

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TRAKYA BÖLGESİNDE FARKLI KÖYLERDEN ALINAN
YOĞURTLARDAN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,
BUNLARIN EPS (EKZOPOLİSAKARİT) ÜRETİM KABİLİYETLERİNİN
BELİRLENMESİ VE BU BAKTERİLER KULLANILARAK
AYRAN ÜRETİMİNE UYGUN KOMBİNASYONLARININ
SEÇİLMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA
BURCU BÖLÜKBAŞI
DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
Tekirdağ 2007

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRAKYA BÖLGESİNDE FARKLI KÖYLERDEN ALINAN YOĞURTLARDAN
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, BUNLARIN EPS
(EKZOPOLİSAKARİT) ÜRETİM KABİLİYETLERİNİN BELİRLENMESİ VE BU
BAKTERİLER KULLANILARAK AYRAN ÜRETİMİNE UYGUN
KOMBİNASYONLARININ SEÇİLMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

BURCU BÖLÜKBAŞI

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Prof. Dr. Şefik KURULTAY

2007

TEKİRDAĞ

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRAKYA BÖLGESİNDE FARKLI KÖYLERDEN ALINAN YOĞURTLARDAN
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, BUNLARIN EPS
(EKZOPOLİSAKKARİT) ÜRETİM KABİLİYETLERİNİN BELİRLENMESİ VE BU
BAKTERİLER KULLANILARAK AYRAN ÜRETİMİNE UYGUN
KOMBİNASYONLARININ SEÇİLMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 11.09.2007 tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr. Şefik KURULTAY
(Danışman)

Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ

Prof. Dr. Levent ARIN

Prof. Dr. Hayri COŞKUN

Doç Dr. Muhammed ARICI

ÖZET

Ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri fermente süt ürünleri üretim teknolojisinde viskozite, tekstür ve emülsifiye edici etkileri sebebiyle büyük bir önem kazanmıştır. Bu etkiye bağlı kalarak, bu tez çalışması, ayran gibi su ilavesi ile üretilen, süte göre düşük kuru maddeli ürünlere doğal, gelişmiş reolojik özellikler ve stabilite sağlayabilecek uygun laktik asit bakterisi kültür kombinasyonlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Bu araştırmada, geleneksel yöntemlerle evde üretilmiş olan yoğurtlardan 45 örnek alınarak bu örneklerden laktik asit bakterileri (LAB) izole edilmiş ve 24 ayrı LAB izolatu hazırlanmıştır. Bu izolatları tanımlamak için API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri kullanılmıştır. Yoğurt ve ayrana özgü laktik asit bakterileri, API50 CHL test kiti ile tanımlanmışlardır. Bakteri izolatlarından, fermente süt ürünleri kültürlerinde kullanıldığı bilinen 22 tanesinin EPS (ekzopolisakkarit) üretim miktarları kontrol edilmiş ve üretilen EPS miktarlarının yüksek olduğu (28,94- 35,00 g/ L) belirlenmiştir. İzole edilen bakterilerden EPS üretim miktarlarına göre seçilen bakterilerin (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) birebir karışımından kültür kombinasyonları oluşturulmuştur. Kültürlerden sadece bir tanesinde, geleneksel yoğurt ve ayran kültürüne ait bir bakteri olmamasına rağmen, EPS üretim miktarı yüksek olduğu için deneme amacıyla *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* bakterisi kullanılmıştır

Hazırlanan kültürler ile ayran örnekleri üretilmiş ve elde edilen örneklerin fizikokimyasal ve duyuşsal analizleri yapılmıştır. Araştırmada; elde edilen dokuz örnekten 4 tanesi (2, 6, 7 ve 8 numaralı kültürler ile üretilmiş olan örnekler) duyuşsal değerlendirmede (görünüm, kıvam, tat/ koku) tam puan olarak öne çıkmışlardır. Burada, ayran örneklerinin fizikokimyasal değerleri arasında fark olmasına rağmen (sırasıyla en yüksek ve en düşük viskozite, YKM, yağ, protein, pH değerleri; 143- 70 saniye, 7,14-

6,83 g/ 100 g, 2,22- 2,13 g/ 100 g, 2,30- 2,21 g/ 100 g, 4,14- 3,86) benzer beğeni aldıkları görülmüştür.

Çalışmamızda duyuşal açıdan tam puanla değerlendirilen 4 örneğ düşük, orta ve yüksek EPS üretim yeteneğindeki LAB izolatlarının kombinasyonu olan kültürler ile üretilmiştir. Sadece yüksek EPS verimine sahip olan izolatlar ile hazırlanan kültür kullanılarak elde edilen ayran örneği 63 saniyelik viskozite değeri ile en düşük viskozite değerini vermiştir. Buna rağmen bu ürün duyuşal değerlendirmede ret edilmemiştir. Sadece düşük EPS verimine sahip olan izolatlar ile hazırlanan kültür kullanılarak elde edilen ayran örneği ise 133 saniyelik yüksek bir viskozite değeri göstermiştir.

Fizikokimyasal değerlerdeki bu farklılıklara rağmen duyuşal değerlendirmede (5- 3- 0 notlama sistemine göre) 4 ürünün tam puan olarak benzer beğeni düzeyinde bulunması ve bu ürünlerle birlikte çalışmadaki tüm ürünlerin ağızda dolgun his bırakmış olmasının, kültürler tarafından üretilen EPS miktar ve kalitesindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda EPS miktarının yanında kalitesinin son ürün kalitesine etkilerinin araştırılmasının uygun olacağı düşünölmüştür.

Tez çalışmaları ve yazımı 2003- 2007 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Tez dökümanı 119 sayfadan oluşmaktadır.

Anahtar kelimeler: Ekzopolisakkarit (EPS), Ekzopolisakkarit izolasyonu, Laktik asit bakterisi (LAB), API, Ayran, Viskozite

SUMMARY

In the fermented dairy product industry, lactic acid bacteria which produce exopolysaccharides, have a great importance with their effect on viscosity, texture and emulsification. In respect to that, this study was performed with the aim of defining favourable culture combinations which brings natural, better rheological properties and stability to the products like ayran which are produced with high water content and even less dry matter than milk.

In our study, lactic acid bacteria (LAB) were isolated from 45 home made yogurt samples and 24 LAB isolates were prepared. Identification of the isolates were made by using API 50 CHL and API 20 Strep test kit. API 50 CHL test kit was used for identification of bacterias specific for yogurt and ayran. EPS (exopolysaccharide) production value of 22 of bacteria isolates which known as typical for fermented dairy product ferment were analyzed and high EPS level (28,94- 35 g/ L) were determined. In respect to their EPS production levels, some of the isolated and identified bacteria (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) were chosen to prepare for ayran cultures. Only one of these cultures was prepared with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, just due to its high EPS production level and for testing purpose even if it was not a specific bacterium for yogurt and ayran.

In this research; 4 samples of prepared nine samples (2, 6, 7 and 8) were got highest score at sensorial analysis (consist of evaluation of aspect, texture, taste/ smell). In this case; it was observed that they had the same evaluation even if they have differences at their physicochemical figures (respectively maximum an minimum viscosity, nonfat dry matter, fat, pH values; 143- 70 second, 7,14- 6,83 g/ 100 g, 2,22- 2,13 g/ 100 g, 2,30- 2,21 g/ 100 g, 4,14- 3,86).

These ayran samples, got the highest score, were produced with the ferments composed of low, medium and high EPS producing LAB isolates. It was determined

that ayran sample produced with the ferment consist of only highest EPS producing LAB, showed the lowest viscosity (63 seconds). In spite of this, this product was not rejected on sensorial evaluation. On the other hand, ayran sample produced with the ferment consist of only lowest EPS producing LAB had high viscosity (133 seconds).

Although there are differences on physicochemical figures, it was thought that preference of 4 samples on sensorial evaluation (according to 5- 3- 0 scoring system) and having good mouth feeling for all other ayran samples, could be related with the level and quality of produced EPS. In respect to that thesis, it would be a right way to perform next studies on not only EPS producing level but also EPS quality.

All studies on this thesis and writing process were completed between years of 2003- 2007. Whole document is composed of 119 pages.

Key words: Exopolysaccharide (EPS), Isolation of exopolysaccharide, Lactic acid bacteria (LAB), API, Ayran, Viscosity.

ÖNSÖZ

Laktik asit üreten bakteriler süt ürünleri teknolojisinde, özellikle de yoğurt ve ayran gibi ürünlerin üretiminde vazgeçilmez unsurlar olarak yer almaktadırlar. Son yıllarda süt ürünlerinin endüstriyel olarak üretiminin artması, endüstriyel olarak üretilen ürünlerin, en az geleneksel yöntemlerle üretilen ürünlerdeki gibi müşteri beklentilerini karşılayabilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Müşteri beklentileri dendiğinde, ilk akla gelen özelliklerden birisi ürünün duyuşal özellikleridir. Duyusal özellikler sütün bileşimiyle doğrudan ilişkili olduğu gibi, süte uygulanan teknolojik işlemler (ısıt işlemler v.b.), fermentasyon sıcaklığı, kullanılan kültür, inkübasyon ve depolama sıcaklığı gibi pek çok faktörün etkisi altındadır. Bu faktörler içinde ürüne karakteristik özelliklerini kazandıran en önemli unsur olduğu için, kullanılan kültür ve özellikleri ön plana çıkmaktadır. Endüstriyel üretim, ürünlerin duyuşal özelliklerinin geliştirilmesinin yanında, karlılığın da göz önünde bulundurulması gerekliliğini ortaya çıkardığı için, kullanılan kültürün karakteristikleri çok daha büyük önem kazanmıştır.

Yoğurt ve ayran üretiminde kullanılan iki temel laktik asit bakterisi *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' dur. Bu bakterilerin farklı suşlarından hazırlanan kültür kombinasyonları süt ürünlerinin duyuşal özelliklerinin ortaya çıkmasında son derece etkilidir. Özellikle ekzopolisakkarit (EPS) üretim yetenekleri ve ürettikleri EPS miktarları son ürün karakteristikleri için belirleyici olmaktadır. EPS' lerin su tutma yetenekleri, ayran gibi su katılarak üretilen ürünlerde viskozite ve serum ayrılması gibi kalite kriterlerini de doğrudan etkilemektedir. Bu yeteneğin ayran üretim teknolojisinde ilave edilecek su oranını arttırabileceği düşüncesi, duyuşal özelliklerin yanında, karlılık faktörünün de desteklenebileceğini düşündürmektedir. Bu araştırma, bu düşüncüyü destekleyecek ve ayrana doğal, gelişmiş reolojik özellikler ve stabilite sağlayabilecek uygun laktik asit bakterisi kültür kombinasyonlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Tez araştırma ve çalışmalarında destek ve yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocalarım olmak üzere tım hocalarıma, çok değerli ağabeyim ve doktora arkadaşım Kemal Toku' a, Danone Lüleburgaz Fabrika Laboratuvarı alışanları, Yrd. Doç. Dr. Tuncay Gümüş, Yrd. Doç. Dr. Binnur Kaptan, Yrd. Doç. Dr. İbrahim akır ve sevgili arkadaşlarım Esra Yasemin, Av. Burcu Döner ve dua ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ	1
2.	KAYNAK ARAŞTIRMASI	9
2.1.	Süt ürünlerinin yapı özelliklerine etki eden faktörler	9
2.2.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ' in özellikleri	11
2.2.1.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	11
2.2.2.	<i>Streptococcus thermophilus</i>	11
2.2.3.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	12
2.3.	LAB EPS' leri ve özellikleri	12
2.4.	LAB' nin ürettikleri EPS çeşitleri ve kimyasal yapıları	15
2.5.	EPS' lerin fermente süt ürünlerinin yapısı üzerine etkileri	19
2.6.	Ayranın fizikokimyasal özellikleri	25
3.	MATERYAL	30
3.1.	Yoğurt örnekleri	30
3.2.	LAB izolatları	30
3.3.	MRS _{5,4} Agar	30
3.4.	%10' luk Laktoz çözeltisi hazırlanması	32
3.5.	M17 Agar	32
3.6.	M17 Broth	33
3.7.	MRS Broth	34
3.8.	Sistein (CTS) çözeltisi (Steril dilüsyon)	35
3.9.	Gram boyama çözeltileri	35
3.10.	% 2' lik Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) çözeltisi	36
3.11.	Gliserol	36
3.12.	API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri	36
3.13.	Ayran kültürleri	36
4.	METOD	37
4.1.	LAB izolasyonu	37
4.2.	Gram boyama	38

VIII

4.3.	Katalaz testinin yapılması	38
4.4.	İzolatların muhafazası	38
4.5.	İzolatların tanımlanması	39
4.6.	API Test kitleri ile tanımlamanın yapılması	40
4.6.1	API 50 CHL medium ve API 50 CH (<i>Lactobacillus- In vitro</i> diagnostik kullanımı için) ile <i>Lactobacillus</i> ve <i>Streptococcus</i> izolatlarının tanımlanması	40
4.6.2.	API 20 Strep (<i>Streptococcaceae</i> ve benzer organizmalar için tanımlama sistemi)	46
4.7.	İzolatların EPS üretim miktarının tespiti	54
4.8.	EPS üretim miktarları dikkate alınarak kültür hazırlanması	55
4.9.	Ayran örneklerinin üretilmesi	58
4.10.	Fizikokimyasal ve duyusal analizler	58
4.10.1.	Toplam kuru madde (TKM) tayini (ISO 6731)	59
4.10.2	Yağ tayini	60
4.10.3	Protein tayininin yapılması (BS EN ISO 8968- 1: 2002; Azot içeriği tayini- Kjeldahl metodu)	62
4.10.4.	Viskozite tayini	64
4.10.5.	Serum ayrılması kontrolü	65
4.10.6.	Duyusal değerlendirme	65
4.11.	İstatistikî değerlendirme	67
5.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	68
5.1.	İzole edilen ve tanımlanan laktik asit bakterileri	68
5.2.	LAB izolatlarının EPS üretim miktarları	68
5.3.	Ayran örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	71
5.3.1.	Ayran örneklerinin viskozite değerleri	71
5.3.2	Ayran örneklerinin yağsız kuru madde değerleri	76
5.3.3	Ayran örneklerinin yağ değerleri	82
5.3.4	Ayran örneklerinin protein değerleri	87
5.3.5	Ayran örneklerinin pH değerleri	90
5.3.6	Ayran örneklerinde serum ayrılması	94
5.3.7	Ayran örneklerinin duyusal özellikleri	94
6.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	97

7.	EKLER	102
7.1.	Ek 1. API 50 ile tanımlama tablosu	102
7.2.	Ek 2. API 20 Strep analitik profil indeksi	103
7.3.	Ek 3. Bakteri izolatlarının tanımları	104
7.4.	Ek 4. API 50 tanımlama tabloları	105
7.5.	Ek 5. API 20 Strep tanımlama tabloları	107
8.	KAYNAKLAR	108
9.	ÖZGEÇMİŞ	119

TABLULAR

Tablo 1.	Fermente sütlerin üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri	5
Tablo 2.	İskandinav lkelerindeki geleneksel fermente süt rnleri	6
Tablo 3.	LAB tarafından üretilen homopolisakkaritler	16
Tablo 4.	LAB' nin ürettiği heteropolisakkaritlerin yapıları	17
Tablo 4 (devamı).	LAB' nin ürettiği heteropolisakkaritlerin yapıları	18
Tablo 5.	MRS Agar (Difco, 288210) bileşimi	31
Tablo 6.	M17 Agar (Oxoid CM 785) bileşimi	32
Tablo 7.	M17 Broth (Merck) bileşimi	33
Tablo 8.	MRS Broth (Merck) bileşimi	34
Tablo 9.	API 50 CHL ve süspansiyon besiyerleri içerikleri	42
Tablo 10.	API 50 CH kuyucuk (strip) bileşimleri	42
Tablo 11.	API GP Medium (2 ml) bileşimi	47
Tablo 12.	API 20 Strep kuyucuk (strip) bileşimleri ve değerlendirme kriterleri	48
Tablo 13.	Bakteri izolatları	56
Tablo 14.	Kültür kombinasyonu ve EPS retim miktarları	57
Tablo 15.	Duyusal değerlendirme kriterleri	66
Tablo 16.	Bakteri izolatlarının EPS retim miktarları	69
Tablo 17.	Tekli ve karışık kültürlere ait EPS miktarları	70
Tablo 18.	Ayran önekleri viskozite değerleri (saniye)	72
Tablo 19.	Ayran önekleri viskozite değerlerine ait varyans analiz tablosu	74
Tablo 20.	Ayran önekleri viskozite değerleri Duncan testi analiz sonuçları	75
Tablo 21.	Ayran nekleri YKM değerleri (g/ 100g)	77
Tablo 22.	Ayran nekleri YKM değerlerine ait varyans analiz tablosu	79
Tablo 23.	Ayran nekleri YKM değerleri Duncan testi analiz sonuçları	80
Tablo 24.	Ayran önekleri yağ değerleri (g/ 100g)	82
Tablo 25.	Ayran önekleri yağ değerlerine ait varyans analiz tablosu	83
Tablo 26.	Ayran önekleri yağ değerleri Duncan testi analiz sonuçları	84
Tablo 27.	Ayran önekleri protein değerleri (g/ 100g)	87
Tablo 28.	Ayran önekleri protein değerlerine ait varyans analiz tablosu	88
Tablo 29.	Ayran önekleri protein değerleri Duncan testi analiz sonuçları	89

Tablo 30.	Ayran örnekleri pH değerleri	91
Tablo 31.	Ayran örnekleri pH değerlerine ait varyans analiz tablosu	92
Tablo 32.	Ayran örnekleri pH değerleri Duncan testi analiz sonuçları	92
Tablo 33.	Ayran örneklerinin duyuşal özellikleri	95

ŞEKİLLER

Şekil 1.	Yoğurt üretim akışı	2
Şekil 2.	Yoğurt ve süttten ayran üretimi	3
Şekil 3.	API test kitleri (API 50 CHL ve API 20 Strep)	40
Şekil 4.	Besiyeri ve süspansiyon şişelerinin açılması	43
Şekil 5.	API 50 CH takip tablosu	44
Şekil 6.	API 50 CHL ve API 50 CH ile identifikasyon	45
Şekil 7.	Besiyeri ve süspansiyon şişelerinin açılması	49
Şekil 8.	API 20 Strep inkübasyon sonu pozitif (+) reaksiyonlar	51
Şekil 9.	API 20 Strep inkübasyon sonu negatif (-) reaksiyonlar	51
Şekil 10.	API 20 Strep takip tablosu	52
Şekil 11.	API 20 Strep ile identifikasyon	53
Şekil 12.	Santrifüjlemenin gerçekleştirildiği Hettich marka santrifüj	54
Şekil 13.	EPS miktar tayini, 2. santrifüj işlemi sonu	55
Şekil 14.	Ayran kültür kombinasyonları ve viskozite değerleri (saniye)	73
Şekil 15.	Ayran kültür kombinasyonları ve YKM değerleri (g/ 100g)	78
Şekil 16.	Ayran kültür kombinasyonları ve yağ değerleri (g/ 100g)	83
Şekil 17.	Ayran kültür kombinasyonları ve protein değerleri (g/ 100g)	89
Şekil 18.	Ayran kültür kombinasyonları ve pH değerleri	93

KISALTMALAR

LAB	Laktik Asit Bakterileri
EPS	Ekzopolisakkarit
GRAS	Generally Recognised as Safe/ Genelde Güvenilir olarak Bilinen
CTS	Sistein çözeltisi
YKM	Yağsız Kuru Madde
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>

1. GİRİŞ

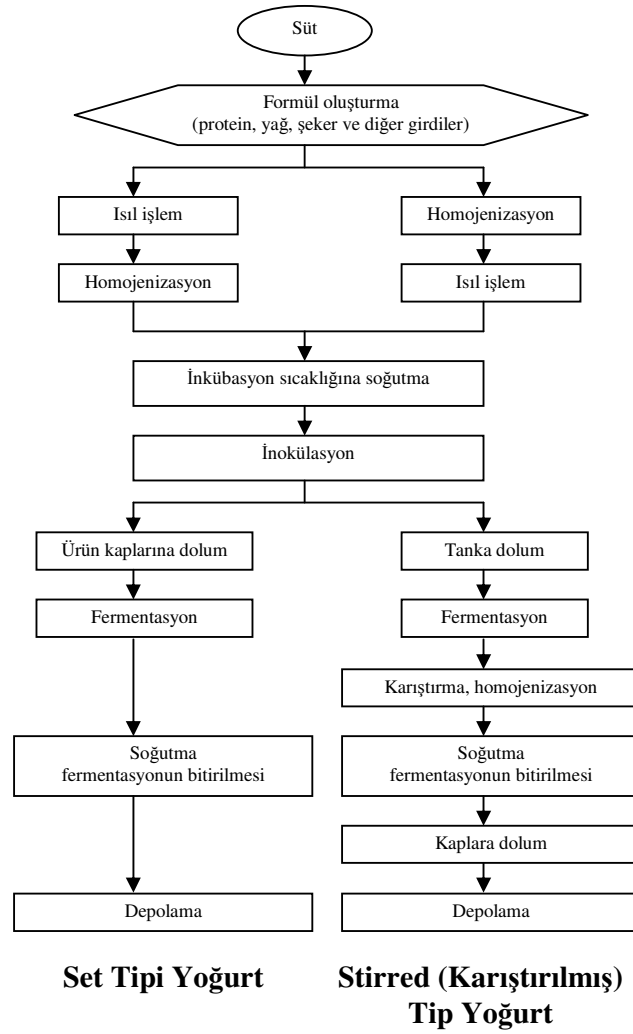
Laktik asit bakterileri (LAB) dünyada yaygın olarak süt, et, sebze gibi pek çok ürünün muhafazası, duyuşal özellikleri ve besin değerlerinin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Farklı aroma, tekstür ve sağılık etkisi olan çok çeşitli süt ürünleri, farklı teknolojiler ve starter kültürler kullanılarak elde edilebilmektedirler. Bugün hala yoğıurt üretiminde kullanılmakta olan iki temel laktik asit bakterisi *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*' dur.

Starter kültürlerin önemli özellikleri hızlı asidifikasyon, sütün mikrobiyal olarak muhafazası, ürüne özel aroma oluşturmaları, yapı oluşturma kapasiteleri ve sağılık etkileridir. Bakteri gelişimi sırasında laktozun fermentasyonu sütün asitliğinin artmasına sebep olur ve bu şekilde süt, sütün bozulmasına sebep olan bakterilere ve patojen bakterilerin gelişmesine karşı korunmuş olur. Asitlik gelişiminin bir diğıer etkisi pıhtı yapısını oluşturan süt proteinleri üzerindeki negatif yüklerin nötralizasyonudur. Asit aynı zamanda yoğıurt ve peynir gibi fermente ürünlerin kendilerine özgü taze ve hafif asit tatlarını verir. Bunun ötesinde LAB şeker, organik asitler, proteinler ya da yağları tipik aroma ve aroma bileşenlerine dönüştürürler (Ruas- Madiedo ve ark., 2002).

Fermente süt ürünleri sevilen duyuşal özelliklere sahip olmaları ve insan sağılığı üzerindeki olumlu fonksiyonel etkileri nedeniyle dünyada birçok ülkede giderek yaygın bir şekilde üretilip tüketilmektedirler. Üretim teknolojilerindeki hızlı gelişim yeni fermente süt ürünlerinin gelişimini de aynı paralelde etkilemekte ve bu yöndeki çalışmaları yoğunlaştırmaktadır. Ülkeden ülkeye farklılıklar göstermekle birlikte, fermente süt ürünü tüketiminin alışkanlık haline dönüşmesi, tüketimi de yine o ölçüde artırmaktadır. Günümüzde birçok yeni fermente süt ürünü üretilmekle birlikte, en çok tüketileni özellikle de ülkemizde en eski fermente süt ürünü olarak bilinen yoğıurttur (Akın, 1999).

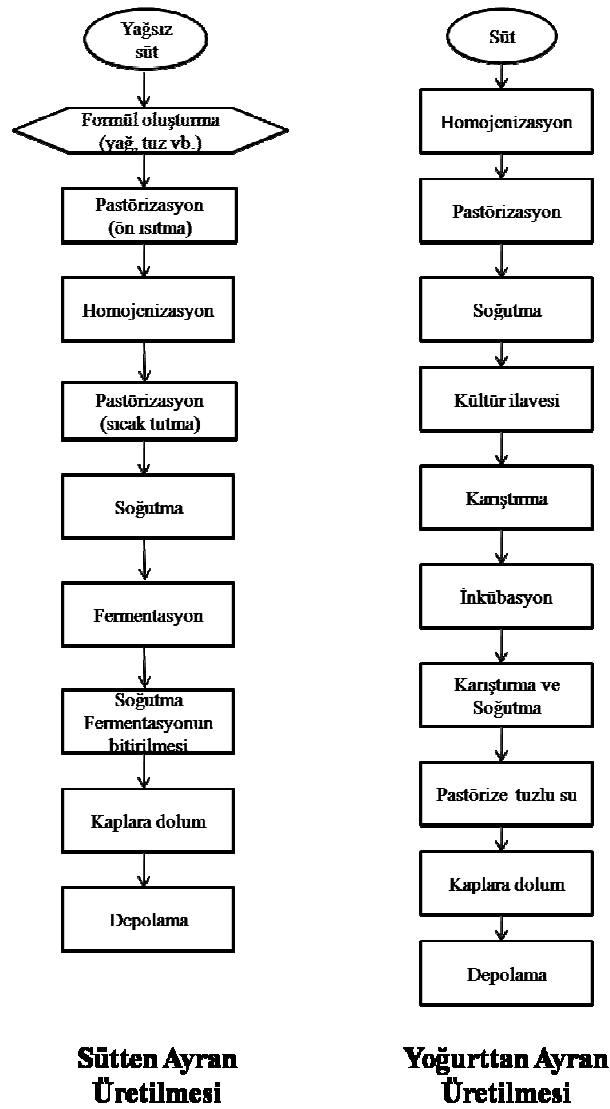
Yoğıurt endüstrisinde, tüketicilerin yumuşak ve kremi tekstüre sahip, karıştırılmış tipte yoğıurt ürünlerine artan ilgisi söz konusudur. Yoğıurt fermentasyonu boyunca sütte bulunan laktoz, ürünün pH' sının düşmesine sebep olan laktik asite

dönüşür. Bunun sonucu olarak pH 5.3' e ulaştığında kazein misellerinin stabil yapısı bozulur ve geri dönüşümsüz olarak pıhtılaşarak jel yapı oluşturur. Karıştırılmış tipte yoğurtlar, fermentasyondan sonra oluşmuş olan pıhtının uygun yöntemlerle homojenizasyonu ile üretilirler (Duboc ve Mollet, 2001). Set tipi ve karıştırılmış tipte yoğurt üretim basamakları Şekil 1' de özetlenmiştir.



Şekil 1. Yoğurt üretim akışı (Duboc ve Mollet, 2001).

Yoğurdun yanında ülkemizde en yaygın olarak tüketilen fermente süt ürünü geleneksel içeceğimiz ayrandır. Ayran, üretim prosesine bağlı olarak yoğurda su katılarak veya kuru maddesi ayarlanan süte yoğurt kültürü ilave edilerek içilebilir kıvamda hazırlanabilen geleneksel bir içeceğimizdir. Bu sebeple üretim prosesine bağlı olarak hammaddesi yoğurt veya süt olup ayranın karakteristik özellikleri yoğurt ve süttten etkilenmektedir (Atamer ve ark., 1999; Anonymous, 2006). Yoğurt ve süttten ayran üretim basamakları Şekil 2' de özetlenmiştir.



Şekil 2. Yoğurt ve süttten ayran üretimi (Atamer ve ark., 1999; Anonymous, 2006).

Dünyada çeşitli ülkelerde de ayrana benzeyen, düşük viskoziteli yoğurt sınıfında değerlendirilen ürünler üretilmektedir. Bu ürünler genel olarak “içilebilir yoğurt” ya da “laktik içecek” olarak adlandırılmaktadırlar (Tamime ve Robinson, 1999; Penna ve ark., 2001).

