

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlkay KIRMA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

HAZİRAN 2016

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK
EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlkay KIRMA

(506151518)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Z. Dilek HEPERKAN

HAZİRAN 2016

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506151518 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **İlkay KIRMA**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“GIDA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Z. Dilek HEPERKAN

.....

İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Neşe Şahin Yeşilçubuk

.....

İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. Meral Birbir

.....

Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : 2 Mayıs 2016

Savunma Tarihi : 6 Haziran 2016

Sevgili aileme ve değerli hocama,

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca araştırmamın gerçekleştirilmesi, geliştirilmesi ve değerlendirilmesi konusunda desteklerini ve fikirlerini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Dilek HEPERKAN’a teşekkür ederim. Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan çok sevgili annem Ayşe KIRMA’ya ve çalışmalarım boyunca desteğini ilgisini ve pozitif enerjisini esirgemeyen çok değerli Oktay Şahin ŞADOĞLU’na çok teşekkür ederim.

Haziran 2016

İlkay Kıрма

(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Laktik Asit Bakterileri	3
2.1.1 Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri	10
2.1.2 <i>Lactobacillus</i> cinsi bakteriler.....	14
2.1.3 <i>Lactococcus</i> cinsi bakteriler.....	17
2.1.4 <i>Leuconostoc</i> cinsi bakteriler.....	18
2.1.5 <i>Pediococcus</i> cinsi bakteriler.....	21
2.1.6 <i>Streptococcus</i> cinsi bakteriler	23
2.1.7 <i>Weisella</i> cinsi bakteriler	24
2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Metabolitleri	26
2.2.1 Organik asitler.....	26
2.2.1.1 Laktik asit.....	27
2.2.1.2 Asetik asit.....	28
2.2.1.3 Propiyonik asit	29
2.2.1.4 Benzoik asit.....	30
2.2.2 Bakteriyosin	30
2.2.3 Hidrojen peroksit.....	37
2.2.4 Karbondioksit.....	38
2.2.5 Diasetil	39
2.2.6 Etanol	40
2.2.7 Reuterin.....	40

2.3 EPS Genel Özellikleri	41
3. MATERYAL VE METOT	47
3.1 Materyal	47
3.1.1 Bakteri izolatları	47
3.1.2 Buğday suyu hazırlanması.....	47
3.1.3 Soya suyu hazırlanması	48
3.1.4 Besiyeri ve çözeltiler	48
3.2 Metot	48
3.2.1 Bakteri suşlarının numunelere ekimi.....	48
3.2.2 Numunelerin pH ölçümü	48
3.2.3 Ekzopolisakkarit eldesi ve oluşan ekzopolisakkarit (toplam karbonhidrat) tayini	48
3.2.4 Differansiyel tarama kalorimetre (DSC) analizi.....	49
3.2.5 Fiziksel ve kimyasal analizler	50
3.2.5.1 Protein tayini	51
3.2.5.2 Kül tayini.....	51
3.2.5.3 Nem tayini	51
3.2.5.4 Yağ tayini	52
3.2.6 İstatistik analizi.....	52
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1 Kimyasal ve Fiziksel Analiz Sonuçları	53
4.2 Mikrobiyal Analiz Sonuçları	54
4.3 İstatistik Analiz Sonuçları	61
4.3 DSC Analizi Sonuçları	64
5. SONUÇ	71
KAYNAKLAR.....	73
EKLER.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	105

KISALTMALAR

EPS	: Ekzopolisakkarit
GRAS	: Generally Recognized As Safe
EMP	: Embden-Meyerhof-Parnas
HMP	: Hegsoz-mono-fosfat
IBD	: İltihabi bağırsak hastalığı
IBS	: Huzursuz bağırsak sendromu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
TCA	: Trikarboksilik asit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
NIR	: Yakın kızılötesi spektroskopisi

SEMBOLLER

v : Hacim

μ : Mikro

g : Gram

mg : Miligram

l : Litre

w : Ağırlık

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Bazı gıdalar ve fermantasyonlarında kullanılan laktik asit bakterileri (Erten ve diğ, 2011; Evren ve diğ, 2014). ..	8
Çizelge 2.2 : Laktik asit bakteri örnekleri ve gıda endüstrisindeki avantajları (Leroy ve diğ, 2004). ..	9
Çizelge 2.3 : Süt ve süt ürünlerinde bulunan probiyotik laktik asit bakteri örnekleri (Xiao ve diğ, 2014).	11
Çizelge 2.4 : Şaraptan elde edilen bazı <i>Lactobacillus</i> türlerinin karakteristikleri (Fugelsang ve diğ, 2007).	16
Çizelge 2.5 : Farklı kaynaktan elde edilen türlerin gelişimine sıcaklık etkisi (Itoi ve diğ, 2009).	18
Çizelge 2.6 : Fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan <i>Lactococcus</i> türleri (Teuber, 1995).	19
Çizelge 2.7 : Şarapla ilgili olan bazı <i>Pediococcus</i> türlerinin karakteristik özellikleri (König ve diğ, 2009).	22
Çizelge 2.8 : Bakteriyosin sentezleyen bazı laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriyosin çeşitleri ve etki spektrumları (Çon ve diğ, 2000).	32
Çizelge 2.9 : Bazı bakteriyosinlerin uyguladığı gıdalar ve etkileri (Kurt ve diğ, 2005).	36
Çizelge 2.10 : Ekzopolisakkarit üretebilen laktik asit bakterileri (Milci ve diğ, 2005).	42
Çizelge 2.11 : Bakteriler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, üretici cinsler ve bazı üretim koşulları (Donot ve diğ, 2012).	44
Çizelge 3.1 : Tez çalışmasında kullanılan laktik asit bakterileri.....	47
Çizelge 3.2 : MRS broth, MRS agar, Modifiye MRS ve peptonlu suyun içeriği ve miktarları.	49
Çizelge 4.1 : Soya ve buğday suyu örneklerinin kuru madde miktarları.	53
Çizelge 4.2 : Buğday ve soya suyunun pH değerleri.	53

Çizelge 4.3 : Bakteri sayımı sonuçları.	54
Çizelge 4.4 : Şekerli soyada üretilen EPS miktarı ve pH değeri.	55
Çizelge 4.5 : Şekersiz soyada üretilen EPS miktarı ve pH değeri.	56
Çizelge 4.6 : Şekerli buğdayda üretilen EPS miktarı ve pH değeri.	57
Çizelge 4.7 : Tür ve cinslere göre elde edilen EPS miktarları.	59
Çizelge 4.8 : Şekerli soya için TUKEY testi sonucu.	63
Çizelge 4.9 : Şekersiz soya için TUKEY testi sonucu.	63
Çizelge 4.10 : Şekerli buğday için TUKEY testi sonucu.	64
Çizelge 4.11 : En iyi termal stabiliteye sahip EPS'lerin üretim ortamları ve erime sıcaklıkları.	67
Çizelge 4.12 : En az termal stabiliteye sahip EPS'lerin üretim ortamları ve erime sıcaklıkları.	68
Çizelge 4.13 : Literatürde çalışılan EPS'lerin DSC sonuçları.	69

