 g/L şeker konsantrasyonundan olumsuz etkilenmiştir. En yüksek EPS konsantrasyonu (38.17 g/L), başlangıç şeker konsantrasyonu 100 g/L iken, en yüksek biyokütle konsantrasyonu (4.41 g/L) başlangıç şeker konsantrasyonu 80 g/L iken bulunmuş olup, bütün şeker konsantrasyonlarının (120 g/L hariç) 30 saat sonunda tükendiği belirtilmiştir. EPS üretimi için optimum sıcaklığı bulmak amacıyla 20°, 30°, 35° ve 40°C sıcaklıklarda inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir (Kuntiya vd. 2010).

Başlangıç şeker konsantrasyonu 100 g/L, pH 5.5' da 30 saat inkübasyon sonunda en yüksek EPS konsantrasyonu (53.40 g/L) 20°C' de tespit edilmiştir. 20°C'de gerçekleşen en yüksek EPS üretimi (30 saat), 30°C ve 35°C'de (sırasıyla, 12 ve 24 saat) için gerekli süreden daha uzun sürdüğü, 40°C sıcaklıkta ise EPS üretimi olmadan sadece hücre gelişimi gerçekleştiği belirtilmiştir. 20°C'de 0-30 saatleri arasında kalıntı şeker ve organik asitlerin HPLC kullanılarak incelenmesi sonucu, en hızlı olarak glikozun tüketildiği (12 saat), glikoz ve sakkaroz tükenirken organik asitlerin miktarının arttığı rapor edilmiştir (Kuntiya vd. 2010).

Nichols vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, *Pseudomonas* sp. CAM025 suşunun EPS veriminin -2°C ve 10°C' de, 20°C' ye göre 30 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. EPS içeriğindeki mannoz ve glikoz yüzdesinin -2°C inkübasyonda 10°C ve 20°C inkübasyon sıcaklıklarındakine göre daha yüksek, galaktoz ve ramnoz yüzdesi düşük bulunmuştur.

Kimmel vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR suşunun sıcaklık (35, 38, 40, 45 °C) , pH (4, 5, 6) ve bacto-casitone (10, 20, 30, 40 g/L) değerlerinde ürettiği EPS miktarları belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimi (295 mg/L) sıcaklık 38°C, pH 5.0 ve bacto-casitone 30 g/L olduğunda bulunmuştur.

Gassem vd. (1997), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR ile sürekli fermentörde, fermentasyon substratı olarak proteini uzaklaştırılmış laktoz, kazamino asit ve amonyum klorid eklenmiş peynir altı suyu besiyeri kullanılarak pH, dilüsyon oranı ve besin değerine bağlı olarak EPS üretimini incelenmişlerdir. Dilüsyon oranı arttıkça EPS üretimi artmış olup; pH 6.5 dilüsyon oranı 0.055 h⁻¹ olduğunda en yüksek EPS konsantrasyonu (2.13 g/L) elde edilmiştir. 0.028 h⁻¹ dilüsyon oranında laktozdan yararlanma oranı % 58-76 arasında değişirken, 0.055 h⁻¹ dilüsyon oranında laktozdan yararlanma oranı % 23-65 arasında bulunmuştur. Besiyeri pH'sının düşüşüne paralel olarak fermentör verimliliği ve EPS konsantrasyonunda azalma tespit edilmiştir. pH 6.5'da fermentör verimliliği 0.073- 0.11 g EPS/L.saat iken, pH 5.2'de verimlilik 0.03-0.06 g EPS/L.saat olarak aralığında bulunmuştur. pH 6.5'da EPS konsantrasyonu 1.55-2.13 g/L aralığında değişirken pH 5.2'de EPS konsantrasyonu 0.6-1.06 g/L aralığında bulunmuştur. Kazamino asit (4.0 g/L) ve amonyum klorid (0.25 g/L) ilavesinin EPS üretim miktarını artırdığı bildirilmiştir.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) suşları ile, sırasıyla MRS ve M17 besiyerlerinde EPS üretimi için pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.2, 7.0), sıcaklık (30, 37, 42, 45°C), inkübasyon süreleri (5, 8, 10, 12, 32 ve 48 saat), farklı karbon kaynakları (sakkaroz, fruktoz, laktoz, glikoz) ve glikoz konsantrasyonları (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 g/L) incelenmiştir. Farklı karbon kaynakları

arasından en yüksek EPS üretiminin glikoz içeren besiyerlerinde görüldüğü bildirilmiştir. Tüm suşlar için en yüksek EPS üretiminin optimum sıcaklık, inkübasyon süresi, pH'sı sırasıyla 45°C, 18 saat, pH 6.2 veya pH 6.8 ve glikoz konsantrasyonu 30 g/L olarak bulunmuştur. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* için en yüksek EPS sırasıyla, 263, 238 ve 117 mg/L olarak 45°C'de inkübasyon sıcaklığında bulunmuştur. B3, G12 ve W22 suşlarının, 18 saatlik inkübasyon sonunda EPS üretimleri sırasıyla 220, 152 ve 120 mg/L olarak tespit edilmiştir. En yüksek EPS üretimi *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları için pH 6.2'de (B3: 211 mg/L, G12: 175 mg/L) belirlenmişken, *Streptococcus thermophilus* suşu için de pH 6.8'de (114 mg/L) bulunmuştur. Glikoz konsantrasyonu 30 g/L iken EPS üretimlerinin B3, W22 ve G12 bakteri suşları için, sırasıyla, 255, 224 ve 174 mg/L olarak bulunduğu belirtilmiştir (Aslım vd. 2005a,b).

Zhang vd. (2011) tarafından skim milk besiyerinde geliştirilen *Lactobacillus fermentum* F6 bakterisinin gelişimi ve EPS üretimi ile ilgili yapılan çalışmada, yüksek pH değerlerinde (6.0, 6.5, 7.0) daha yüksek miktarlarda EPS üretimi gerçekleşirken en yüksek EPS üretimi (14.61 mg/L, 32 saat) pH 6.5'da tespit edilmiştir. En yüksek EPS üretim miktarları pH 5.0, 5.5, 6.0 ve 7.0 için, sırasıyla 5.86 mg/L (40 saat), 7.86 mg/L (40 saat), 10.11 mg/L(32 saat) ve 8.32 mg/L(32 saat) olacak şekilde bulunmuş olup, hem bakteri gelişiminde hem de EPS üretiminde asidik koşulların kuvvetli bir şekilde etkili olduğunu ileri sürülmüştür. 42°C'de logaritmik ve durgun fazda biyokütle gelişimi diğer sıcaklıklara göre daha düşük bulunmuş olup; optimum gelişme 37°C' de gerçekleşirken en iyi asit oluşturma kapasitesi ve en yüksek EPS üretimleri ise 25, 30, 37 ve 42°C sıcaklıklarında sırasıyla, 8.18, 8.86, 14.75 ve 12.90 mg/L olarak belirtilmiştir. 37°C'de, pH 6.5'da, skim milk besiyerine % 2 (w/v) glikoz, fruktoz, galaktoz ve laktoz eklenerek 48 saat gelişimin sonunda en iyi karbon kaynağı olarak glikoz (33.05 mg/L) bulunmuştur. Elde edilen verilere göre, tüm optimum koşullar ayarlandığında, EPS veriminin (44.49 mg/L) kontrol değerinden (15.11 mg/L) oldukça yüksek bulunduğu belirtilmiştir.

Lactobacillus helveticus BCRC14030, *L.helveticus* BCR14076 ve *Streptococcus thermophilus* BCRC14085 sünme yapan suşlarının, farklı fermantasyon sürelerinin EPS

üretimine, moleküler ağırlık ve sünme oranına etkisini belirlemek için skim milk besiyerinde pH 5, 37°C'de 0-84 saat süreyle inkübe edildikleri belirtilmiştir. En yüksek EPS verimi 0.73 g/L ile 60 saat fermantasyon süresinde, 26.500 kDa moleküler ağırlığında, 21.0 mm sünme değerinde *L. helveticus* BCRC14030 suşu ile elde edilmiştir. Moleküler ağırlıktaki artış ile sünme oranının da arttığı belirtilmiştir (Lin ve Chien 2007).

Desai vd. (2006), *Lactobacillus plantarum* suşunun EPS üretiminde fermantasyon besiyerinin optimizasyonu için Plackett-Burman (PB) dizayn metodu, yapay sinir ağı (ANN) ve genetik algoritma (GA) içeren karma bir metottan yararlanılarak besiyeri komponentlerinden hangilerinin EPS verimini arttırdığını incelemişlerdir. Beş farklı besiyeri bileşeninden laktoz, kazein ve triamonyum sitrat EPS verimini artırmada etkili bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda belirlenen besiyeri bileşenlerine göre verimin 7.01 g/L olarak hesaplandığı bildirilmiştir. ANN modelleme verilerine göre besiyerinde bulunması gereken optimize miktarlar; laktoz 25 g/L, triamonyum sitrat 0.2 g/L olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, GA-optimize çözümüyle yapılan denemede EPS veriminin 7.14 g/L olarak bulunduğu bildirilmiştir.