Sütün farklı LAB suşları ile fermentasyonu, farklı tekstür özelliklerine sahip son ürünlerin, örneğin kırılğan ya da sünen yapıda yoğurtların elde edilmesini sağlar. Bu duyuşal özellik fermentasyon boyunca besin ortamında üretilen makromoleküllerin (Ekzopolisakkaritler (EPS)) varlığı ile açıklanmaktadır (Raviart, 2003).

Belirli laktik asit bakterileri (LAB) süt gibi ortamlarda EPS sentezleyebilmektedirler (Cerning, 1990; De Vuyst ve Degeest, 1999; Ricciardi ve Clementi, 2000; Sikkema ve Oba, 1998). Özellikle yoğurt, içilebilir tipte yoğurt, peynir, fermente krema, sütlü tatlıların üretimi için EPS üreten LAB çok önemlidir (Bouzar ve ark., 1997; Cerning, 1995). EPS; son ürünün tekstür, ağızdaki his, tat ve stabilitesine katkıda bulunur. LAB’ nin bu özelliklerinden faydalanılan Kuzey Avrupa, Doğu Avrupa ve Asya’ da fermente süt ürünlerinin üretiminde temel rol oynayan LAB Tablo 1 ve Tablo 2’ de gösterilmiştir.

Tablo 1. Fermente sütlerin üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri (Duboc ve Mollet, 2001).

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

Tablo 2. İskandinav ülkelerindeki geleneksel fermente süt ürünleri (Duboc ve Mollet, 2001).

	İsveç	Norveç	Danimarka	Finlandiya
1	Långfil	Tettemelk		Viili
2	Filmjök	Kulturmek	Tykmælk	Talouspiimä
3	Lättfil	Skummet kulturmek		Rasvatonpiimä
4	Kärnmjök	Kjernemelk	Kærnemælk	Kirnupiimä
5	Gräddfil	Rømme	Crème fraîche	Kermapiimä
6	Lactofil		Ymer	Kokkeli

Mekanik etki, oluşan jel yapıyı bozacağı için pıhtı ve serum ayrılması üzerinde çok güçlü etkiye sahiptir. Fermente süt ürünlerinin tekstürünü geliştirmek ve serum ayrılmasını azaltmak için farklı çözümler öne sürülmüştür. Tekstür ve stabilite, kültür özellikleri (Rohm ve Kovac, 1994) ve üretim şartlarından etkilenirler. Ürün kalitesini geliştirmek için iyi bilinen teknolojik yaklaşımlar süt kuru maddesinin yağ, proteinler (Duboc ve Mollet, 2001) ya da şekerlerin (sakkaroz, fruktoz) ilavesi ile artırılması, yasalar izin verdiği takdirde pektin, nişasta, alginat, jelatin, gibi stabilizörlerin ilavesi şeklindedir. Bununla birlikte bu yaklaşımlar mümkün olduğunca düşük yağ, düşük şeker, daha ucuz ve daha az gıda katkıları ile üretilmiş ürünler yönündeki artan müşteri beklentisi ile uyuşmamaktadır. Bu zorluğa karşı yapılabilecek uygulamalar; kültürü uygun gelişim sıcaklığında inkübe etmek ve/ veya fermentasyonda starter kültür olarak kullanılan LAB' nin doğal olan EPS üretimini avantaj olarak kullanmak olabilir (Duboc ve Mollet, 2001; Ruas-Madiedo ve ark., 2002).

Son yıllarda LAB tarafından üretilen EPS' ler üzerinde çok sayıda inceleme yapılmıştır (Cerning, 1990, 1994, 1995; Ricciardi ve Clementi, 2000; Sikkema ve Oba, 1998; De Vuyst ve Degeest, 1999). Bu çalışmalar temel olarak EPS' lerin yapı ve kimyasal kompozisyonu, biyosentezi ve genetiği, mikrobiyal fizyolojisi, üretimi ve mühendisliğine odaklanmış ve aynı zamanda bazı uygulamaları dikkate almıştır.

EPS üreten LAB süt ürünlerinin reolojik özelliklerini geliştirmek için kullanıldıklarından fermente ürünlerde EPS' in yapı ile ilişkili fonksiyonunun daha iyi anlaşılması, bu biyopolimerlerin ileri dönemlerdeki teknolojik uygulamalarında çok önemlidir. Bunun ötesinde, büyüyen fonksiyonel gıdalar pazarı EPS' lerin insan sağlığı üzerine olası faydalı etkilerine ilgiyi arttırırken, bu doğrultudaki çalışmalar az sayıda ve *in vitro* denemelerle sınırlıdır. Bu genel bakış LAB tarafından üretilen EPS' lerin teknolojik ve fizyolojik (sağlığı destekleyen) etkinliği üzerine mevcut bilgiler ile alakalıdır (Ruas- Madiedo ve ark., 2002).

Hem lezzet ve hem de sağlık özelliklerinden dolayı çok tüketilen geleneksel fermente süt ürünlerinden ayran ülkemizde en çok tercih edilen içeceklerden birisidir. Gelişen endüstri ve beslenme alışkanlıklarının da etkisi ile ayranın ev tipi üretiminin dışında endüstriyel boyutta ve standart kalitede üretilebilmesi büyük önem arz etmektedir. Endüstride bu standardın sağlanması, endüstriyel üretimlere yönelik hazırlanmış ticari laktik asit kültürlerinin kullanılması ile sağlanmaktadır. Fermente süt ürünlerine kendilerine özgü görünüm, tat, koku, kıvam ve görünüm özelliklerini kazandıran kültürler yaygın olarak laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterilerinin fermente süt ürünlerine kendilerine özgü özellikleri kazandırmaları sadece laktik asit ya da aroma maddeleri üretmeleriyle ilgili değildir. LAB' nin ürünlere özellikle görünüm ve kıvam anlamında istenen özelliklerini sağlayan ekzopolisakkarit (EPS) üretim yetenekleridir. EPS' ler ürün yapı özelliklerini geliştiren doğal stabilizörler olarak adlandırılabilir. Dolayısıyla farklı kaynaklardan elde edilmiş ve katkı maddesi olarak değerlendirilen stabilizörler (keçi boynuzu, guar gam vb.) yerine tamamen ürüne özel kültürler tarafından üretilen doğal stabilizörler yardımıyla ürün elde edilmesi tercih edilmelidir. Bunun için de LAB' nin EPS üretim yetenekleri ve üretilen EPS özellikleri iyi bilinen bakteri suşlarının ve dolayısıyla kültürlerin belirlenmesi en önemli adımdır.

Günümüzde, geleneksel ürünlerimiz olan yoğurt ve ayranın endüstriyel üretimleri hazır ticari kültürler ile gerçekleştirilmektedir. Bu kültürler, yurtdışında üretilerek ticari ambalajları ile endüstriyel yoğurt ve ayran üretimine sunulmaktadır. Geleneksel ürünlerimizi, alışlagelmiş ağız tadı ile üretebilmek için en uygun yolun; ulusal gen kaynaklarımızdan yararlanılarak elde edilen LAB ile hazırlanmış kültürler kullanmak olduğuna inanmaktayız. Bu yolun, ürün özelliklerinin alışılan kalite ve

beğenide olmasını sağlamanın yanında, yerli üretim sayesinde; kültür maliyetlerinde ciddi ekonomik kazançları beraberinde getireceği, ülke varlıklarının yurtdışına çıkmasını da engelleyeceği açıktır.

Bu çalışmada LAB tarafından üretilen EPS' lerin yapı özellikleri ve sağlık etkilerinden çok üretim miktarları dikkate alınarak, yöresel olarak üretilen çeşitli yoğurtlardan izole edilip tanımlanan bazı LAB' nin kültür kombinasyonları oluşturulmuş ve geleneksel ürünlerimizden ayran için en uygun yapı, tat ve su tutma özelliğini sağlayacak en uygun kombinasyon seçilmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Süt ürünlerinin yapı özelliklerine etki eden faktörler

Fermente ürünler yüzyıllardır bilinmektedir ve çok çeşitli fermente ürünler tüketilmektedir. Bu ürünler, yapımlarında kullanılan sütün çeşidi (örn.: inek, keçi, manda sütü vb.), starter kültür ve üretim işlemlerine göre değişik özelliktedirler. Bu başlıklarda toplanan etkenler aslında çok daha detaylıdır ve bu etkenlerden herhangi birisindeki değişiklik ürünün karakteristik özelliklerini de değiştirebilir.

Fermente süt ürünlerinin yapısına etki eden faktörler aşağıdaki gibidir (Raviart, 2003):

- Sütün kuru madde oranı
- Sütün mikrobiyolojik kalitesi
- Isıl işlem sıcaklığı
- İnhibitör ya da koruyucu madde varlığı
- Kültürde kullanılan suş ve kullanılan oranı
- Bakteriyofaj varlığı
- İnkübasyon sıcaklığı
- Depolama sıcaklığı
- Organik asitlerin üretimi
- EPS ve proteinler arasındaki olası etkileşim
- Kıvam arttırıcı maddelerin/ stabilizatör katılması

Yoğurt üretimi için genelde inek sütü, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile fermente edilir (Tamime ve Robinson, 1999). Fermentasyon 40-42 °C' lerde 3- 6 saatte gerçekleştirilir. Sıcaklığın limitler

dışına çıkması ürün özelliklerinin değişmesi ile sonuçlanır. Fermentasyon, asit konsantrasyonu % 1,2 - 1,4' e ulaştığında soğutma yoluyla hızlı bir şekilde durdurulur. Bu şekilde ürünün asitliğinin istenen düzeyin üzerinde artmasının önüne geçilmiş olur.

Bakteriyofaj varlığı da özellikle endüstriyel olarak en çok dikkat edilmesi gereken noktalardan birisidir. Faj varlığının küçük ya da büyük miktarda olmasından çok, fermente ürünü üretmek için kullanılan laktik bakterilerinin tür ya da cinsine özgü faj olması önemlidir. Çünkü fajın atak yapıp çoğalabilmesi için faja özel bakterinin bulunması gerekmektedir. Fermente ürünün kültüründe bulunan bakteriye özel fajın varlığı söz konusu olduğunda, faj bakteriye atağa geçerek bakterinin inhibe olmasına ve dolayısıyla fermentasyonun kısmen ya da tamamen gerçekleşmemesine sebep olur. Çünkü faj, fermentasyon süresi boyunca her atağında kendisinden 20 ila 80 faj üretebilir. Bu şekilde de tüm bakteri popülasyonuna atakta bulunabilir (Anonymous, 1999).

Fermentasyon boyunca üretilen laktik asit sütün pH' sını düşürür ve bunun sonucunda misellerdeki kalsiyum ve fosfatın çözünürlüğü artarak miselleri destabilize eder. Buna ilave olarak kazein misellerinin elektrik yükü izoelektrik noktasına düşer. Bu sebeple, kazein hidrofobik etkileşimler sebebiyle çöker ve içi serum ile dolu boşlukları olan sürekli bir ağ yapı oluşturur. Mekanik bir etki böyle bir jeli kırdığında, kazein ağ serum içinde dağılan jel parçalarına bölünür. Jel partiküllerinin dağılım viskozitesi serum fazının viskozitesine orantılıdır (Potanin, 1991; Potanin ve Uriev, 1991; Zoon ve van Marle, 1998). Bunun bir sonucu olarak; EPS üretmeyen bir kültür suyu ile fermente edilmiş, karıştırılmış tipte bir yoğurdun viskozitesi düşüktür ve tekstür granüllü olmaya yatkındır.

EPS üretebilen kültürler ile yapılan yoğurtlar, EPS' in protein kompleksinde serumun kuvvetli tutulmasına imkân verdiği için, yüksek su tutma kapasitesine sahip olur (Duboc ve Mollet, 2001). EPS üreten LAB sadece yoğurt ve yoğurt benzeri içecekler için değil, aynı zamanda peynir üretimi için de önemlidir. Örneğin bazı *Lactobacillus helveticus* suşlarının EPS üretmeleri ve bu yolla ürünün su tutma özelliğini arttırmaları sebebiyle Mozzarella peyniri üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (Low ve ark., 1998).

2.2. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*' in özellikleri

2.2.1. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

Yoğurt, İsviçre tipi ve İtalyan (örn., Grana) peynirlerinin üretimi için diğer starter kültürler ile birlikte kullanılan termofilik bir starterdir. Metakromatik granülleri vardır. Argininden amonyak üretmez. Seroloji grubu E' dir. D(-) laktik asit üretir. *L. lactis*' e çok benzer fakat onun kadar çeşitli şekeri fermente edememesiyle ayrılır. Laktoz ve sellobiyozu fermente edebilir; fakat amigdalin, maltoz ya da manitolü fermente edemez. Gelişim için bazı vitaminler ve amino asitlere ihtiyaç duyar. Optimum gelişme sıcaklığı yaklaşık 40 °C' dir (Robinson, 1985).

2.2.2. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus, yoğurt, İsviçre tipi ve İtalyan peynirlerinin üretiminde diğer starterler ile birlikte kullanılan termofilik starterdir. Sütteki inhibitör maddelerin tespitinde kullanılabilir. Viridans gruptadır. Kanlı agarda γ - reaksiyonu verir. Gram pozitif, homofermentatif bir bakteri olup L(+) laktik asit üretir. Minimum gelişme sıcaklığı 19 ila 21 °C iken optimum gelişme sıcaklığı 42 – 43 °C' dir. Maksimum gelişme sıcaklığı (50 °C' de gelişir fakat 53 °C' de gelişmez) ve ısıya dayanımı (60 °C' de 30 dakika canlı kalır) ayırıcı özelliğidir. Buna karşı % 4' lük NaCl ve 9,6' nın üzerindeki pH' da gelişmeye dayanıklı değildir. Karışık besin ihtiyacı gösterir (Robinson, 1985; Raviart, 2003).

2.2.3. *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*

Başta Emmental peyniri olmak üzere, İsviçre tipi ve İtalyan peyirlerinin ve bazı sert peynirlerin üretiminde diğer starterler ile birlikte kullanılan termofilik starterdir. Normal olarak kolonileri tırtıklı, 1- 3 mm çapında ve beyazdan açık griye kadar pigmentsizdir. Metakromatik granüller metilen mavisi ile gösterilebilir.

Gram pozitif, genişliği 2 µm' den küçük olan çubuk şeklinde bir bakteridir. Serolojik grubu E' dir. D (-) laktik asit üretir. Argininden amonyak üretmez. Salisilin, sakkaroz ve manitolü fermente edebilir fakat amigdalin ya da sellobiyozu fermente edemez. Özellikleri ve parçalanma ürünleri bakımından *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus'* a çok benzer. Gelişme faktörü olarak bazı vitaminlere ve aminoasitlere ihtiyaç duyar. Optimum gelişme sıcaklığı 40 - 43 °C' dir; ancak 15 - 52 °C' ler arasında da gelişebilirler (Robinson, 1985; Metin, 1999).

2.3. LAB EPS' leri ve özellikleri

Pek çok diğer bakteri gibi LAB hücredeki yerlerine bağlı olarak sınıflandırılan farklı tipte polisakkaritler üretebilme yeteneğindedirler. Bunlardan hücre duvarı dışından salgılananlar ekzoselüler (hücre dışı) polisakkaritler ya da EPS' ler diye adlandırılırlar. Bunlar yapışkan tutucu bir tabaka oluşturabilirler ve kapsül polisakkaritleri olarak adlandırılırlar. EPS' ler aynı zamanda hafifçe yapışabilir ya da salgı olarak ortama salgılanabilir (Cerning, 1994).

EPS biyosentezi, nükleotid şekerlerin üretimi ve birincil karbonhidrat metabolizma enerjisi (de Vos, 1996; De Vuyst ve Degeest, 1999) ile bağlantılıdır. Çeşitli çalışmalarda EPS üretiminin gelişim ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda; *Lactobacillus sakei* 0-1 (van den Berg ve ark., 1995), *L. rhamnosus* C83 (Gamar ve ark., 1997), *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 (Grobben ve ark.,

1995) ve *S. thermophilus* (De Vuyst ve ark., 1998) bakteri suşları ile yapılan çalışmalarda heteropolisakkarit üretimi ile biyokütle oluşumunun paralel olduğu tespit edilmiştir. EPS üretimi için optimum pH, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un sürekli kültürlerindeki gelişme için optimum olan pH' ya yakın (pH 6,5 civarı) bulunmuştur. Sıcaklık ile ilgili olarak da; bakteri gelişimi için kısmen uygun olan sıcaklık şartlarının çoğu zaman EPS sentezi için en uygun olduğu tespit edilmiştir (Cerning ve ark., 1992; Gancel ve Novel, 1994a). Grobber ve ark. (1995) da benzer şekilde *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un EPS üretimi için optimum sıcaklığı, gelişim için optimum olan sıcaklığa yakın bulmuşlardır.

Bouzar ve ark. (1997), fermentasyon parametrelerinin, EPS üretimi ve viskozite için karışık suşlu kültürlerde kullanılan *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fenotipinde olduğundan daha az önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Bakteriyel EPS' ler kendilerini üreten mikroorganizmalar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Doğal ortamda kurumaya, fagositozis ve protozoa tarafından parçalanma, faj etkisi, antibiyotikler ya da toksik bileşenler ve ozmotik basınç gibi olaylara karşı koruyucu etkilerinin olma ihtimali vardır. EPS' ler aynı zamanda hücre tanımlanması, yüzeye yapışma ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilimlerin oluşturulmasında da rol oynarlar (Looijesteijn ve ark., 2001). LAB' nin ürettiği EPS' lerin ekolojik fonksiyonu tam olarak tanımlanamamıştır ve muhtemelen karmaşıktır; fakat hücreye yapışma ve farklı ortamlarda hücrenin korunması ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. *Streptococcus thermophilus* ve *S. mutans* tarafından üretilen EPS' ler bakteri kolonizasyonu ve dış plağı oluşumunda rol oynarlar (Cerning, 1990). Looijesteijn ve ark. (2001)' nin bir araştırması; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NZ4010 tarafından üretilen EPS' lerin bakteriyi bakteriyofajlar, metal iyonları, nisin ve lizozim gibi çeşitli antimikrobiyal faktörlere karşı koruduğunu göstermiştir. Bu ekolojik fonksiyonlardan farklı olarak, LAB' nin ürettiği EPS' ler çeşitli fermente ürünlerin üretiminde teknolojik öneme sahiptirler. EPS oluşturan *S. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* içeren "sünme özelliğindeki- ropy" kültürlerin kullanımı, yoğurt üretiminde tekstürü geliştirmek, su salmayı önlemek ve yoğurt viskozitesini arttırmak için alışıldık bir

uygulamadır. “Viili” gibi iskandinav süt ürünlerinde, EPS üreten *Lactococcus* suşları kullanılmaktadır.

Tekstür oluşumundaki bu role ilave olarak, fermente süt ürünlerinin insan sağlığı üzerine pozitif fizyolojik etkilerinin; LAB’ nin çeşitli hücre duvarı bileşenlerine, özellikle hücre dışı (ekstraselüler) polisakkaritlere bağlanabileceği öne sürülmüştür. Günümüzde probiyotik bakteri içeren fonksiyonel gıdaların gelişmesi, hem sağlık ve hem de ekonomik faydaları ile büyüyen bir pazar durumundadır. Probiyotikler sağlığa faydalı olan canlı mikrobiyolojik gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde kullanılmakta olan probiyotik bakteriler; bazıları EPS’ leri üreten, ağırlıklı olarak *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*’ lardır. Aslında ileri sürülen, EPS üreten suşların sağlığı destekleyen etkileri bu biyopolimerlerin biyolojik aktiviteleri ile ilişkilidir. Ekzopolisakkaritler; prebiyotik ya da antitümör, antiülser, immünomodüle edici ya da kolesterol düşürücü aktiviteleri sayesinde insan sağlığına katkıda bulunabilirler. Pek çok çalışma, LAB ve fermente süt ürünlerinin antikarsinojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Kitazawa ve ark. (1991), liyofilize *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonunun farelerde Sarcoma-180 tümörlerinin gelişiminin durması ile sonuçlandığını, fakat LAB suşunun S-180 tümör hücrelerine karşı yapılan “*in vitro*” çalışmalarında sitotoksiste göstermediğini bulmuşlardır. Bu bilgi, bu suşun tümör gelişmesini önlemedeki etkinliğini immün aktivitesi ile ilişkilendirmiştir. Bu araştırmacılar *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 tarafından üretilen salgı maddesinin, antitümör etkisindeki temel bileşen olabileceğini gerçekçi kabul etmektedirler. Daha sonraki bir çalışma, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20’ nin salgı maddesi ürünleri sayesinde B-hücresi mitojenik aktivitesinin belirgin şekilde arttığını göstermiştir. Nakajima ve ark. (1995) da *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495 EPS’ sinin, farelerde intraperitoneal olarak artan özel antikorların üretimini yönettiğini tespit etmişlerdir. Bu da EPS’ in bağışıklık sistemini destekleyebildiğini göstermektedir. EPS üreten *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073R-1 yoğurt kültürünün antitümör aktivitesi için arabulucu olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Ruas- Madiedo ve ark., 2002).

2.4. LAB' nin ürettikleri EPS çeşitleri ve kimyasal yapıları

Hücrel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar;

- hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsül polisakkaritleri (CPS),
- hücre duvarının bir bileşeni olan lipopolisakkaritler (LPS)
- dış ortama salgılanan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan gevşek bağlar ile bağlanmış polisakkaritlerdir (LAM- lipoarabinomannan).

CPS ve LPS, genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadırlar. LAM ise gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Ancak laktik asit bakterileri (LAB) gibi GRAS (Generally Recognised as Safe/ Genelde Güvenilir olarak Bilinen) mikroorganizmalar da CPS ve LAM üretiminde rol aldıkları gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadır (Koçer, 2002).

LAB tarafından üretilen EPS' ler kimyasal bileşimleri bakımından iki kategoriye ayrılabilir: Sadece tek tip monosakkarid içeren homopolisakkaritler ve şeker olmayan moleküller de içerebilen çeşitli boyutlardaki ditheptasakkaritlerin tekrarlayan birimlerden oluşan heteropolisakkaritler.

Homopolisakkaritler dört grupta toplanabilir: α -d-glukanlar, β -d-glukanlar, fruktanlar ve poligalaktan gibi. Bu gruplar Tablo 3' de gösterilmiştir.

Tablo 3. LAB tarafından üretilen homopolisakkaritler (Ruas Madiedo ve ark., 2002)

EPS	Suş	Bağ ¹
α -D-glukanlar		
Dekstran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	α -D-Glcp ² (1→6)
Mutan	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>	α -D-Glcp ² (1→3)
Alternan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	α -D-Glcp (1→3)/(1→6)
β -D-glukanlar	<i>Pediococcus</i> ssp. <i>Streptococcus</i> ssp.	β -D-Glcp (1→3)
Fruktanlar		
Levanlar	<i>Streptococcus salivarius</i>	β -D-Frup (2→6)
İnülin benzeri	<i>Streptococcus mutans</i>	β -D-Frup (2→1)
Poligalaktan	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> H414	α -D-Galp/ β -D-Galp ³

¹Glc: glukoz; Gal: galaktoz; Fru: fruktoz.

²En az bağlarının %50 si

³Galaktozun pentamerik tekrarlayan bir ünitesini içeren homopolisakkarit

Suşlara özel farklılıklar, dallanma derecesi ve farklı bağlantı noktalarına göre değişir (De Vuyst ve Degeest, 1999). Homopolisakkaritler yüksek molekül ağırlığına sahiptir; fakat kaynaklarda bildirilen bazı değerler, sulu çözeltilerinde toplanmaları sebebiyle tahmin edilenin üzerinde olmuştur. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F' in ürettiği dekstranın (α -glukan) toplanmamış moleküllerinin ortalama molar kütlesi 6,2 ila 7,1x10⁶ Da arasında değişir. *S. mutans*' ın pek çok suşu tarafından üretilen Levanlar daha yüksek bir molekül ağırlığına sahiptir (2,7- 21,6x10⁶ Da) ve *S. mutans* JC2 12,4 x10⁶ Da molekül ağırlıklı inülin benzeri bir fruktan sentezler (Cerning, 1990). Homopolisakkaritlerin üretimi sakkaroz gibi özel bir bileşimin varlığını gerektirir ve monosakkarit ünitelerinin birleşmesi bakteri hücrelerinin dışında olur (Cerning, 1990). Bu biyopolimerler yüksek miktarlarda üretilirler. Örneğin *Lb. reuteri*' nin bir suşu (*Lb. reuteri* LB 121) yaklaşık 10 g/ L homopolisakkaritin iki çeşidini, başlıca D- glukoz ya da D- fruktoz oluşturabilir (van Geel-Schutten ve ark., 1999).


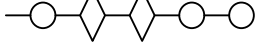
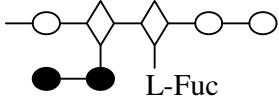

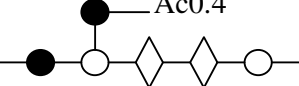
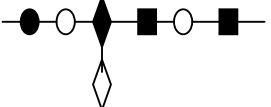
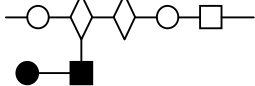
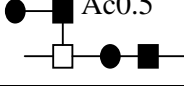
Dekstran - sükröz gibi salgılanan enzimlerin polimerize ettiği homopolisakkaritlerin üretimi, eğer yeterli sükröz varsa, enzim substratı mevcutsa ve pH ve sıcaklık enzim aktivitesi için doğru değerlerde ise litrede belli gramda EPS değerlerine ulaşılabilir. Aksi durumda, LAB' nin ürettiği heteropolisakkarit miktarı çok daha düşük olur (Cerning, 1990; Cerning ve ark., 1990).

Heteropolisakkaritler, çok çeşitli mezofilik ve termofilik LAB tarafından oluştururlar ve çoğunlukla D- glukoz, D- galaktoz ve L- ramnoz ve nadir durumlarda N- asetilglukozamin (GlcNAc), N- asetilgalaktozamin (GalNAc) ya da glukoronik asitin (GlcA) bir kominasyonunu içeren tekrarlayan birimlerden oluşurlar. Bazen fosfat, asetil ve gliserol gibi karbonhidrat olmayan bileşenler bulunur. Heteropolisakkaritlerin yapılarındaki bileşenler Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4. LAB' nin ürettiği heteropolisakkaritlerin yapıları¹

	Tekrarlayan üniteler	Referanslar
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 291		Faber ve ark., (2001a)
<i>Lb. helveticus</i> Lb161		Staaf ve ark. (2000)
<i>Lb. helveticus</i> K16		Yang ve ark. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> C83		Vanhaverbeke ve ark. (1998)
<i>Streptococcus</i>		
<i>S. macedonius</i> Sc136		Vincent ve ark. (2001)
<i>S. thermophilus</i> SFi 20		Navarini ve ark. (2001)

Tablo 4 (devamı). LAB' nin ürettiği heteropolisakkaritlerin yapıları¹

	Tekrarlayan üniteler	Referanslar
<i>Streptococcus</i>		
<i>S. thermophilus</i> Rs		Faber ve ark. (1998)
<i>S. thermophilus</i> Sts		
<i>S. thermophilus</i> MR-1C		Low ve ark. (1998)
<i>S. thermophilus</i> S3		Faber ve ark., (2001b)
<i>S. thermophilus</i> 8S ²		Faber (2000)
<i>S. thermophilus</i> EU20		Marshall ve ark. (2001)
<i>Lactococcus</i>		
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. cremoris NIZO B39		van Casteren ve ark., (2000a)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. cremoris NIZO B891		van Casteren ve ark., (2000b)

¹Bu tablo önceki çalışmalarda tanımlanmış yapıları içermemektedir (De Vuys ve Degeest, 1999; Ricciardi ve Clementi, 2000; Sikkema ve Oba, 1998) ■ β -D-glukoz; □ α -D-glukoz; ● β -D-galaktoz; ○ α -D-galaktoz; ◆ β -L-ramnoz; ◇ α -L-ramnoz; (Rib) D-riboz; (Fuc) fukoz; (Nac) N-asetil, (Ac) asetil; (G) gliserol.