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1 : Şekerli soya ve şekerli soyada laktik asit bakterilerinin üretmiş olduğu EPS miktarları.	61
Şekil 4.2 : Şekerli soya ve şekerli buğdayda laktik asit bakterilerinin üretmiş olduğu EPS miktarları.	62
Şekil A.1 : 25A'nın buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	82
Şekil A.2 : 25A'nın şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	82
Şekil A.3 : 25A'nın şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	83
Şekil B.1 : B2'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	84
Şekil B.2 : B2'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	84
Şekil B.3 : B2'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	85
Şekil C.1 : E32'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	86
Şekil C.2 : E32'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	86
Şekil C.3 : E32'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	87
Şekil D.1 : E42'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	88
Şekil D.2 : E42'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	88
Şekil D.3 : E42'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	89
Şekil E.1 : E55'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	90
Şekil E.2 : E55'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	90
Şekil E.3 : E55'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	91
Şekil F.1 : A15'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	92
Şekil F.2 : A15'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	92
Şekil F.3 : A15'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	93
Şekil G.1 : A47'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	94
Şekil G.2 : A47'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogra.	94
Şekil G.3 : A47'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	95
Şekil H.1 : C19'un buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	96
Şekil H.2 : C19'un şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	96

Şekil H.3 : C19'un şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	97
Şekil I.1 : C55'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	98
Şekil I.2 : C55'in şekerli soya ürettiği EPS'ye ait termogram.	98
Şekil I.3 : C55'in şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	99
Şekil J.1 : F39'un buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	100
Şekil J.2 : F39'un şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	100
Şekil J.3 : F39'un şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	101
Şekil K.1 : D41'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.	102
Şekil K.2 : D41'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	102
Şekil K.3 : D41'in şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.	103

GIDA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ

ÖZET

Laktik asit bakterileri gıdaların fermantasyon aşamalarında kullanılan mikroorganizma grubudur. Gram pozitif olan ve spor oluşturmeyen bu bakterilerin en önemli ürünü fermantasyon sonucu oluşturdıkları laktik asittir. Heterotrof beslenme şekline sahip olan bu bakterilerin gelişme sıcaklıkları 10-45°C arasındır. Aerotolerant anaerob özellik göstermektedirler. Bu bakteriler *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* ve *Tetragenococcus* gibi cinsleri içermektedir. Morfolojik özellikler ve fermantasyon şekilleri nedeniyle homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Çoğu laktik asit bakteri GRAS statüsünde kabul edilerek et, süt, meyve ve tahıl gibi gıdaların olgunlaşmasında kullanılmaktadır. Oluşturdıkları antimikrobiyal maddeler nedeniyle de olgunlaşma dışında koruma yöntemi olarak da kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan gıda grubu ise süt ürünleridir. Kefir, yoğurt ve peynir farklı laktik asit bakterilerinin fermantasyonu sonucu oluşan ürünlerdir. Özellikle yapısal özellikleri laktik asit bakterilerinin ürettiği metabolitlerle gelişmektedir. Et ürünleri de laktik asit bakterisi kullanımının sıkça rastlandığı ürün gruplarıdır. Özellikle bu ürünlerin renk ve yapı stabilitesinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Şarap ise bu bakterilerin kullanıldığı önemli bir içecektir. Özellikle molalaktik fermantasyonu ile şarap kendi karakteristik özelliğini kazanmaktadır. Ürün kalitesini artırmak için de bazı taze meyve ve sebzede kullanılmaktadır. Bu sayede ürünün kalitesi artırılmaktadır. Ancak laktik asit fermantasyonunu etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Beslenme ortamındaki maddeler, pH, substrat engellenmesi ve sıcaklık en önemli faktörlerdendir.

Laktik asit bakterilerinin besinlere yarar sağlamasının dışında bazıları probiyotik olarak değerlendirilerek insanlara da yararlı birçok etkisi bulunmaktadır. Bağırsakta mikrobiyal dengenin sağlanması, sindirime yardımcı olması, sindirim sistemi için birçok fonksiyonel madde üretmesi, laktoz intoleransının semptomlarını azaltması ve bazı bağırsak hastalıklarının düzenlenmesi olumlu etkilerindendir. Ancak probiyotik olarak değerlendirilmesi için bazı ölçütler bulunmaktadır. Yaşıyor olması gerekliliği, GRAS statüsünde olması, bağırsağa kolayca adapte olabilmesi, mide ve safra tuzuna karşı toleranslı olması ve proteolitik aktivitesi bu ölçütlerdendir.

Laktik asit bakterileri gıdayı bozucu mikroorganizmaları veya gıda kaynaklı patojenleri engelleyici aktivite göstermektedir. Bu amaçla da birçok metabolit üretmektedirler. Organik asitler pH'ı düşürerek mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyici özellik göstermektedirler. Laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve benzoik asit laktik asit bakterilerinin ürettiği organik asitlerdendir. Bakteriyosin

hidrojen peroksit, karbondioksit, diasetil, etanol ve reuterin de benzer etkiyi gösteren diğer metabolitlerdir.

Laktik asit bakterileri metabolitleri dışında gıdanın yapısının iyileşmesini sağlayan ekzopolisakkaritleri (EPS) üretmektedir. EPS'ler bakteriyel hücre yüzeyinde kapsül şeklinde bulunan veya çevreye salgılanan hücre dışı polisakkaritlerdir. Yüzeye yapışabilen EPS c-EPS, çevreye salgılanan EPS ise r-EPS olarak isimlendirilmektedir. Laktik asit bakterileri de genel de ikisini de üretebilmektedirler. Viskozite artırıcı, yapı düzenleyici, su bağlayıcı, stabilite ve emülsifiye edici gibi özellikleri nedeniyle özellikle süt ürünlerinin kalitesini iyileştirmektedir. İnsan sağlığı üzerinde ise kolonileşmeye yardımcı olması ve sindirimi kolaylaştırması gibi olumlu etkileri bulunmaktadır.

Bu çalışmada bozadan elde edilen 11 suş, şekerli buğday suyu, şekerli ve şekersiz soya suyuna ekilerek hem şekerin hem de substratın EPS üretimine etkisi incelenmiştir. Öncelikle buğday suyu ve soya suyu bileşenlerine bakılarak farkları belirlenmiştir. Daha sonra sayımı yapılan bakterilerin ekimi gerçekleştirilmiştir. DSC analizi ile de gıdada kullanılabilirlikleri belirlenmiştir.

Genel olarak şekerli soyada şekersiz soyaya göre EPS üretiminin fazla olduğu belirlenmiştir. Soya ve buğday suyu karşılaştırıldığında ise, soyada EPS üretiminin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu da bileşenlerinin farklı olmasına özellikle soyada yağ oranının fazla olmasına bağlanmıştır. Soya ürünlerinde en fazla üretim *Weissella confusa* bakterisi tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak buğdayda en fazla EPS üretimi ise *Streptococcus macedonicus* tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi her mikroorganizmanın kendine özgü gelişme faktörlerinin olması ve ürün farklılıkları olabilmektedir.