Velasco vd. (2006), *Pediococcus parvulus* 2.6 mikroorganizmasını etkileyen çevresel faktörlerle ilgili yaptıkları çalışmada en yüksek EPS üretimi ve biyokütle verimi pH 5.2' de bulmuştur. Çok sayıda bileşenin EPS oluşumu ve mikrobiyal büyüme oranına etkisi incelemiş, bunlardan glikozun 75 g/L, ethanolün % 4.9 (w/v) ve gliserolün % 6.6 (w/v) değerlerine kadar EPS üretiminde pozitif etkili oldukları tespit etmiştir. EPS üretiminin hücresel gelişimle bağlı bulunmadığı, durgun fazda glikoz varlığında da EPS üretiminin devam etmekte olduğu belirtilmiştir. *P. parvulus* 2.6 gelişiminin 58.9 ±18.1 g/L laktat varlığında tamamen inhibe olduğu belirtilmiştir. Temel fermantasyon ürünü olan laktatın, manganezi çelatlaştırmasıyla büyümede etkili olduğu düşünülmektedir. Bir seviyeye kadar glikoz konsantrasyonu arttıkça EPS üretimi artarken bir seviyeden sonra yüksek osmolarite sonucu EPS üretiminin durduğu ileri sürülmüştür. Bu düşüncenin doğruluğunu test etmek için farklı NaCl konsantrasyonları denenmiştir. Glikoz ile aynı NaCl konsantrasyonları artışında oluşan osmolarite sonucu hücre mikrobiyal gelişim oranında ve EPS veriminde gerçekleşen düşme aynı bulunmuştur. Fakat EPS

kompozisyonunun değişiminde NaCl'ün glikoz gibi etkili olmadığı belirtilmiştir. EPS oluşumunun stres tepkisi olmadığı ileri sürülmüştür.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri Kùltürleri

Bu alışmada, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakùltesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kùltür Koleksiyonu'nda bulunan, bu çalışmadan önceki araştırmalarda izole edilen 154 adet bakteriden sünme özelliklerine bakılarak uygulanarak seçilen 10 adet laktik asit bakterisi suşu (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus namurensis*, *Pediococcus ethanolidurans*) kullanılmıştır (izelge 3.1).

Biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlamaları gerçekleştirilmiş kùltürler, % 30 (v/v) gliserin bulunan “kriyo” tüpleri içinde -65°C'de muhafaza edilmişlerdir. Denemelerde kullanılan suşların gelişimleri iin MRS sıvı besiyeri kullanılmış olup, 30°C'de 48 saat süreyle Binder (USA) marka inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

izelge 3.1 alışmada kullanılan bakteri kùltürleri

Örnek no	Laktik asit bakterileri
E1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E3	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>
E4	<i>Lactobacillus namurensis</i>
E5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E6	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E9	<i>Lactobacillus plantarum</i>
E10	<i>Lactobacillus plantarum</i>

3.1.2 Besiyeri

Bakterilerin geliştirilmeleri ve EPS üretim miktarlarının belirlenmesinde standart besiyeri olarak de Man Rogasa Sharp (MRS) sıvı besiyeri (Merck) kullanılmış olup, bileşimi g/L olarak aşağıda verilmiştir. Bacto pepton (10.0); Meat extract (8.0); Yeast Extract (4.0); D(+) Glucose (20.0); di-potassium hydrogen phosphate (2.0); Tween-80 (1.0); di-ammonium hydrogen citrate (2.0); Sodium acetate (5.0); Magnesium sulfate (0.2); Manganese sulfate (0.04). Besiyerinin pH'sı 5.8 olarak ayarlanmıştır.

3.2 Yöntem.

3.2.1 EPS izolasyonu

Bakteri kültürünün ürettiği EPS miktarlarının belirlenmesi amacıyla çöktürme işlemi uygulanmıştır. 10 mL MRS besiyerinde geliştirilen kültürler 1 mL % 80 (v/v) triklorasetik asit (TCA) ilave edilip karıştırılmıştır. Karıştırılan kültürler 10 dakika -18°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Örnekler, bakteri hücreleri ve proteinlerin çöktürülmesi amacıyla 20 dakika süre ile 5000 devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen 10 mL hacimli örneklerden 5 ml süpernatant alınmıştır. Daha sonra 5 mL alınan süpernatant üzerine 10 mL % 95 (v/v) soğuk etil alkol ilave edilmiştir. Etil alkol ilave edilen süpernatantlar karıştırılıp, daha sonra 30 dakika -18°C sıcaklıkta bekletilmiştir (Yüksekdağ ve Aslım 2008).

Ekzopolisakkaritlerin çöktürülmesi amacıyla, 5000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş, santrifüj sonrasında peletler 5 dakika süre ile süzülmüştür. Süzülen peletler 5 mL etil alkol ile tekrar santrifüj edilerek yıkanmıştır. Alkolü iyice uçurularak arındırılan peletler yapılacak diğer analizler için -18°C'de muhafaza edilmişlerdir(Yüksekdağ ve Aslım 2008).

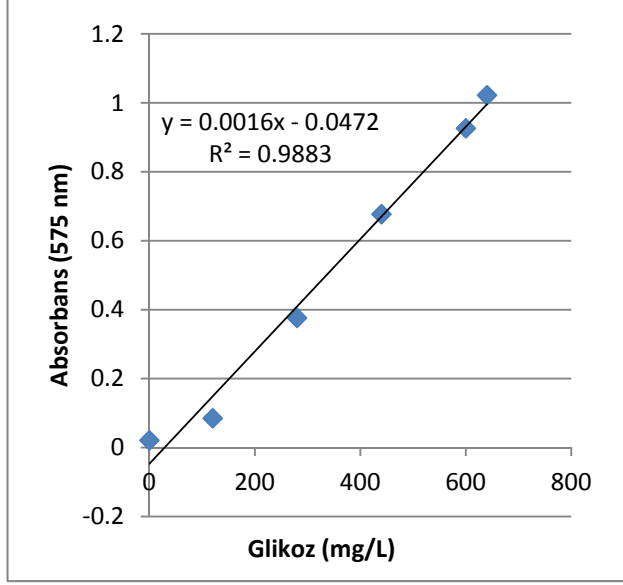
3.2.2 İzole edilen EPS'lerde toplam şeker analizi

Sıvı besiyerlerinden çöktürülen ve izole edilen EPS'lerde bulunan toplam şeker içeriğini belirlemek amacıyla değiştirilmiş Miller Yöntemi'nden yararlanılmıştır (Forouchi ve Gunn 1983). Toplam şeker tayini, DNS (3,5-Dinitrosalisilik asit) kullanılarak, glikoz eşdeğeri indirgen şeker olarak, spektrofotometrede (SHIMADZU UV-1280 dijital) belirlenmiştir.

Hidrolizasyon işlemi için 1 mL örnek üzerine 2 mL 2N HCl eklenerek kaynar su banyosunda 2 saat tutulmuştur. Hidrolize olan örnekler soğutulduktan sonra 2 mL 2N NaOH ilave edilerek nötralize edilmiştir.

Hidrolizasyon işleminden sonra, örnekler yeterli oranda seyreltilmiş, bu seyreltilmiş örnekten 1 mL alınıp üzerine 2 mL DNS çözeltisi (% 1 DNS, % 1 NaOH, % 0,16 fenol) ilave edilip karıştırılmıştır. Kaynar su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra, oluşan sarı-kahve rengin stabilizasyonu için hızlıca soğutulan örnekler üzerine 1 mL Rachele tuzu çözeltisi (% 40 sodyum-potasyum tartarat) eklenip tekrar karıştırılmıştır. Spektrofotometrede 575 nm dalga boyunda tanığa karşı absorbans değerleri okunmuştur.

Aynı şartlarda, 0-640 mg/L aralığında hazırlanmış seri glikoz çözeltileri yardımıyla standart eğri çizilerek örneklerdeki toplam şeker içeriği hesaplanmıştır. Belirlenen EPS miktarları (mg/L) şekil ve çizelgelerde glikoz eşdeğeri cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.1 Glikoz standardı eğrisi

3.2.3 EPS üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi

3.2.3.1 Farklı inkübasyon sürelerinin EPS üretimine etkisi

Laktik asit bakterilerinde, farklı inkübasyon sürelerinin EPS üretimine etkisini belirlemek amacıyla 48, 72 ve 120 saatlik inkübasyon süreleri denenmiştir. Bunun için, 30°C’de 48 saat MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilen kültürlerden, 10 mL MRS sıvı besiyerine % 1 oranında aşılansak her bir tüp belirtilen sürelerde 30°C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda sıvı besiyerindeki EPS, etil alkol (% 96) ile çöktürülmüş ve elde edilen EPS çöktürülmesinin şekeri içeriği DNS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bakteriler tarafından üretilen EPS miktarı mg/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.3.2 Farklı sıcaklık değerlerinin EPS üretimine etkisi

Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklık değerlerinde EPS üretim miktarlarını incelemek amacıyla, bakteriler 30°C’de 48 saat süre ile MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir.

Aktifleşen kültürlerden % 0.1 oranında 10 mL MRS besiyeri bulunan tüplere aşılama yapılmıştır. Kültürler 20°C, 30°C ve 37 °C sıcaklıklardaki besiyerlerinde 5 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda 10 mL MRS besiyerlerinde gelişmiş kültürlerle protein ve hücre çöktürme işlemleri ve EPS izolasyonu için gerekli işlemler yapılmıştır. Elde edilen EPS peletleri hidrolize edildikten sonra, DNS yöntemi ile şeker analizi yapılmıştır.

3.2.3.3 Ortam pH' sının EPS üretimine etkisi

Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde EPS üretim miktarlarını incelemek amacıyla, kültürler 30°C'de 48 saat süre ile MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir.