²Sug; 6-O-(3', 9'-dideoxy-D-threo-D-alto-nononic acid-2'-yl)- α -D-glucopyranose' dur.

Tekrarlayan ünitelerin belirleyici olduğu heteropolisakkarit sentezi ve homopolisakkarit sentezi arasındaki ayırım hücre içinde oluşturulur ve isoprenoid glikozil taşıyan lipitler prosese katılır (Cerning, 1990). Tekrarlayan üniteler membran üzerinde boydan boya yerleşmiştir ve daha sonra hücre dışında polimerize olurlar. Van Kranenburg (1999) NIZO B40 EPS' in setezlenme döngüsü için bir işleyiş modeli önermiştir. Heteropolisakkaritlerin molar kütlesi $4,0 \times 10^4$ ila $6,0 \times 10^6$ Da arasında değişir.

Heteropolisakkarit üretimini, bakteri gelişim fazı, besin ortamı bileşimi (karbon ve nitrojen kaynağı), pH ve sıcaklık etkilemektedir (De Vuyst ve Degeest, 1999).

Laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS' ler değişen oranlarda galaktoz, glukoz ve ramnoz içeren nötral heteropolisakkaritlerdir (Cerning ve ark., 1986 ve 1988). Buna ilave olarak, *S. thermophilus*' un EPS' sinde N- asetil galaktozamin tanımlanmış ve *L. helveticus*' un EPS' sinde N- asetil glukozamin bulunmuştur (Bouzar ve ark., 1997).

2.5. EPS' lerin fermente süt ürünlerinin yapısı üzerine etkileri

Genel olarak iki yapı karakteristiğinden bahsedilebilir:

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

Elastikiyet: Bu, bir bozulma meydana geldikten sonra maddenin kendisini tekrar toparlaması özelliğidir. Bu özellik sıkı bir yapı ve kıvamlı bir fermente ürün anlamına gelmektedir.

Her iki özellik de bir ürünün organoleptik kalitesi ve çekici görünümü ve ağızda bıraktığı his açısından önemlidir (Skriver ve ark., 1993). Ürün yapısı; sıvı fazdaki (serum) biyo-koyulaştırıcı varlığı, temel olarak kazeinlerden oluşan bir protein jelinin varlığı, proteinler ve polisakkaritler arasındaki etkileşim, bakteri hücreleri ve EPS' lerin bakterilere bağlandığı bağların bulunması, serbest su moleküllerinin miktarını azaltan suyun bağlanmasından etkilenir ve sonuç olarak da serum fazındaki EPS konsantrasyonu artar (Duboc ve Mollet, 2001).

EPS, doğal biyo-koyulaştırıcı özelliği ile fermente bir ürünün reolojisini geliştiren önemli bir fonksiyona sahiptir ve fiziksel bir stabilizatör olarak suyu bağlayarak su salmayı azaltır. Bunun yanında fonksiyonel etki EPS' in bileşimi, yapısı

ve başta iyon ve proteinler olmak üzere süt bileşenleri ile etkileşimine bağlıdır (Duboc ve Mollet, 2001).

Belirtilen bu özellikler sebebiyle saflaştırılmış bir EPS' in yapı özelliklerinin fermente bir üründe görülen EPS yapısından farklı olacağı beklenebilir. Her iki sebeple de fermentasyon boyunca ortaya çıkan jel oluşumu ve EPS biyosentezi büyük ölçüde çapraz bağlar içeren bir ağ yapı oluşumu ile sonuçlanır.

Duboc ve Mollet (2001), nötral EPS içeren ürünün viskozitesinin zamanla arttığını ve polisakkarit üretmeyen bir suş ile elde edilen ürünün viskozitesinden 10 misli daha fazla değerlere ulaştığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada nötral EPS' in viskoziteye katkısı olduğu, fakat elastikiyete katkısı olmadığı görülmüştür. Sadece polisakkaritler serum fazında iyi çözüldüğü zaman pozitif yüklü proteinler ile zayıf etkileşime girmiştir. Diğer taraftan; negatif yüklü polisakkaritler, elektrostatik etkileşim yoluyla pozitif yüklü kazeinler ile etkileşime girerek ağı kuvvetlendirdikleri için elastikiyete katkıda bulunmuş fakat viskoziteye katkıda bulunmamışlardır. Bu durumun, negatif yüklü polisakkaritlerin serum fazında çok zayıf dağılması sonucunda viskoziteye çok küçük bir katkıda bulunmuş olmasıyla açıklanmıştır.

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

kısıtlanabileceği ancak bunun ürün viskozitesi üzerine ters bir etkisinin olabileceğini düşündürmüştür (Shihata ve Shah, 2002).

Çeşitli kültürler ile yapılan yoğurtlardan izole edilen EPS miktarları ile ürün viskoziteleri arasında direkt ilişki bulunamamıştır. Bu; ürün viskozitesinin artan süne özelliği ile arttığı, ancak EPS konsantrasyonu ile bir ilişki bulunamamış olan önceki çalışmalar ile benzerdir (Faber ve ark., 1998). Bununla birlikte, Cerning ve ark., (1986, 1988) viskozite ve üretilen EPS miktarı arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Fakat bu ilişki her zaman çok açık değildir.

Bakteri suşlarının EPS üretim özelliğinin stabil olmaması sebebiyle, viskozite ve EPS verimindeki sonuçların tekrar elde edilmesi zordur (Bouzar ve ark., 1997). EPS üretim yeteneğinin stabil olmaması ve bununla ilişkili olarak yapıyı daha az etkileme özelliği, farklı laktik asit bakterileri üzerinde de incelenmiştir (Cerning ve ark., 1988). Bu çalışmalarda daha düşük viskoziteler daha az EPS üretimi ile ilişkili olmuştur. Bouzar ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada sütü; EPS üretebilen ve üretemeyen, tek bakteri suşu ve farklı bakteri suşları içeren kültürler ile fermente ederek ve glukono- δ -lakton ilavesi ile süte jel yapısı kazandırarak örnekler elde etmişlerdir. Elde ettikleri örneklerin viskozitelerini, örnek yapılarını bozmadan ve karıştırarak yapılarını bozduktan sonra ölçmüşlerdir. Karıştırma sonrasında ölçülen viskozite değerleri karıştırma öncesinde ölçülenlerden daha düşük olmuştur. Bununla birlikte karıştırma sonrasında dahi EPS üreten suşlarla elde edilen viskozite değerleri, EPS üretmeyen suşlarla fermente edilmiş sütlerde ya da glukono- δ -lakton ile asitlendirilerek elde edilen jelde ölçülenlerden daha yüksek (170 ila 230 mPa.s arasında) olmuştur.

Karışık suşlu kültürlerde protokooperasyonun EPS üretimi, EPS kompozisyonu ve tekstür gelişimi üzerine etkisi hakkında bilgi az olmakla birlikte, yapılan bir çalışmada; *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187' nin heterojen hücre yapısının, tek suşlu kültürlerde EPS üretimi ve tekstür geliştirme yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bouzar ve ark., 1996).

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

belirlenmiştir (Cerning ve ark., 1986). Başka bir çalışmada; üç karışık suşlu kültürün hepsi tek suşlu kültürlerin oluşturduğu viskoziteden daha yüksek viskozite oluşturmuşlardır. Karışık suşlu kültürler ile yapılan bu çalışmada, farklı bir sonuç elde edilmiştir; çünkü burada EPS verimi viskozite ile ilişkili olmamıştır (Bouzar ve ark., 1997). Bu ilişki farkı, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un ana suşu ve W varyantını içeren karışık suşlu kültürler ile elde edilen sonuçlar dikkate alındığında çok açıktır. İlk üretilen 110 mg EPS/ L için 390 mPa.s viskozite ve ikinci üretilen 240 mg EPS/ L için 220 mPa.s viskozite elde edilmiştir. Bu sonuçlar üretilen EPS miktarının dikkate alınması gereken tek unsur olmadığını göstermiştir.

pH' nın süt proteinleri tarafından oluşturulan pıhtının yapısı üzerine oldukça etkili olduğu ve EPS miktarlarının fermente sütlerin viskozite ve yapısını etkileyen tek faktör olmadığı çok iyi bilinmektedir. Bununla birlikte Bouzar ve ark. (1997)' nin yaptıkları bir çalışmada; fermentasyonun 6. saatinde viskozite (St/ Lb W, St/ Lb P ve St/ Lb 1187 için sırasıyla 170, 270 ve 350 mPa.s) ve buna karşılık gelen pH (4,1, 4,0 ve 4,1) değerlerini karşılaştırılmışlardır. Buna göre tespit edilen viskozitelerin daha çok salgılanan EPS' lerden etkilendiği açıktır. pH 4,0 de kimyasal olarak asitlendirilmiş jelin viskozitesi 90 mPa.s ve EPS üretmeyen kültürlerin viskozitesi yaklaşık 100 mPa.s olmuştur.

Karıştırma öncesi en yüksek EPS verimi ve en düşük viskoziteye sahip olan fermente süt ürününün, karıştırmaya karşı diğerlerinden çok daha dayanıklı olması, karıştırılmış tipte yoğurtların üretiminde EPS üreten suşların kullanımının avantaj olduğunu göstermiştir. Bu kültürü oluşturan LAB' nin farklı fizikokimyasal özelliğe sahip bir EPS üretmiş olabileceğinin de bir göstergesidir.

Kırılan/yapısı bozulan yoğurtlar için mekanik uygulama etkisi daha çok pıhtının yapısı (reolojisi) ve serum ayrılması üzerine olur. Serumun viskozitesi kırılan/yapısı bozulan yoğurdun yapısını (reolojisini) etkiler ki bu da serum EPS' leri üzerine çalışmasını önemli kılar. Bu yüzden EPS üretemeyen bir suş ile üretilmiş bir set yoğurdun viskozitesi zayıftır ve tekstür granüllü yapıda olmaya meyillidir (Duboc ve Mollet, 2001).

Bouzar ve ark. (1997); *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* P' nin EPS üretiminin duraklama fazı boyunca devam ettiği ve daha sonra fermentasyonun 10,5 ve 24. saatleri arasında viskozite düşüşü ile birlikte keskin bir şekilde düştüğünü tespit etmişlerdir. Bu sonuç, *S. thermophilus* gibi diğer laktik asit bakterileri için de ileri sürülmüş olduğu gibi, EPSyi parçalayabilen enzimlerin varlığını gösterebilir (Cerning ve ark., 1988).

Bir EPS uygulamasının başarısı; su bağlama yeteneği, proteinler ile etkileşim ve süt serum fazı viskozitesini arttırmak olarak tanımlanabilir. EPS, yapı ve kıvam artırıcı etki gösterebilir ve bunun sonucunda da gıda katkılarının kullanımını engeller. Fermente ürünlerde süt bileşenleri ve EPS arasındaki etkileşim mekanizması çok iyi anlaşılammış olmasına rağmen, viskozite ve EPS miktarı son ürünün fiziksel özelliklerini geniş ölçüde belirlemiştir. LAB' nin ürettiği EPS' lerin tadı yoktur. Fakat bir fermente ürün çok daha viskoz hale geldiği zaman, ağızda kalma ve damak ile temas süresi ve tat algısı artar. Amaç, bir ürüne hoş bir görünüm sağlamak, su salmayı önlemek, kremi ve sıkı bir yapı sağlamak ve iyi bir damak tadı kazandırmaktır. Bununla birlikte tek tip EPS' in üretimi tüm yapı özellikleri için yeterli olmayabileceği için bir ya da daha fazla starter kültür tarafından çeşitli EPS' lerin üretilmesi gerekebilir. Böylece bir son ürünün yapısını kesin olarak belirlemek ve bir ülkeden diğerine değişebilen müşteri tercihlerini karşılamak mümkün olur. Farklı LAB' den elde edilen polisakkaritler kompozisyonlarında, fonksiyonlarında, molekül yapılarında, kararlılıklarında ve proteinlerle etkileşim yeteneklerinde büyük farklılıklar gösterdikleri için EPS konsantrasyonları ve viskozite arasında net bir ilişki tanımlanmamıştır (Welman ve Maddox, 2003).

Daha önce de belirtildiği gibi fermente süt ürünlerinin kalitesine etki eden pek çok unsur vardır. Bunların başta geleni, elde edilmek istenen ürüne uygun kültür ve bakteri suşlarının seçilmesidir. Bunu destekleyen inkübasyon süresi, sıcaklığı, kullanılan besin ortamının bileşimi gibi diğer unsurlar viskozite ve yapı özelliklerinin oluşumunda belirleyici olmaktadır. Viskozite yanında yapıya çok etkili olan sünme özelliği; kültürdeki suşlar ve belirtilen diğer tüm etkenlerden etkilenmektedir. Viskozite de sünme de LAB' nin EPS üretimi ile alakalıdır. Mårtenson ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada; iki farklı LAB' nin süt olmayan, yulaf bazlı besin ortamındaki glikoz tüketimleri farklı olmuş (besin ortamındaki glikozun % 30 ve % 40' ı tüketilmiş)

olmasına rağmen viskozitedeki artış her iki suş için de hemen hemen aynı olmuştur. Her ne kadar bu iki parametre de EPS üretimi ile ilişkili ise de bu durum iki parametrenin EPS üretim aşamalarıyla ilişkili farklı tipte etkileşimde olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmada; fermentasyon süresinin son aşamasında her iki suş için de viskozite düşmüştür. Bu şekildeki bir azalmanın büyük olasılıkla fermentasyon süresi boyunca karıştırma olmamasından kaynaklanan besin ortamındaki homojen olmayan yapıya bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Viskozitedeki düşüşün de EPS' in kısmi hidrolizinden kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir. Benzer tespitler daha önceki bazı çalışmalarda diğer EPS üreten LAB suşları için de tespit edilmiştir (De Vuyst ve Deegest, 1999).

Farklı iki çalışmada ise; sünme özelliği gösteren suşlar ile yapılan yoğurtların yapı oluşumu ve kıvamının, EPS miktarındaki artış ile azaldığı tespit edilmiştir (Hassan ve ark., 1996; Marshall ve Rawson, 1999). Bununla birlikte yine Hassan ve ark. (1996)' nın çalışmasında; sünme özelliği gösteren kültürlerle üretilen yoğurtların su salma eğiliminin azaldığını ve en yüksek su tutma kapasitesini gösterdikleri tespit edilmiştir.

Van Marle ve Zoon (1995), sünme özelliği olmayan LL yoğurt kültürünün (90 mg/ L) sünme özelliği olan RR kültürü (101 mg/ L) ile hemen hemen aynı miktarda polimer ürettiğini göstermişlerdir. Oysa bu iki tip yoğurdun viskozitesinde büyük bir farklılık gözlenmiştir.

Güzel-Seydim ve ark. (2005), sünme özelliği gösteren kültürlerin ürün viskozitesinde gelişmeyi sağlayan yüksek molekül kütleli EPS sentezleyebildiklerini ve sünme özelliği gösteren EPS üretme yeteneğindeki kültür ile (B- 3) inoküle edilmiş süttten elde edilen yoğurt viskozitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. De Vuyst ve ark. (2003), sünme özelliği gösteren *Streptococcus thermophilus* LY03' ün yüksek miktarda yüksek molekül kütleli EPS ürettiği ve fermente sütte yüksek viskozite oluşturduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte bazı araştırmacılar tarafından EPS üretimi ve viskozite arasında bir ilişki gözlenmediği bildirilmiştir (Faber ve ark., 1998; Sebastiani ve Zelger, 1998; Shihata ve Shah, 2002).

Beal ve ark. (1999), en viskoz yoğurtları, fermentasyonu uzun olan bir *Streptococcus thermophilus* suşu kullandıklarında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu suşun düşük sıcaklık ve asitlik aktivitesinde EPS üretebildiği bulunmuştur.

EPS üretiminin genetik olarak kararlı olmaması da endüstriyel uygulamalarda ciddi bir problemdir. Çeşitli çalışmalar üretimde kayıp ya da düşüş, ya da EPS kompozisyonunda değişiklik olduğunu bildirmektedir (Bouzar ve ark.,1996). Yüksek inkübasyon sıcaklığı, inokülasyon oranı, kültürlerin birçok kere zenginleştirilerek tekrar kültürünün alınması gibi faktörlere göre EPS üretim stabilitesi farklılık göstermektedir. Bu amaçla bu bakterilerden istenilen sonucu alabilmek için tüm üretim basamaklarında standarda bağlı kalınmalıdır (Kılıç ve ark., 2003).

Pekçok çalışma *S. thermophilus*' un uzayan inkübasyon sonrasında EPS miktarlarının düştüğünü göstermiştir (Cerning ve ark., 1988, 1990; Gancel ve Novel, 1994b; De Vuyst ve ark., 1998; Degeest ve De Vuyst, 1999; Pham ve ark., 2000). Fermentasyon boyunca gerçekleşen bu düşüşün fiziksel ya da kimyasal faktörlerdeki bir değişiklik ile ilişkili olduğu ancak glikohidrolazların aktivitesi ile ilgili olmadığı ileri sürülmüştür. Örneğin EPS düşüşü daha yüksek fermentasyon sıcaklıklarında daha az belirgin olmuştur ve *S. thermophilus* LY03 fermentasyonları için pH 4,9' da son derece dikkat çekici olmuştur (De Vuyst ve ark., 1998).

Pham ve ark. (2000) EPS veriminin, *Lactobacillus rhamnosus* R hücreleri laktozda geliştiğinde, glukozda geliştiğinden daha belirgin şekilde düştüğünü tespit etmişlerdir. Cerning ve ark. (1988) bu EPS düşüşünün polimeri hızla parçalayan bir enzim sebebiyle olduğunu ve bu enzimin muhtemelen bir glukohidrolaz olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

2.6. Ayrannın fizikokimyasal özellikleri

Daha önce de belirtildiği gibi, ayrannın kalitesi; üretiminde hammadde olarak kullanılan süt ve yoğurt kalitesinden etkilenmektedir (Atamer ve ark., 1999). Bu

noktada ayranın bu özelliği temel alınarak, hem ayran ve hem de yoğurt özelliklerine ilişkin literatür bilgilerine yer verilmiştir.

Ayran duyusal değerlendirme parametreleri de düşünüldüğünde, ayran kalitesi için bahsi geçen en önemli unsurlar viskozite ve bunun yanında serum ayrılmasıdır (Köksoy, 2003).

Viskozite, sıvıların kıvamını tanımlamada kullanılan bir olgudur ve bilindiği gibi sıvıların akmaya ya da karıştırmaya karşı direnci olarak ifade edilir (Anonymous, 1991; Anonymous, 1998). Serum ayrılması da ayran gibi fermente süt ürünlerinin stabilitesinin belirlenmesinde önemli bir parametredir (Tonguç, 2006). Serum ayrılması sıvı fazın jel fazdan ayrılması (Harwalkar ve Kalab, 1986) ve değişik büyüklükteki kazein partiküllerinin yerçekimi kuvveti ile çökmesi şeklinde tanımlanmıştır (Gülümser, 1986).

Serum ayrılmasının başlıca sebepleri olarak;

- Hammadde kalitesi (Atamer ve ark., 1999),
- Ayranın kuru madde ve yağ değerlerinin düşük olması (Tonguç, 2006; Sodini ve ark., 2004),
- Yüksek inkübasyon sıcaklığı ve hızlı asit oluşumu (Köksoy, 2003),
- Kullanılan kültür (Duboc ve Mollet, 2001),
- Jelin hızlı karıştırılması (Köksoy, 2003),
- Asit üretim miktarı ve protein ağ yapısının / jel yapı oluşması (Duboc ve Mollet, 2001),
- Ayran protein (kazein) partikülleri ve yerçekimi ilişkisinde destekleyici olan depolama şartları (sıcaklık, süre vb.) (Gülümser, 1986).

Harwalkar ve Kalab (1986), yoğurdun kuru maddesinin % 10' dan % 30' a çıkarılmasıyla serum ayrılmasının azaldığını belirtmişlerdir. Sodini ve ark. (2004), sütün bileşiminin, starter kültürlerin ve uygulanan proseslerin yoğurda etkilerini derledikleri çalışmada; süt yağının yoğurdun jel yapısında yer aldığını, yağ oranının serum ayrılmasını azalttığını, viskoziteyi % 20 ila % 60 arasında arttırdığını bildirmişlerdir.

Depolama sırasında serum ayrılmasını azaltmak, kıvamı ve beyazlığı arttırmak amacıyla yoğurt sütü homojenize edilmektedir (Lucey ve Singh, 1998; Köksoy, 2003). Kıvamı arttırmada proteinlerden sonra en etkili bileşen yağdır. Keogh ve O' Kennedy (1998), homojenize edilen süttten yapılan yoğurtta; yağ, protein kaplı yağ küreciği haline geldiğinden yağın serum ayrılmasını azalttığını bildirmişlerdir.

Yoğurt üretiminde yapıyı geliştirmek amacıyla süte ısıl işlem (90- 95 °C, 5- 10 dakika) uygulanmaktadır (Schmidt ve ark., 1985; Benezech ve Maingonnat, 1994). Yüksek sıcaklığa ısıtılmayan sütlerden yapılan yoğurtlarda aşırı serum ayrılması görülmektedir (Lucey, 2001). Lucey ve Singh (1998), ısıtılmamış sütlerden yapılan asit süt jellerinin gevşek olduklarını belirtmişlerdir. Isıtılmış süttten yapılan yoğurt yapısının daha sıkı ve serum ayrılmasına daha dayanıklı olduğu belirtilmektedir (Harwalkar ve Kalab, 1986; Velez- Ruiz ve Cánovas, 1997).

Düşük sıcaklık uzun süre (tankta ısıtma, 85 °C, 10- 40 dakika) ısıl işlem uygulanan sütlerden üretilen yoğurtların yüksek sıcaklık kısa süre (UHT, 140 °C, 2- 8 saniye) ısıl işlem uygulanmış sütlerden elde edilen yoğurtlara göre daha yüksek viskoziteye sahip olduğu bulunmuştur (Parnell- Clunies ve ark., 1986).

Özellikle ayran gibi içilebilir fermente süt ürünlerine doğal stabilizatör etkisi yapan EPS' in verimi ve fermentasyon boyunca yapı ve miktar olarak korunması enzimler ile yakından ilgilidir. Bu ilişkiyi doğrulamak ve bu etkiyi olumlu yönde kullanmak üzere Escalante ve ark. (2002), farklı enzimler ve sünme özelliği gösteren EPS üretme yeteneğindeki farklı bakteri suşları üzerinde çalışmışlardır. Bahsedilen bu çalışmada; *S. thermophilus*' un EPS üretimindeki kaybın ve normalden fazla EPS üretiminin; nükleotid-şeker katalizörlerinin sentezine katkıda bulunan enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Buna ilave olarak; fosfoglukomutaz, UDP-galaktoz 4 epimeraz ve UDP-glukoz pirofosforilaz enzim aktiviteleri artan mutant bir suş da, genetik değişiklik yoluyla, sünme özelliği gösteren bir suşun normalden fazla EPS üretmesine sebep olmuştur.

pH değeri, tuz miktarı ve tuzun tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Gallegos ve Franco, 1999). Schkoda ve ark. (1999), asidifikasyondan önce süte, farklı konsantrasyonlarda sodyum klorür (NaCl) ilave ederek kazeinlerin yapısal stabilitesini

incelemişlerdir. Süte ilave edilen NaCl' ün serum tutma kapasitesini arttırdığı ve viskoziteyi düşürdüğü belirlenmiştir. Viskozitedeki düşüş kazein misellerinin yüzeyinde oluşturulan itme kuvvetinden dolayı daha az topaklanma eğilimine bağlanmıştır. Ayran ve benzeri fermente süt ürünlerinde depolama sırasında proteinlerin birbiriyle etkileşmeleri ve topaklaşarak çökmeleri sonucunda serum ayrılması görülmüştür (Lucey ve ark., 1999).

Köksoy (2003); ayranın yapısal özelliklerinin stabilizör katkısıyla iyileştirilmesi üzerine yaptığı bir çalışmada, beş farklı ticari markalı ayran örneğine ait yağsız kuru madde değerlerinin % 5,5- 6,3 aralığında değiştiğini tespit etmiştir. Aynı ayran örneklerindeki tuz miktarı da % 0,78- 0,82 olarak tespit edilmiştir. Örneklerin ilk günde ölçülen pH' ları da 3,6- 4,2 arasında değişmiştir. Bu çalışmada ticari ayran örneklerinin beşer günlük aralıklar ile ve 15 gün boyunca serum ayrılması kontrolü de yapılmıştır. Kontrolün 1. gününde 1 ila 3 ml olan serum miktarının 10. kontrol gününden itibaren kontrol edilen ayran hacminin % 20' i seviyesine (9 ila 12 ml) ulaştığı görülmüştür. Aynı çalışmada ticari yoğurtlara farklı oranlarda su ve tuz katılarak ayranlar hazırlanmış ve bu ayranlarda 15 günlük depolama sonunda kuru madde artıp, tuz oranı azaldıkça serum ayrılmasının azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmanın bu basamağında %30 su ilavesi ile hazırlanan ayranların 15. kontrol gününde, ilave edilen tuz oranına göre değişen, 0 ila 5 ml serum ayrılması tespit edilmişken bu değerler % 50 su ilavesi ile hazırlanan ayranlarda 7 ila 12 ml' ye kadar yükselmiştir. Bu sonuçlara rağmen aynı ayran örneklerinin yapılarında kıvam anlamında herhangi bir değişiklik tespit edilmediği bildirilmiştir.

Köksoy (2003); liyofilize kültür ve yoğurttan inokülasyon yöntemleri ile de ayran yapmış ve kültür hazırlama ve inokulum hazırlanması anlamında özellikle liyofilize kültürlerle tekrarlanabilirliğin zor olduğunu bildirmiştir. Stabilizör kullanımında tekrarlanabilirliğin daha iyi olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca duyu değerlendirmede, kültür kullanılarak üretilen ayranlarda belirgin bir ekşilik hissedildiği bildirilmiştir.

Tonguç (2006); probiyotik ayran üretimi üzerine farklı probiyotik kültürler ile hazırladığı tam yağlı ayranların kuru madde ve protein değerleri arasındaki farklılığın

istatistiksel olarak önemli bulunduğunu ($p < 0,05$), ancak ayranların yağ oranlarında herhangi bir değişime neden olmadığını ($p > 0,05$) bildirmiştir. Bu çalışmada üretilen tam yağlı ayranlarda 10 günlük depolama süresi boyunca herhangi bir serum ayrılmasının gözlenmediği belirtilmiştir. Aynı araştırmada üretilen yarım yağlı ayranlarda ise sadece ayranların protein değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu ve depolamanın 5. gününde 2. ve 3. örneklerde serum ayrılmasının gözlemlendiği bildirilmiştir.

3. MATERYAL

3.1. Yoğurt örnekleri

Araştırmada Trakya Bölgesindeki farklı köylerden (Karacaoğlan, Terzili, Kuzuçardağı, Oruçlu, Sipahi, Gazi Mehmet, Sultan Şah) 47 yoğurt örneği alınmıştır. Burada, ticari kültür kullanılmadan, evde üretilmiş yoğurt örneklerinin alınmasına dikkat edilmiştir. Yoğurtların taze yapılmış ve mümkün olduğunca koyu kıvamlı olması dikkat edilen diğer husus olmuştur. Örnekler, steril şartlarda, steril kaplara yaklaşık 100 g alınmış, soğuk kutularda muhafaza edilmiş ve örnek alınmasını müteakip 5 saat içinde analize alınmıştır.

3.2. LAB izolatları

LAB izolatları, köylerden alınan yoğurt örneklerinden, uygun seçici besiyerleri yardımıyla izole edilmiş, özel tanımlama testleri kullanılarak tanımlandıktan ve EPS üretim miktarları belirlendikten sonra araştırmada kullanılmışlardır.