DSC analizinde ise şekersiz ürünlerde üretilen EPS'nin daha dayanıklı olduğu görülmüştür. İlk ekzotermik pik kristallenme sıcaklığını vermektedir ancak bu çalışmada kristallenme sıcaklığına rastlanmamıştır. Endotermik pik ise erime sıcaklığını göstermektedir. Ayrıca önceki çalışmalarla karşılaştırılarak ürün bileşeni farkı ortaya konmuştur.

Ürünlerde EPS üretiminin geliştirilmesi veya dışarıdan EPS katılmasıyla ürünleri kalitesi iyileştirilmekte ve ürünler sağlık için daha yararlı olmaktadır. Bu nedenle endüstrinin bu aşamasına daha çok destek verilmeli ve araştırmalara devam edilerek en uygun koşullar belirlenmelidir. Bu sayede gıdalar tüketici için hem daha sağlıklı hem de daha güvenilir olmaktadır. Tüketicilere de daha cazip gelmektedir.

EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY USING FOOD BORNE LACTIC ACID BACTERIA

SUMMARY

Lactic acid bacteria are microorganisms group that are used in fermentation steps. The most important product of this bacteria that are gram positive, non-spore forming and have prokaryote cell structure is lactic acid produced in the end of fermentation. Lactic acid bacteria have rod or coccus shape. Growth temperature of this bacteria that have heterotroph nourishment is between 10 and 45°C. These are aerotolerant anaerob. And this group have genus such as *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* and *Tetragenococcus*. There are divided into two group according to morphologic properties and type of fermentation: homofermentative and heterofermentative.

Many lactic acid bacteria are used in developing of foods such as meat, milk, fruit and cereal due to these are accepted in GRAS status. Because these produce antimicrobial materials, these are used as preservative methods with the exception developing. The most usage of lactic acid bacteria is dairy products. Kefir, yoghurt and cheese are products that are occurred by fermentation. Especially, texture properties of these foods are developed with metabolites that are produced by lactic acid bacteria. In yoghurt, diacetyl and acetaldehyde develop taste of this food. Lactic acid bacteria produce aromatic compounds by proteolytic and lipolytic activities during maturation of cheese. Meat products are food groups in which lactic acid bacteria are used. Especially, these lactic acid bacteria contribute color and texture stability of foods. In meat products, during fermentation sensory properties of foods are developed and pathogens are inhibited. Wine gains characteristic properties by malolactic fermentation. To enhance product quality, these bacteria are used in fresh fruit and vegetable. So, quality is increased. But, there are many factors that affect lactic acid fermentation. Technological factors are the most important. Matters in medium, pH, substrate inhibition and temperature are important factors.

Although lactic acid bacteria provide benefit to goods, these provide benefit to people by evaluated as probiotic bacteria. Enabling balance in microbial, helping digestion system, producing many functional materials, reducing symptoms of lactose intolerance and regulating some intestinal diseases are positive effects. Antagonism means hostility to determine probiotic bacteria. During fermentation lactic acid bacteria produce metabolites to inhibit pathogens. Especially, this reduce pH and inhibition occur. But that this metabolites effect other bacteria is determined. So, before probiotics are used, antagonistic effect must be searched. However, there are many criterion

to evaluate lactic acid bacteria as probiotic bacteria. Being alive, being in GRAS status, being adapted easily in intestine, be tolerance stomach and bile salt and proteolytic activity are many criteria.

Lactic acid bacteria show inhibition activity against to spoilage microorganisms and food borne pathogens. So, for this aim, many metabolites are produced by lactic acid bacteria. Organic acids show inhibition properties against to microorganisms by reducing pH. Lactic acid, acetic acid, propionic acid and benzoic acid are organic acids produced by lactic acid bacteria.

Lactic acid are end product of fermentation. Especially, it occurs during yoghurt, olive and dairy products fermentation. Genus such as *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* can produce lactic acid. For each strain, lactic acid concentration become different. Also, effects of lactic acid, butyric acid, propionic acid and acetic acid on other microorganisms are different. Bacteriocin, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, ethanol and reuterin are metabolites that show same inhibition properties. Bacteriocin is natural antimicrobial matters that can be secreted by lactic acid bacteria. Production of this metabolites produced by *Streptococcus* and *Lactobacillus* are the most common. These matters increase shelf life of foods, reduce risk of distribution of pathogens. Due to less process is applied to preserve foods, sensory properties and nutrition values can be preserved. These show tolerance to pH and temperature. For foods, nisin is used as bacteriocin. These are active on gram negative microorganisms. These are used as packaging materials. In fresh fruit and vegetables, lactic acid bacteria produced nisin are used. But other preservatives can be used with bacteriocin. Hydrogen peroxide have killing effect on spores and vegetative cells of microorganisms such as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* spp. Carbon dioxide affect meat quality by reducing respiratory of microorganisms. Diacetyl is used with other antimicrobial matters to reduce activity.

Exception with metabolites, lactic acid bacteria produce exopolysaccharides that develop texture of foods. EPSs are extra cellular polysaccharides that are found in cell structure as capsule or are secreted to environment of bacteria. EPS adhering to surface is c-EPS and EPS secreted to environment is r-EPS. Lactic acid bacteria generally produce not only c-EPS but also r-EPS. Due to properties such as increasing viscosity, regulating texture, water binding, stabilizing and emulsifying, EPS develops quality of dairy products. For human health, there are positive effects such as helping colonize and easing digestion system.

In this study, effect of both sugar and substrate were investigated by 11 isolates isolated by boza were inoculated in wheat water with sugar, soy water with sugar and soy water without sugar. Firstly, ingredients of wheat and soy water were determined. Then, counting of strain was done and inoculation is done.

Also differential scanning calorimetry analysis was done for determining availability of EPS in food industry. In DSC analysis, thermogram was get and comment is done according to peaks in this thermograms. According to peaks, for first low temperature, crystallization temperature was determined and for second high temperature, melting point of EPS is determined.

Generally, EPS production was determined higher in soy water with sugar than soy water without sugar. EPS production was determined higher in soy water with sugar

than wheat water with sugar. This situation was linked with different ingredients of soy water and wheat water.

In soy water samples, the most production number was occurred by *Weisella confusa*. But, in wheat water samples, the most production number was occurred by *Streptococcus macedonicus*. The reason for this was factors effecting growth of each bacteria and differences between soy water and wheat water properties.

According to differential scanning calorimetry analysis, EPS produced in sugar free soy was determined as more heat resistant than others. Generally, there was one peak in thermograms. But there were some two peaks in thermograms. So generally, crystallization is less determined for this EPS. Also results was compared with others study. So, some comments according to differences were done.

Quality of products is developed and products are more healthier by developing EPS production and adding EPS to products. So, more support is gave to this step of industry and the most suitable conditions are determined by continuing researches. So, foods are being more healthy for consumers and more safety.