Gelişme ortamının pH değerleri 2N NaOH ve 2N HCl ile pH 5.0, pH 6.0 ve pH 7.0 olacak şekilde pH ayarlanması yapılan MRS besiyerlerine aktifleştirilen kültürlerden % 0.1 oranında paralel aşılama yapılmıştır. Bu kültürler, 30°C'de 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 10 mL MRS besiyerlerinde gelişmiş kültürlerle protein ve hücre çöktürme işlemleri ve EPS izolasyonu için gerekli işlemler yapılmıştır. Elde edilen EPS peletleri hidrolize edildikten sonra DNS yöntemi ile şeker analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4 Farklı NaCl konsantrasyonlarının EPS üretimine etkisi

Laktik asit bakterilerinin farklı NaCl konsantrasyonlarında EPS üretim miktarlarını incelemek amacıyla, kültürler 30°C'de 48 saat süre ile MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir.

NaCl konsantrasyonları %0, %3 ve %6 olacak şekilde normal MRS besiyeri bileşimine NaCl ilave edilmiştir. NaCl ilave edilerek hazırlanan besiyerlerine, aktifleştirilen

kültürlerden % 0.1 oranında paralel aşılama yapılmıştır. Bu kültürler, 30°C’de 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 10 mL MRS besiyerlerinde gelişmiş kültürlere protein ve hücre çöktürme işlemleri ve EPS izolasyonu için gerekli işlemler yapılmıştır. Elde edilen EPS peletleri hidrolize edildikten sonra DNS yöntemi ile şeker analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.5 Farklı şeker kaynaklarının EPS üretimine etkisi

Laktik asit bakterilerinin EPS üretimine farklı şekerlerin etkisini incelemek amacıyla, kültürler 30 °C’de 48 saat süre ile MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir.

Normal MRS bileşimine, şeker türleri farklı olacak şekilde, %2 oranlarında glikoz, laktoz ve fruktoz ayrı ayrı ilave edilerek üç farklı besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine aktifleştirilen kültürlerden % 0.1 oranında aşılama yapılmıştır. 30°C’de 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 10 mL MRS besiyerlerinde gelişmiş kültürlere protein ve hücre çöktürme işlemleri ve EPS izolasyonu için gerekli işlemler yapılmıştır. Elde edilen EPS peletleri hidrolize edildikten sonra DNS yöntemi ile şeker analizi yapılmıştır.

3.2.3.6 Farklı azot kaynaklarının EPS üretimine etkisi

Laktik asit bakterilerinin EPS üretimine farklı azot kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla, kültürler 30°C’de 48 saat süre ile MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir.

Normal MRS bileşimindeki azot kaynaklarından farklı olarak %1 oranında sodyum nitrat, amonyum sülfat ve normal MRS besiyeri bileşiminde de yer alan bacto-pepton olmak üzere üç farklı azot kaynağı ilave edilerek besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan

besiyerlerine aktiveştirilen kültürlerden % 0.1 oranında aşılama yapılmış, 30°C’de 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 10 mL MRS besiyerlerinde geliştirilen kültürlere protein ve hücre çöktürme işlemleri ile EPS izolasyonu için gerekli işlemler yapılmıştır. Elde edilen EPS peletleri hidrolize edildikten sonra DNS yöntemi ile şeker analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.7 Farklı mineral kaynakların EPS üretimine etkisi

Laktik asit bakterilerinin EPS üretimine farklı mineral maddelerin etkisini incelemek amacıyla, öncelikle kültürler 30°C’de 48 saat süre ile MRS sıvı besiyerinde aktiveştirilmiştir.

Farklı mineral kaynakları olarak %0.5 oranında demir klorür ($FeCl_3$), %2 oranında kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) ilave edilmiş ve katkı ilavesi olmayan normal MRS besiyeri bileşimi olmak üzere farklı besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine aktiveştirilen kültürlerden % 0.1 oranında paralel tüplere aşılama yapılmış ve 30°C’ de 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 10 mL sıvı besiyerlerinde geliştirilmiş kültürlere protein ve hücre çöktürme işlemleri ve EPS izolasyonu için gerekli işlemler yapılmıştır. Elde edilen EPS peletleri hidrolize edildikten sonra DNS yöntemi ile şeker analizi gerçekleştirilmiştir.

Tüm denemeler 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm deneme sonuçlarında EPS üretimleri glikoz eř değeri cinsinden mg/L olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

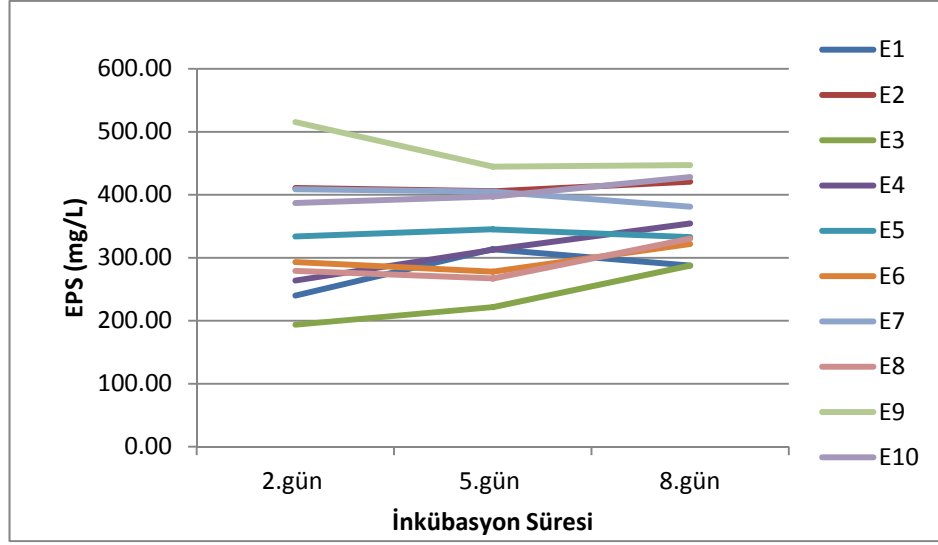
Yapılan bu çalışmada, EPS üreticisi olarak belirlenen 10 adet laktik asit bakteri suşunun EPS üretimi üzerine farklı sıcaklık, süre ve pH gibi ortam koşulları; ayrıca besiyeri bileşimlerinin etkileri incelenmiştir.

4.1 Farklı İnkübasyon Sürelerinin EPS Üretimine Etkisi

EPS üretiminde farklı inkübasyon sürelerinin etkisini incelemek amacıyla bakteri örnekleri 30°C inkübasyon sıcaklığında 48 saat (2.gün), 120 saat (5.gün) ve 192 saat (8.gün) inkübasyon sürelerinde geliştirilmiştir. Bakteri örneklerinin belirtilen inkübasyon süreleri sonunda ürettikleri EPS miktarı şekil 4.1 ve çizelge 4.1’ de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin 30°C’de farklı inkübasyon sürelerinde inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/mL)

No	2.gün	5.gün	8.gün
E1	239.95 ± 24.62	313.60 ± 9.65	287.48 ± 17.97
E2	410.78 ± 3.33	405.60 ± 5.32	420.66 ± 9.32
E3	193.60 ± 4.33	221.60 ± 9.32	287.72 ± 24.29
E4	263.95 ± 24.62	312.66 ± 12.98	354.31 ± 6.66
E5	333.84 ± 10.32	345.13 ± 9.65	332.89 ± 7.65
E6	293.13 ± 3.33	277.84 ± 14.97	321.84 ± 15.97
E7	408.66 ± 9.65	404.89 ± 24.96	381.13 ± 5.32
E8	279.01 ± 0.00	267.01 ± 1.66	330.31 ± 31.94
E9	515.48 ± 16.97	444.66 ± 2.00	447.25 ± 18.30
E10	386.78 ± 19.97	397.13 ± 5.99	428.19 ± 19.97



Şekil 4.1 Laktik asit bakterilerinin 30°C’de farklı inkübasyon sürelerinde inkübasyonu sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

En yüksek EPS üretimi 515.48 ± 16.97 mg/L ile E9 örneğinin 48 saat inkübasyonu sonunda gerçekleşmiştir. 48 saat inkübasyon sonunda, en düşük EPS üretimi ise 193.60 ± 4.2 mg/L ile E3 örneğinde tespit edilmiştir. 120 saat inkübasyon süresinde, yine E9 örneği 444.66 ± 2.0 mg/L ile en yüksek EPS üretimini göstermiştir. 120 saat inkübasyon süresinde en düşük EPS üretimi 221.60 ± 9.32 mg/L ile E3 örneğinde gerçekleşmiştir. 192 saat inkübasyon süresi sonunda, en yüksek EPS üretimi yine E9 örneğinde 447.25 ± 18.30 mg/L olarak bulunurken, en düşük EPS üretimi 287.48 ± 17.47 mg/L ile E1 örneğinde tespit edilmiştir. Bütün inkübasyon sürelerinde en yüksek EPS üretim miktarı E9 örneğinde elde edilmiştir. 48 ve 120 saat inkübasyon sonunda ikinci en yüksek EPS üretimi (sırasıyla, 410.78 ± 3.33 mg/L, 405.60 ± 5.32 mg/L) E2 örneğinde belirlenmiştir. 192 saat inkübasyon sonunda ise ikinci en yüksek EPS üretimi (428.19 ± 19.97 mg/L) E10 örneği olarak belirlenmiştir.