3.3. MRS_{5,4}Agar

Lactobacillus izolasyonu için pH' sı 5,4' e ayarlanmış MRS Agar kullanılmıştır. MRS_{5,4}Agar, pH' sı 5,4' e düşürülmüş MRS Agar (Difco, 288210) ile hazırlanmıştır. MRS Agar (Difco, 288210) ticari besiyerinin bileşimi 1 L besiyeri için Tablo 5' de verilmiştir.

Tablo 5. MRS Agar (Difco, 288210) bileşimi

Bileşen	Bileşim miktarı (g/ L)
Proteaz pepton No: 3	10,0
Sığır eti ekstraktı	10,0
Maya ekstraktı	5,0
Dekstroz	20,0
Polysorbat	1,0
Amonyum sitrat	2,0
Sodyum asetat	5,0
Magnezyum sülfat	0,1
Manganez sülfat	0,05
Dipotasyum fosfat	2,0
Agar	15,0

MRS Agar (Difco, 288210)' dan 70 g tartılmış, tartılan miktar 1000 ml distile suda çözüldürülmüştür. Çözelti, sürekli karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve besiyerinin tamamen berrak şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş besiyerinin pH' sı sitrik asit ilavesi ile 5,4' e ayarlanmıştır. Bu işlem sırasında karıştırıcı ısıtıcı yardımıyla çözünmüş besiyeri sürekli karıştırılarak besiyerinin sıcaklığı ve sıvı fazı korunmuştur. pH kontrolü 25 °C sıcaklıkta yapılmıştır. pH ayarlandıktan sonra besiyeri şişelere dağıtılarak 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavlama işlemi sonunda pH' nın, 25 °C' de, 5,4 ± 0,1 olduğu kontrol edilmiştir.

Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C' ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Anonymous, 2002 a).

3.4. % 10' luk Laktoz çözeltilisi hazırlanması

Streptococcus izolasyonunda kullanılan M17 Agar (Oxoid CM 785)' ın hazırlanmasında % 10' luk laktoz çözeltilisi kullanılmıştır. Laktoz çözeltilisi hazırlanırken; laktoz (Oxoid L70)' dan 10 g tartılmış ve 100 ml suda çözüldürülmüştür (Anonymous, 2002b).

3.5. M17 Agar

Streptococcus izolasyonunda M17 Agar (Oxoid CM 785) kullanılmıştır. M17 Agar (Oxoid CM 785) ticari besiyerinin bileşimi 1 L besiyeri için Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6. M17 Agar (Oxoid CM 785) bileşimi

Bileşen	Bileşim miktarı (g/ L)
Tripton	5,0
Soya pepton	5,0
Et ekstraktı	5,0
Maya ekstraktı	2,5
Askorbik asit	0,5
Magnezyum sülfat	0,25
Di- sodyum- β - gliserofosfat	19,0
Agar	11,0

M 17 Agar (Oxoid CM785)' dan 48,25 g tartılmış, tartılan miktar 950 ml distile suda çözüldürülmüştür. Çözelti, sürekli karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve besiyerinin tamamen berrak şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş besiyeri 50 °C civarına soğutulmuştur. Soğutulan besiyerine, % 10' luk laktoz çözeltisinden 50 ml ilave edilerek dikkatlice karıştırılmıştır. Daha sonra besiyeri şişelere dağıtılarak 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavlama işlemi sonunda pH' nın, 25 °C' de, $6,9 \pm 0,2$ olduğu kontrol edilmiştir.

Besiyeri hazırlandıktan sonra hemen kullanıldığı için 45 °C' ye soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Anonymous, 2002 b).

3.6. M17 Broth

Streptococcus zenginleştirmesinde M17 Broth (Merck) besiyeri kullanılmıştır. M17 Broth (Merck) ticari besiyerinin bileşimi 1 L besiyeri için Tablo 7' de verilmiştir.

Tablo 7. M17 Broth (Merck) bileşimi

Bileşen	Bileşim miktarı (g/ L)
Soya unu peptonu	5,0
Et peptonu	2,5
Kazein peptonu	2,5
Maya ekstraktı	2,5
Et ekstraktı	5,0
D (+) laktoz	5,0
Askorbik asit	0,5
Na- β - gliserofosfat	19,0
Magnezyum sülfat	0,25

M17 broth toz besiyerinden 42,5 g tartılarak 1 L distile su içinde çözüldürülmüştür. Kullanım amacına uygun olarak deney tüplerine ve/ veya numune kaplarına uygun hacimlerde (10 ila 100 ml) dağıtılarak 121 °C’ de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Kullanılacak besiyerleri oda sıcaklığına kadar soğutulularak kullanıma hazır hale getirmiştir. Stoklanması gereken besiyeri kalmış olduğu durumlarda buzdolabı sıcaklığında en fazla 1 hafta muhafaza edilmiştir.

3.7. MRS Broth

Lactobacillus zenginleştirmesi ve çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan kültürlerin fermentasyon için zenginleştirilmesinde MRS Broth (Merck) besiyeri kullanılmıştır. MRS Broth (Merck) ticari besiyerinin bileşimi 1 L besiyeri için Tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. MRS Broth (Merck) bileşimi

Bileşen	Bileşim miktarı (g/ L)
Kazein peptonu	10
Et ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
D (+) glikoz	20
Di- potasyum hidrojen fosfat	2
Tween®80	1
Di- amonyum hidrojen sitrat	2
Sodyum asetat	5
Magnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,04

MRS broth toz besiyerinden 52,2 g tartılarak 1 L distile su içinde çözüldürülmüştür. Kullanım amacına uygun olarak deney tüplerine ve/ veya numune kaplarına uygun hacimlerde (10 ila 100 ml) dağıtılarak 121 °C’ de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Kullanılacak besiyerleri oda sıcaklığına kadar soğutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Stoklanması gereken besiyeri kalmış olduğu durumlarda buzdolabı sıcaklığında en fazla 1 hafta muhafaza edilmiştir.

3.8. Sistein (CTS) çözeltisi (Steril dilüsyon)

Yoğurt örneklerinin mikrobiyolojik analizler için seyreltilmelerinde steril sistein (CTS) çözeltisi kullanılmıştır. Sistein çözeltisi hazırlanırken 1 g tripton ve 8,5 g sodyum klorid tartılarak 1000 ml distile suda çözüldürülmüştür. Elde edilen çözeltinin 25 °C’ deki pH’ sı kontrol edilmiştir. pH 7,00 olması gerektiği için, eğer pH 7,00 değil ise sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ilavesi ile pH 7,00’ e ayarlanmıştır.

Hazırlanan çözelti deney tüplerine 9,0 ml’ lik miktarlarda dağıtılmış ve 121 °C’ de 20 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Çözeltiler, buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmiştir. CTS tüpleri kullanılmadan önce 100 ± 2 °C’de 20 ± 5 dakika süreyle su banyosunda bekletilmiştir. Homojen hale getirmek için de elle karıştırılmıştır.

3.9. Gram boyama çözeltileri

Gram boyamada kullanılan reaktif çözeltiler set halinde BioMérieux’ den temin edilmiştir.

3.10. % 2' lik Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltilisi

2 ml analitik saf (%35' lik) Hidrojen peroksit (H₂O₂) 100 ml' lik balon jojeye aktarılmıştır. Balon joje içeriği distile su ile çizgisine tamamlanmıştır. Balon joje, meydana gelen ısınma sebebiyle oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve yine distile su ile çizgisine tamamlanmıştır. Çözelti 24 saat bekletildikten sonra kullanılmıştır.

3.11. Gliserol

Ticari olarak satılan gliserol alınarak 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda steril edildikten sonra araştırmada kullanılmıştır.

3.12. API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri

API test kitleri (API 50 CHL ve API 20 Strep) LAB' nin tanımlanması için gerekli tüm reaktifleri ile birlikte BioMérieux' den temin edilmiştir. Çalışma sırasında yoğurt kültürüne özgü bakterilerinin tanımlamasında API 50 CHL' nin kullanılması gerektiği de belirlenmiştir.

3.13. Ayran kültürleri

Ayran kültürleri, tanımlamaları yapıldıktan sonra belirlenmiş olan EPS üretim miktarlarına göre seçilmiş LAB izolatlarının birebir karıştırılması ile elde edilmiştir.

4. METOT

4.1. LAB izolasyonu

Laktik asit bakterilerinin izole edilmesi için yoğurt örnekleri CTS (steril dilüsyonlar) kullanılarak 10^{-6} dilüsyon oranına kadar seyreltilmişlerdir. 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyon oranındaki tüplerden ekim yapılmıştır. Ekimlerde *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* izolasyonu için pH' sı 5,4' e ayarlanmış MRS Agar (Difco 288210), *Streptococcus thermophilus* izolasyonu için besiyerinin litresine 50 ml %10' luk (m/ v) laktoz çözeltisi ilave edilen M 17 Agar (Oxoid CM785) besiyerleri kullanılmıştır (Anonymous, 2002 a, 2002 b).

Yoğurt örneklerinin besiyerine inokülasyonun yapıldığı andan itibaren, *Lactobacillus* izolasyonu için MRS agar besiyerinde geliştirilerek incelemeye alınan bakteriler MR1, MR2, MR3, MR4,..., *Streptococcus* izolasyonu için M17 agar besiyerinde geliştirilerek incelemeye alınan bakteriler de M1, M2, M3, M4,..., tanımlamaları ile adlandırılmıştır. Bu tanımlamalar, araştırmanın tüm aşamalarında aynı şekilde kullanılmıştır. Ürünlerin üretilmesi için gereken kültürlerin hazırlanması aşamasında da kültürlerin hangi bakterilerden oluştuğu belirtilirken izolatlar için yine aynı tanımlamalar kullanılmıştır.

Petri kutuları, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* izolasyonu için anaerobik ortamda 37 °C' de 5 gün, *Streptococcus thermophilus* izolasyonu için aerobik ortamda 37 °C' de 3 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda elde edilen kolonilerden saf bakteri stoğu hazırlayabilmek için birer tane alınıp *Streptococcus thermophilus* için M 17 broth (Merck 15029), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* için MRS broth (Merck 10661) besiyerine aktarılmıştır. Tüplere aktarma işleminden önce, koloniler üzerinde gram boyama ve katalaz testleri (Ellner, 2001) uygulanmış, Gram pozitif ve katalaz negatif koloniler değerlendirmeye alınmıştır.

4.2. Gram boyama

Temizlenip alev ile fikse edilen lam üzerine steril öze ucu ile distile su aktarılmıştır. Gram boyama yapılacak olan bakteri kolonisi steril öze ile lam üzerine alınarak lamdaki su yardımı ile dağıtılmış ve ince bir tabaka haline gelmesi sağlanmıştır. Lam, üzerine sürülen tabaka kuruyuncaya kadar kendi haline bırakılmıştır. Kuruma gerçekleştikten sonra lam, hızla iki üç kez alev üzerinden geçirilmiştir. Daha sonra sırasıyla aşağıdaki adımlar takip edilerek Gram Boyama (HUCKER'e göre Kristalviolett- Safranin boyaması) işlemi gerçekleştirilmiştir (Ellner, 2001);

Kurutma ile kontrole hazırlanan preparata immersiyon yağı damlatılarak 100' lük objektif ile kontrol yapılmıştır. Mavi renkli hücreler Gram (+), kırmızı- pembe renkli hücreler Gram (-) olarak tanımlanmıştır (Ellner, 2001).

4.3. Katalaz testinin yapılması

Araştırmada besiyeri üzerinde gelişmiş koloniden steril öze yardımı ile boş ve steril petri plağı içine aktarılmıştır. % 2' lik H₂O₂ çözeltisinden bir iki damla koloni üzerine damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlenmiştir. Gaz çıkışı olan koloniler Katalaz (+) ve gaz çıkışı olmayan koloniler Katalaz (-) olarak tanımlanmıştır.

4.4. İzolatların muhafazası

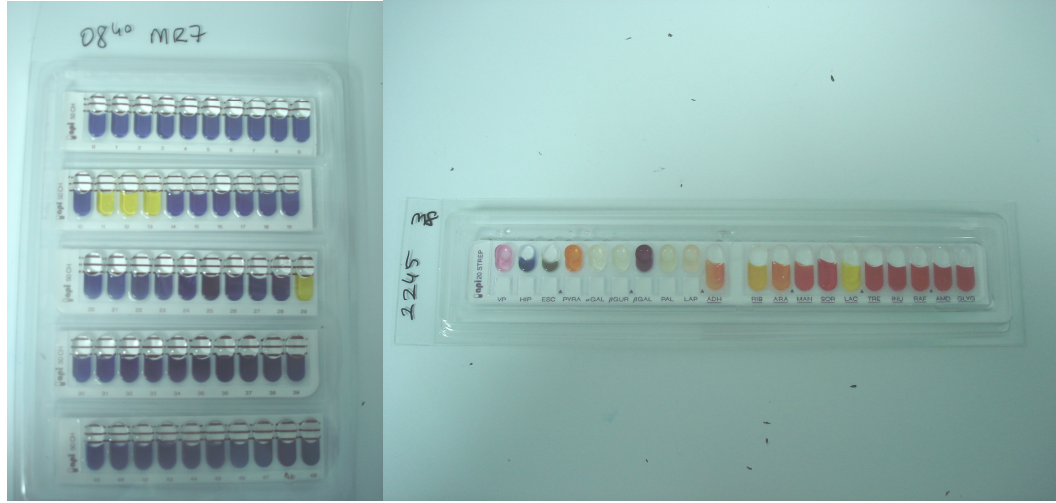
Gram (+) ve katalaz (-) olduğu teyit edilen çubuk ve kok bakterilere ait tek bir koloni aktarılan sıvı besiyeri 37 °C' de inkübasyona bırakılmış ve tortu ve/ veya bulanıklık oluşumu takip edilmiştir. Tortu ve/ veya bulanıklık oluşan tüplerdeki tortu/

bulanıklıktan yaklaşık 2 ml alınarak içinde 600 µL gliserol bulunan steril tüplere aktarılarak stok izolatlar oluşturulmuştur. Stok izolatlar derin dondurucuda (-50 °C) muhafaza edilmişlerdir.

4.5. İzolatların tanımlanması

Stok izolatlar hazırlanırken aynı tortu/ bulanıklıktan 0,1 mL alınarak daha önce bildirilen katı besiyeri üzerine (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* için MRS ve *Streptococcus thermophilus* için M 17 agar) sürme yöntemi ile sürülerek tek koloni düşürülmek amacıyla 37 °C’ de inkübasyona tabi tutulmuştur. Petriler, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* izolasyonu için anaerobik ortamda 37 °C’ de, *Streptococcus thermophilus* izolasyonu için aerobik ortamda 37 °C’ de tek koloni gelişimi elde edilinceye kadar inkübasyona tabi tutulmuştur. Oluşan tek koloni tekrar gram ve katalaz testlerine tabi tutulduktan sonra, daha önce yapıldığı gibi *Streptococcus thermophilus* için M 17 broth, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* için MRS broth besiyerine aktarılarak 37 °C’ de çoğaltılmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Tortu/ bulanıklık şeklinde üreme görülen tüplerden tekrar katı besiyerine yüzeye sürme yöntemi ile yoğun üreme sağlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla inkübasyon şartları katı besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilen diğer adımlar ile aynıdır. İstenen üreme görüldüğünde petriler, LAB izolatları ile ilgili tanımlama yapılması için API testlerinin yapılmasında kullanılmıştır. Bu amaçla API 20 strep ve API 50 CHL testleri (Biomérieux) kullanılmıştır. Testler yardımı ile elde edilen izolatların tanımlamaları yapılmıştır.

API 50 CHL ve API 20 strep test stripleri (test kuyucuk bantları) Şekil 3’ de gösterilmişlerdir.



Şekil 3. API Test kitleri (API 50 CHL (sol taraf) ve API 20 Strep (sağ taraf))

4.6. API Test kitleri ile tanımlamanın yapılması

4.6.1. API 50 CHL Medium ve API 50 CH (*Lactobacillus*- *In vitro* diagnostik kullanım için) ile *Lactobacillus* ve *Streptococcus* izolatlarının tanımlanması

a. Prensiptir

API 50 CHL Medium, *Lactobacillus* ve ilişkili cinslerin identifikasyonu için hazırlanmış hazır bir besiyeridir. API 50 CH sribi (kuyucukların grup halinde bulunduğu bant) ile 49 karbonhidratın fermentasyon özellikleri tespit edilebilir. Besiyeri içinde test edilecek mikroorganizma ile bir süspansiyon hazırlanır ve stripteki her tüp inoküle edilir. İnkübasyon sırasında karbonhidratların fermentasyonu ile asidik ortam oluşur ve buna bağlı olarak pH düşer. Bu ortam değişikliği indikatörler

sayesinde tespit edilir. Bu sonuçlar izolatın biyokimyasal profilini ortaya koyar ve tanımlama ya da tiplemeye kullanılır.

b. Reaktifler

- 10 ampul API 50 CHL Besiyeri
- API 50 CH kuyucukları (ref. 50 300),
- McFarland Standartı (ref. 70 900) nokta 2,
- İdentifikasyon yazılım programı (BioMerieux)
- Pipetler ya da PSİpetler (ref. 70 250)
- Mineral yağ (ref. 70 100)
- Ampul kutusu (ref. 70 200)
- Swaplar (ref. 70 610)
- MRS Besiyeri
- Suspension medium, 2 ml, (ref. 70 600) ve 5 ml (ref. 20 110),

c. Besiyeri bileşimi

API 50 CHL ve Suspension medium' un bileşimleri Tablo 9' da verilmiştir.

Tablo 9. API 50 CHL ve süspansiyon besiyerleri içerikleri

Besiyeri	Bileşen	Bileşen miktarı
Suspension medium (2 ve 5 ml)	Demineralize su	----
API 50 CHL Besiyeri 10 ml	Polipepton	10 g
	Maya ekstraktı	5 g
	Tween 80	1 ml
	Dipotasyum fosfat	2 g
	Sodyum asetat 3 H ₂ O	5 g
	Diamonyum sitrat	2 g
	Magnezyum sülfat 7 H ₂ O	0,20 g
	Manganez sülfat 4 H ₂ O	0,05 g
	Bromokresol moru	0,17 g
	Demineralize su pH 6,7- 7,1	1000 ml' ye tamamlayacak kadar

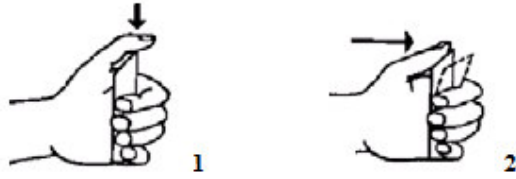
API 50 CH test kuyucuklarının bileşimi Tablo 10' da verilmiştir.

Tablo 10. API 50 CH kuyucuk (strip) bileşimleri

STRIP 0- 9 Kuyucuk no/ bileşim	STRIP 10-19 Kuyucuk no/ bileşim	STRIP 20- 29 Kuyucuk no/ bileşim	STRIP 30- 39 Kuyucuk no/ bileşim	STRIP 40- 49 Kuyucuk no/ bileşim
0 KONTROL	10 GALactose	20 α- Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 α- Methyl-D-Glucoside	31 Sucrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N- Acetyl- Glucosamine	32 TRFhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MaNnose	23 AMYgdalin	33 INUlin	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SorBose	24 ARButin	34 Mel.c/itose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCulin	35 RARffinose	45 D ARAbitoL
6 D XYLose	16 DULeitol	26 SALidin	36 Starch	46 L ARAbitoL
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELobiose	37 GLYocGen	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiTol	48 2- Keto- Gluconate
9 β Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACTose	39 GENTiobiose	49 5 Keto- Gluconate

d. Tanımlamanın gerçekleştirilmesi;

- 2- 8 °C' de muhafaza edilen besiyerleri ve kuyucuklar, kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir (20 ± 5 °C).
- Kullanılacak besiyeri ve süspansiyon şişeleri açılırken dik tutulup, plastik kapak başparmak ile mümkün olduğunca aşağı doğru bastırılmış ve plastik kapak düzleştirilmiş kısmından dışa doğru ittirilerek kapak içinde kalan ampulün uç kısmının kopması sağlanmıştır.
- Tüplerin açılırken nasıl tutulması gerektiği Şekil 4' de gösterilmiştir.



Şekil 4. Besiyeri ve süspansiyon şişelerinin açılması

- API 50 CHL ile identifikasyon için hazırlanmış olan petride üreyen saf bakteri kolonileri steril eküvyon yardımı ile toplanıp 2 ml' lik "Suspension medium" çözeltisinin içine aktarılmış ve bu şekilde yoğun bir stok süspansiyon hazırlanmıştır,
- 2 McFarland standardı çalkalanarak bulanıklık elde edilmiştir. Suspension medium 5 ml' lik tüpü ile karıştırılmış, bulanık olan 2 McFarland standardı siyah bir zeminde yan yana tutulmuştur. Hazırlanmış yoğun stok süspansiyondan 5ml' lik Suspension mediuma damlatılarak her damla sayılmıştır. Bu şekilde 5 ml' lik Suspension mediumda da aynı bulanıklığın elde edilmesi sağlanmıştır. Bulanıklığın elde edildiği damla sayısı (n) not edilmiştir,

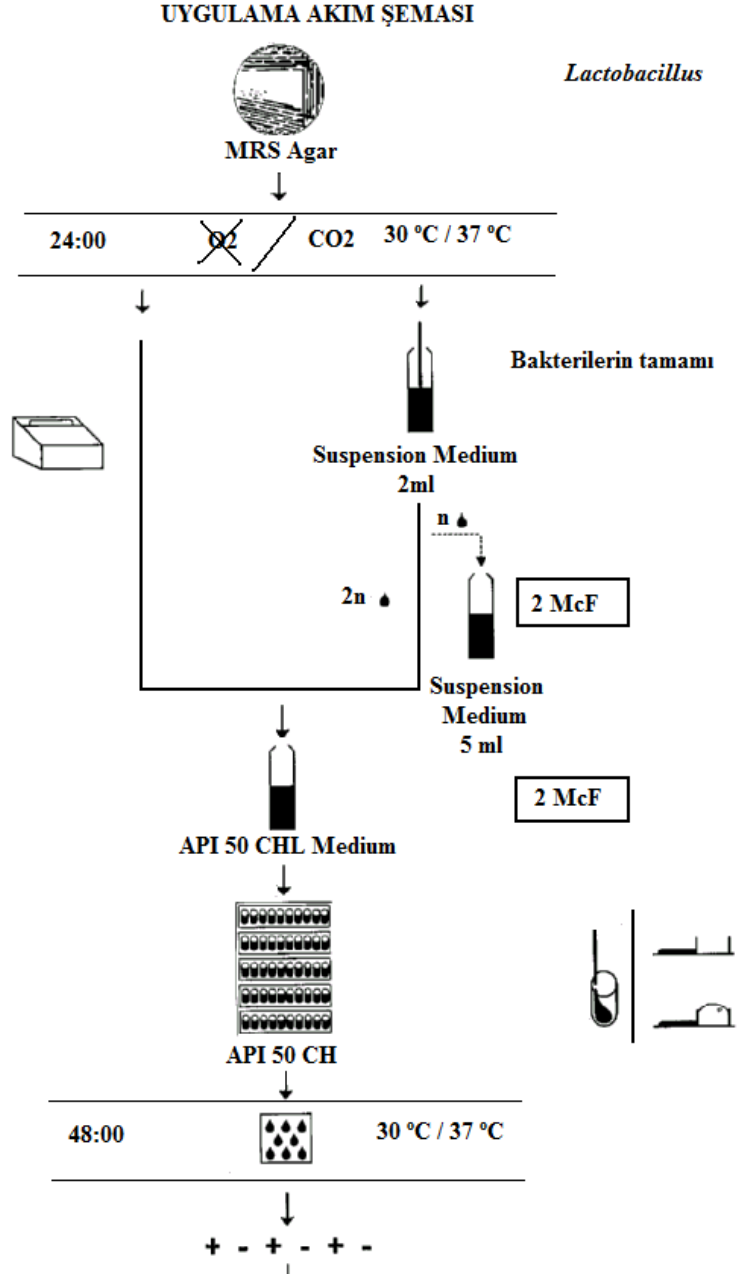
- API 50 CHL Medium ampulüne (10 ml), 5ml’ deki bulanıklığın elde edilmesini sağlayan damla sayısının iki katı (2n) kadar, yoğun stok süspansiyondan damlatılarak tüp iyice karıştırılmıştır,
- Bu şekilde hazırlanan inokulum steril pastör pipeti yardımıyla API 50 CH kuyucuklarına, kuyucukların boğazına kadar ve kuyucuklarda hiç hava kalmayacak şekilde dağıtılmıştır,
- Kuyucukların boğaz kısmından yukarısı mineral yağ ile doldurulmuş ve kuyucukların bulunduğu tepsinin üstü kapak ile kapatılmıştır,
- Bu şekilde hazırlanan stripler 37 °C ± 2 °C’ de 48 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuşlardır,
- Tüm testler hem 24 ve hem de 48 saat sonra okunmuştur,
- Standard metoda uygun olarak; besiyeri içindeki bromkresol moru indikatörünün renk değiştirmemesi negatif (-), asidifikasyon etkisiyle sarıya dönmesi pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir,
- Sadece 25 numaralı kuyucuk (Esculin testi) siyah renkli ise (+), mor ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir,
- 24. ve 48. saatlerden sonra yapılan değerlendirmeler takip tablosuna işaretlenmiştir. Takip tablosu örneği aşağıda Şekil 5’ de verilmiştir;

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	GLV	ERY	DAR	LARA	RIB	DKYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MD	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLVG	XLT	GEN	TUR	LXK	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG		

Şekil 5. API 50 CH takip tablosu

Takip tablosundaki işaretlemeler, identifikasyon yazılım programına girilerek üzerinde çalışılan bakterinin identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyonda kullanılan tanım tablosu Ek 1’ de verilmiştir (Bkz Ek 1).

API 50 CHL ve API 50 CH ile identifikasyon aşamalarını gösteren uygulama akış şeması Şekil 6’ da verilmiştir.



Şekil 6. API 50 CHL ve API 50 CH ile identifikasyon

4.6.2. API 20 Strep (*Streptococcaceae* ve benzer organizmalar için tanımlama sistemi)

a. Prensip

API 20 Strep stribi, karbonhidratların enzimatik aktivitesi ya da fermentasyonunun belirlenmesi için dehidrate substratlar içeren 20 mikrotüpten (strip, kuyucuk) oluşmaktadır.

Enzimatik testler, enzimatik substratları yeniden hidrate etmek için kullanılan saf bir kültürden yapılmış yoğun bir organizma süspansiyonu ile inoküle edilir. İnkübasyon periyodu sırasında ortaya çıkan metabolik son ürünler spontan olarak ya da reaktiflerin eklenmesiyle ortaya çıkan renk değişiklikleri meydana gelir.

Fermentasyon testleri, şeker substratları meydana getiren zenginleştirilmiş bir madde ile inoküle edilir. Karbonhidratların fermentasyonu pH indikatöründeki değişiklik ile saptanır.

Reaksiyonlar, Okuma Tablosu'na göre okunur ve tanımlama, analitik Profil İndeksi ya da bilgisayar tanımlama programı kullanılarak elde edilir.

b. Reaktifler

- API 20 strep stripleri (ref. 20 600),
- 25 GP Medium ampulü
- API Suspension Medium, 2 ml (Ref. 70 700)
- Reaktifler:
 - NIN (Ref. 70 490)

- VP 1 + VP 2 (Ref. 70 422)
- ZYM A + ZYM B (Ref. 70 472)
- Mineral yağ (Ref. 70 100)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) nokta 4
- API 20 Strep Analitik Profil İndeksi (Ref. 20 690) (Bkz. Ek 2) ya da bilgisayar tanımlama programı

c. Besiyeri bileşimi

API GP Medium' un bileşimi Tablo 11' de verilmiştir.