1. GİRİŞ

Fermente ürünler farklı mikroorganizmalar veya farklı hammaddeler kullanılarak değişik tekniklerde üretilmektedir. Fermentasyonda rol oynayan mikororganizmalar mayalar ve laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterilerinin yer aldığı laktik asit fermantasyonu peynir, şarap, meyve, sebze, zeytin ve hububatlarda yıllardır uygulanan bir prosestir. Yani laktik asit bakterileri gıda fermantasyonunda merkezi rolü bulunan bir gruptur. Birçok fermente gıdanın ve içeceğin daha güvenli olmasında rol oynamaktadır. Laktik asit bakterileri gıdada doğal olarak bulunmakta ya da gıdaya saf kültür olarak eklenmektedir (Blagojev ve diğ, 2012).

Laktik asit bakterileri ürettiği metabolitlerle gıdayı daha güvenli, tüketici açısından daha çekici hale getirmektedir. Laktik asit, asetik asit, etanol, aromalı bileşikler, bakteriyosin, ekzopolisakkarit ve çeşitli enzimlerin laktik asit bakterileri tarafından üretimi ile raf ömrü, mikrobiyal güvenlik, yapı ve duysal özellikler önemli derecede artırılmaktadır. Oksijenin yok edilmesi ve pH değerinin düşürülmesiyle diğer mikroorganizmaların gelişimi engellenmektedir. Ayrıca birçok probiyotik olarak değerlendirilmekte ve insan sağlığı üzerinde sindirime yardımcı olması, anti-tümör ve bağırsak hastalıklarını azaltması gibi birçok olumlu etkisi bulunmaktadır (Blagojev ve diğ, 2012).

Laktik asit bakterilerinin özellikle gıdaya yapısal açıdan birçok olumlu özellik sağlayan metabolitlerinden biri ekzopolisakkaritlerdir (EPS). Şeker polimeri olan EPS'ler viskozite artıcı, yapıyı düzenleyici, su bağlayıcı, stabilize ve emülsifiye edici gibi özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle süt endüstrisinde, yoğurt, az yağlı peynir, kefir ve dondurma yapımında kullanılmaktadır. Gıdaya sağladığı teknolojik özelliklerin yanı sıra tüketiciye sağladığı yararlar da bulunmaktadır. EPS içeren gıdanın viskozitesinin yüksek olması sindirim sisteminde bu gıdanın kalma süresini uzatarak bağırsak florasını düzenlemektedir. Bunun dışında kolesterolü düşürdüğü, antitümör ve antiülser

aktivitesine sahip olduğu da çalışmalarla belirlenmiştir. Ancak EPS üretimini hem substrat faktörleri hem de mikroorganizma faktörleri etkilemektedir.

Bu çalışmada bozadan izole edilen 11 suş kullanılmıştır ve seçilen ortamlara ekim yapılarak EPS retimi gerçekleştirilmiştir. şekerli buğday suyuna, şekerli soya suyuna ve şekersiz soya suyuna ekim yapılarak hem şekerin hem de farklı bileşenlerdeki ortamın EPS üretimine etkisi incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri endüstriyel gıda fermantasyonunda yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grubudur (Boeck ve diğ, 2010). Bu bakteriler gram-pozitifdir. Spor oluşturmeyen yapıya sahiplerdir. Şekilleri çubuk veya kok şeklinde olabilirler. En önemli son ürünleri şekerin fermantasyonu sonucunda oluşturdukları laktik asittir (Erten ve diğ, 2014). Gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özelliktedirler ve 10-45°C arası sıcaklıklarda gelişme gösterebilmektedirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme ve asit veya alkaliye karşı tolere etme yeteneklerine sahiptirler ve heterotrof beslenme şekli gösterirler (Evren ve diğ, 2011). Laktik asit bakterileri anaerobik şartlar altında gelişme gösterebilmektedirler. Oksijene karşı duyarlı olmayıp oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Bu nedenle aerotolerant anaerob organizmalar olarak değerlendirilmektedir (Dinçer ve diğ, 2009). Bu bakteriler *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* ve *Tetragenococcus* gibi cinsleri içermektedir (Erten ve diğ, 2014).

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında morfolojik özellikler önemli kıstas olarak karşımıza çıkmaktadır. İkinci en önemli karakteristik ise standart koşullar altında glikoz fermantasyon şeklidir (Halasz, 2009). Bu nedenle laktik asit bakterilerinin karbonhidrat mekanizmaları göz önüne alındığında homofermantatif ve heterofermentatif olarak iki ayrı alt grubu bulunmaktadır (Dinçer ve diğ, 2009). Homofermentatif laktik asit bakterileri glikozu EMP yoluyla kullanarak parçalanması sonucu %90 laktik asit %10 CO₂ oluşturan bakterilerdir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise glikozu HMP yoluyla parçalayarak laktik asit yanında etanol, asetik asit ve CO₂ gibi yan ürünler oluştururlar. Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan laktik asidin miktarı türlere göre değişmektedir (Evren ve diğ, 2011).

Birçok laktik asit bakterisi güvenli olarak kabul edilir ve çok sayıda fermente gıda ve içeceğin üretiminde veya olgunlaşmasında kullanılmaktadır. Yoğurt, sucuk, turşu, zeytin bu ürünlerden sadece birkaçıdır (Erten ve diğ., 2014). Bunlar gibi fermente et, süt, meyve ve tahıl ürünlerinin üretiminde ve olgunlaştırılmasında büyük önem taşıdıkları için gıda teknolojisi için çok kıymetli bakterilerdir. Ürünü olgunlaştırma dışında en eski gıda koruma yöntemi olarak kabul edilmektedir (Çon ve diğ., 2000). Çizelge 2.1’de bazı ürünler ve fermentasyonları için kullanılan laktik asit bakterileri gösterilmektedir. Bu bakteriler üründe tat, yapı veya sağlıkla alakalı ara ürün yani metabolitler üretmektedirler (Boeck ve diğ., 2010). Bu bakterilerin genel olarak kullanım amaçları gıda ve içeceklerin besinsel değerini, duyu özelliklerini iyileştirmekte ve yiyecek veya içeceği korumaktır (Zannini ve diğ., 2016). Çizelge 2.2’de bazı laktik asit bakterileri ve bu bakterilerin gıda endüstrisindeki fonksiyonel olarak avantajları gösterilmektedir.