Özet olarak, en yüksek EPS üretimleri E7 ve E9 örneklerinde 48 saat; E1 ve E5 örneklerinde 120 saat; E2, E3, E4, E6, E8, E10 örnekleri için ise 192 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir. Genel olarak, yüksek miktarda EPS üreticisi suşlar için 2 gün inkübasyon süresi yeterli olurken, düşük EPS üreticisi suşlarda 8 güne kadar uzayabilmektedir

Yılmaz (2006) *Bacillus* suşlarının 24, 48, 72 saat inkübasyon sürelerinin denemiş ve en yüksek EPS üretiminin *B.sphaericus* 7055 (67 mg/L) ve *B.subtilis* 1404 (66 mg/L) suşları tarafından 48 saat inkübasyon sonunda elde edildiğini belirtmiştir.

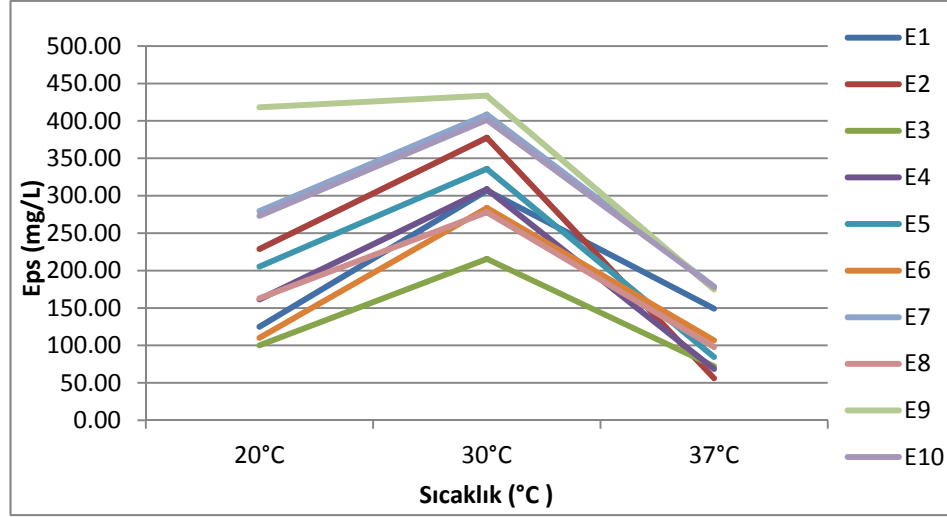
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) suşları ile MRS ve M17 besiyerlerinde EPS üretimi için farklı inkübasyon süreleri (5, 8, 10, 18, 32 ve 48 saat) denenmiş ve en yüksek EPS üretimi 18 saatlik inkübasyon sonunda, bu bakteriler için, sırasıyla 220, 152 ve 120 mg/L olarak tespit edilmiştir (Aslım 2005b).

4.2 Farklı Sıcaklık Değerlerinin EPS Üretimine Etkisi

Bakteri örneklerinin EPS üretiminde farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisini incelemek amacıyla bakteri örnekleri 120 saat inkübasyon süresinde 20°C, 30°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında geliştirilmiştir. 120 saat inkübasyon süresinde 20°C, 30°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarındaki EPS üretim miktarları şekil 4.2 ve çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

No	20°C	30°C	37°C
E1	124.92 ± 6.58	306.93 ± 5.12	149.22 ± 4.39
E2	228.85 ± 5.85	377.50 ± 7.68	56.15 ± 2.92
E3	100.10 ± 2.92	215.67 ± 4.75	72.18 ± 9.51
E4	161.37 ± 5.48	308.74 ± 8.41	68.56 ± 4.39
E5	205.32 ± 6.95	335.88 ± 8.04	84.59 ± 2.19
E6	110.19 ± 4.75	283.66 ± 10.97	106.57 ± 13.53
E7	279.52 ± 2.19	408.53 ± 29.61	178.70 ± 4.39
E8	162.93 ± 14.99	277.97 ± 16.82	97.78 ± 5.48
E9	418.09 ± 7.31	433.61 ± 7.31	174.82 ± 10.60
E10	273.06 ± 6.22	401.29 ± 8.41	177.92 ± 9.87



Şekil 4.2 Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

Bütün örneklerde en yüksek EPS üretimi 30°C inkübasyon sıcaklığında elde edilirken, en düşük EPS üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ise 37°C olarak belirlenmiştir. 30°C sıcaklıkta en yüksek EPS üretimi E9 ve E7 örneklerinde, sırasıyla, 433.61 ± 7.31 mg/L ve 408.53 ± 29.61 mg/L olarak gerçekleşmiştir. 30°C sıcaklıkta en düşük EPS üretimi 215.67 ± 4.75 mg/L ile E3 örneğinde belirlenmiştir. 20°C sıcaklıkta en yüksek EPS üretimi E9 ve E7 örneklerinde, sırasıyla, 418.09 ± 7.03 mg/L ve 279.52 ± 6.95 mg/L olurken, en düşük EPS üretimi ise E3 örneği ile 100.10 ± 2.92 mg/L olarak belirlenmiştir. Tüm örnekler için en düşük EPS miktarlarını veren 37°C sıcaklıkta en yüksek EPS miktarı için birbirine yakın sonuçlar birden fazla örnekte elde edilmiştir. Bu örnekler sırasıyla 178.70 ± 4.39 mg/L ile E7, 177.92 ± 9.87 mg/L ile E10 ve 174.82 ± 10.60 mg/L ile E9 olarak belirlenirken, en düşük EPS miktarı ise E2 örneği ile 56.15 ± 2.92 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Nichols vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, *Pseudomonas* sp. CAM025 suşunun EPS verimleri -2°C ve 10°C' de 20°C' ye göre 30 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Kimmel vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR suşu ile farklı inkübasyon sıcaklıkları (35, 38, 40, 45 °C) denenmiş ve en yüksek EPS üretimi (295 mg/L) 38°C'de elde edilmiştir.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) suşları ile MRS ve M17 besiyerlerinde farklı sıcaklıklarda (30, 37, 42, 45°C) inkübasyon sonunda, tüm suşlar için en yüksek EPS üretiminin (sırasıyla, 263 mg/L, 238 mg/L ve 57 mg/L) 45°C sıcaklıkta gerçekleştiği bildirilmiştir (Aslım 2005b).

Zhang vd. (2011) tarafından skim milk besiyerinde geliştirilen *Lactobacillus fermentum* F6 bakterisinin gelişimi ve EPS üretimi ile ilgili yapılan çalışmada optimum gelişme 37°C' de gerçekleşirken 25, 30, 37 ve 42°C sıcaklıklarındaki en yüksek EPS üretimlerinin sırasıyla, 8.18, 8.86, 14.75 ve 12.90 mg/L olarak bulunduğu belirtilmiştir.

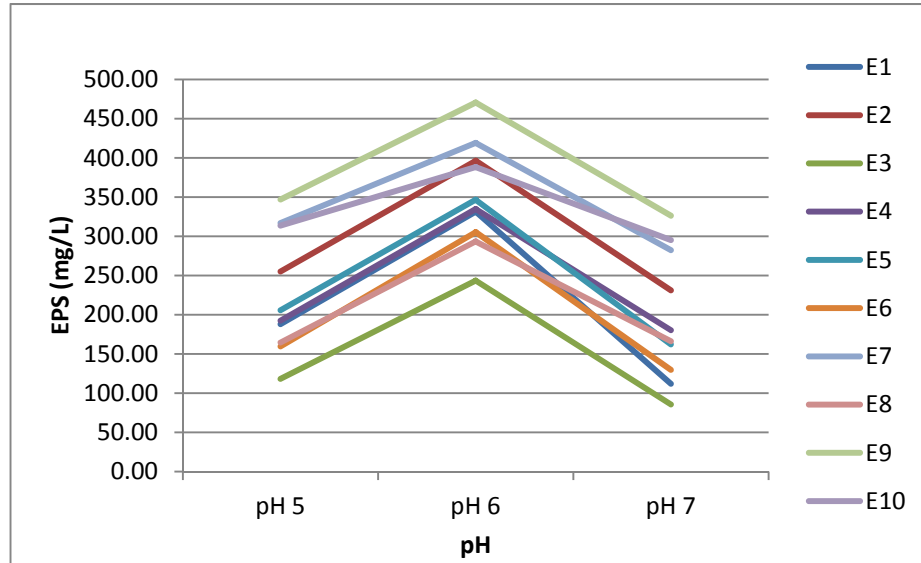
4.3 Ortam pH'sının EPS Üretimine Etkisi

Mikroorganizmalar gelişimleri için farklı pH değerlerine ihtiyaç duymaktadır. Bakteri örneklerinin MRS besiyerinin normal pH'sı olan 5.8 değerinden farklı olarak pH'sı 5.0, 6.0 ve 7.0'ye ayarlanmış besiyerlerinde 30°C'de 5 gün inkübasyon sonunda ürettikleri EPS miktarları şekil 4.3 ve çizelge 4.3 de görülmektedir.