Tablo 11. API GP Medium (2 ml) bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Bileşen miktarı
API GP Medium 2 ml	L-sistin	0,5 g
	Tripton (inek/domuz orijinli)	20 g
	Sodyum klorid	5 g
	Sodyum sülfid	0,5 g
	Fenol kırmızısı	0,17 g
	Demineralize su pH 7,4- 7,6	1000 ml' ye tamamlayacak kadar

API 20 Strep test kuyucuklarının bileşimi ve inkübasyon aşamalarına göre değerlendirme şekilleri Tablo 12' de verilmiştir.

Tablo 12. API 20 Strep kuyucuk (strip) bileşimleri ve değerlendirme kriterleri

Testler	Aktif içerikler	Miktar (mg/ küp)	Reaksiyonlar/ enzimler	Sonuçlar			
				Negatif		Pozitif	
VP	Sodyum piruvat	1,9	Asetoin üretimi (Voges Proskauer)	VP1 + VP2 / 10 dakika beklenir (3)			
				Reknsiz		Pembe/ Kırmızı	
HIP	Hippurik asit	0,4	Hidrolizis (HIPpurik asit)	NIN/ 10 dakika beklenir			
				Reknsiz/ soluk mavi		Koyu mavi/ Mor	
ESC	Esculin ferrik sitrat	1,16 0,152	B-glukosidaz hidrolizi (ESCulin)	4 saat	24 saat	4 saat	24 saat
				Reknsiz açık sarı	Reknsiz açık sarı Açık gri	Siyah Gri	Siyah
PYRA	Pyroglutamik asit-β-naftilamid	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidaz	ZYM A + ZYM B/ 10 dakika (PYRA dan LAP' a) (1) gerçekleşirse yoğun ışık ile renk giderin			
				Reknsiz veya çok açık turuncu		Turuncu	
αGAL	6-bromo-2-naftil-α-D-galaktopiranosid	0,0376	α-GALaktosidaz	Reknsiz		Eflatun	
βGUR	Naftol ASBl-glukuronik asit	0,0537	B-GlUKURonidaz	Reknsiz		Mavi	
βGAL	2-naftil-βD-galaktopiranosid	0,0306	B-GALaktosidaz	Reknsiz veya çok açık eflatun		Eflatun	
PAL	2-naftil fosfat	0,0244	Alkalinc Phosphataz	Reknsiz veya çok açık eflatun		Eflatun	
LAP	L-lösin-β-naftilamid	0,0256	Lösin Amino Peptidaz	Reknsiz		Turuncu	
ADI1	L-arginin	1,9	Arginin Diilhidrolaz	Sarı		Kırmızı	
				4 saat	24 saat	4 saat	24 saat
<u>RIB</u>	D- ribosc	1,4	Asidifikasyon (RIBoz)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>ARA</u>	L-arabinoz	1,4	Asidifikasyon (ARAbinoz)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	Asidifikasyon (MANnitol)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1,36	Asidifikasyon (SORbitol)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>LAC</u>	D-laktoz (sıgır orjinli)	1,4	Asidifikasyon (SORbitol)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>TRF</u>	D-trehaloz	1,32	Asidifikasyon (LACToz)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>INU</u>	İnulin	5,12	Asidifikasyon (TRFhaloz)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>RAF</u>	D-raffinose	3,12	Asidifikasyon (TRFhaloz)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
<u>AMD</u>	Nişasta (2)	2,56	Asidifikasyon (INUlin)	Kırmızı	Turuncu/ Kırmızı	Turuncu/ Sarı	Sarı
			Asidifikasyon (RAFlinoz)				
			Asidifikasyon (AmiDon)				
<u>GLYG</u>	Glikojen	1,28	Asidifikasyon (GLYcoGen)	Kırmızı veya Turuncu		Parlak sarı	

(1) 24 saatlik inkübasyondan sonra ikinci okuma sırasında, ZYM A ve ZYM B reaktifleri ilave edildiği tüplerde birikim olabilir. Bu olay dikkate alınmalıdır.

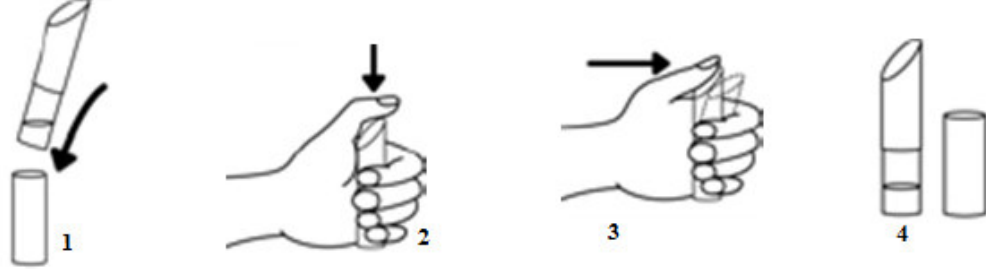
(2) Nişasta asidifikasyonu diğer şekerlerden daha hafiftir.

(3) 10 dakika sonra hafif pembe renk negatif olarak kabul edilir.

Gösterilen miktarlar kullanılan ham malzemenin miktarına bağlı olarak ayarlanabilir. Bazı küpüller, özellikle peptonlar, hayvan kaynaklı ürünler içerir.

d. İdentifikasyonun gerçekleştirilmesi;

Ampüller Şekil 7' de gösterildiği gibi dikkatlice açılmıştır:



Şekil 7. Besiyeri ve süspansiyon şişelerinin açılması

- 2- 8 °C' de muhafaza edilen besiyerleri ve kuyucuklar, kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir (20 ± 5 °C).
- Ampül, ampül koruyucusuna yerleştirilmiştir (Şekil 7, Resim 1),
- Dik pozisyonda tek elle koruyucu ampülü tutulmuştur (beyaz plastik kapak en üstte),
- Kapak, başparmak kapağın düzleştirilmiş kısmına dayanarak mümkün olduğu kadar aşağıya doğru bastırılmıştır (Şekil 7, Resim 2),
- Ardından kapak başparmağın dışa doğru hareketiyle itirilerek, ampülün tepesinin kırılıp ayrılması sağlanmıştır (Şekil 7, Resim 3),
- Ampül koruyucusundan çıkarılmış ve koruyucu bir sonraki kullanım için saklanmıştır (Şekil 7, Resim 4),
- Kapak dikkatlice uzaklaştırılmıştır,
- Bir eküvyon kullanarak, petride gelişmiş olan tüm bakteriler toplanıp API Suspension Medium (2 ml) ampülüne aktarılmıştır. Bu şekilde 4 Mc Farland' dan daha bulanık yoğun bir stok süspansiyon hazırlanması sağlanmıştır. Stok süspansiyon hazırlandıktan hemen sonra kullanılmıştır,
- Hazırlanan stok süspansiyondan stribin ilk yarısına (VP' den ADH' ye kadar olan kuyucuklara) hava kabarcığı olmayacak şekilde dağıtılmıştır,
- VP' den LAP' a kadar testler için her kuyucuğa yaklaşık 100 µl, ADH test kuyucuğuna ise boynuna kadar stok süspansiyondan konulmuştur,

- API GP Medium ampülü başlangıçta açıklandığı şekilde açılıp stok süspansiyonun geri kalanı bu ampüle aktarılmış (yaklaşık 0, 5 ml) ve iyice karıştırılmıştır,
- Stribin ikinci yarısına (RIB' den GLYG' ye kadar olan kuyucuklara) bu yeni süspansiyondan dağıtılmıştır. Süspansiyon, bu kuyucuklara da hava kabarcığı kalmayacak şekilde boynuna kadar doldurulmuştur,
- Altı çizili olarak belirtilen kuyucuklara (ADH' den GLYG' ye kadar olan kuyucuklar) hafif konveks bir yapı oluşturacak şekilde mineral yağ doldurulmuştur,
- Kuyucukların bulunduğu tepsinin üstü kapak ile kapatılmıştır,
- Bu şekilde hazırlanan stripler $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de inkübasyona tabi tutulmuşlardır,
- İlk okuma 4- 4,5 saat sonunda, ikinci okuma da 24 saat (± 2 saat) sonunda yapılmış ve değerlendirmeler takip tablosuna işaretlenmiştir.
- 4 saat inkübasyondan sonraki kontrolden önce ilgili reaktifler ait oldukları kuyucuklara damlatılmıştır,
- Buna göre;
- VP test kuyucuğuna sırasıyla birer damla VP 1 ve VP 2 reaktifleri,
- HIP test kuyucuğuna 2 damla NIN reaktif,
- PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL ve LAP test kuyucuklarına sırasıyla birer damla ZYM A ve ZYM B reaktifleri damlatılmıştır,
- 10 dakika beklenip süre sonunda gerçekleşen reaksiyonlar okuma tablosuna göre değerlendirilmiştir (Eğer gerekirse PyrA' dan LAP' a kadar olan kuyucuklardaki fazla reaktifleri renksizleştirmek için kuyucuklar 10 saniye süreyle güçlü bir ışığa (1000 W) tutulmuştur.
- Okumada pozitif (+) olarak değerlendirmesi gereken reaksiyonlar Şekil 8' de verilmiştir,



Şekil 8. API 20 Strep inkübasyon sonu pozitif (+) reaksiyonlar

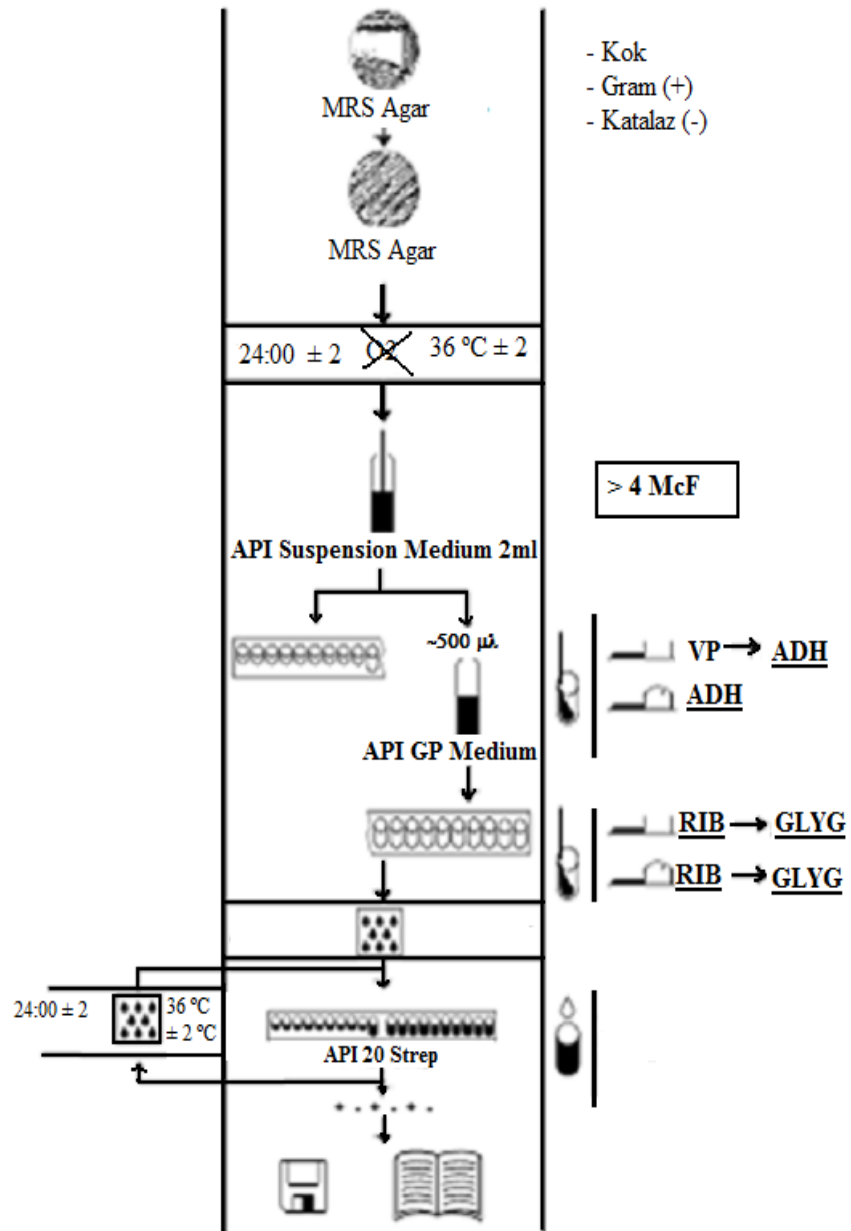
- Okumada negatif (-) olarak değerlendirmesi gereken reaksiyonlar Şekil 9’ da verilmiştir,



Şekil 9. API 20 Strep inkübasyon sonu negatif (-) reaksiyonlar

- Bu okuma işleminden sonra striplerin inkübasyonuna devam edilmiş ve 24 saat (\pm 2 saat) sonunda ESC kuyucuğunda değişiklik olup olmadığı kontrol edilip, ADH ile RIB’ den GLYG’ ye kadar olan kuyucuklarda da ikinci kez okuma gerçekleştirilmiştir,
- Okumada pozitif (+) ve negatif (-) değerlendirmeler yukarıda belirtildiği gibi yapılmış ve takip tablosuna işlenmiştir. Takip tablosu örneği aşağıda Şekil 10’ da verilmiştir;

UYGULAMA AKIM ŞEMASI



Şekil 11. API 20 Strep ile identifikasyon

4.7. İzolatların EPS üretim miktarının tespiti

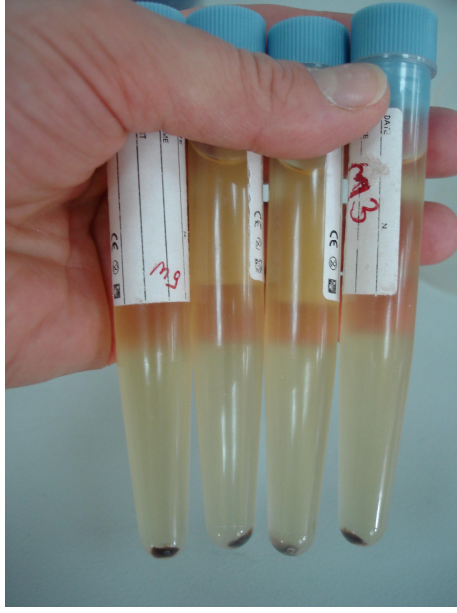
Bu amaçla Smitinont ve ark. (1999) tarafından kullanılan EPS ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışma için LAB izolatları MRS broth besiyerinde 4,60 pH' ya kadar geliştirilerek yine MRS broth besiyerine % 2 oranında inoküle edilmiş ve 30 °C' de 2 gün boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur.

İnkübasyondan sonra EPS' in ekstraksiyonu için örneklerden yaklaşık 10' ar ml alınarak (santrifüj dengesini korumak amacıyla tüpler tek tek tartılmıştır) santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler, örneklerde bulunan hücrelerin ayrılabilmesi amacıyla Hettich marka (Almanya) santrifüj yardımıyla + 20 °C' de 5000 rpm' de 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süre sonunda hücreler tortu şeklinde ayrılmıştır. Üstte kalan sıvı kısım ise; EPS' in çöktürülmesi amacıyla %95' lik etanol (Merck) ile bire beş (1/ 5) oranında karıştırılmıştır. Etil alkol ile hazırlanmış olan karışım aynı santrifüj ile bu kez + 4 °C ve 5000 rpm' de 20 dakika süreyle santrifüjlenmiştir.



Şekil 12. Santrifüjlemenin gerçekleştirildiği Hettich marka santrifüj

Bu işlem sonunda EPS dipte tortu olarak ayrılmıştır. Bu ikinci santrifüjleme işlemi sonunda tüplerin dibindeki tortu Şekil 13’ de gösterilmiştir.



Şekil 13. EPS miktar tayini, 2. santrifüj işlemi sonu

Santrifüjleme işlemi sonrasında tüpler tartılarak 60 °C’ de kurutulmuş ve işlem sonunda kuru ağırlığı alınmıştır. Ardından tüpler tamamen temizlenerek aynı sıcaklıkta kurutulmuş ve daralar tespit edilmiştir. EPS miktarı son kütlenin başlangıçtaki hacme oranından belirlenmiş ve g/ L olarak ifade edilmiştir.

4.8. EPS üretim miktarları dikkate alınarak kültür hazırlanması

Araştırmada ayran üretmek üzere *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* laktik asit bakterisi (LAB) izolatlarından EPS üretim

miktarları dikkate alınarak kültür kombinasyonları oluşturulmuştur. Kültür kombinasyonları oluşturulurken; bakteri izolatlarının EPS üretim yetenekleri ile bu bakterilerden oluşturulacak kültürler kullanılarak üretilen ayranların özellikleri arasında bir ilişki olup olmadığı düşünülmüştür.

Bu doğrultuda en yüksek, en düşük ve en yüksek ile en düşük arasında (orta) EPS üretim miktarına sahip olan birer izolat kültür hazırlığı için seçilmiştir. Klasik yoğurt/ ayran kültürlerinde hiç kullanılmamasına rağmen, sadece viskoziteye olası etkisinin incelenmesi amacıyla kültür hazırlamak üzere bir de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* izolatu seçilmiştir. Bu izolat da; seçilen diğer izolatlardan en yüksek EPS üretim miktarına sahip olanlarına benzer EPS üretim yeteneğinde bulunduğu için seçilmiştir.

Kültür hazırlamak üzere seçilen bakteri izolatları Tablo 13’ de verilmiştir.

Tablo 13. Bakteri izolatları

Bakterinin tanımlandığı sembol	Bakterinin adı
M1	<i>Streptococcus thermophilus</i>
M3	<i>Streptococcus thermophilus</i>
M7	<i>Streptococcus thermophilus</i>
MR4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
MR5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
MR7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
MR9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* izolatu geleneksel ayran üretimi ve tanımı içinde yer almadığı ve sadece viskoziteye olası etkisinin incelenmesi düşünüldüğünden, seçilen diğer LAB’ den sadece orta EPS üretim miktarına sahip olan bir tek *Streptococcus thermophilus* izolatu ile birebir karıştırılarak kültür kombinasyonu

hazırlanmıştır. Bu şekilde 9 adet kültür kombinasyonu oluşturulmuştur. Oluşturulan kültür kombinasyonlarının içeriği Tablo 14’ de verildiği gibidir.

Tablo 14. Kültür kombinasyonu ve EPS üretim miktarları

Kültür no	Kültür adı	Kültürdeki bakteri izolatları	EPS üretim miktarı
1	M3+MR4	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Orta+Yüksek
2	M1+MR9	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Orta
3	M1+MR7	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Düşük
4	M3+MR7	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Düşük
5	M1+MR5	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Yüksek
6	M3+MR5	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Yüksek
7	M7+MR7	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Düşük
8	M7+MR9	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Orta
9	M7+MR5	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Yüksek

4.9. Ayran örneklerinin üretilmesi

Ayran örneklerinin üretilmesi için hazırlanan kültürler MRS broth sıvı besin ortamına inoküle edilerek 41 °C’ de pH 4,60 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. Ürün hazırlığının endüstriyel prosese paralel gerçekleştirilmesi için süt yağsız ve prepastörizasyonu yapılmış sütlerden seçilmiştir. Çalışmada kullanılan süt bileşimi; 8,47 g/ 100 g YKM, 0,14 g/ 100 g yağ ve 3,32 g/ 100 g protein olarak tespit edilmiştir. Süt ayran üretimi için gerekli girdiler (krema, su, tuz) ilave edildikten sonra 95 °C’ de 3 dakika bekletilerek ısıl işleme tabi tutulmuştur. Süt, ısıl işleme tamamlandıktan hemen sonra 45- 50 °C’ ye soğutulmuş, inokülasyon ve fermentasyonu gerçekleştirmek üzere eşit hacimli kapaklı kaplara dağıtılmıştır. Bu işlem sonunda süt sıcaklığı 42 °C’ ye düşmüştür. Her bir kaptaki süte bu sıcaklıkta, hazırlanmış olan kültürlerden % 2 oranında inoküle edilmiş ve 41 °C’ de fermentasyona tabi tutulmuştur. Ayranların fermentasyonları yine endüstriyel prosese uygun olması için 4,60 pH’ da sonlandırılmış ve soğutma işlemine geçilmiştir. Soğutma işlemi için soğuk su banyosu ve soğukta muhafaza için ise buzdolabı kullanılmıştır. Ayranların endüstriyel yöntemle üretilmiş ayran benzeri homojen yapı kazanabilmesi için fermentasyonun gerçekleştirildiği kaplar eşit sayı ve hızda başaşağı edilmiştir.

4.10. Fizikokimyasal ve duyu analizler

Ayran örnekleri fermentasyon ve soğutmalarının tamamlanmasından 1 gün sonra fizikokimyasal analizlere tabi tutulmuşlardır. Bu kapsamda ayran örneklerinin yağsız kuru madde (YKM), yağ, protein, viskozite, serum ayrılması ve pH değerleri belirlenmiştir.

YKM, ISO 6731’ e uygun olarak belirlenen toplam kuru madde değerinden (TKM) Gerber metoduna (Anonymous, 2000a) göre tespit edilen yağ değeri çıkarılarak elde edilmiştir. Protein değeri BS EN ISO 8968- 1: 2002 Kjeldahl metoduna göre

belirlenmiştir. Viskozite değeri 2,5 mm çaplı akış ucuna sahip Bosvik hunisi ile ölçülerek tespit edilmiştir. Serum ayrılması, ayran örneklerinin sabit hacimli dereceli kaplara konarak 24 saat sonunda kontrol edilmesi suretiyle kontrol edilmiştir. pH değeri ise Mettler Toledo 330 model pH metre ile ölçülmüştür.

4.10.1. Toplam kuru madde (TKM) tayini (ISO 6731)

Toplam kuru madde tayininde kullanılan tartım kapları, boş halde, en az 1 saat süre ile kurutma fırınında kurutulup desikatörde soğutulmuş (yaklaşık 30 dakika) ve 0,1 mg hassasiyetle tartılmıştır.

Hazırlanan tartım kabı içine, analizi yapılacak olan örnekten 0,1 mg hassasiyetle 5 g hızlı bir şekilde tartılmış ve ince bir tabaka halinde yayılması sağlanmıştır.

Örneğin tartıldığı kap, 30 dakika boyunca su banyosunda bekletilerek suyu uçurulmuştur. Süre sonunda kap su banyosundan alınarak 2 saat süre ile kurutma fırınında kurutulmuştur. Ardından oda sıcaklığına gelinceye kadar (en az 30 dakika) desikatörde bekletilmiş ve 0,1 mg hassasiyetle tartılmıştır. Kap kurutma fırınında 1 saat süre ile tekrar kurutulmuş ve oda sıcaklığına gelinceye kadar (en az 30 dakika) desikatörde bekletilmiş ve 0,1 mg hassasiyetle tartılmıştır.

Bir saatlik kurutma, soğutup tartım işlemlerinde arda arda yapılan tartımlar arasındaki fark 1 mg' dan az oluncaya kadar tekrarlanmış ve en düşük ağırlık kaydedilmiştir.

Toplam kuru madde içeriği ile ilgili hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır ve kütlede % olarak ifade edilmiştir. (Anonymous, 1989)

$$\text{TKM (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Burada;

m_0 , kap ve kapağın gram olarak ağırlığını,

m_1 , kap, kapak ve örneğin toplam ağırlığını,

m_2 , kap, kapak ve kurutulmuş örneğin toplam ağırlığını göstermektedir.

Formülden elde edilen sonuç % 0,01 şeklinde ifade edilmiştir (m/m).

4.10.2. Yağ tayini

a. Kullanılan malzemeler;

- Gerber Santrifüj
- Süt bütirometresi: 100 ml için 0,025 gram hassaslıkta okuma yapılabilen,
- Süt pipeti: 10,75 ml
- 40 °C ± 2 °C su banyosu,
- Yoğunluğu 1,820 g/ ml ± %2 olan konsantre sülfirik asit,
- Yoğunluğu 0,813 g/ ml ± 0,005 g/ ml ± %2 olan amil alkol.

b. Analizin gerçekleştirilmesi;

- Örneklerin karıştırılmaması için bütirometreler sayı veya rakamla tanımlanmıştır.
- Güvenlik maskesi kullanarak otomatik büret yardımıyla bütirometreye, boynunu ıslatmadan 10 ml sülfirik asit konulmuştur,
- Örnek sıcaklığı, analiz için $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlanmıştır. Sıcaklık ayarlaması yapılırken homojen kalması için düzenli olarak karıştırılmıştır,
- 10,75 ml' lik pipet, içine örnekten bir miktar çekilip bırakılarak çalkalanmış, sonra da pipetle hacmi kadar örnek alınmıştır,
- Bütirometredeki asidin üstünde bir tabaka oluşturacak şekilde bütirometrenin boynunu ıslatmadan pipetteki örnek yavaşça bütirometreye konulmuştur,
- Örneğin üzerine otomatik büret yardımı ile 1 ml amil alkol ve kalibreli bir pipet yardımıyla 0,5 ml distile su konulmuştur,
- Bütirometre tıpa ile kapatılıp ve yavaş hareketler ile baş aşağı edilerek bütirometre içindeki örneğin tamamen yanması, erimesi sağlanmıştır,
- Bütirometre dengeli olarak hemen santrifüje konulup 5 dakika santrifüjlenmiştir,
- Bütirometreyi santrifüjden çıkararak tıpası aşağıda olacak şekilde $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' lik su banyosuna konulmuştur. Burada banyodaki suyun seviyesinin bütirometredeki yağ kolonundan yüksek olmasına dikkat edilmiştir. Bütirometre 5 dakika süre ile su banyosunda bekletilmiştir,
- Daha sonra iki kez daha santrifüj ve su banyosunda bekletme işlemleri tekrarlanmıştır.
- Toplam üç santrifüjleme ve su banyosunda bekletme işlemlerinden sonra bütirometre su banyosundan çıkarılıp kurulmuştur. Yağ değeri, bütirometrenin dereceli kısmı dik tutularak, mercek yardımıyla hızlı şekilde okunmuştur,
- Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve 0,01 g/ 100 ml (g) şeklinde ifade edilmiştir;
- Yağ değeri g/ 100 ml = Okunan yağ değeri x 1,02
- Yağ değeri g/ 100 g = Okunan yağ değeri x 1,02/ 1,028

Not 1. 1,02; 40 °C sıcaklıkta yağın kapladığı hacimdeki azalmayı düzeltmek için kullanılan faktör.

Not 2. Tekrar edilebilirlik: İki örnek arasındaki fark 0,05 g/ 100 ml(g) dır (Anonymous, 2000a).

4.10.3. Protein tayininin yapılması (BS EN ISO 8968- 1: 2002; Azot içeriği tayini- Kjeldahl metodu)

Temiz ve kuru bir Kjeldahl balonuna 5 ila 10 kaynama taşı, 15,0 g potasyum sülfat, 1,0 ml bakır (II) sülfat çözeltisi, 0,1 mg hassasiyetle tartılmış yaklaşık 5 ml \pm 0,1 ml test örneği ve 25 ml sülfirik asit konulmuştur. Kjeldahl balonu içeriği ile birlikte, balonun borusuna ulaşacak bir köpürmeye izin vermeyecek şekilde bir ısı ayarı ile ısıtılmıştır. Bu ısıtma işlemi, yaklaşık 20 dakika sonra balonda beyaz duman görülünceye kadar devam ettirilmiştir. Isıtıcı ayarı, en yüksek ısıtıcı sıcaklık ayarının yarısına getirilmiş ve ısıtmaya 15 dakika devam edilmiştir. 15 dakikalık süre sonunda ısı ayarı en yüksek ısıtıcı sıcaklık ayarına getirilmiştir. Yakılan içerik berraklaşınca (berrak açık yeşil- mavi renkte) kaynatma işlemi en yüksek ısıtıcı sıcaklık ayarında 1 ila 1,5 saat sürdürülmüştür.