Laktik asit bakterileri karşımıza en çok süt ürünlerinde çıkmaktadır. Bunlardan biri kefirdir. Kefir, kefir tanelerinin süte eklenmesiyle elde edilen, asidik ve alkolik fermentasyonların bir arada olduğu süt ürünüdür. Kefir tanelerinin laktozu fermente eden veya etmeyen mayalar ile homofermantatif ve heterofermantatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinin oluşturduğu mikrofloraya sahip olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizma türü ve oranları tanelerin orijinine göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak belirlenen bazı türler *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* olarak çeşitli araştırmalarda belirlenmiştir. Tüm kefirlerde fermentasyon sırasında ilk olarak laktozdan laktik asit oluşumu gerçekleşmektedir. Buna da laktik asit fermentasyonu denir. İkinci oluşum ise alkol fermentasyonudur. Laktozdan etil alkol ve CO₂ oluşturulmaktadır. Daha sonra aroma oluşmakta ve sınırlı sayıda protein, pepton ve amino asit parçalanması gerçekleşmektedir. Fermentasyon sonucu oluşan yararlı ürünler sonucunda kefir beslenme değeri yüksek gıda olarak belirlenmiştir ve sağlık üzerinde de birçok olumlu etkisi keşfedilmiştir (Yüksekdağ ve diğ., 2003). Yoğurt, peynir ve kreması alınmış sütlerde sıkça kullanılan laktik asit bakterileri ise mezofilik *Lactococcus lactis* and termofilik *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus and *Streptococcus thermophilus* türleridir. Laktik asit fermentasyonu ile asetaldehid ve diasetil üretimi gerçekleşmekte ve bu ürünler özellikle yoğurtta tat oluşumunu gerçekleştirmektedir. Ayrıca eksopolisakkarit üretimiyle süt ürünlerinin yapısal özelliğini artırmaktadır. Laktik asit bakterilerinin bu ürünlerdeki sağlık üzerine faydası ise laktoz ve galaktozun L-alanine gibi tatlandırıcılara dönüştürülmesidir. *Lactococcus lactis* peynirin olgunlaşması sırasında biyokimyasal proseslerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Amino asit salınımıyla tat özelliğine katkıda bulunmaktadır. Diğer önemli bir özelliği ise sitrik asidin diasetile ve CO₂ 'ye dönüştürmesidir (Erten ve diğ, 2014).

Laktik asit bakterileri et ürünlerinde de sıkça kullanılmaktadır. Fermentasyon boyunca duyuşal özellikleri geliştirerek asitleştirme sayesinde patojen oluşumunu engellemektedir. Gıdanın renk ve yapısının stabilitesine katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda bakteriyosin üreterek koruyucu özellik göstermektedir. Özellikle sucuk fermentasyonunda dominant türler *Lactobacillus sakei* ve *Lactobacillus curvatus* türleridir (Erten ve diğ, 2014).

Laktik asit bakterilerinin kullanıldığı en önemli gıdalardan biri de şarap, proses ise malolaktik fermentasyondur. Bu fermentasyonu sınırlandıran ve laktik asit bakterisinin gelişimini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlardan ilki teknolojik faktörlerdir. Berraklaştırma prosesi laktik asit bakterilerinin gelişimi için uygun olmayan bir prosestir. Bu işlem doğal mikrofloranın bir kısmını elimine etmektedir. Ayrıca fermentasyon için gerekli besin maddesinin de azalmasına neden olmaktadır. Alkolik fermentasyon sonunda eklenen SO₂ ise antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle laktik asit bakteri popülasyonunu düşürmektedir. Özellikle *Oenococcus oeni* aşamalar sırasında diğer bakterilerle beraber bulunmaktadır. Şarap yapımı sırasında birçok farklı laktik asit bakteri cinsleri rekabet içinde olmaktadır. *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Oenococcus* türleri bulunmakta ve aralarında ters etki yaratmaktadırlar. Bu etkinin antimikrobiyal özellikteki bileşiklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Ayrıca *O.oeni* fajdan etkilenmektedir ve bu nedenle fermentasyon yavaşlayabilmektedir. Diğer önemli faktörler ise fiziksel ve kimyasal faktörlerdir. Laktik asit bakterileri genelde nötrofiliktir. Optimum gelişme pH değerleri nötr değere yakındır. *Lactobacillus* ve *Oenococcus* gibi bazı cinsler daha çok asidofiliktir. Ancak şarap yapımı boyunca pH değeri 3.0 ve 3.8 değerleri

arasındadır bu nedenle bakteri gelişim hızı oldukça yavaştır. Eğer pH değeri 3.0'dan daha düşük olursa, bakterilerin gelişimi fiziksel ve kimyasal bazı faktörlere göre oldukça zor veya imkansızdır. Etanolün varlığı da önemlidir. Bazı cinsler tolere edebilmektedir. *O.oeni* %14 (v/v) etanole tolere edebilmektedir. Etanole karşı dirençli olabilme sıcaklık, pH gibi diğer çevresel faktörlere karşı değişebilmektedir. Sıcaklık ise şarabın son kalitesi için önemli bir ölçüttür. Bütün mikroorganizmaların gelişme hızını etkilemektedir. Birçok laktik asit bakterisi mezofiliktir ve optimum gelişme sıcaklıkları 25-30°C arasındadır. Ancak bu sıcaklık değerleri de diğer faktörlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Molalaktik fermantasyonunda sıcaklık ortalama 18-22°C arasındadır. Bu koşullar *O.oeni* gelişimi için uygun olmaktadır. Besinsel eksiklik de önemli bir sorundur. Şaraptaki besin bileşenleri üzüme, koşullara ve kullanılan mikroorganizmalara göre değişmektedir. Laktik asit bakterileri mineral ihtiyacına ilaveten aynı zamanda karbon ve nitrojen kaynağına da ihtiyaç duymaktadır. Aynı zamanda polifenol gibi bazı bileşikler bakterilerin gelişimini engellemektedir. Gallik asit gibi bazı bileşikler ise bakteri gelişimini teşvik edip molalaktik aktiviteyi artırmaktadır (Guzzo, 2009).

Laktik asit bakterileri süt ürünlerinden peynirde de olgunlaştırmayı hızlandırmaktadır. Peynir olgunlaşması boyunca, laktik asit bakterisinin proteolitik ve lipolitik aktiviteleri sonucunda süt enzimlerinin reaksiyonuyla aromatik bileşikler oluşturulmaktadır (Leroy ve diğ, 2004).

Tüketimi gün geçtikçe artan taze sebze ve meyvede de fermantasyon uygulanmaktadır. Uygun laktik asit bakterisinin gelişimi sağlanarak ürün kalitesi artırılmaktadır. Ekonomik anlamda en çok dikkat çeken bu bitkisel ürünler ise turşu,, lahana ve yağlardır. Bakteriler taze bir bitkide toplam popülasyonun %0.15-1.5'ini kapsayacak şekilde bulunmaktadır (Dinçer ve diğ, 2009).

Laktik asit bakterilerinin besinlere sağladığı yararlar dışında insanlara da yararlı birçok etkisi bulunmaktadır. Bu bakteriler özellikle bağırsakta yüksek oranda fayda göstermektedirler. Bağırsakta mikrobiyal dengenin sağlanmasında rol oynarlar. Besin sindirimine yardımcı olurlar ve sindirim sistemi için birçok fonksiyonel madde üretimini sağlamaktadırlar. Laktoz intoleransının semptomlarını azaltmaktadırlar. Laktoz emilimi bozukluğu laktaz enziminin yetersizliği sonucu oluşmaktadır. Bu da karında şişme, midede gaz, ishal gibi

rahatsızlıklara neden olmaktadır. Ancak laktik asit bakterisinde bulunan β -galaktosidaz enzimi laktoz toleransına katkıda bulunarak bu rahatsızları azaltmaktadır. *Bifidobacterium* türleri de B vitamini sentezleyebilen laktik asit bakterileri olarak bilinmektedir. Kalın bağırsakta bulunan bu tür bakteriler vitamin sentezleyerek vücutla ilgili vitamin seviyesine katkıda bulunmaktadır. Crohn hastalığı, iltihabi bağırsak hastalığı (IBD) ve huzursuz bağırsak sendromu (IBS) gibi hastalıklar da özellikle bazı *Bifidobacterium* türleri tarafından düzenlenebilmektedir. Bunlar dışında bağışıklık sistemini destekleme, alerjik rahatsızlıkları azaltma, kanser riskini düşürme ve yağ metabolizmasını geliştirme gibi sağlık açısından daha birçok fayda sağlamaktadırlar (Xiao ve diğ, 2014).