Tüm örneklerde, en yüksek EPS üretimleri pH 6.0 ile sağlanırken, en düşük EPS üretimleri pH 7.0'de elde edilmiştir. Tüm örnekler arasında en yüksek EPS üretimini pH 6.0'da 470.47±8.04 mg/L ile E9 örneği sağlamış olup, pH 6.0'da en düşük EPS üretimi 243.48±10.24 mg/L ile E3 örneğinde görülmüştür. Tüm örnekler içinde en düşük EPS üretimi ise pH 7.0' de 85.52±10.60 mg/L ile E3 örneğinde belirlenmiştir. pH 7.0'de en yüksek EPS üretimi 326.21±30.71 mg/L ile E9 örneğinde belirlenmiştir. pH 5.0'de en yüksek EPS üretimi 346.89±5.85 mg/L E9 örneğinde bulunurken, en düşük EPS üretimi 118.10±14.99 mg/L ile E3 örneğinde belirlenmiştir. Sonuç olarak; tüm pH değerlerinde en yüksek EPS üretimi E9 örneğinde belirlenirken en düşük EPS üretimi ise E3 örneğinde bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

No	pH 5	pH 6	pH 7
E1	187.90 ± 5.48	331.38 ± 8.04	111.89 ± 15.72
E2	255.12 ± 6.22	396.27 ± 2.56	231.07 ± 12.43
E3	118.10 ± 14.99	243.48 ± 10.24	85.52 ± 10.60
E4	192.29 ± 4.39	334.74 ± 1.83	180.14 ± 4.02
E5	205.74 ± 21.94	346.64 ± 5.48	162.05 ± 6.95
E6	159.46 ± 13.53	305.27 ± 16.45	129.73 ± 4.39
E7	316.91 ± 5.12	419.02 ± 9.14	282.26 ± 5.12
E8	164.37 ± 10.97	293.38 ± 1.83	166.18 ± 8.41
E9	346.89 ± 5.85	470.47 ± 8.04	326.21 ± 30.71
E10	313.54 ± 5.48	388.26 ± 9.51	295.19 ± 8.04



Şekil 4.3 Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

Ko vd. (2000) *Hahella chejuensis* bakterisi ile EPS üretiminde, en yüksek EPS verimini pH 6.0 ile pH 8.0 arasında, özellikle pH 7.0'de (9.19 g/L) elde etmişler, pH 5.0'in altında ve pH 9.0'un üzerinde verimin düştüğünü belirtmişlerdir.

Gorret vd. (2001) *Propionibacterium acidi-propionici* bakterisi ile denenen bütün pH değerlerinde organik asit üretimi ve biyokütle artışı görülürken, sadece pH 5.3-6.5 arasında EPS üretimi gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. En yüksek EPS üretimi pH 6.0'da 310 mg/L olarak bulunmuştur.

Gassem vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR ile sürekli fermentörde, fermantasyon substratı olarak proteini uzaklaştırılmış laktoz, kazamino asit ve amonyum klorid eklenmiş peynir altı suyu besiyerinde gerçekleştirilen üretimde pH 6.5'da EPS konsantrasyonu 1.55-2.13 g/L aralığında, pH 5.2'de ise EPS konsantrasyonu 0.6-1.06 g/L aralığında belirlenmiştir.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) suşları ile yapılan bir çalışmada, MRS ve M17 besiyerlerinde farklı pH değerlerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.2, 7.0) en yüksek EPS üretimi *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları için pH 6.2'de (B3: 211 mg/L, G12: 175 mg/L), *Streptococcus thermophilus* suşu için de pH 6.8'de (114 mg/L) bulunmuştur (Aslım vd. 2005b).

Zhang vd. (2011) tarafından skim milk besiyerinde geliştirilen *Lactobacillus fermentum* F6 bakterisinin gelişimi ve EPS üretimi ile ilgili yapılan çalışmada yüksek pH değerlerinde (6.0, 6.5, 7.0) daha yüksek miktarlarda EPS üretimi gerçekleşirken en yüksek EPS üretimi (14.61 mg/L, 32 saat) pH 6.5'da tespit edilmiştir.

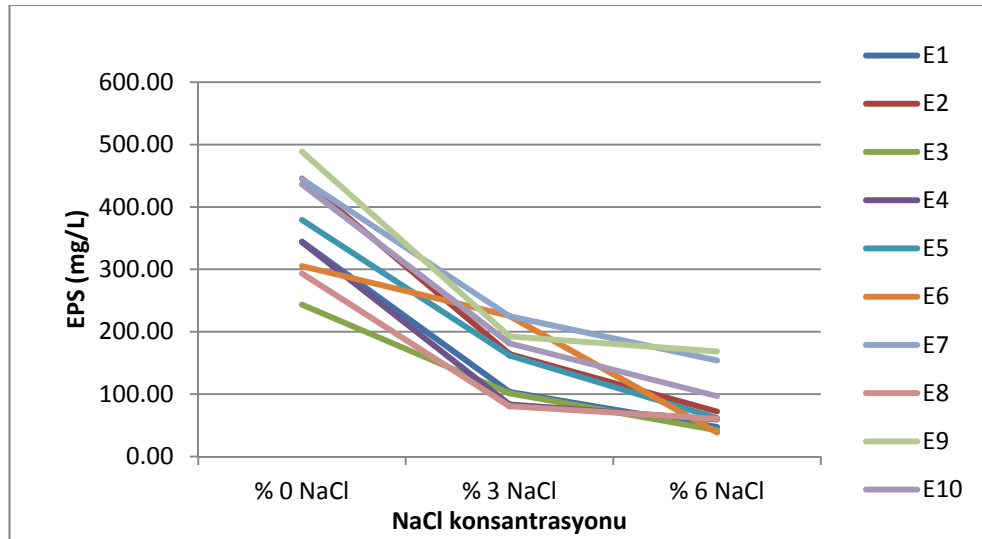
Bu çalışmada elde edilen EPS miktarları, Gassem vd. (1997) ve Ko vd. (2000) tarafından elde edilen değerlerden düşük, Gorret vd. (2001) tarafından elde edilen değerlere benzer, Aslım vd. (2005b) ve Zhang vd. (2011) tarafından elde edilenlerden yüksek olarak belirlenmiştir.

4.4 Farklı NaCl Konsantrasyonlarının EPS Üretimine Etkisi

Bakteri örneklerinin, %0, %3 ve %6 NaCl ilave edilen besiyerlerinde 30°C'de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları incelenmiş, sonuçlar çizelge 4.4 ve şekil 4.4' de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4 Laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren besiyerlerinde 30°C'de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

No	% 0 NaCl	% 3 NaCl	% 6 NaCl
E1	344.57 ± 10.60	103.62 ± 2.56	47.26 ± 9.87
E2	445.65 ± 5.85	164.37 ± 5.85	72.34 ± 9.51
E3	243.48 ± 10.24	101.55 ± 9.87	42.09 ± 3.29
E4	343.53 ± 14.26	83.45 ± 7.68	59.41 ± 10.97
E5	379.21 ± 10.60	162.05 ± 19.38	61.74 ± 3.29
E6	305.27 ± 16.45	22539 ± 11.70	38.73 ± 0.73
E7	444.88 ± 27.42	224.87 ± 11.70	154.03 ± 0.00
E8	293.38 ± 1.83	80.61 ± 3.66	60.44 ± 1.46
E9	488.57 ± 2.19	192.55 ± 4.02	168.51 ± 5.85
E10	436.35 ± 6.58	181.44 ± 13.89	96.90 ± 7.68



Şekil 4.4 Laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren besiyerlerinde 30°C'de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

Tüm örneklerde, NaCl ilavesi ile EPS üretim miktarlarının düştüğü, en yüksek EPS üretiminin hiç NaCl ilave edilmemiş besiyerlerinde elde edildiği tespit edilmiştir. Daha önceki süre, sıcaklık ve pH denemelerinde olduğu gibi, en yüksek EPS (488.57 ± 2.19 mg/L) üreten bakteri suşu, NaCl içermeyen besiyerinde gelişen E9 örneği olmuştur.

E9 örneğini takip eden en yüksek EPS üretim miktarları, sırasıyla, 445.65 ± 5.85 mg/L ile E2, 444.88 ± 27.42 mg/L ile E7 ve 436.35 ± 6.58 mg/L ile E10 örneklerinde belirlenmiştir. Tüm örneklerde en düşük EPS üretim miktarları % 6 NaCl ilave edilen besiyerlerinde gerçekleşmiştir. En düşük EPS üretimi 38.73 ± 0.73 mg/L ile % 6 NaCl içeren besiyerinde E6 örneğinde bulunmuştur. En yüksek EPS üretim miktarlarının tespit edildiği NaCl içermeyen besiyerinde, en düşük EPS üretimi 243.48 ± 10.24 mg/L ile E3 örneğinde belirlenmiştir. En düşük EPS üretim miktarlarının belirlendiği % 6 NaCl içeren besiyerinde ise en yüksek EPS üretimi 168.51 ± 5.85 mg/L olarak E9 örneği ile elde edilmiştir. % 3 NaCl içeren besiyerlerinde ise en yüksek EPS üretimi 225.39 ± 11.70 mg/L ile E6 örneğinde belirlenirken, en düşük EPS üretimi 80.61 ± 3.66 mg/L ile E8 örneğinde tespit edilmiştir. % 3 NaCl ilave edilmiş besiyerinde en yüksek EPS üretiminin (225.39 ± 11.70 mg/L) görüldüğü E6 örneğinin % 6 NaCl içeren besiyerinde en düşük EPS üretimi (38.73 ± 0.73 mg/L) gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu verilere dayanarak, NaCl ilavesinin EPS üretimini olumsuz etkilediği; buna karşın % 3'e kadar NaCl içeren ortamlarda ise en etkili bakteri suşunun E6 örneği olduğu söylenebilir.