Yakma sonunda, yakılan örneğin berrak ve yanmamış herhangi bir madde kalmamış olmasına dikkat edilmiştir. Örnek, açık bir kapta ve çekerocak altında yaklaşık 25 dakika bırakılarak oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. 25 dakikanın sonunda örnek, sıvı ya da dibinde birkaç küçük kristalin bulunduğu bir sıvı haline gelmiştir. 500 ml' lik Kjeldahl balonuna 300 ml su ilave edilmiştir. Balon içeriği, kristaller tamamen eriyinceye kadar karıştırılmıştır. 5- 10 tane kaynama taşı ilave edilmiştir. Distilasyon öncesinde karışım oda sıcaklığına soğuması için bekletilmiştir.

75 ml sodyum hidroksit çözeltisi, balonun boynundan yavaşça akıtılarak ve balonun dibinde bir tabaka oluşturacak şekilde Kjeldahl balonundaki seyreltilmiş yanmış örnek üzerine ilave edilmiştir. İki çözelti arasında net bir tabaka oluşması

sağlanmıştır. Sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilir edilmez Kjeldahl balonu hızlı bir şekilde distilasyon cihazına bağlanmıştır. Yoğunlaştırıcının çıkış ucundaki boru, içinde 50 ml borik asit çözeltisi bulunan erlenin içine daldırılmış, Kjeldahl balonu, içindeki çözeltiler de aralarındaki tabaka kaybolup çözeltiler tamamen karışacak şekilde kuvvetlice karıştırılmıştır. Balon yakma cihazına konmuş ve yakma cihazı, karışımı kaynatmak için yeterince yüksek olan bir sıcaklığa ayarlanarak açılmıştır. Düzensiz (sıçramalar olan) kaynama başlayıncaya kadar distilasyona devam edilmiş ve düzensiz kaynama olduğu gibi ısıtıcı kapatılarak Kjeldahl balonu sistemden çıkarılmıştır. Çıkış borusunun içi ve dışı su ile çalkalanıp çalkalanan su erlende toplanmış ve karıştırılmıştır.

Erlenin içeriği, otomatik büret yardımıyla hidroklorik asit ile titre edilmiştir. pH, titrasyonun bitiş noktasında titrasyon eğrisinin en üst noktasında 4,6' ya ulaşır. Bu noktada otomatik titratörde sarfedilen kimyasal miktarı okunmuştur.

Kör örnekler de, test örnekleri için kullanıldığı gibi, aynı hidroklorik asit ile ve otomatik büret yardımı ile titre edilmiştir. Test, yukarıda ürün örneği için açıklandığı gibi yapılmıştır ancak burada örnek yerine 5 ml su ve yaklaşık 0,85 g sakkaroz kullanılmıştır. Kör test için değerler kaydedilmiştir.

Test örneğinin azot içeriği, w_N , aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır:

$$w_N = \frac{1,4007 \times ((V_s - V_b) \times M_T)}{m}$$

w_N örneğin azot içeriğidir, kütlede yüzde oran olarak ifade edilir;

V_s deneyde kullanılan hidroklorik asitin mililitre olarak sayısal değeridir, 0,05 ml hassasiyet ile ifade edilir;

V_b kör testte kullanılan hidroklorik asitin mililitre olarak sayısal değeridir, 0,05 ml hassasiyet ile ifade edilir;

M_r hidroklorik asitin tam molarite değeridir, dört desimal olarak ifade edilir;

m test örneğinin gram cinsinden ağırlığıdır, 0,1 g hassasiyetle ifade edilir.

Test örneğinin ham protein içeriği, w_p , aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır:

$$w_p = w_N \times 6,38$$

Burada;

w_p örneğin ham protein içeriği, kütlede yüzde oran olarak ifade edilir;

w_N örneğin azot içeriği, kütlede yüzde oran ve dört desimal olarak ifade edilir;

6,38 azot içeriğini, ham protein içeriği olarak ifade edebilmek için genel olarak kabul görmüş katsayıdır (Anonymous, 2001).

4.10.4. Viskozite tayini

a. Kullanılan malzemeler;

- Viskozite ölçüm hunisi (2,5 mm çaplı akış ucuna sahip Bosvik hunisi),
- Cam kapak (en az huni dış çapı kadar geniş),
- Sıcaklığı 10 °C ± 3 °C' de korunabilen oda/ ortam,
- Kronometre

b. Analizin gerçekleştirilmesi;

- 10 °C sıcaklıkta muhafaza edilen viskozite ölçüm hunisi, düzeneği üzerine yerleştirilmiştir,
- Analizi yapılacak ayran örneği 7 kez başaşağı getirilip düzeltilerek homojen hale getirilmiştir,
- Huninin deliği parmak ile kapatılarak huninin içi ayran örneği ile doldurulmuştur,
- Düz cam kapak, huninin kenarından kaydırılarak huninin üzeri tamamen kapatıldıktan sonra parmak huninin deliğinden çekilmiştir,
- Ölçümde kullanacak olan kronometre sıfırlanıp huninin üstündeki cam, yatay yönde hızla çekilirken kronometre de çalıştırılmıştır,
- Huni içindeki ayranın tamamı bittiği anda kronometre durdurulmuş ve geçen süre saniye cinsinden viskozite değeri olarak kaydedilmiştir (Anonymous, 2000b).

4.10.5. Serum ayrılması kontrolü

Serum ayrılmasının kontrolü için homojen hale getirilmiş ayran örnekleri 10 °C' lik ortamda sabit hacimli dereceli kaplara eşit hacimde (500' er ml) konmuştur. Ayran örneklerindeki serum ayrılması 24 saat sonunda kontrol edilmiştir. Doğrulama ve ikinci bir kontrol anlamında 48 saat sonunda da kontrol yapılmıştır (Anonymous, 2000c).

4.10.6. Duyusal değerlendirme

Ayranların duyusal değerlendirmesi yedi kişilik panelist grubu ile gerçekleştirilmiştir. Panelist grubu, duyusal analizler konusunda eğitilmiş ve düzenli ayran tadımı yapan kişilerden oluşturulmuştur. Duyusal değerlendirmede görünüm,

kıvam ve tat/ koku özellikleri dikkate alınmıştır. Bu özelliklerin değerlendirme parametreleri Tablo 15' de verilmiştir.

Tablo 15. Duyusal değerlendirme kriterleri (Anonymous, 2006)

Görünüm	Kıvam	Tat/ Koku	Not
Homojen, parlak görünüm Karakteristik renkte Faz ayrılması/ serum ayrılması yok: < 2g (ya da ml)	Akıcı kıvamda Homojen Damakta dolgun his bırakan	Tipik aroma ve kokuya sahip, Taze, karakteristik tatta	5
<u>Ürüne 0 ve 5 puan verilmediğinde ve ayranın özellikleri 5 puan özelliklerine yakın olduğu takdirde değerlendirmede 3 puan verilir.</u>			3
Anormal renk ve görünüm Gaz oluşumu Maya ya da küf oluşumuna benzer görünüm Çökmüş, pıhtılaşmış Faz ayrılması olmuş	Homojen olmayan, düzensiz yapıda Sulu Çok koyu kıvamlı/ akışkan olmayan Topak topak, pütürlü	Anormal, alışıldık olmayan, hoş olmayan koku Kötü tat (kokmuş, acımış, bayat, garip, küfümsü, mayamsı) Çok asidik, çok ekşi	0

Tablodan da anlaşıldığı gibi değerlendirmede alışıldık ayran tanımı (5 puan) ve bunun tam aksi olan tanımlar (0 puan) netleştirilmiştir. Bu tanımların arasında kalan ve ayranın özelliklerinin 5 puan tanımlamalarına daha yakın olması (tespit edilen eksiklik ve/ veya kusurlar ayranın tüketimi için kabul edilmez, olumsuz bir durum teşkil etmediğinde) 3 puan ile ilgili tanımları oluşturmuştur. Herhangi bir özellik ile ilgili genel

değerlendirme puanı belirlenirken ortalama alınmamış, sözkonusu örneğin değerlendirilen özelliği ile ilgili en düşük puan değerlendirme puanı olarak alınmıştır.

4.11. İstatistikî değerlendirme

Araştırmada üretilen ayranların fizikokimyasal değerlerinin istatistikî değerlendirmesinde Varyans analizi ve Duncan testi yapılmıştır. Varyans analizi ve Duncan testi, SPSS bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

5.1. İzole edilen ve tanımlanan laktik asit bakterileri

Çalışmada 45 yoğurt örneğinden izole edilen, Gram (+), katalaz (-) olduğu teyit edilen çubuk ve kok bakterilerin (toplam 24 tane) izolatları hazırlanmıştır. Bu bakteri izolatlarının tanımlaması API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri ile yapılmıştır.

Yoğurt ve ayrana özgü LAB (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) API 50 CHL test kitleri ile tanımlanmıştır. Tanımlanmış olan 24 izolat ile ilgili bilgiler Ek 3' de verilmiştir. API 50 CHL ile tanımlanmış bakterilere ait reaksiyon tabloları Ek 4 ve API 20 Strep ile tanımlanmış bakterilere ait reaksiyon tabloları Ek 5' de verilmiştir.

5.2. LAB izolatlarının EPS üretim miktarları

Tanımlama sonucunda fermente süt ürünleri kültürlerinde kullanıldığı bilinen 22 bakteri izolatının EPS üretim miktarlarını belirlemek üzere analiz yapılmıştır. Elde edilen EPS miktarları, kültür hazırlamada kullanılacak yoğurt ve ayrana özgü bakteri izolatlarının seçilmesinde kullanılmıştır. Bakteri izolatlarının EPS üretim miktarları Tablo 16' da verilmiştir.

Tablo 16. Bakteri izolatlarının EPS üretim miktarları

No	Bakteri izolatu	EPS üretim miktarı (g/ L)
1	M7	35,00
2	M9	33,81
3	M5	32,46
4	M12	31,51
5	M2	31,47
6	M3	31,43
7	M6	31,41
8	M8	30,70
9	M1	30,69
10	MR5	30,82
11	MR2	30,60
12	MR15	30,55
13	MR4	30,49
14	MR1	30,39
15	MR14	30,22
16	MR8	30,16
17	MR3	30,14
18	MR6	30,03
19	MR9	29,97
20	MR12	29,66
21	MR10	29,48
22	MR7	28,94

Genel olarak bu suşların ürettiği EPS miktarı, aşağıda açıklanan daha önceki çalışmalardaki değerler ile karşılaştırıldığı zaman daha yüksek olarak tespit edilmişlerdir. *Streptococcus thermophilus*' un EPS miktarı 0,03 g/ L gibi düşük miktarlardan (Cerning ve ark., 1988) 890 mg/ L' ye kadar (Escalante ve ark., 1998) ve

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*' un EPS miktarı da 0,06- 0,15 g/ L arasında değişmektedir (Cerning, 1995; Cerning ve ark., 1986).

Buna karşın araştırmamızda elde edilen EPS miktarları, Shihata ve Shah (2002) çalışmasındaki tekli ve karışık kültürlerin EPS miktarları ile benzerlik göstermektedir. Shihata ve Shah (2002) tarafından elde edilen EPS miktarları Tablo 17' de verilmiştir.

Tablo 17. Tekli ve karışık kültürlerle ait EPS miktarları (Shihata ve Shah, 2002)

Kültür adı (Tekli ve/ veya karışık)	EPS miktarı (g/ kg)
ABT ^a -1	30,1 ± 3,6
ABT-1 + LB 2501	34,1 ± 3,4
ABT-1 + LB 2515	36,1 ± 4,5
ABT-4	27,6 ± 3,6
ABT-4 + LB ^b 2501	32,7 ± 3,1
ABT-4 + LB 2515	35,6 ± 1,2
Mix starter kültür ^c	30,1 ± 0,8
Mix + LB 2501	28,8 ± 1,9
Mix + LB 2515	36,4 ± 2,0
^a ABT= <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp. ve <i>S. thermophilus</i> .	
^b LB= <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> .	
^c Mix starter kültür= <i>S. thermophilus</i> 2002, <i>L. acidophilus</i> 2415 ve <i>Bifidobacterium</i> 20210.	

LAB tarafından üretilen EPS verimi aynı zamanda besin ortamının bileşimine (karbon ve nitrojen) ve organizmaların gelişme şartlarına (De Vuyst ve Degeest, 1999) bağlıdır. Bu çalışmada kullanılan besin ortamları tamamen standard tutulmuştur. Bu sebeple elde edilen değerler LAB izolatlarının aynı şartlardaki EPS üretim yeteneklerini görmemizi sağlamıştır. Maksimum ve minimum değerler ve yukarıda da belirtilmiş olan veriler de dikkate alındığında, çalışmada izole edilen izolatların genel olarak EPS verimlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

5.3. Ayran örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

Çalışmada üretilen ayran örneklerinin yağsız kuru madde (YKM), yağ, viskozite, protein, pH ve serum ayrılması değerlerini tespit etmek üzere analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler, ayranların üretiminden 24 saat sonra gerçekleştirilmiştir.

5.3.1. Ayran örneklerinin viskozite değerleri

Çalışmada hazırlanan ayranlara ait viskozite değerleri, sabit hacimdeki ayranın 2,5 mm ağız çapına sahip huniden akış hızının saniye cinsinden ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Elde edilen viskozite değerleri Tablo 18' de belirtilmiştir.

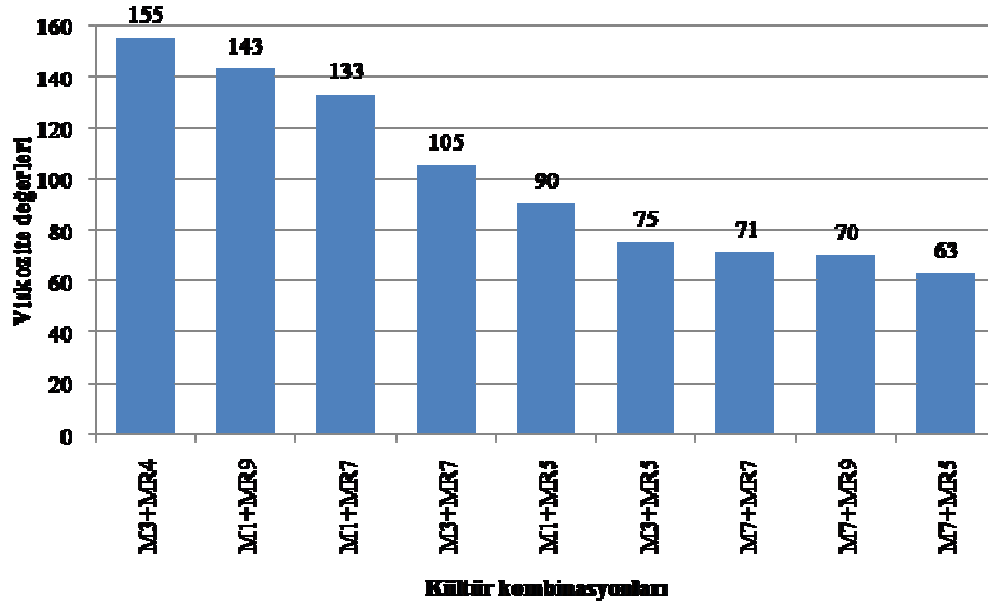
Tablo 18. Ayran örnekleri viskozite değerleri (saniye)

Kültür no	Kültür adı	Kültürdeki bakteri izolatları	EPS üretim miktarı	Viskozite değeri
1	M3+MR4	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Orta+ <i>L. lactis</i>	155,00
2	M1+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Orta	143,00
3	M1+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Düşük	133,00
4	M3+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Düşük	105,00
5	M1+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Yüksek	90,00
6	M3+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Yüksek	75,00
7	M7+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Düşük	71,00
8	M7+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Orta	70,00
9	M7+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Yüksek	63,00

Tablodan da açıkça görüldüğü gibi, elde edilen ayranlarda en yüksek viskozite değeri *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ile *Streptococcus thermophilus*' un bire bir karışımı ile oluşturulmuş 1 numaralı kültür ile hazırlanan ayranda tespit edilmiştir. Bu sonuç; standart ayran tanımına uygun bir kültür olmamakla birlikte, kültür hazırlamada kullanılan LAB izolatlarının birlikte oluşturdukları EPS miktar ve/ veya kalitesinin ürün viskozitesinin yüksek olması yönünde etki ettiğini göstermektedir.

Bu (1 numaralı) kültür ile elde edilen ayran viskozite değerini, EPS üretim miktarı düşük ve/ veya orta olan LAB izolatlarının karışımıyla hazırlanan diğer kültürler kullanılarak üretilmiş ayranların viskozite değerleri izlemiştir.

Ayran örnekleri viskozite değerlerindeki düşüşün grafik üzerinde ifadesi Şekil 14' de verilmiştir.



Şekil 14. Ayran kültür kombinasyonları ve viskozite değerleri (saniye)

Kültür hazırlamada kullanılan *Streptococcus thermophilus* izolatlarının ürettiği EPS miktarı arttıkça, bu izolatların dâhil edildikleri kültürler ile üretilen ayranların viskozitelerinin düştüğü gözlenmiştir. En düşük viskozite değeri en yüksek miktarda EPS üreten *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* izolatlarının karışımı ile hazırlanmış kültür ile üretilen ayranla elde edilmiştir.

Bu tespitler, bakteri izolatlarının bireysel EPS üretim miktar ve/ veya kalitesinin, kültür kombinasyonları halindeki EPS üretimlerinden farklılık gösterebileceğini akla getirmiştir.

İzolatların EPS üretim miktarları dikkate alınarak hazırlanan kültürler ile üretilmiş ayranların viskozite değerlerindeki farklılıkların belirlenmesi için varyans analizleri yapılmıştır. Yapılan varyans analizine ait değerler Tablo 19' da verilmiştir.

Tablo 19. Ayran örnekleri viskozite değerlerine ait varyans analiz tablosu

	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler Toplamı (KT)	Kareler Ortalaması (KO)	Frekans (F)	P
Genel	17	19670,444			
Kültürler	8	19640,444	2455,056	736,517	0,000**
Hata	9	30,000	3,333		

Kültürlerin, ayranların viskozite değerleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan varyans analizi sonucunda; kültürlerin ayranların viskozite değeri üzerine $p < 0,01$ düzeyinde önemli derecede etkide bulunduğu belirlenmiştir.

Önemli bulunan varyasyon kaynakları arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Duncan Testi yapılmıştır. Yapılan Duncan Testi sonucuna göre örnekler arasındaki farklılıklar Tablo 20' de gösterilmiştir.

Tablo 20. Ayran örnekleri viskozite değerleri Duncan testi analiz sonuçları

Kültürler	Ortalama	
9	63	A
8	70	B
7	71	BC
6	75	C
5	90	D
4	105	E
3	133	F
2	143	G
1	155	H

Buna göre örneklerin viskozite değerleri açısından 8 ve 7 numaralı örneklerle 6 ve 7 numaralı örneklerin kendi aralarında benzer oldukları, diğer örneklerin ise tamamen farklı gruplarda yer aldıkları tespit edilmiştir.

9 numaralı kültür, en yüksek miktarda EPS üreten LAB' den oluşturulmuş olmasına rağmen, bu kültür ile üretilen ayranın en düşük viskoziteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu tespit, LAB izolatlarının tek başlarına EPS üretim miktarlarının yüksek olmasının üretimlerinde kullanıldığı ayranların viskozitesini yükselteceği sonucunun çıkarılamayacağını göstermiştir. Söz konusu tespit van Marle ve Zoon (1995) tarafından yoğurtlar üzerinde gerçekleştirilen araştırmada olduğu gibi fermente süt ürünlerinin viskozitesi ve EPS konsantrasyonu arasında açık bir ilişki bulunmadığı sonucuyla benzerlik göstermektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi, bu çalışmada ayran örneklerinin üretilmesinde LAB izolatlarının bire bir karışımından oluşan kültürler kullanılmıştır. İlişkili olarak, kültürlerde LAB izolatlarının birbirleri ile etkileşimlerinin bir sonucu olarak farklı yapı ve/ veya miktarda EPS üretmiş olabildikleri ve bunun da ürün viskozite ve YKM değerlerinde beklenen paralelliğin görülmemesine sebep olabileceğini akla getirmektedir. Bu düşünce, yeni çalışmalar ile doğrulanması gerektiği bildirilmiş

olmakla birlikte, Bouzar ve ark. (1997)' nin çalışmasındaki yorum ile paralellik göstermektedir.

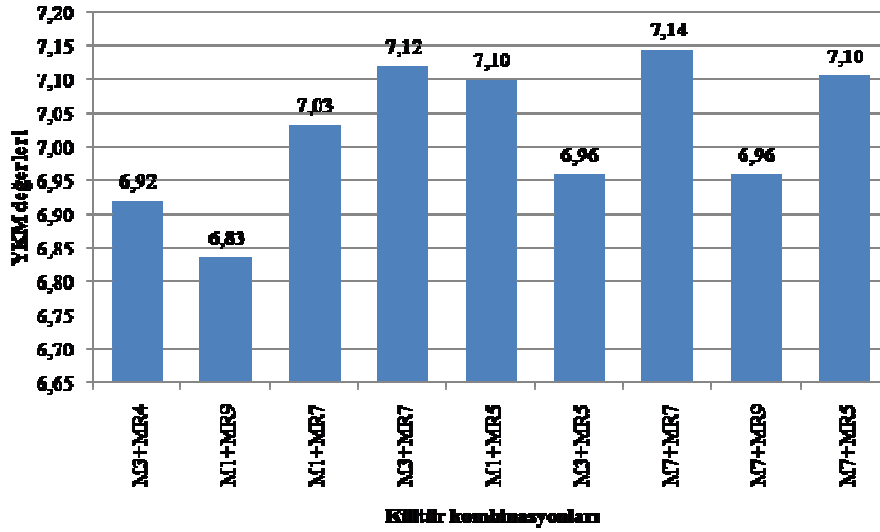
5.3.2. Ayran örneklerinin yağsız kuru madde değerleri

Çalışmada hazırlanan ayranlara ait YKM değerleri, ISO 6731' e (Anonymous, 1989) uygun olarak belirlenen toplam kuru madde değerinden (TKM) Gerber metoduna göre tespit edilen yağ değeri çıkarılarak elde edilmiştir. Elde edilen YKM değerleri Tablo 21' de belirtilmiştir.

Tablo 21. Ayran örnekleri YKM değerleri (g/ 100 g)

Kültür no	Kültür adı	Kültürdeki bakteri izolatları	EPS üretim miktarı	YKM değeri
1	M3+MR4	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Orta+ <i>L. lactis</i>	6,92
2	M1+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Orta	6,83
3	M1+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Düşük	7,03
4	M3+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Düşük	7,12
5	M1+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Yüksek	7,10
6	M3+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Yüksek	6,96
7	M7+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Düşük	7,14
8	M7+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Orta	6,96
9	M7+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Yüksek	7,10

Ayran örneklerine ait YKM değerleri incelendiğinde, elde edilen YKM değerleri ile bakteri suşlarının EPS üretme yeteneklerinin paralellik göstermediği düşünülmüştür. Bu yoruma ilişkin veriler, YKM değerlerinin görsel olarak da ifade edildiği Şekil 15 ile daha net görülebilmektedir.



Şekil 15. Ayran kültür kombinasyonları ve YKM değerleri (g/ 100 g)

Grafikten de görüldüğü gibi, Düşük + Orta kombinasyonları olan 2 ve 4 numaralı kültürler ile üretilmiş olan ayranların YKM değerleri arasında dikkat çekici bir farklılık söz konusudur.

Orta + Yüksek kombinasyonları olan 6 ve 8 numaralı kültürler ile üretilmiş olan ayranların YKM değerleri 6,96 g/ 100 g olarak tespit edilmiştir.

Düşük + Yüksek kombinasyonları olan 5 ve 7 numaralı kültürler ile üretilmiş olan ayranların YKM değerlerinin de birbirlerine, analizlerdeki tekrarlanabilirlik limitinde ($\pm 0,05$ g/ 100 g), çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Buna benzer/ yakın bir durum, Yüksek + Yüksek kombinasyonu olan 9 numaralı ve düşük + düşük kombinasyonu olan 3 numaralı kültüre ait ayran örneklerinde de söz konusudur.

Bu sonuçlar, daha önce de belirtildiği gibi, kültürleri oluşturan LAB izolatlarının tek başlarına EPS üretim yetenekleri ile, izolatların kültür içinde ve farklı besin ortamında EPS yeteneklerinin değiştiğini ve bunun da YKM gibi ayran fizikokimyasal özellikleri üzerinde belirleyici olduğunu düşündürmektedir.

İzolaların EPS üretim miktarları dikkate alınarak hazırlanan kültürler ile üretilmiş ayranların YKM değerlerindeki farklılıkların belirlenmesi için varyans analizleri yapılmıştır. Yapılan varyans analizine ait değerler Tablo 22' de verilmiştir.

Tablo 22. Ayran örnekleri YKM değerlerine ait varyans analiz tablosu

	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler Toplamı (KT)	Kareler Ortalaması (KO)	Frekans (F)	P
Genel	26	0,277000			
Kültürler	8	0,273000	0,0341000	131,543	0,000**
Hata	18	0,004667	0,0002593		

Kültürlerin ayranların YKM içeriği üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan varyans analizi sonucunda, kültürlerin ayranların YKM içeriği üzerine $p < 0,01$ düzeyinde önemli derecede etkide bulunduğu belirlenmiştir.

Farklı kültür kullanımına bağlı olarak, ayranların YKM içerikleri arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Duncan Testi yapılmıştır. Yapılan Duncan Testi sonucuna göre örnekler arasındaki farklılıklar Tablo 23' de gösterilmiştir

Tablo 23. Ayran örnekleri YKM değerleri Duncan testi analiz sonuçları

Kültürler	Ortalama	Önemlilik değeri
2	6,83	A
1	6,92	B
6	6,96	C
8	6,96	C
3	7,03	D
5	7,10	E
9	7,10	E
4	7,12	EF
7	7,14	F

Duncan Testi sonuçlarında; örneklerin YKM değerleri bakımından aralarındaki farklılık; 6 ve 8 numaralı kültürler için kendi aralarında, 5, 9 ve 4 numaralı kültürler için de kendi aralarında önemsiz ($p > 0,05$) düzeyde bulunmuştur. Bu iki grubun kendi aralarında ve tüm diğer kültürler (2, 1, 3, 7 numaralı kültürler) ile aralarındaki farklılığın ise $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak ayran örneklerinin YKM içeriği ve viskozite değerleri arasındaki ilişki olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Buna göre *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ile üretilen ayran hariç tutulduğunda, 2 numaralı kültür ile üretilen ayran en yüksek viskoziteye sahip (143 s) iken, bu ayran aynı zamanda YKM değeri en düşük (6,83 g/ 100 g) olan ayran olarak belirlenmiştir. Duncan Testine göre benzer grupta yer alan 6 ve 8 numaralı kültürlerle ait ayranların YKM değerleri, en düşük YKM değerine sahip olan 2 numaralı kültüre ait ayranın YKM değerinden 0,13 g/ 100 g daha fazla olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu ayranların viskozitesi 2 numaralı kültür ile üretilen ayran viskozitesinin neredeyse yarısı kadar olmuştur (143 s karşı 75 s ve 70 s). Yine Duncan Testine göre YKM değerleri açısından benzer grupta yer alan 5, 9, 4 numaralı kültürlerle ait ayranların YKM değerleri ile viskozite değerleri

paralellik göstermemiştir (7,10 g/ 100 g/ 90 sn, 7,10 g/ 100 g/ 63 sn, 7,12 g/ 100 g/ 105 sn). Bu da kültürdeki izolatların birlikte çalıştıklarında süt bileşenlerini (laktöz) farklı miktarlarda kullanarak farklı miktar ve yapıda EPS üreterek ürünlerde farklı viskozite değerlerinin oluşmasını sağladığını düşündürmüştür. Özellikle ayran üretiminin içerdiği karıştırma/ kırma işlemi, oluşan jeli parçalar halinde serumda dağıttığı için proteinlerle etkileşimi desteklemiş olabileceği düşünülmüştür. Bu düşünce farklı araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar ile paralellik göstermektedir (Potanin, 1991, Potanin ve Uriev, 1991). Aynı şekilde Bouzar ve ark. (1997) da karışık suşlu kültürlerde EPS' in çok daha hızlı üretildiğini ve bunların şeker kompozisyonlarının tekli saf kültürlerle elde edilenden farklı olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer düşünce de; EPS' in enzim etkisi ile değişime uğraması sonucu miktarının azalmasının kuru maddede değişiklik şeklinde ortaya çıkmış olabileceğidir. De Vuyst ve ark. (1998) ve Cerning ve ark. (1988) tarafından yapılan araştırma sonuçları da bu düşünceyi desteklemektedir.