Gıdalarda sıkça ve farklı amaçlarla kullanılan laktik asit fermantasyonunu etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden ilki beslenme ihtiyaçlarıdır. İyi bir üretime ulaşabilmek için, laktik asit bakteri hücrelerini geliştirmek ve yaşanabilirliği sağlamak için kültüre ve karbon, nitrojen, mineral ve vitamin gibi besinlere ihtiyaç duymaktadır. Azot aminoasit, peptit ve inorganik bileşiklerde bulunabilmektedir. Mineraller (Mg, Mn ve Fe) tuzlarla ($MgSO_4$, $MnSO_4$ ve $FeSO_4$) sağlanmaktadır. Vitaminler ise maya ekstraktının ana elementlerindendir ve birçok enzimatik reaksiyonu etkilemektedir. İkinci faktör ise asitliktir. Laktik asit bakterileri pH 5-7 arasındaki değerlerde gelişmektedir. Laktik asit üretimiyle pH düşmesi nedeniyle fermantasyon engellenebilmektedir. Bunu minimize etmek için, kalsiyum karbonat eklenerek pH'nın 6 civarında tutulması sağlanmaktadır. Bu sayede laktik asit nötralize edilmektedir. Asidik koşulları tolere edebilen laktik asit bakterilerinin kullanımı da diğer bir yöntemdir. Diğer bir faktör ise substrat engellenmesidir. Bu engelleme hem mikroorganizmaya hem de karbon kaynağına bağlı olmaktadır. Bu engellemeyi minimize etmek için, substrat eklenmelidir. Ancak yüksek laktik asit konsantrasyonu elde etmek için, ilk substrat konsantrasyonu az olmalıdır. Ürün engellemesi ise diğer bir faktördür. Laktik asit fermantasyon aktivitesinden daha çok engelleyici özellik göstermektedir. Asetik asit, formik asit gibi yan ürünler de aynı etkiye sahiptir. Bunu engellemek için bazı teknolojiler geliştirilmektedir. Bu teknolojiler fermantasyon sırasında bu ürünlerin fermantasyon ortamından uzaklaştırılmasını içermektedir. Bunların dışında laktik

asit bakterisinin kendi gelişme koşulları da bu faktörlerin içinde yer almaktadır (Martinez ve diğ, 2013).

Çizelge 2.1 : Bazı gıdalar ve fermentasyonlarında kullanılan laktik asit bakterileri (Erten ve diğ, 2011; Evren ve diğ, 2014).

Gıda	Laktik Asit Bakterisi
Peynir	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>S.cremoris</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Yoğurt	<i>Enterococcus durans</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Tereyağı	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i> , <i>Streptococcus sp.</i>
Kefir	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>S.avium</i> , <i>S.cremoris</i> , <i>L.brevis</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leuconostoc sp.</i>
Kıymız	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L.bulgaricus</i>
Sucuk	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L.curvatus</i> , <i>L.pentosus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.brevis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P.acidilactici</i> , <i>L.agilis</i> , <i>L.carnis</i>
Pastırma	<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>
Boza	<i>Lactobacillus confusus</i> , <i>L.sanfransisco</i> , <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> , <i>L.mesenteroides</i> subsp.
Tarhana	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Şalgam	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L.sanfranciscensis</i> , <i>L.pontis</i> , <i>L.brevis</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.alimentarius</i> , <i>L.reuteri</i>
Turşu	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Çizelge 2.2 : Laktik asit bakteri örnekleri ve gıda endüstrisindeki avantajları (Leroy ve diğ, 2004).

Avantaj	Fonksiyonellik	Laktik asit bakterileri
Gıda koruması	Bakteriyosin üretimi -Süt ve süt ürünleri -Fermente et ürünleri -Fermente zeytin -Fermente sebze	<i>Enterococcus spp</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lactococcus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i>
Duyusal	Ekzopolisakkarit üretimi Amilaz üretimi Aroma üretimi Aroma geliştirici -Molalaktik fermentasyon	Birçok lactobacilli ve streptococci Birçok lactobacilli Birçok suş <i>Oenococcus oeni</i>
Teknolojik	Bakteriyofaj direnci Yoğurta fazla asitliğin önlenmesi Otolize starteri -Bakteriyosin-teşvik edici Nutrasötiklerin üretimi -Düşük kalorili şeker -Oligosakkarit üretimi -B grubu vitaminlerin üretimi -Biyoaktif peptitlerin salınımı Toksik ve besinsel değeri olmayan maddelerin azaltımı -Laktik asit izomerinin üretimi -Laktoz ve galaktozun yok edimi -Soyada rafinozun yok edimi -Amilaz inhibitörlerin azaltımı -Biyojenik aminlerin üretiminin azaltılması	Birçok suş <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Birçok suş</i> Laktik asit üreten suşlar <i>Streptococcus thermophilus</i> Birçok suş <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>

2.1.1 Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri

Bazı laktik asit bakterileri yararlı bakteriler olarak yani sağlığı geliştiren probiyotik bakteriler olarak da düşünülmektedirler (Zannini ve diğ, 2016). Probiyotik genel olarak bağırsağın mikrobiyal dengesini düzenleyerek hayvanlara yararlı etkiler sağlayan organizmalar olarak tanımlanmaktadır (Xiao ve diğ, 2014). Probiyotik ürün ise vücut için faydalı mikroorganizma eklenmiş gıdalara verilen isimdir. Günümüzde probiyotik yoğurtlar ticari olarak üretilmektedir. Genellikle kullanılan probiyotik bakteriler *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* karışımından ibarettir (Gülmez ve diğ, 2002). Bu bakteriler enzimlerin antimikrobiyal etkisine, asit ortama, yüksek oksidasyon redüksiyon potansiyeline ve düşük yüzey gerilimine diğer probiyotiklere kıyasla daha dirençli oldukları için fermente süt ürünlerinden sıkça kullanılmaktadır. Normal yoğurt üretiminde fermentasyon 42-43°C sıcaklıkları arasında gerçekleştirilirken, probiyotik yoğurtlarda fermentasyon insan vücut sıcaklığı olan 37°C sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Ayrıca probiyotik kültür yoğurtları, aside dirençli olmaları nedeniyle geleneksel yöntem yoğurtlarına göre daha uzun raf ömrüne sahiptirler (Kundakçı ve diğ, 2006). Çizelge 2.3’de süt ve süt ürünleri ve içerdikleri probiyotik laktik asitlerden bazıları gösterilmektedir.

Probiyotikler zayıf bağışıklık sistemi, yüksek kolesterol, kanser, laktoz intoleransı, Chron hastalığı, ishal, kabızlık ve üriner sistemi hastalıklarında koruyucu ve iyileştirici olarak denenmiş ve sonuncunda güvenilir mikroorganizmalara olarak kabul edilmiştir (Gülmez ve diğ, 2002).