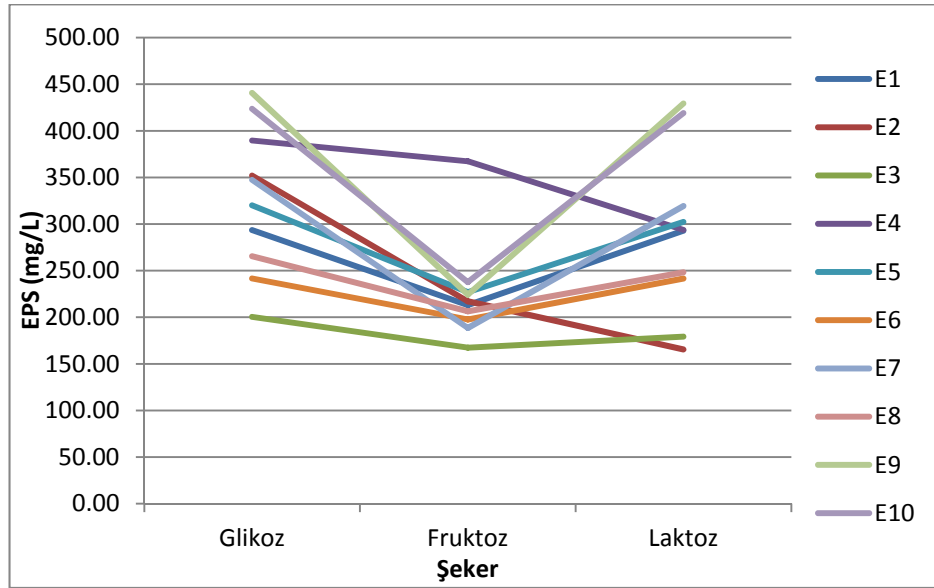
Ko vd. (2000) % 0-20 (w/v) NaCl konsantrasyonları arasında en yüksek EPS üretimini % 1 oranında NaCl ilave edildiğinde elde etmişler, optimum değer üzerindeki ilavelerde ise EPS üretiminin düştüğünü belirtmişlerdir.

4.5 Farklı Şeker Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

Glikoz, fruktoz ve laktöz olmak üzere farklı şeker kaynaklarını içeren besiyerlerinin EPS üretimine etkisini incelemek amacıyla, bakteri örneklerinin 30°C'de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları belirlenmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5).

Çizelge 4.5 Laktik asit bakterilerinin farklı şekerler içeren besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

No	Glikoz	Fruktoz	Laktoz
E1	293.48 ± 3.88	212.99 ± 10.49	292.93 ± 12.43
E2	351.98 ± 6.60	217.11 ± 16.32	165.47 ± 10.88
E3	200.36 ± 5.83	167.39 ± 26.03	179.21 ± 3.88
E4	389.62 ± 9.32	367.37 ± 7.38	293.75 ± 19.03
E5	320.12 ± 1.94	227.00 ± 47.39	302.27 ± 13.98
E6	241.56 ± 12.04	197.61 ± 7.38	241.56 ± 5.05
E7	347.31 ± 8.55	188.55 ± 4.66	319.30 ± 13.21
E8	265.46 ± 0.78	206.40 ± 22.14	248.15 ± 6.60
E9	440.71 ± 10.10	224.25 ± 9.32	429.45 ± 6.60
E10	423.68 ± 9.32	237.71 ± 5.83	419.01 ± 22.14



Şekil 4.5 Laktik asit bakterilerinin farklı şekerler içeren besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

Tüm örnekler için en yüksek EPS üretim değerleri glikoz içeren besiyerinde bulunmuştur. Glikoz içeren besiyerinde en yüksek EPS üretimi E9 ve E10 bakterileri ile, sırasıyla, 440.71±10.10 mg/L ve 423.68±9.32 mg/L olarak tespit edilmiştir. Laktoz

içeren besiyerinde de yine aynı bakteriler ile, sırasıyla, 429.45 ± 6.60 mg/L ve 419.01 ± 22.14 mg/L miktarlarında, glikoz içeren besiyerindeki değerlere yakın sonuçlar elde edilmiştir. Glikoz içeren besiyerinde üçüncü en yüksek EPS üretimi 389.62 ± 9.32 mg/L olarak E4 örneğinde belirlenmiştir. Glikoz ve fruktoz içeren besiyerinde en düşük EPS üretimleri, sırasıyla, 200.36 ± 5.83 mg/L ve 167.39 ± 26.03 mg/L olmak üzere E3 örneğinde belirlenmiştir. Fruktoz içeren besiyerinde, diğer denemelerdekinden farklı olarak E4 örneği 367.37 ± 7.38 mg/L ile en yüksek EPS üreten suş olup, E4 örneğini 237.71 ± 5.83 mg/L ile E10 örneği takip etmektedir. E9 örneği ise 224.25 ± 9.32 mg/L ile dördüncü en yüksek EPS üreten suş olmuştur. Laktoz içeren besiyerinde de en yüksek EPS üretimi, diğer denemelerde de sık sık görüldüğü gibi, 429.45 ± 6.60 mg/L ile E9 örneği olarak belirlenirken, E9 örneğini 419.01 ± 22.14 mg/L ile E10 örneği takip etmektedir. Laktoz içeren besiyerinde en düşük EPS üretimi 165.47 ± 10.88 mg/L ile E2 örneğinde belirlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında, bütün bakteriler arasında her zaman ikinci en yüksek EPS üretimi elde edilen E10 örneğinin, diğer bakteri suşlarına kıyasla, EPS üretim yeteneğinin şeker kaynağından en az etkilendiği söylenebilir. Glikoz ve laktoz içeren besiyerinde en yüksek EPS üretimi gösteren E9 örneğinin fruktoz içeren besiyerinde dördüncü sırada EPS üretmesi (224.25 ± 9.32 mg/L), fruktoz besiyerinin bu bakteri üzerinde olumsuz etkisini göstermektedir. Fruktoz içeren besiyerinde en yüksek EPS üretimi (367.37 ± 7.38 mg/L) görülen E4 örneğinin EPS üretiminde fruktoz içeren besiyeri teşvik edici olmuştur.

Wu vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, bir monosakkarit olan fruktoz içeren besiyerinde, disakkarit (sakkaroz ve laktoz) içeren besiyerlerinkinden daha yüksek EPS üretimi elde edilmiştir. Bu bulgu, bizim çalışmamızda da en yüksek EPS üretim değerlerinin glikoz içeren besiyerinde bulunmasını desteklemektedir.

Ko vd. (2000) ise, Wu vd. (2008)'in belirttiğinin aksine, bir disakkarit olan sakkaroz karbon kaynağı olarak seçildiğinde en yüksek EPS üretimine ulaşmıştır.

Yılmaz (2006), *B.sphaericus* 7055 ve *B.subtilis* 1404 suşları ile % 1 oranında farklı karbon kaynakları (glikoz, sakkaroz, fruktoz ve maltoz) içeren besiyerlerinde en yüksek

EPS üretiminin (sırasıyla, 1038 mg/L ve 884 mg/L) 48 saat inkübasyon sonunda fruktoz içeren besiyerinde gerçekleştiğini bildirmiştir. Ayrıca, *B.sphaericus* 7055 ve *B.subtilus* 1404 suşları için farklı fruktoz konsantrasyonları denenmiş ve en yüksek EPS üretiminin (sırasıyla, 1170 mg/L ve 1133 mg/L) % 2.5 fruktoz içeren besiyerinde bulunduğu rapor edilmiştir.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) suşları ile MRS ve M17 besiyerlerinde farklı karbon kaynakları (sakkaroz, fruktoz, laktoz, glikoz) ve glikoz konsantrasyonları (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 g/L) incelenmiş ve en yüksek EPS üretimi için karbon kaynağı glikoz ve glikoz konsantrasyonu 30 g/L olarak bulunmuştur. Glikoz konsantrasyonu 30 g/L olan besiyerlerinde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) suşları için en yüksek EPS üretimleri, sırasıyla, 224 mg/L, 255 mg/L ve 174 mg/L olarak bulunduğu bildirilmiştir (Aslım vd. 2005b).

Zhang vd. (2011) tarafından *Lactobacillus fermentum* F6 bakterisi ile EPS üretimi üzerine yapılan çalışmada glikoz, fruktoz, galaktoz ve laktoz olmak üzere farklı karbon kaynaklarının % 2 oranında (w/v) ilave edildiği skim milk besiyerinde, 48 saat inkübasyonu sonunda, en yüksek EPS değeri (33.05 mg/L) glikoz içeren besiyerinde elde edilmiştir.

4.6 Farklı Azot Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

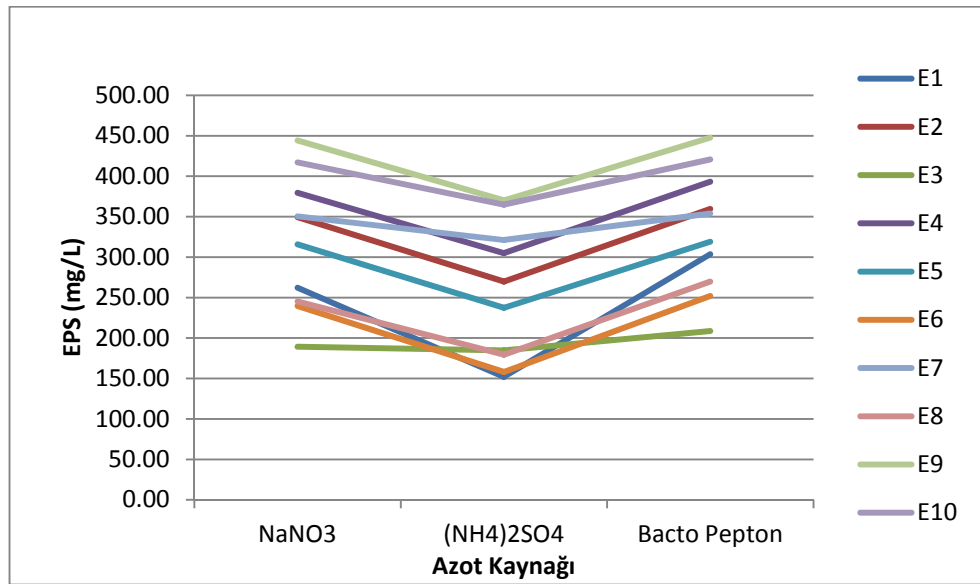
Bakteri örneklerinin amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), sodyum nitrat (NaNO₃) ve bacto pepton olmak üzere farklı azot kaynakları ilave edilmiş besiyerlerinde, 30°C’de, 5 gün inkübasyon sonunda ürettikleri EPS miktarları çizelge 4.6 ve şekil 4.6’da görülmektedir.