Elde edilen bu YKM değerleri ile ilgili olarak bir de ekonomik ayran üretebilme olasılığının olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda ayran örnekleri 6,2 g/ 100 g YKM değerine ayarlanarak üretilmişlerdir. Bu çalışmada hazırlanan ayran örneklerinin yağsız kuru madde değerleri hedeflenen değerden ve dolayısıyla TS 3810 standardındaki (Anonymous, 1982) tam yağlı ayrana özgü YKM değerinden (% 6,0) yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durumun EPS üretim miktarlarıyla alakalı olduğu düşünülmüştür. Bu da çalışmamızda olduğu gibi yüksek miktarda EPS üretim yeteneğindeki LAB kültürleri ile fizikokimyasal değerler açısından standartlara uygun ve istenen duyuşsal özelliklere sahip ayran üretimi ile ilgili alternatif çalışmaların yapılabileceğini akla getirmiştir.

5.3.3. Ayran örneklerinin yağ değerleri

Çalışmada hazırlanan ayranlara ait yağ değerleri, Tablo 24' de belirtilmiştir.

Tablo 24. Ayran örnekleri yağ değerleri (g/ 100 g)

Kültür no	Kültür adı	Kültürdeki bakteri izolatları	EPS üretim miktarı	Yağ değeri
1	M3+MR4	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Orta+ <i>L. lactis</i>	2,18
2	M1+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Orta	2,22
3	M1+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Düşük	2,21
4	M3+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Düşük	2,18
5	M1+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Yüksek	2,18
6	M3+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Yüksek	2,18
7	M7+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Düşük	2,13
8	M7+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Orta	2,18
9	M7+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Yüksek	2,13

Tablodaki yağ değerleri incelendiğinde, 9 örnekten 5 tanesinde tespit edilen 2,18 g/ 100 g ortalama bir değer olarak ele alındığında geri kalan diğer tüm değerlerin analizlerdeki tekrarlanabilirlik limiti ($\pm 0,05$ g/ 100 g) dâhilinde bulunduğu

görülmektedir. Bu bakış açısıyla ayran örneklerine ait yağ değerleri arasındaki farklılık kabul edilebilir sınırlarda görülmektedir. Ancak kültürlerin; üretimlerinde kullanılan ayranların yağ içeriği üzerine etkisini net olarak belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizine ait değerler Tablo 25' de verilmiştir.

Tablo 25. Ayran örnekleri yağ değerlerine ait varyans analiz tablosu

	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler Toplamı (KT)	Kareler Ortalaması (KO)	Frekans (F)	P
Genel	26	0,0206500			
Kültürler	8	0,0205900	0,002573000	694,750	0,000**
Hata	18	0,0000667	0,000003704		

Varyans analizi sonucunda, kültürlerin ayranların yağ içeriği üzerine $p < 0,01$ düzeyinde önemli derecede etkide bulunduğu belirlenmiştir.

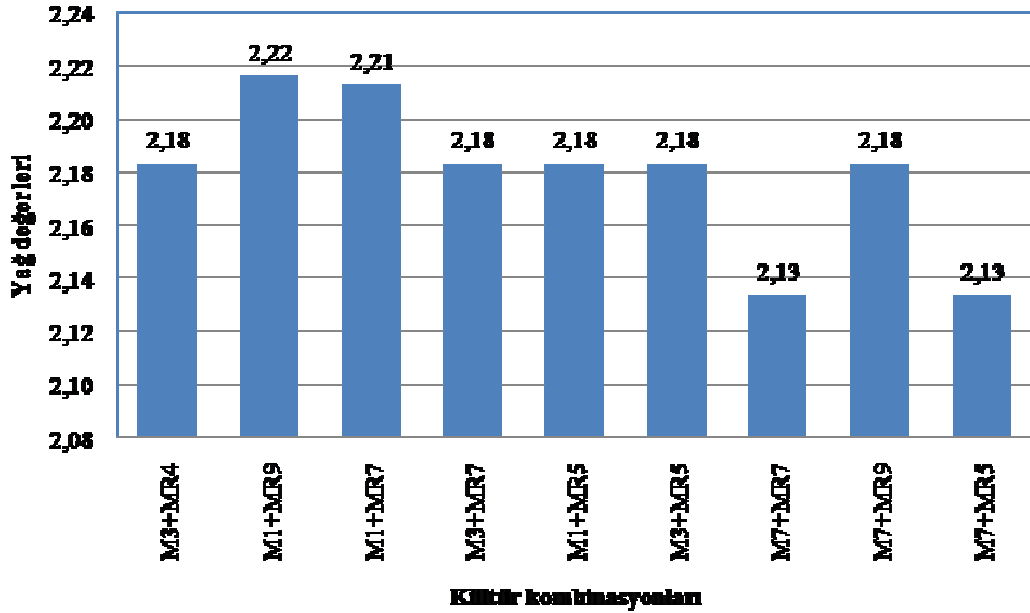
Kültürlerin ayranların yağ içeriği üzerine önemlilik düzeyindeki farklılıkları belirlemek amacıyla Duncan Testi yapılmıştır. Yapılan Duncan Testi sonucuna göre örneklerin göstermiş oldukları önemlilik değerleri Tablo 26' da gösterilmiştir.

Tablo 26. Ayran örnekleri yağ değerleri Duncan testi analiz sonuçları

Kültürler	Ortalama	
7	2,13	A
9	2,13	A
1	2,18	B
4	2,18	B
5	2,18	B
6	2,18	B
8	2,18	B
3	2,21	C
2	2,22	D

Yapılan Duncan Testi sonucuna göre örneklerin yağ içeriğinde 7 ve 9 numaralı kültürlerin kendi aralarında ve 1, 4, 5, 6, 8 numaralı kültürlerin de kendi aralarında önemsiz ($p > 0,05$) düzeyde etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu iki grubun birbirleri ve 3 ve 2 kültürleri arasındaki farklılığın ise $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Ayran örneklerinin yağ değerlerini gösteren grafik Şekil 16' da verilmiştir.



Şekil 16. Ayran kültür kombinasyonları ve yağ değerleri (g/ 100 g)

Grafikten açık olarak görüldüğü gibi, ayran örneklerinin yağ değerleri incelendiğinde Düşük + Orta kombinasyonu olan 2 numaralı kültür (M1+MR9) ve Düşük + Düşük kombinasyonu olan 3 numaralı kültür (M1+MR7) ile üretilmiş ayran örneklerinde en yüksek ve benzer (sırasıyla 2,22 ve 2,21 g/ 100 g) yağ değerlerinin olduğu görülmüştür.

Bununla birlikte Yüksek + Düşük kombinasyonu olan 7 numaralı kültür (M7+MR7) ve Yüksek + Yüksek kombinasyonu olan 9 numaralı kültür (M7+MR5) ile üretilmiş ayran örneklerinde en düşük ve eşit (sırasıyla 2,13 g/ 100 g) yağ değeri tespit edilmiştir.

Bu kültürlerin dışındaki diğer kültürler ile üretilen diğer ayranlarda aynı yağ değeri (2,18 g/ 100 g) tespit edilmiştir.

Burada LAB izolatlarının EPS üretim miktarları ile yağ değerleri arasındaki ilişkiyi açıklamak çok kolay görünmemektedir. Bu sonuçlar daha ziyade LAB izolatlarının bire bir karıştırılmış kombinasyonlarından oluşan kültürlerin ayran üretimi

sırasındaki fermentasyon boyunca etkileşimleri ve ortaya çıkardıkları fizikokimyasal değişimlerin ayran yağ değerleri üzerine etki etmiş olduğunu akla getirmektedir. YKM değerleri ile ilgili değerlendirmede olduğu gibi, kültürdeki LAB izolatları birarada iken farklı miktarda EPS üreterek kuru madde değerine etki etmiş ve bu durumda birim kuru maddedeki yağ oranını değiştirmiş olması olasılığı düşünülmüştür.

Madkor ve ark. (2000), laktobasillerin; suşa bağlı olarak, düşük de olsa lipolitik aktivite gösterdikleri için bazı peynir çeşitlerinin lipolitik olgunlaşmasında önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir. Bu bilgi çalışmamızda elde ettiğimiz kültürleri oluşturan LAB' nin lipolitik özellik göstererek ayran örneklerinde daha düşük yağ değerinin elde edilmesine sebep olmuş olabilecekleri de akla getirmektedir.

5.3.4. Ayran örneklerinin protein değerleri

Çalışmada hazırlanan ayranlara ait protein değerleri Tablo 27' de belirtilmiştir.

Tablo 27. Ayran örnekleri protein değerleri (g/ 100 g)

Kültür No	Kültür adı	Kültürdeki bakteri izolatları	EPS üretim miktarı	Protein değeri
1	M3+MR4	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Orta+ <i>L. lactis</i>	2,34
2	M1+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Orta	2,29
3	M1+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Düşük	2,28
4	M3+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Düşük	2,33
5	M1+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Yüksek	2,30
6	M3+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Yüksek	2,21
7	M7+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Düşük	2,30
8	M7+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Orta	2,25
9	M7+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Yüksek	2,30

Kültürlerin ayranların protein miktarı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Yapılan varyans analizine ait değerler Tablo 28' de verilmiştir.

Tablo 28. Ayran örnekleri protein değerlerine ait varyans analiz tablosu

	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler Toplamı (KT)	Kareler Ortalaması (KO)	Frekans (F)	P
Genel	17	0,029250			
Kültürler	8	0,025800	0,0032250	8,413	0,002**
Hata	9	0,003450	0,0003833		

Tablodan da görüldüğü gibi; varyans analizi sonucunda kültürlerin ayranların protein miktarı üzerine $p < 0,01$ düzeyinde önemli derecede etkide bulunduğu belirlenmiştir.

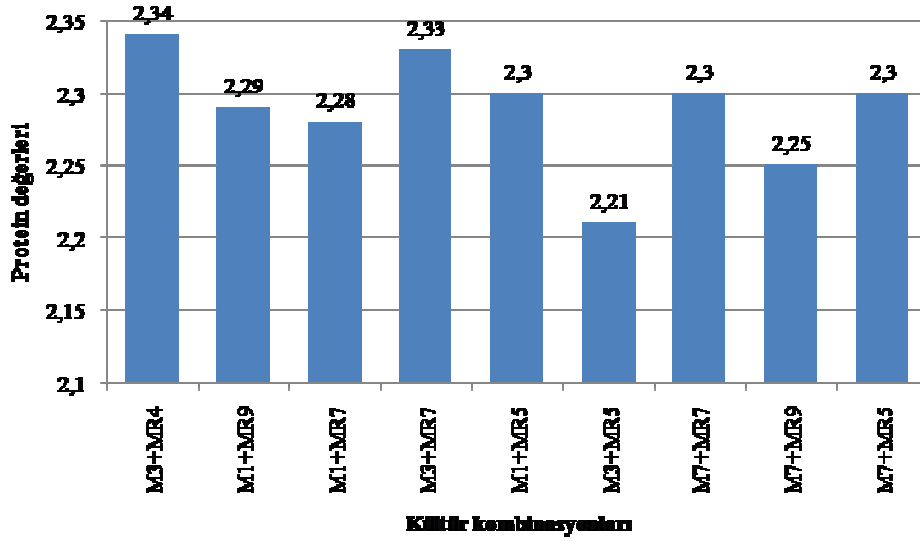
Kültürlerin ayranların protein miktarı üzerine önemlilik düzeyindeki farklılıkları belirlemek amacıyla Duncan Testi yapılmıştır. Yapılan Duncan Testi sonucuna göre, örneklerin gruplandırılması Tablo 29' da gösterilmiştir.

Tablo 29. Ayran örnekleri protein değerleri Duncan testi analiz sonuçları

Kültürler	Ortalama	
6	2,21	A
8	2,25	AB
3	2,28	BC
2	2,29	BCD
5	2,30	CDE
7	2,30	CDE
9	2,30	CDE
4	2,33	DE
1	2,34	E

Buna göre örneklerin protein miktarında 6, 8 numaralı örnekler kendi aralarında, 8, 3, 2 numaralı örnekler kendi aralarında, 3, 2, 5, 7, 9 numaralı örnekler kendi aralarında, 2, 5, 7, 9, 4 numaralı örnekler kendi aralarında ve 5, 7, 9, 4, 1 numaralı örnekler kendi aralarında önemsiz düzeyde ($p > 0,05$ düzeyinde) etkiye sahip olduğu, 6 numaralı örnek ile 5, 7, 9, 4, 1 numaralı örnekler arasındaki farklılığın ise $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Ayran örneklerine ait protein değerlerini gösteren grafik Şekil 17' de verilmiştir.



Şekil 17. Ayran kültür kombinasyonları ve protein değerleri (g/ 100 g)

Şekil 17' den net olarak görüldüğü gibi ayran örneklerinin protein miktarlarında diğer örneklere göre en dikkat çekici farklılık Orta + Yüksek kombinasyonu olan 6 numaralı kültür (M3+MR5) ile üretilmiş ayran örneğinde tespit edilmiştir. Bu durumun kültür tarafından oluşturulan EPS yapı ve miktarından çok olası proteine etki eden enzim varlığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Potanin, 1991; Potanin ve Uriev, 1991).

5.3.5. Ayran örnekleri pH değerleri

Çalışmada hazırlanan ayranlara ait pH değerleri, pH 7,00 ve pH 4,00 standart çözeltileri ile doğruluğu kontrol edilmiş, kalibrasyonu tamam olan, WTW 330 marka pH metre yardımıyla ölçülmüştür. Tespit edilen pH değerleri Tablo 30'. da belirtilmiştir.

Tablo 30. Ayran örnekleri pH değerleri

Kültür No	Kültür adı	Kültürdeki bakteri izolatları	EPS üretim miktarı	pH değeri
1	M3+MR4	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Orta+ <i>L. lactis</i>	3,77
2	M1+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Orta	3,86
3	M1+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Düşük	4,00
4	M3+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Düşük	4,26
5	M1+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Düşük+Yüksek	3,89
6	M3+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Orta+Yüksek	4,00
7	M7+MR7	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Düşük	4,14
8	M7+MR9	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Orta	3,90
9	M7+MR5	<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yüksek+Yüksek	4,10

Tablodan da görüldüğü gibi ayran örnekleri, kültürlerin EPS üretim yetenekleri ile ilişki kurmamızın zor olduğu, çok farklı pH değerleri göstermişlerdir.

Kültürlerin, ayranların pH değeri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizine ait değerler Tablo 31’ de verilmiştir.

Tablo 31. Ayran örnekleri pH değerlerine ait varyans analiz tablosu

	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler Toplamı (KT)	Kareler Ortalaması (KO)	Frekans (F)	P
Genel	26	0,575			
Kültürler	8	0,573	0,07166	716,583	0,000**
Hata	18	0,001800	0,0001000		

Tablodan da görüldüğü gibi kültürlerin, ayran pH değerleri üzerine $p < 0,01$ düzeyinde önemli derecede etkide bulunduğu belirlenmiştir.

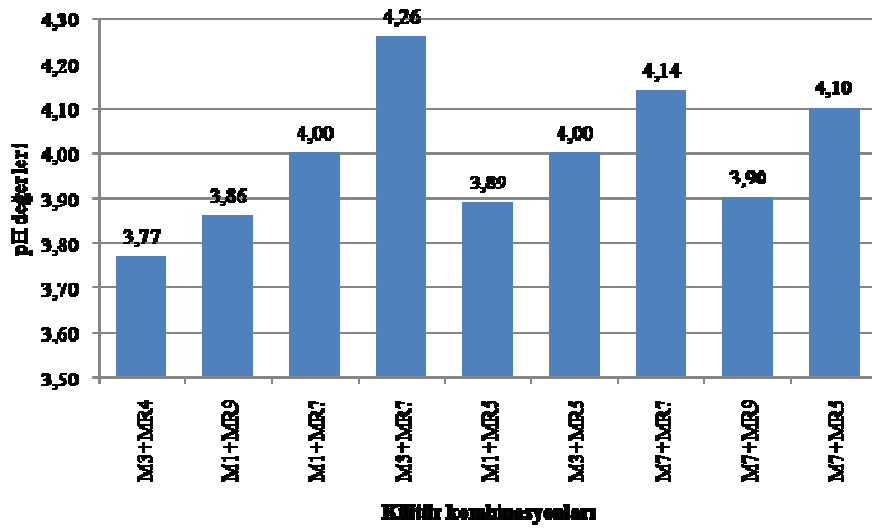
Kültürlerin ayranların pH değeri üzerine önemlilik düzeyindeki farklılıkları belirlemek amacıyla Duncan Testi yapılmıştır. Yapılan Duncan Testi sonucuna göre örnek grupları Tablo 32' de gösterilmiştir.

Tablo 32. Ayran örnekleri pH değerleri Duncan testi analiz sonuçları

Kültürler	Ortalama	
1	3,77	A
2	3,86	B
5	3,89	C
8	3,90	C
3	4,00	D
6	4,00	D
9	4,10	E
7	4,14	F
4	4,26	G

Yapılan Duncan Testi sonucuna göre örneklerin pH değerleri bakımından aralarındaki farklılık; 5 ve 8 numaralı kültürler için kendi aralarında, 3 ve 6 numaralı kültürler için kendi aralarında önemsiz ($p > 0,05$) düzeyde bulunmuştur. Bu iki grubun kendi aralarında ve tüm diğer kültürler ile aralarındaki farklılığın $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir.

Ayran örneklerinin pH değerlerindeki değişimleri gösteren grafik Şekil 18' de verilmiştir.



Şekil 18. Ayran kültür kombinasyonları ve pH değerleri

Grafikten de net olarak görüldüğü gibi, çalışmadaki ayranların pH değerlerinin birbirinden tamamen farklı olması kültürde bulunan izolatların laktoz kullanma yetenekleri ve/ veya simbiyoz etkileşimlerinin laktoz tüketimlerine nasıl etki ettiğinin bir göstergesidir. Bir numaralı kültür ile üretilen ayranın pH değerinin çok düşük olması kültürü oluşturan LAB izolatlarından bir tanesinin *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* olmasına bağlanmıştır. Bunun dışında pH değerlerinin 4,00 ve altına düşmüş olması ayran kültürlerinin post asidifikasyonlarının yüksek olduğu fikrinin yanında endüstriyel üretim prosesinin soğutma aşamasının laboratuvar şartlarında aynı etkinlik ile gerçekleştirilememe olasılığını akla getirmiştir.

5.3.6. Ayran örneklerinde serum ayrılması

Araştırmada hazırlanan ayran örnekleri 10 °C’ de 24 ve 48 saat bekletildikten sonra serum ayrılması kontrolleri yapılmıştır. Kontrollerde herhangi bir serum ayrılması gözlenmemiştir. Bu haliyle örneklerin Tonguç (2006) tarafından hazırlanan tam yağlı probiyotik ayranlar ve Köksoy (2003) tarafından hazırlanan % 30 su katkılı tuzsuz ayranlar ile benzer sonuçlar verdiği görülmektedir. Çalışmamızdaki ayran örneklerinin göstermiş olduğu EPS miktarları, viskozite, YKM ve yağ değerlerindeki farklılığa rağmen, serum ayrılması gözlenmemesinin ayran yapısındaki özellikle EPS, protein ve yağ etkileşimiyle ilgili olabileceği düşünülmüştür (Tonguç, 2006; Hess ve ark., 1997; Bhaskaracharya ve Shah, 2000). Ayrıca serum ayrılması için kontrol periyodunun daha uzun tutulması, bu konudaki yorumu netleştirmek için bir yol olabilir.

5.3.7. Ayran örneklerinin duyusal özellikleri

Araştırmamızda, duyusal değerlendirme sırasında panelistlerin yapmış oldukları değerlendirmeye ait puanların ortalama değerleri Tablo 33’ de verilmiştir.

Tablo 33. Ayrar örneklerinin duysal özellikleri

Kültür No	Kültür adı	Görünüm	Kıvam	Tat/ Koku	Notlar
1	M3+MR4	5	5	3	Çok ekşi Peynirimsi tat (bir panelistin yorumu)
2	M1+MR9	5	5	5	-
3	M1+MR7	5	5	3	-
4	M3+MR7	5	5	3	Ekşi
5	M1+MR5	5	5	3	-
6	M3+MR5	5	5	5	-
7	M7+MR7	5	5	5	-
8	M7+MR9	5	5	5	-
9	M7+MR5	5	5	3	Ekşi

Değerlendirmede 2, 6, 7 ve 8 numaralı ayran örnekleri panelistlerden tam puan almışlardır. Bu dört örnek dışındaki örnekler tat ve koku bakımından alışıldık ayran tat ve kokusundan farklı (ekşi, peynirimsi, karakteristik olmayan ya da kolay hissedilmeyen aroma gibi) olarak değerlendirilmiş ve bu sebeple daha düşük puan almışlardır. Bu puanlamaya rağmen tüm panelistlerin tüm örnekler için ortak görüşü; kıvamın normal ayrana göre daha dolgun ve pütürsüz olduğu şeklindedir. Ayran örneklerinin viskozitelerindeki farklılığa rağmen panelistler tarafından herhangi bir ayran örneği kıvamı diğerlerine göre çok koyu ya da çok ince şeklinde tanımlanarak ayrılmamıştır. Bu ayranların ağızda bıraktıkları dolgunluk hissinin benzer olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayran kültürleri ile ilgili bu değerlendirme; farklı kültür kombinasyonları ile yeni denemeler yapılması, farklı fermentasyon ve soğutma şartlarının sağlanması, daha yüksek oranda su ve daha düşük oranda tuz ilavesi ve daha

geniş gruplar ile duyuşal değerlendirme yapılması sureti ile beğenilen ayran tat ve kıvamının yakalanabileceği dūşünölmüştür. Doğrulama için, program dâhilinde bu değişkenlerin deneneceği yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Ayran örneklerinin tatları ile ilgili genel değerlendirme de ekři olmakla birlikte, ayranların geleneksel tüketim alışkanlığından dolayı iyi olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Ayrıca ayran örneklerinde tuzun çok hissedildiği bu sebeple oranının biraz daha düşük olmasının da tercih edilebileceği değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu da ayran üretiminde daha az tuz kullanılarak beğenilen ayran tadının elde edilebileceğini göstermektedir. Bu özelliğin, standartlarla da sınırlandırılan (TSE 3810' a göre % 1' den yüksek olmamalıdır) tuz kullanımını konusunda kolaylık sağlayacağı dūşünölmüştür. Ayran örneklerinin pH değerleri arasındaki farklılığa rağmen, ayranların tatları ile ilgili yapılan ekři değerlendirmeden 1 numaralı kültür ile üretilmiş ayran örneği çok ekři, buruk değerlendirmesi ile ayrılmıştır. Yine 1 numaralı örnek ile ilgili bir panelistin yapmış olduğu ağızda peynirimsi bir tat bırakıyor yorumu kültürü oluşturan izolatlardan birisinin farklı (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*) olmasına bağlanmıştır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu araştırmada ulusal gen kaynaklarımızdan, alışıldık özellikte standart kalitede ayran üretimi için uygun kültürler belirlenmesi hedeflenmiştir. Hareket noktası olarak laktik asit bakterilerinin EPS üretim miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla geleneksel yolla elde edilen yoğurtlardan uygun metodlarla izole edilen ve tanımlanan LAB içinden seçilen 7 LAB bakteri suşunun (3 farklı *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 1 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ve 3 farklı *Streptococcus thermophilus*) bire bir karıştırılması ile kültürler hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler ile ayranlar üretilmiş ve fizikokimyasal ve duyu analizleri yapılmıştır.

İlk olarak LAB' nin EPS üretim miktarları belirlenmiştir. Elde edilen EPS miktarları 28,94- 35,0 g/ L aralığında tespit edilmiştir. Bu şu ana kadar yapılan pek çok çalışmada (Cerning ve ark., 1988; Escalante ve ark., 1998; Cerning, 1995; Cerning ve ark., 1986) tespit edilen EPS üretim miktarından çok daha yüksek bir değerdir. Araştırmamızda elde edilen EPS miktarları Shihata ve Shah (2002) tarafından elde edilen değerler ile benzerlik göstermiştir.

LAB tarafından üretilen EPS verimi, besin ortamının bileşimiyle de (karbon ve nitrojen) ilgili olduğu ve organizmaların gelişme şartlarına (De Vuyst ve Degeest, 1999) bağlı olduğu için, bu faktörden etkilenmemek amacıyla çalışmamızda standart besin ortamı (MRS Broth) kullanılarak EPS ekstraksiyonuna gidilmiştir. Bu sebeple daha sonraki çalışmalarda, standart besin ortamının yanında ürünün üretileceği ortamlarda ve hatta tek bakteri suşları ve hazırlanabilecek kültür kombinasyonları şeklinde de EPS miktarlarını tespit edilmesi önerilmektedir. Bu şekilde; besin ortamı ve bakteri suşlarının birbirleri ile etkileşimi faktörlerinin EPS üretimini nasıl etkilediğini daha net görmek açısından iyi olacaktır. Dolayısıyla EPS üretim miktarları ile viskozite ve YKM gibi temel ürün özellikleri ile kültürlerin EPS üretim miktarları arasındaki etkileşimi yorumlamak da çok daha kolay olacaktır.

Ayran örneklerinin viskoziteleri ile ilgili değerlendirme, ayran akışının “saniye” cinsinden tespit edildiği değerler üzerinden yapılmıştır. En yüksek viskozite değeri

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* ile *Streptococcus thermophilus*' un bire bir karışımı ile oluşturulmuş 1 numaralı kültür ile hazırlanan ayranın tespiti yapılmıştır. Bu sonuç; kültürü oluşturan LAB' nin ve birlikte ürettikleri EPS miktar ve kalitesine bağlı olarak ürün viskozitesinin etkilendiğini düşündürmüştür. Viskozite açısından kültürde kullanılan LAB' sinin standart yoğurt ve ayran kültürüne ait bir bakteri olup olmamasının önem taşımadığı görülmektedir.

Çalışmada yüksek EPS üretim yeteneğindeki *Streptococcus thermophilus* bakteri izolatlarını içeren kültürler ile üretilmiş ayran örneklerinin viskozitelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. En düşük viskozite değeri de; en yüksek miktarda EPS üreten *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* izolatlarının karışımı ile hazırlanmış kültür ile üretilen ayranın elde edilmiştir. Bu tespitler, bakteri izolatlarının bireysel EPS üretim miktar ve/ veya kalitesinin, kültür kombinasyonları halinde ve/ veya farklı besin ortamlarında değişebileceğini akla getirmiştir. Benzer şekilde; 9 numaralı kültür, EPS üretme yeteneği en yüksek olan LAB'den oluşturulmuş olmasına rağmen, bu kültür ile üretilen ayranın en düşük viskoziteye (63 saniye) sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu tespit, LAB izolatlarının tek başlarına EPS üretim miktarlarının yüksek olmasının üretimlerinde kullanıldığı ayranların viskozitesini yükselteceği sonucunun çıkarılamayacağını göstermiştir. Söz konusu tespit Van Marle ve Zoon (1995) tarafından yoğurtlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada olduğu gibi, fermente süt ürünlerinin viskozitesi ve EPS konsantrasyonu arasında açık bir ilişki bulunmadığı sonucuyla benzerlik göstermektedir.

Ayran örneklerine ait YKM değerleri incelendiğinde de, elde edilen YKM değerleri ile bakteri izolatlarının EPS üretme yeteneklerinin paralellik göstermediği tespit edilmiştir. Benzer durum; YKM ve viskozite değerleri arasında da tespit edilmiştir.