Probiyotik bakterilerinin insan vücuduna ve çeşitli sistemlerine yararlı etkisi bulunduğu artık neredeyse tüm çalışmalarla kanıtlanmıştır. Antibiyotik tedavisi sonucunda bazı patojenler direnç kazandığı için, bu bakterilerin probiyotiklerle tedavisi fikri ortaya çıkmıştır. Bu bakterilerin ürettiği organik asitler ve diğer asitler düşük pH’lı ortamı yaratmakta ve çoğu patojeni bu şekilde inhibe etmektedir. Düşük pH patojen bakteriler üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik etki yapmaktadır (Leroy ve diğ, 2008; Sağdıç ve diğ, 2004).

Çizelge 2.3 : Süt ve süt ürünlerinde bulunan probiyotik laktik asit bakteri örnekleri (Xiao ve diğ, 2014).

Ürünler	Probiyotik laktik asit bakterileri
Yoğurt	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus paracasei</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
Peynir	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	<i>Bifidobacterium breve</i>
Yoğurtlu içecek	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>Lactobasillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>

Antimikrobiyal maddelerin yanında mukus salınımını da teşvik ettiği için *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarını önlemeyi ve tedavi etmeyi sağlamaktadır. Bazı çalışmalarda probiyotik suşların mutajen ve kanserojen etkiye sahip olan β -glukosidaz, nitroredüktaz ve üreaz gibi fekal mikrobiyal enzimlerin miktarını azalttığı tespit edilmiştir. Bu etki de antimutajenik etki olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda probiyotik bakteriler antitümör etkisine sahiptir. Bu etki de insanda bağışıklık sisteminin geliştirmesiyle açıklanmaktadır. Bu bakterilen aynı zamanda kansere sebep olan enzim veya kaynakları ortamdan uzaklaştırabilirler. Laktoz intoleransı semptomlarının da azalmasında büyük bir rol oynamaktadırlar. Probiyotikle yapılan yoğurtlarla yapılan çalışmalarda laktoz emiliminin iyi tolere edildiği belirlenmiştir. Aynı zamanda probiyotiklerin kullanıldığı fermente süt ürünlerinin tüketimi sonucunda serum kolesterol değerinin düştüğü

belirlenmiştir. Bunun nedeninin hidroksimetil glutarat üretiminden dolayı olduğu düşünülmüştür (Leroy ve diğ, 2008; Sağdıç ve diğ, 2004).

Bir organizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için bazı ölçütler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi yaşıyor olması gerekliliğidir (Xiao ve diğ, 2014). Çünkü probiyotik olarak tanımlanabilmesi için yaşayabilirliğe ihtiyaç vardır. Probiyotiklerin yaşayabilirliğinin teknolojik, ekonomik, düzenleyici ve biyolojik önemi bulunmaktadır. Yaşayabilirliği test etmek amacıyla tarama metodları kullanılmaktadır. Örneğin probiyotik, asit içeren fermente bir gıdaya konur ve çevre zorluluklarına karşı direnci ve raf ömrü boyunca yaşayabilirliğinin kalıp kalmadığı test edilir. Aynı test yüksek sıcaklıkta da uygulanır ve probiyotiğin sıcaklığa dayanıklılığı belirlenmiş olur. (Forssten ve diğ, 2011).

Bir bakterinin sağlık için yararlı olduğu bilgilerle veya araştırmalarla desteklenmiyorsa, bu bakteri probiyotik olarak değerlendirilememektedir. Güvenli olması da bakterinin probiyotik olarak seçiminde diğer önemli bir konudur. İnsanlar için güvenli olmalı yani patojen olmamalı ve toksik etkisi bulunmamalıdır. Bu bakterilerin herhangi bir hastalık geçmişi de bulunmamalıdır. Bu bakteri GRAS (genel olarak güvenli kabul edilir) statüsünde kabul edilmelidir. Örneğin *Lactobacillus* güvenli olarak kabul edilen laktik asit bakterilerindendir (Xiao ve diğ, 2014; Novik ve diğ, 2014).

Bu bakteriler aynı zamanda bağırsak ekosistemine kolayca adapte olmalıdır. Bağırsak mukusuna ve epitel hücrelerine yapışabilmesi de probiyotik olarak kabul edilmesinde önemli ölçütlerdendir. Bu bakterilerin bağırsaklara tutunması, koloni oluşturması ve çoğalması istenir. Bağırsaktaki yapışma kolonizasyon için önemli bir özelliktir. Yapışma sayesinde sindirim kanalında probiyotiklerin varlığının süresi de uzamaktadır. Yapılan çalışmalarda *Bifidobacterium* cinslerinin bağırsakların küçük bölümünde bulunduğu ancak *L. acidophilus* bakterisinin ise bağırsakların daha fazla bölümünde bulunduğu belirlenmiştir (Forssten ve diğ, 2011; Sağdıç ve diğ, 2004).

Antogonizm de probiyotik bakterilerin belirlenmesinde kullanılan düşmanlık anlamına gelen bir terimdir. Laktik asit bakterileri fermantasyon sonucu laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal

maddeler üretmektedirler. Probiyotik mikroorganizmalar da aynı zamanda bazı asitler oluşturmaktadır. Bu maddeler bozulmaya neden olan birçok mikroorganizmayı ve gıda kaynaklı birçok patojeni inhibe etmektedir. Ancak bazen bir probiyotik bakterinin ürettiği bakteriyosinlerin diğer faydalı bakterilerinin canlılığını etkilediği tespit edilmiştir. Bu nedenle probiyotiklerin birbirlerine karşı antagonistik etkisi bu probiyotikler kullanılmadan önce mutlaka kontrol edilmelidir (Sağdıç ve diğ, 2004).

Bakterinin probiyotik olarak kabul edilmesi için gerek başka bir ölçüt de mide ve safta tuzuna karşı toleranslı olmasıdır ve bağırsağa geçişi boyunca canlılığının bu sayede korumasıdır (Forssten ve diğ, 2011). Yani probiyotik organizmalar mide asitliğinde canlı kalabilmelidir. Ancak tolere edebilirlik derecesi suşlara göre değişiklik göstermektedir (Sağdıç ve diğ, 2004).

Proteolitik aktivite de probiyotik bakterilerin seçiminde kullanılan kıstaslardan biridir. Bazı bakteriler proteolitik özellikleri nedeniyle ve simbiyotik ilişkilerinden dolayı esansiyel amino asit üretirler. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bu türlerden olup sütte çok hızlı gelişmektedirler. *L. acidophilus* gibi bazı türlerin ise proteolitik aktivitelerinin eksikliğinden dolayı sütteki gelişmeleri yavaştır. Bu nedende yoğurttaki fermentasyonu düşürmek için yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan türler kullanılmaktadır (Sağdıç ve diğ, 2004).