En yüksek EPS üretimi E9 bakterisi ile, bacto pepton ve NaNO₃ içeren besiyerlerinde, sırasıyla, 447.58±3.50 mg/L ve 444.28±2.72 mg/L olarak birbirine çok yakın belirlenmiştir. İkinci en yüksek EPS üretim miktarı E10 örneği ile, bacto pepton ve

NaNO₃ içeren besiyerlerinde, sırasıyla, 420.66±8.16 mg/L ve 417.09±2.33 mg/L olarak yine birbirine çok yakın bulunmuştur.

Çizelge 4.6 Laktik asit bakterilerinin farklı azot kaynakları ilave edilmiş besiyerlerinde 30°C’ de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/ L)

No	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Bacto Pepton
E1	262.16 ± 6.99	152.01 ± 2.72	303.64 ± 4.27
E2	349.51 ± 2.33	269.85 ± 6.99	359.68 ± 3.50
E3	189.09 ± 3.88	184.70 ± 4.66	208.60 ± 8.93
E4	379.45 ± 7.38	305.01 ± 4.66	393.19 ± 12.82
E5	315.73 ± 2.72	237.44 ± 15.54	319.02 ± 6.60
E6	239.64 ± 5.44	158.06 ± 8.93	252.00 ± 7.38
E7	350.34 ± 1.94	321.22 ± 8.16	353.91 ± 4.66
E8	245.13 ± 2.33	179.48 ± 1.94	269.85 ± 6.22
E9	444.28 ± 2.72	370.11 ± 8.16	447.58 ± 3.50
E10	417.09 ± 2.33	364.89 ± 6.99	420.66 ± 8.16



Şekil 4.6 Laktik asit bakterilerinin farklı azot kaynakları ilave edilmiş besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

En düşük EPS üretim miktarları ise E6 ve E1 örneğinde, sırasıyla, 152.01±2.72 mg/L ve 158.06±8.93 mg/L olarak (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerinde belirlenmiştir. En düşük EPS

üretimlerinin gerçekleştiği amonyum sülfat besiyerindeki en yüksek EPS üreten suşlar 370.11 ± 8.16 mg/L ile E9 ve 364.89 ± 6.99 mg/L ile E10 örnekleri olarak tespit edilmiştir. En yüksek EPS üretimlerinin gerçekleştiği bacto pepton ve sodyum nitrat içeren besiyerindeki en düşük EPS üreten suş ise E3 olmuştur.

Wu vd. (2008) *Pleurotus citrinopileatus* ile farklı azot kaynaklarının (yeast pepton, keramine HD, hidrolize sebze proteini, bacto pepton, NaNO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) EPS üretimine etkisini inceledikleri çalışmada en yüksek EPS üretimi (1.87 g/L) organik azot kaynağı % 2.5 yeast pepton ilaveli besiyerinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Bacto pepton, NaNO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilaveli besiyerlerinde EPS üretimleri, sırasıyla, 470 mg/L, 120 mg/L ve 110 mg/L olarak bulunmuştur. Organik azotların EPS sentezi için gerekli esansiyel aminoasitler içermesi nedeniyle inorganik azotlardan daha yüksek EPS üretimi sağladığı ileri sürülmüştür.

Kuntiya vd. (2010) yetersiz veya fazla azot konsantrasyonlarının EPS üretimini olumsuz yönde etkilediğini, düşük azot konsantrasyonlarının polisakkarit üretimi için daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.

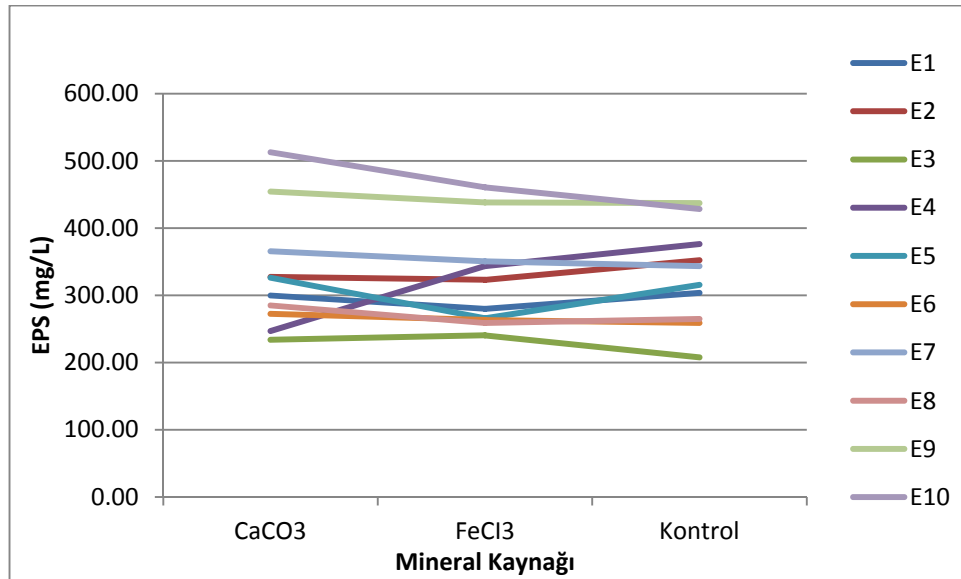
4.7 Farklı Minerallerin EPS Üretimine Etkisi

Bakteri örneklerinin % 2 CaCO_3 , % 0.5 FeCl_3 ilave edilmiş ve normal MRS besiyerinde 30°C 'de 5 gün inkübasyon sonunda ürettikleri EPS miktarları çizelge 4.7 ve şekil 4.7'de verilmiştir.

En yüksek EPS üreten bakteri örneği (512.81 ± 8.29 mg/L) CaCO_3 ilave edilmiş besiyerinde gelişen E10 suşu olmuştur. CaCO_3 içeren besiyerinde en yüksek EPS üreten E10 bakteri suşu FeCl_3 ilaveli besiyerinde de en yüksek EPS (460.65 ± 12.43 mg/L) üreten suş olmuştur. İkinci en yüksek EPS üretimleri, sırasıyla, 454.21 ± 5.80 mg/L 438.09 ± 2.90 mg/L olarak CaCO_3 ve FeCl_3 içeren besiyerlerinde E9 bakteri suşu olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7 Laktik asit bakterilerinin farklı mineral katkıli besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

No	CaCO ₃	FeCl ₃	Kontrol
E1	299.80 ± 4.56	279.87 ± 0.41	303.61 ± 3.31
E2	327.34 ± 2.90	322.94 ± 4.14	352.24 ± 5.80
E3	233.87 ± 7.46	240.32 ± 15.75	207.80 ± 2.90
E4	246.76 ± 8.29	343.45 ± 22.38	376.27 ± 8.29
E5	326.17 ± 7.04	265.81 ± 2.07	315.62 ± 2.90
E6	272.26 ± 5.39	263.17 ± 6.63	258.78 ± 8.70
E7	365.43 ± 7.04	350.49 ± 3.31	343.45 ± 6.63
E8	284.85 ± 3.31	258.78 ± 10.36	264.93 ± 1.66
E9	454.21 ± 5.80	438.09 ± 2.90	437.21 ± 4.14
E10	512.81 ± 8.29	460.65 ± 12.43	428.42 ± 5.80



Şekil 4.7 Laktik asit bakterilerinin farklı mineral katkıli besiyerlerinde 30°C’de 5 gün inkübasyon sonunda EPS üretim miktarları (mg/L)

CaCO₃ ve FeCl₃ ilavesi E4 ve E2 örneklerinde EPS üretimini olumsuz yönde etkilerken, E1 ve E5 örneklerinde ise FeCl₃ ilavesi EPS üretimini olumsuz etkilemiştir. CaCO₃ ve FeCl₃ ilavesi diğer suşlar için EPS üretimini artırıcı etkide bulunmuştur. En düşük EPS üretim miktarı (207.80±2.90 mg/L) ise herhangi bir ilave olmayan kontrol besiyerinde

gelişmiş E3 bakterisi ile elde edilmiştir. Genel olarak denemelerde E9 örneği birinci, E10 örneği ikinci en yüksek EPS üretimi sağlarken; mineral katkılı besiyerlerinde E10 örneği birinci, E9 örneği ise ikinci en yüksek EPS üreten suş olmuştur. Bu bilgilerin ışığında E10 örneğinde mineral ilavesinin daha etkili bir faktör olduğu söylenebilirken, E9 örneği için de diğer tüm denemelerdekine oranla en yüksek EPS üretimi sonucunu veren en etkili faktör olmuştur.

5. SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

1. Deneme kapsamındaki laktik asit bakterileri arasında, öncelikle E9 olmak üzere, E2, E7 ve E10 örnekleri en başarılı EPS üreticisi suşlar olarak belirlenmiştir.
2. En yüksek EPS üretimleri E7 ve E9 örneklerinde 48 saat; E1 ve E5 örneklerinde 120 saat; E2, E3, E4, E6, E8, E10 örnekleri için ise 192 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir. Genel olarak, yüksek miktarda EPS üreticisi suşlar için 2 gün inkübasyon süresi yeterli olurken, düşük EPS üreticisi suşlarda 8 güne kadar uzayabilmektedir.
3. En yüksek EPS üretimleri, tüm örnekler için 30°C inkübasyon sıcaklığında elde edilmiştir. Optimum sıcaklığın altındaki ve üzerindeki sıcaklıklarda EPS üretimleri düşmüştür.
4. Farklı pH denemelerinde, tüm örnekler için normal besiyeri pH(5.8)'sına oldukça yakın olan pH 6.0'da en yüksek EPS üretimi sonuçları elde edilmiştir. Optimum pH'nın üzerinde ve altındaki pH'larda EPS üretimleri düşmüştür.
5. Farklı oranlarda NaCl ilave edilmiş besiyerlerinde gerçekleştirilen denemelerde, NaCl konsantrasyonundaki artışın EPS üretiminde düşüşe neden olduğu görülmüştür.
6. Glikoz ilaveli besiyerinde en yüksek EPS üretimleri elde edilirken E1, E6, E7, E8, E9 ve E10 örnekleri laktoz içeren besiyerinde de yüksek EPS üretimleri sağlamıştır.
7. En yüksek EPS üretimleri NaNO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içermeyen normal MRS besiyerinde elde edilirken; E2, E4, E5, E7, E9 ve E10 örnekleri için NaNO_3 ilaveli besiyerlerindeki EPS üretimleri normal MRS besiyerindeki değerlere oldukça yakın bulunmuştur. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi ise tüm örnekler için EPS üretiminde olumsuz etki göstermiştir.

8. Farklı mineral katkılı besiyerlerinde E5, E6, E8 ve E9 örnekleri için en yüksek EPS üretimleri CaCO_3 ilave edilmiş besiyerlerinde bulunurken, E3 örneği için FeCl_3 içeren besiyerinde en yüksek EPS üretimi belirlenmiştir. E7 ve E10 örnekleri ise hem CaCO_3 hem de FeCl_3 içeren besiyerlerinde en yüksek EPS üretimini sağlamıştır. E1, E2 ve E4 örnekleri için en yüksek EPS üretimleri ise normal MRS besiyerinde bulunmuş olup, CaCO_3 ve FeCl_3 ilavesi EPS üretiminde azalmaya neden olmuştur. Tüm suşlar üzerinden yapılan genel bir değerlendirmeyle, mineral katkılarının EPS üretiminde önemli bir etkiye sahip olmadığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Akoğlu, A., Karahan, A. G., akmakçı, M. L. ve akır, İ. 2010. Bakteriyel selülozun özellikleri ve gıda sanayinde kullanımı. GIDA, cilt.35(2), s.127-134.
- Aslim, B., Beyatlı, Y., Soran, H., Mercan, N., Durlu Özkaya, F., Yüksekdağ, Z. N. ve Ediz, N. 2005a. Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretiminin belirlenmesi. Proje No: TBAG-2090 (101T129), 242 s.
- Aslim, B., Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y. and Mercan, N. 2005b. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. World Journal of Microbiology & Biotechnology, vol. 21, pp. 673-677.
- Auld, W. E. 2010. Survival and exopolysaccharide production of lactic acid bacteria grown on grape pomace. Master of Science, University of Missouri, USA.
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. 2011. New Perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. Biotechnology Advances, vol. 29, pp. 54-66.
- Bejar, V., Llamas, I., Calco, C. and Quesada, E. 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. Journal of Biotechnology, vol. 61, pp. 135-141.
- Deegest, B., Vaningelgem, F. and De Vuyst, L. 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 11, 747-757.
- Deegest, B., Mozzi, F. and De Vuyst, L. 2002. Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. International Journal of Food Microbiology, 79, 161-174.
- Demirci, A. Ş. ve Arıcı, M. 2008. Mikrobiyal yollarla üretilen gumlar ve gıda sanayinde kullanımı, Türkiye 10.Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Desai, K. M., Akolkar, S. K., Badhe, Y. P., Tambe, S. S. and Lele, S. S. 2006. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques. Process Biochemistry, vol. 41, pp. 1842-1848.
- De Vuyst, L. and Deegest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, vol. 23, pp. 153-177.
- De Vuyst, L. and Marshall, V. M. 2001. First International symposium on exopolysaccharides from lactic acid bacteria: from Fundamentals to applications. International Dairy Journal, vol. 11, pp. 659-768.

- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. and Deegest, B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 84, pp. 1059-1068.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Deegest, B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, vol.11, pp. 687-707.
- Duboc, P. and Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 759-768.
- Dursun, S. ve Erkan, N. 2009. Yenilebilir protein filmler ve su ürünlerinde kullanımı. *Journal of Fisheries Science*, cilt. 3(4), s. 352-373.
- Forouchi, E. and Gunn, D. J. 1983. Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology Bioengineering*, vol. 25, pp.1905-1911.
- Gassem, M. A. , Sims, K. A. and Frank, J. F. 1997. Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR in a continuous fermentor. *Lebensm.-Wiss. u. Technology*, vol. 30, pp. 273-278.
- Gamar-Nourani, L., Blondeau, K. and Simonet, J. M. 1998. Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83,. *Journal of Applied of Microbiology*, vol. 85, pp. 664-672.
- Gorret, N., M., Aubois, J. L., Engasser, J. M. and Ghoul, M. 2001. Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidi-propionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 90, pp. 788-796.
- Gökalp, H. Y., Nas, S., Certel, M. 2002. *Biyokimya-I Temel “Yapılar ve Kavramlar”*. Pamukkale Üniversitesi Ders Kitapları Yayın No:001, 400s., Denizli.
- Hayaloğlu, A. A., Erginkaya, Z. 2001. *Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:23, 26 s., Ankara.
- Hoa, P.T., Nair, L. and Visvanathan, C. 2003. The effects of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. *WaterSA*, vol. 29, pp. 437-442.
- Kimmel, S.A., Roberts, F.R and Ziegler, G.R. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64 (2), pp.659-664.

- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., Itoh, T. 1998. Phosphate group requirement for mutagenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 40, pp. 169-175.
- Kumar, A. S., Mody, K. and Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides- a perception. *Journal of Basic Microbiology*, vol. 47, pp. 103-117.
- Kuntiya, A., Hangmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki, K. and Seesuriyachan, P. 2010. Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTIR 1498 using coconut water as a raw material substitute. *Maejo International Journal of Science and Technology*, vol.4(02), pp.318-330.
- Ko, S. H., Lee, H.S., Park, S.H. and Lee, K. H. 2000. Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, vol. 5, pp. 181-185.
- Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, vol. 19, pp. 597-625.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 15, pp. 67-78.
- Lin, T. Y. and Chang Chien, M. F. 2007. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100, 1419-1423.
- Milci, S. ve Yaygın, H. 2005. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *GIDA*, 30(2), 123- 129.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Siméon, M. R. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 675-685.
- Nichols, C. M., Bown, J.P. and Guezennec, J. 2005. Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic Sea Ice bacterium grown in batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71(7), pp. 3519-3523.
- Patel, S., Majumder, A. and Goyal, A. 2011. Potential of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology* (in press).
- Pigman, W. and Horton, D. 1972. *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry* Vol 1A, 2nd edition, Academic Press, 67s., San Diego.

- Rehm, B. H. A. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, pp. 578-592.
- Ruas-Madeido, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 12, pp. 163-171.
- Sutherland, I. W. 1972. Bacterial Exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, vol. 8, pp. 143-212.
- Sutherland, I. W. 1997. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure & Applications Chemistry*, vol. 69 (9), pp. 1911-1917.
- Sutherland, I. W. 2001. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, vol. 11, pp. 663-674.
- Tieking, M. and Gänzle, M. G. 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated *lactobacilli*. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 16, pp. 79-84.
- Tok, E. 2007. Probiyotik olarak kullanılabilir bazı laktik asit bakterilerinin kollesterol giderimi özellikleri ve safra tuzu dekonjugasyonuna etkilerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi. Gazi Üniversitesi, 95 s., Ankara.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G., Etzler, M. 2008. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, California.
- Velasco, S., Arsköld, E., Paese, M., Grage, H., Írastorza, A., Radstrom, P. and Van Niel, E.W.J. 2006. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 252-258.
- Welman, A. D. and Maddox, I. S. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, vol. 21(6), pp. 269-274.
- Wu, C. Y., Liang, Z. C., Lu, C. P. and Wu, S. H. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 16 (2), pp. 61-67.
- Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation, Department of Food Technology, University of Helsinki, 61s., Helsinki.
- Yüksekdağ, Z. N and Aslim, B. 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Braz. arch. biol. technol.*, vol. 51(3), pp. 581-585.

Yılmaz, M. 2006. Bazı *Bacillus* türlerinin ekzopolisakkarit(EPS) üretimi. Yüksek lisans tezi. Niğde Üniversitesi, 59 s., Niğde.

Zhang, Y., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H. and Yang, Z. 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. African Journal of Biotechnology, vol. 10 (11), pp. 2080-2091.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fazilet MIDİK

Doğum Yeri : Uşak

Doğum Tarihi : 1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Uşak Orhan Dengiz Anadolu Lisesi (1996-2002)

Lisans : Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2003- 2008)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2008- Aralık2011)