Yukarıda belirttiğimiz savımızla ilişkili olarak; kültürlerde LAB izolatlarının birbirleri, enzimler ve besin ortamı ile etkileşimlerinin bir sonucu olarak farklı yapı ve/ veya miktarda EPS üretmiş olabildikleri ve bunun da ürün viskozite ve YKM değerlerinde beklenen paralelliğin görülmemesine sebep olabileceğini akla getirmiştir. Bazı araştırmacıların (Potanin, 1991, Potanin ve Uriev, 1991) elde ettikleri sonuçlar ile

paralellik gösteren bu tespit, belirtilen değişkenlerin kullanılacağı yeni çalışmalar ile netleştirilmelidir.

Bu çalışmada hazırlanan ayran örneklerinin YKM değerleri; hedeflenen değerden (6,2 g/ 100 g) yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durumun EPS üretim miktarlarıyla alakalı olduğu düşünölmüştür. Bu da çalışmamızda olduğu gibi yüksek miktarda EPS üretim yeteneğindeki LAB kültürleri ile fizikokimyasal değerler açısından standartlara uygun ve istenen duyuşal özelliklere sahip ayran üretimi ile ilgili alternatif çalışmaların yapılabileceğini akla getirmiştir.

Çalışmamızdaki ayran değerlerinin ortalamasından hareketle ve analiz tekrarlanabilirlikleri dikkate alındığında ayran örneklerine ait yağ değerleri arasındaki farklılık kabul edilebilir sınırlarda görölmektedir. Ancak istatistiksel analiz sonuçlarına göre yağ değerleri üzerinde farklılık önemli bulunmuştur.

Burada YKM değerleri ile ilgili değerlendirmede olduğu gibi kültürdeki LAB izolatları birarada iken farklı miktarda EPS üreterek kuru madde değerine etki etmiş ve bu durumda birim kuru maddedeki yağ oranını değiştirmiş olması olasılığı akla gelmiştir. Bu sav da YKM ve viskozite için önerilen çalışmalar dâhilinde incelenebilir. Farklı bir bakış açısı ile de; kültürdeki LAB' nin lipolitik özellik gösterip göstermediği de incelenmesi gereken bir özellik olarak görölmüştür.

Ayran örneklerinin protein miktarlarında diğer örneklere göre en dikkat çekici farklılık Orta + Yüksek kombinasyonu olan 6 numaralı kültür (M3+MR5) ile üretilmiş ayran örneğinde tespit edilmiştir. 6 numaralı ayran örneğinin protein değeri 2,21 g/ 100 g ile en düşük protein değeri olmuştur. Bu durum; kültür tarafından oluşturulan EPS yapı ve miktarından çok, proteine etki eden olası enzim varlığından kaynaklanabilir (Potanin, 1991, Potanin ve Uriev, 1991). Bu sava istinaden daha sonraki çalışmalarda "proteinaz" aktivitesinin de incelenmesi uygun olabilir.

Çalışmamızda elde edilen ayran örneklerine ait pH değerleri, kültürlerin EPS üretim yetenekleri ile paralel bir ilişki kurmamızın zor olduğu kanısını uyandırmıştır. Çalışmamızda elde edilen pH değerlerinin birbirinden tamamen farklı olması; kültürde bulunan izolatların laktoz kullanma yetenekleri ve/ veya simbiyoz etkileşimlerinin

laktoz tüketimlerine nasıl etki ettiğinin bir göstergesidir. 1 numaralı kültür ile üretilen ayranın pH değerinin çok düşük olması kültürde bulunan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* bakteri suşuna bağlanmıştır. Ayrıca, pH değerlerinin 4,00 ve altına düşmüş olması ayran kültürlerinin post asidifikasyonlarının yüksek olduğu fikrinin yanında endüstriyel üretim işleminin soğutma aşamasının laboratuvar şartlarında aynı etkinlik ile gerçekleştirilememe olasılığını akla getirmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, fermentasyon sonlandırma pH' sı yükseltilip soğutma işlemindeki etkinlik artırılarak son ürün pH' sı ve daha da önemlisi post asidifikasyon değerlendirilmelidir. Bu, ayran örneklerinin duyuşal değerlendirmelerinde ekşiliğın önüne geçebilmek için de titizlikle uygulanması gereken bir nokta olarak düşünölmüştür.

Çalışmamızda elde edilen ayranların tamamı ile ilgili, panelistlerin duyuşal değerlendirmedeki ortak görüşü; kıvamın iyi olması, ağızda dolgun ve kremşis his bırakmaları olmuştur. Bu da, çalışmamızda kullanılan ve daha önceki çalışmalarda tespit edilenlere oranla oldukça yüksek miktarda EPS ürettiğı görölen bakteri suşlarının yapıya olumlu etkisi olarak düşünölmüştür. Bu düşünce, EPS üretim miktarı bu araştırmadaki bakterilerinkine oranla daha düşük ve yüksek olan bakteri suşlarıyla üretilcek ürünlerin karşılaştırılması yoluyla desteklenebilir.

Ayran örneklerinin tat ve kokuları ile ilgili değerlendirmede panelistler; tuzun çok hissedildiğini ve bu sebeple formöilde (formöilde % 0,7 hedeflenmiştir) bir miktar azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Tüketim alışkanlıklarımıza göre ekşi ayranın tercih edilmesinin, tat konusunda değerlendirme yapılırken algıyı etkilediğı ancak ekşi tat değerlendirmesinin ürün pH' ları ile çok da paralel olmadığı görölmüştür.

Ayran kültürleri ile ilgili bu değerlendirme; farklı kültür kombinasyonları ile yeni denemeler yapılması, farklı fermentasyon ve soğutma şartlarının sağlanması, daha yüksek oranda su ve daha düşük oranda tuz ilavesi ve daha geniş gruplar ile duyuşal değerlendirme yapılması sureti ile beğenilen ayran tat ve kıvamının yakalanabileceğı düşünölmüştür. Doğrulama için, program dâhilinde bu değişkenlerin deneneceğı çalışmalar yapmak gerekmektedir.

Ayran örneklerinin pH değerleri arasındaki farklılığa rağmen, ayranların tatları ile ilgili yapılan "ekşi" şeklindeki değerlendirmede, 1 numaralı kültür ile üretilmiş ayran

örneği çok ekşi, buruk değerlendirmesi ile ayrılmıştır. Yine 1 numaralı örneğ ile ilgili bir panelistin yapmış olduğu ağızda peynirimsi bir tat bırakıyor yorumu kùltürü oluşturan izolatlardan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* olmasına bağlanmıştır. Bu kùltür, geleneksel yoğurt ve ayran kùltüründen farklı bir bakteri suşu iğermesine rağmen diğer ayranlara göre çok farklı ya da kötü olarak değerlendirilmemiştir. Ekşi tat ve tuzun bu değerlendirmede etkisi olmuş olabilir.

Araştırmada hazırlanan ayran örneğleri 10 °C' de 24 ve 48 saat bekletildikten sonra serum ayrılması kontrolleri yapılmıştır. Çalışmamızdaki ayran örneğlerinin göstermiş olduğu EPS miktarları, viskozite, YKM ve yağ değerlerindeki farklılığa rağmen serum ayrılması gözlenmemesinin ayran yapısındaki özellikle EPS, protein ve yağ etkileşimiyle ilgili olabileceği düşünölmüştür. Ayrıca serum ayrılması için kontrol periyodununun daha uzun tutulması, bu konudaki yorumu netleştirmek için bir yol olabilir. Bunun dışında YKM ve tuz ile ilgili olarak önerilen daha fazla su ve daha az tuz ilavesinin bu yapıyı ve dolayısıyla serum ayrılmasını arttıracak yönde etki edebileceğinden denenmesinin olumlu olacağı düşünöncesindeyiz.

7.3. Ek 3. Bakteri izolatlarının tanımları

No	Bakteri izolati	Tanımı
1	M7	<i>Streptococcus thermophilus</i>
2	M9	<i>Streptococcus thermophilus</i>
3	M5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1
4	M12	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
5	M2	<i>Streptococcus thermophilus</i>
6	M3	<i>Streptococcus thermophilus</i>
7	M6	<i>Streptococcus thermophilus</i>
8	M8	<i>Streptococcus thermophilus</i>
9	M1	<i>Streptococcus thermophilus</i>
10	M4	<i>Enterococcus faecium</i>
11	M10	<i>Enterococcus durans</i>
12	MR5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
13	MR2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
14	MR15	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
15	MR4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> 1
16	MR1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
17	MR14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
18	MR8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
19	MR3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
20	MR6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
21	MR9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
22	MR12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
23	MR10	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
24	MR7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>

7.4. Ek 4. API 50 tanımlama tabloları

API 50 CH

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*

	0	GLY	-	
	1	ERY	-	
	2	DARA	-	
	3	LARA	-	
	4	RIB	-	
	5	DXYL	-	
	6	LXYL	-	
	7	ADO	-	
	8	MDX	-	
	9	GAL	-	
	10	GLU	+	
	11	FRU	+	
	12	MNE	+	
	13	SBE	-	
	14	RHA	-	
	15	DUL	-	
	16	INO	-	
	17	MAN	-	
	18	SOR	-	
	19	MDM	-	
	20	MDG	-	
	21	NAG	-	
	22	AMY	-	
	23	ARB	-	
	24	ESC	+	
	25	SAL	-	
	26	CEL	-	
	27	MAL	-	
	28	LAC	+	
	29	MEL	-	
	30	SAC	-	
	31	TRE	-	
	32	INU	-	
	33	MLZ	-	
	34	RAF	-	
	35	AMD	-	
	36	GLYG	-	
	37	XLT	-	
	38	GEN	-	
	39	TUR	-	
	40	LYX	-	
	41	TAG	-	
	42	DFUC	-	
	43	LFUC	-	
	44	DARL	-	
	45	LARL	-	
	46	GNT	-	
	47	2KG	-	
	48	5KG	-	

API 50 CH

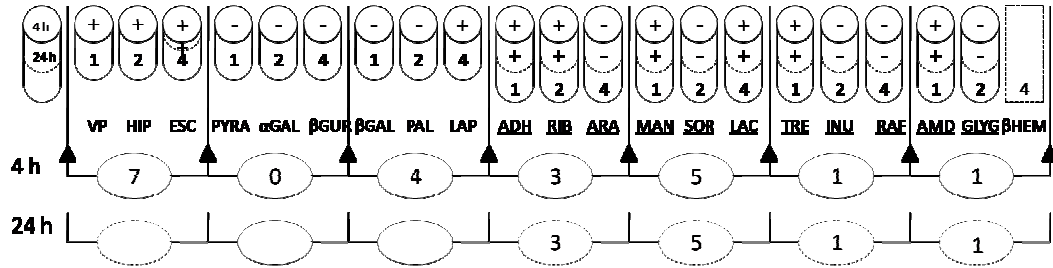
Streptococcus thermophilus

	0	GLY	-	
	1	ERY	-	
	2	DARA	-	
	3	LARA	-	
	4	RIB	-	
	5	DXYL	-	
	6	LXYL	-	
	7	ADO	-	
	8	MDX	-	
	9	GAL	-	
	10	GLU	+	
	11	FRU	+	
	12	MNE	-	
	13	SBE	-	
	14	RHA	-	
	15	DUL	-	
	16	INO	-	
	17	MAN	-	
	18	SOR	-	
	19	MDM	-	
	20	MDG	-	
	21	NAG	-	
	22	AMY	-	
	23	ARB	-	
	24	ESC	-	
	25	SAL	-	
	26	CEL	-	
	27	MAL	-	
	28	LAC	+	
	29	MEL	-	
	30	SAC	+	
	31	TRE	-	
	32	INU	-	
	33	MLZ	-	
	34	RAF	-	
	35	AMD	-	
	36	GLYG	-	
	37	XLT	-	
	38	GEN	-	
	39	TUR	-	
	40	LYX	-	
	41	TAG	-	
	42	DFUC	-	
	43	LFUC	-	
	44	DARL	-	
	45	LARL	-	
	46	GNT	-	
	47	2KG	-	
	48	5KG	-	

7.5. Ek 5. API 20 Strep tanımlama tabloları

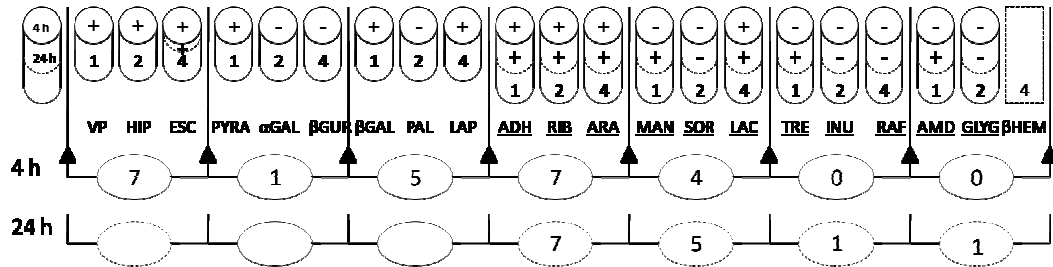
API 20 Strep

Lactococcus lactis ssp. lactis



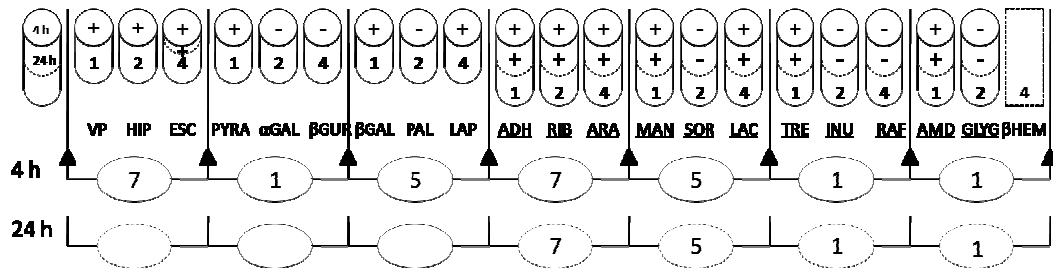
API 20 Strep

Enterococcus durans



API 20 Strep

Enterococcus faecium



8. KAYNAKLAR

Akın, N., (1999). İnek ve koyun sütünden üretilen bazı konsantre fermente süt ürünlerinin sertliği ve duyuşal özellikleri, J. Veterinary and Animal Sci., 3, 583- 590.

Anonymous (1982). TS- 3810, Ayran, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonymous (1989). ISO 6731 Milk, cream and evaporated milk- Determination of total solids content (Reference Method). First edition 1989-05-15.

Anonymous (1991). Ankara Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi uygulama laboratuvarı ders notları.

Anonymous (1998). Danone Milky Way eğitim notları, bölüm 9; ürün kontrol yöntemleri

Anonymous (1999). Ferment Formation, Danone Grup eğitim notları, Lüleburgaz.

Anonymous (2000a). Danone analiz talimatları, Ayran Yağ Analizi, Lüleburgaz.

Anonymous (2000b). Danone analiz talimatları, Ayran Serum Miktarı Tayini, Lüleburgaz.

Anonymous (2000c). Danone analiz talimatları, Ayran Viskozite Tayini, Lüleburgaz.

Anonymous (2001). BS EN ISO 8968- 1: 2002 (The European Standard EN ISO 8968- 1: 2001 has the status of a British Standard). Milk- Determination of nitrogen content- Part 1: Kjeldahl method.

Anonymous (2002 a). KMH/ Counting Lactobacillus bulgaricus in Yoghurt- Bulletin/ Feb 2002/ 1:1

Anonymous (2002 b). KMH/ Counting Streptococcus thermophilus in Yoghurt- Bulletin/ Feb 2002/ 1:1

Anonymous (2006). Danone ürün spesifikasyonları, Ayran spesifikasyonu, s. 4 ve s. 8.

Atamer, M., Gürsel, A., Tamuçay, B., Gençer, N., Yıldırım, G., Odabaşı, S., Karademir, E., Şenel, E. ve Kırdar, S. (1999). Dayanıklı ayran üretiminde pektin kullanım olanakları üzerine bir araştırma, *Gıda*, 24, 119- 126.

Bhaskaracharya, R. K., Shah, N. P. (2000). Texture characteristics and microstructure of skim milk Mozzarella cheese made using exopolysaccharide and non-exopolysaccharide producing starter cultures. *The Australian J. Dairy Tech.*, 55, 132-138.

Beal, C., Skokanova, J., Latriille, E., Martin, N., Corrieu, G., (1999). Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt, *J. Dairy Sci.*, 82, 673- 681.

Benezech, T. ve Maingonnat, J. F., (1994). Characterisation of rheological properties of yogurt, a review, *J. Food Engineering*, 21, 447- 472.

Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M. (1997). Exopolysaccharide production and texture promoting abilities of mixed strain starter cultures in yogurt production. *J. Dairy Sci.*, 80, 2310- 2317.

Bouzar, F., Cerning, J. ve Desmazeaud, M. (1996) Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *J. Dairy Sci.* 79, 205- 211.

Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75, 463- 472.

Cerning, J. (1994). Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. In H. de Roissart, F. M. Luquet, *Bactéries Lactiques. Aspects Fondamentaux et Technologiques.*, Vol. I, 309- 329 France: Loriga

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. J. (1992). Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 75, 692-699.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. J. (1990). Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sci. des Aliments*, 10, 443- 451.

Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 113- 130.

Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., Landon, M. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotech. Letters* 10, 255-260.

Cerning, J. Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., Landon, M. (1986). Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotech. Letters*, 8, 625- 628.

Degeest, B., De Vuyst, L. (1999). Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2863-2870.

de Vos, W. M. (1996). Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*, 70, 223- 242.

De Vuyst, L., Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 153- 177.

De Vuyst, L., Vanderveken, F., van de Ven, S., Degeest, B. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth- associated biosynthesis. *J. App. Microbiol.*, 84, 1059- 1068.

De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V. and Degeest, B., (2003). Exopolysaccharide producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy J.*, 13, 707- 717.

Duboc, P., Mollet B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, *International Dairy J.*, 11, 759- 768.

Ellner, R. (2001). Soru ve cevaplarla Süt Mikrobiyolojisi Çevirenler; Arıcı, M., Demirci, M., Tekirdağ.

Escalante, A., Villegas, J., Wachter, C., García-Garibay, M., Farrés, A., (2002). Activity of the enzymes involved in the synthesis of exopolysaccharide precursors in an overproducing mutant ropy strain of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Letters*, 209, 289- 293.

Escalante, A., Wachter- Rodarte, C., Garcia- Garlybay, M., Farres, A. (1998). Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 108- 114.

Faber, E. J., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. (2001a). Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 291. *Carbohydrate Research*, 331, 183–194.

Faber, E. J., van den Haak, M. J., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. (2001b). Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. *Carbohydrate Research*, 331, 173– 182.

Faber, E. J. (2000). Investigation of the structure of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Faber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. G. (1998). The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research*, 310, 269–276.

Gallegos, C. ve Franco, J. M., (1999). Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. *Current Opinion in Colloid & Interface Sci.*, 4, 288- 293.

Gamar, L., Blondeau, K., Simonet, J. M. (1997). Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. J. Appl. Microbiol., 83, 281- 287.

Gancel, F., Novel, G. (1994a). Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. J. Dairy Sci., 77, 685- 688.

Gancel, F., Novel, G., (1994b). Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* cultures: 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. J. Dairy Sci., 77, 689- 695.

Grobben, G. J., Sikkema, J., Smith, M. R., de Bont, J. A. M. (1995). Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. J. Appl. Bacteriology, 79, 103-107.

Gülümser, N., (1986). Karboksimetil selüloz ile ayranın dayanıklı hale getirilmesi üzerine araştırmalar, Yüksek lisans tezi, E. Ü. Ziraat Fakültesi, İzmir.

Güzel- Seydim, Z. B., Sezgin, E., Seydim, A. C. (2005). Influence of incubation temperatures and exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. Food Control, 16, 205- 209.

Harwalkar, V. R. ve Kalab, M., (1986). Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yoghurt made from reconstituted nonfat dry milk, Food Microstructure, 5, 287- 294.

Hassan, A. N., Frank, J. F., Schmidt, K. A., Shalabi, S. I. (1996). Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. J. Dairy Sci., 79, 2098–2103

Hess, S. J., Roberts, R. F., Ziegler, G. R. (1997). Rheological properties of nonfat yoghurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharides or using commercial stabilizer system. J. Dairy Sci., 80, 252- 263.

Keogh, M. K. ve O' Kennedy, B. T., (1998). Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids, J. Food Sci., 63, 108- 112.

Kılıç, S., Karagözlü, C., Akbulut, N. ve Mater, Y., (2003). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*' un ekzopolisakkarit oluşturma özellikleri. Dünya Gıda, 8, 64-68.

Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., Yamaguchi, T. (1991). Antitumoral activity of slime- forming encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, "viili". Animal Sci. and Technol., 62, 277-283.

Koçer, E. (2002). Ekzopolisakkarit üreten Laktokok suşlarının izolasyonu, tanısı ve bu suşlarda ekzopolisakkarit üretiminin genetik analizi yüksek lisans tezi, A. Ü. Fen Bilimleri Enst.

Köksoy, A., (2003). Ayranın yapısal özelliklerinin iyileştirilmesi yüksek lisans tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enst.

Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. International J. Food Microbiol., 64, 71- 80.

Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Broadbent, J. R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR- 1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. Appl. Environ. Microbiol., 64, 2147- 2151.

Lucey, J. A. ve Singh, H., (1998). Formation and physical properties of acid milk gels: a review, Food Research International, 30, 529- 542.

Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H. ve Munro, P. A., (1999). Stability of model acid milk beverage: Effect of pectin concentration, storage temperature and milk heat treatment, J. Texture Studies, 30, 305- 318.

Lucey, J. A., (2001). The relationship between rheological parameters and whey seperation in milk gels, Food Hydrocolloids, 15, 603- 608.

Madkor, S. A., Tong, P. S., El Soda, M. (2000). Ripening of Cheddar Cheese With Added Attenuated Adjunct Cultures of *Lactobacilli*. J. Dairy Sci., 83, 1684-1691.

Marshall, V. M., & Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide- producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. International J. Food Sci. Tech., 34, 137-143.

Marshall, V. M., Dunn, H., Elvin, M., McLay, N., Gu, Y., Laws, A. P. (2001). Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. Carbohydrate Research, 331, 413-422.

Mårtenson, O., Dueñas- Chasco M., Irastorza, A., Öste, R., Holst, A. (2003). Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. Lebensm.- Wiss. U.- Technol., 36, 353- 357.

Metin, M. (1999). Süt Teknolojisi.1.Bölüm: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. E.Ü. Müh Fak. Yayın No:33,Genişletilmiş 3 Baskı, E.Ü. Rektörlüğü Basımevi, Bornova.

Nakajima, H., Toba, T., Toyoda, S. (1995). Enhancement of antigen- specific antibody production by extracellular slime products from slime- forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495 in mice. Int. J. Food Microbiol., 25, 153- 158.

Navarini, L., Abatangelo, A., Bertocchi, C., Conti, E., Bosco, M., & Picotti, F. (2001). Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* SFi20. International J. Biological Macromolecules, 28, 219-226.

Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J., (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 66, 2302- 2310.

Parnell- Clunies, E., Kakuda, Y., Deman, J. M., (1986). Influence of heat treatment of milk on the flow properties of yoghurt, J. Food Sci., 51, 1459- 1462.

- Penna, A. L. B., Sivieri, K., Oliveria, M. N., (2001). Relation between quality and rheological properties of lactic beverages, *J. Food Engin.*, 49, 4- 13.
- Potantin, A. A. (1991). On the mechanism of aggregation in the shear flow suspensions. *J. Colloid and Interface Sci.*, 145, 140- 157.
- Potantin, A. A., Uriev, N. B. (1991). Microrheological models of aggregated suspensions in shear flow. *J. Colloid and Interface Sci.*, 142, 385- 395.
- Raviart, A. (2003). Danone Vitapole. Caractérisation des Exopolysaccharides de *Streptococcus thermophilus*. *Ensia*, 1- 53.
- Ricciardi, A., Clementi, F. (2000). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Italian J. Food Sci.*, 1, 23- 45.
- Robinson, R. K. (1985). *Dairy Microbiol. Volume 1 The Microbiology of Milk*, 51- 59.
- Rohm, H., Kovac, A. (1994). Effects of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yogurt gels. *J. Texture Studies*, 25, 311- 329.
- Ruas- Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 163- 171
- Schkoda, P., Hechler, A. ve Kessler. H. G., (1999). Effect of minerals and pH on rheological properties and syneresis of milk- based acid gels. *Int. Dairy J.*, 9, 269- 273
- Schmidt, R. H., Vargas, M. M., Smith, K. L. ve Jezeski, J. J., (1985). The effect of ultra-high temperature milk processing on yogurt texture, *J. Food Processing and Preservation*, 9, 235- 240.
- Sebastiani, H., Zelger, G., (1998). Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 53, 15- 20.
- Shihata, A., Shah, N. P. (2002). Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture

of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 765- 772

Sikkema, J., Oba, T. (1998). Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. *Snow Brand R& D Reports*, 107, 1- 31.

Skriver, A., Roemer, H., Qvist, K. B. (1993). Rheological characterization of stirred yoghurt: Viscosimetry. *J. Texture Studies*, 24, 185- 198.

Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P. (1999). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 105–111

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G., (2004). The relative effect of milk base, starter and process on yoghurt texture: A review, *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrit.*, 44, 113- 137

StAAF, M., Yang, Z., Huttunen, E., Widmalm, G. (2000). Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161. *Carbohydrate Research*, 326, 113–119.

Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt Sci. and Tech.*. Cambridge, GB: CRC Press.

Tonguç, İ. E., (2006). Probiyotik ayran üretimi üzerine bir araştırma, Yüksek lisans tezi, E. Ü. Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir, 54.

van Casteren, W. H. M., Dijkema, C., Schols, H. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J. (2000a). Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* B39. *Carbohydrate Research*, 324, 170–181.

van Casteren, W. H. M., de Waard, P., Dijkema, C., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. (2000b). Structural characterisation and enzymatic modification of the

exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* B891. Carbohydrate Research, 327, 411–422.

van den Berg, D. J. C., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Ledebøer, A. M., Verrips, C. T. (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0- 1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol., 61, 2840- 2844.

van Geel- Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Dijkhuizen, L. (1999). Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild type strain and by mutant strains. Appl. Environ Microbiol., 65, 3008- 3014.

Vanhaverbeke, C., Bosso, C., Colin-Morel, P., Gey, C., Gamar- Nourani, L., Blondeau, K., Simonet, J. M., Heyraud, A. (1998). Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. Carbohydrate Research, 314, 211– 220.

van Kranenburg, R. (1999). Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*: A molecular characterisation. Ph.D. Thesis, University of Wageningen, The Netherlands.

van Marle, M. E., Zoon, P. (1995). Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim milk gels. Netherlands Milk and Dairy J., 49, 47- 65.

Velez- Ruiz, J. F. ve Cánovas, G. V.B., (1997). Rheological properties of selected dairy products, Critical Rev. in Food Sci. and Nutrit., 37, 311- 359.

Vincent, S. J. F., Faber, E. J., Neeser, J. R., Stingele, F., Kamerling, J. P. (2001). Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonius* Sc136. Glycobiology, 11, 131–139.

Welman, A., D., Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biotech. 21, 269- 274.

Yang, A., Staaf, M., Huttunen, E., Widmalm, G. (2000). Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* K16. Carbohydrate Research, 329, 465–469

Zoon, P., van Marle, M. E. (1998). Relation between the consistency of stirred yoghurt and the structure of the yoghurt gel. Texture of fermented milk products and dairy desserts, Vicenza, Italy, May 5- 6, 1997.

9. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Kırklareli' de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Babaeski Alpulu İlkokul ve Lisesinde tamamladı. 1989 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi bölümü' nden 1993 yılında mezun oldu. 1994-1997 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans eğitimini tamamladı ve 2002 yılında aynı Anabilim Dalı' nda Doktora eğitimine başladı.