Probiyotik bakteriler diğer bakteriler gibi bağışıklık sistemi hücreleriyle etkileşim içinde olabilmelidirler. Sindirim sistemindeki hücrelerle etkileşim içinde olarak, bağışıklık tepkilerini düzenler. Böylece doğuştan gelen bağışıklık fonksiyonlarını artırmalı ve hücrenin iltihaplı durumunu düzenlemelidirler (Forssten ve diğ, 2011). Ayrıca probiyotik içeren her ürün son kullanma tarihine kadar probiyotik olma özelliğinin korunduğunun garantisini vermelidir (Xiao ve diğ, 2014; Verse ve diğ, 2008; Forssten ve diğ, 2011). β -D-galaktosidaz aktivitesi de bir bakterinin probiyotik olarak belirlenmesinde göz önünde tutulan önemli bir kriterdir (Sağdıç ve diğ, 2004).

Probiyotik seçiminde zaman zaman gözden kaçırılan ve son derece önemli olan ölçüt ise büyük ölçekli endüstri üretimi için suşun uygun olabilmesidir. Gereksinimleri olmadan gelişemeyen suşlar etkili olarak üretilmemekte ve

maliyet açısından yüksek olduğu için tercih edilmemektedir (Forssten ve diğ, 2011).

2.1.2 *Lactobacillus* cinsi bakteriler

Lactobacillus cinsi bakteriler Gram pozitif ve mikroaerofilik bakterilerdir. Genel olarak bu bakteriler katalaz negatif özellik göstermektedirler (Fugelsang ve diğ, 2007). Şekilleri çubuk olmakla beraber uzunluğu ve eğriliği ortamın bileşimine ve oksijen gerilimine bağlıdır. Genişlik ve uzunlukları değişkenlik göstermekte ve genellikle sırasıyla 0,5–1,2, 1,0–10,0 µm değerleri arasında olmaktadır. Asidurik veya asidofilik özellik gösterebilmektedirler. Maksimum gelişimleri için pH 7,2 civarındır (König ve diğ, 2009; Sun ve diğ, 2014). Gelişim için optimum pH ise 5,5-6,2 değerleri arasında optimum sıcaklıkları ise 30-40°C arasındadır. Gelişebilme sıcaklık aralığı ise 2-53°C'dir (Idler ve diğ, 2015). Spor oluşturmazlar ve hareketsiz bakterilerdir. Türleri arasında nadiren nitrat indirgeyici özelliğine rastlanmaktadır. Fermantasyon için glikozdan yararlanırlar. Homofermantatif olan türleri glikozdan yararlanarak daha fazla laktik asit üretilir. Heterofermantatif olan türleri ise eş molar miktarda laktik asit, CO₂, etanol ve asetik asit üretilir (Hammes ve diğ, 2006). Genel olarak karbonhidrat metabolizması için heksoz ve pentoz şekerlerinden yararlanma özelliğine göre fermantasyon tipi değişmektedir. Heksozun fermantasyonu zorunlu homofermantatif ve zorunlu heterofermantatif laktik asit bakterileriyle, pentozun fermantasyonu ise fakültatif heterofermantatif laktik asit bakterileriyle ilişkilendirilmektedir (Idler ve diğ, 2015).

Bu cins bakteriler yüksek miktarda çözülebilir karbonhidratın, protein yıkım ürünü, vitamin ve düşük oksijen geriliminin olduğu çeşitli ortamlarda gelişebilmektedirler. Asidofilik özellik gösterebilen bu bakteriler gelişebilmek için kendilerini çeşitli çevresel koşullara adapte edebilmektedirler. Yüksek miktarda asit üretimleri pH düşüşünü sağlar ve birçok bakteri bu sayede ortadan kaldırılmaktadır. Gıdaların fermantasyonunda da kullanılan bu bakterilerin kullanıldığı başlıca ürün grupları hububat ürünleri, meyve ve sebzeler, süt ve bazı süt ürünleridir (Hammes ve diğ, 2006). Özellikle uzun yıllardır kullanılan en önemli ürünler hububatlardır. 50 türden fazla laktik asit bakterisi ekşi hamurdan izole edilmiştir. Bunlardan en çok rastlanan ise *Lactobacillus* cinsleridir. Ekşi

hamur, hamur ve ekmek yapımı için oluşturulan ara üründür ve aktif mikroorganizmalar içermektedir. *Lactobacillus* cinsi bakteriler de bu ürünün reolojik, tat ve besinsel özelliklerinden sorumludur. Ürünün mikrobiyolojik dengesinde, ekmeğin fiziksel gelişiminde ve istenilen ekmek asitliğine ulaşılmasında etkisi büyüktür. Bu endüstride en çok kullanılan türler ise *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. paralimentarius*, *L. brevis*, *L. pontis*, *L. amylovorus*, *L. alimentarius*, *L. delbrueckii*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. casei*, ve *L. fermentum* olarak karşımıza çıkmaktadır (Gerekova ve diğ, 2011).

Lactobacillus grubu bakteriler diasetil, H₂S ve amin üreterek fermente gıdaların lezzetine katkıda bulunmaktadır. Gıda mikrobiyolojisi ve insan beslenmesi için önemli olan bu cins bakteriler aynı zamanda probiyotik özellik göstermektedirler (König ve diğ, 2009). *Lactobacillus brevis* süttten, peynirden, inek gübresinden, posadan, insan ve sıçanların ağızlarından veya sindirim sistemlerinden izole edilen heterofermantatif Gram pozitif mikroorganizmadır. GRAS statüsünde olması ve uzun zamanda birçok gıdanın fermantasyonunda kullanılması nedeniyle bazı suşları bazı çalışmalarda kullanılmamasına rağmen potansiyel probiyotik bakteri olduğu belirtilmektedir. Yapılan deneylerle bu tür bakterinin pH 4 iken 3 saat yaşamını sürdürebilmesine rağmen, pH 2 olduğunda yaşayan bakteri sayılarında azalma gözlemlenmiştir. Safra tuzunun ise etkilemediği belirlenmiştir. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus* gibi bazı bakterileri de inhibe edebildiği gözlemlenmiştir (Rönka ve diğ, 2003). Bu tür bakteriler süt ürünleri dışında şarap veya üzümünden izole edilmektedir. Bazı suşları ise şarap kalitesine istenilen karakteristik özelliği verebilmektedir ancak fazlası istenmemektedir. Özellikle diasetil üretimi tat vermektedir. Fazla olan mannitol üretimleri ise şarap bozulmasına neden olmaktadır. *Lactobacillus brevis* mikroaerofilik yapısı ve düşük pH'a karşı dirençli olması nedeniyle birada da bozulmaya yol açabilmektir. Aynı tür bozulma narenciye suyunda da olabilmektedir. Asetat üretimleri nedeniyle elma suyunda da tat bozulmasına neden olmaktadır. Ancak birçok gıda da fermantasyonda kullanıldıkları için gıda sanayisinde önemleri büyüktür (Teixeria, 2014).

Türleri belirlemek için glikozdan laktik asit üretimi, fruktozun fermantasyonu, sakkarozun fermantasyonu gibi bazı fizyolojik özellikler bulunmaktadır

(Fugelsang ve diğ, 2007). Gelişme sıcaklıkları, heksozu fermente edebilme homofermantatif veya heterofermantatif potansiyellerine göre bu türler gruplanabilmektedir. Zorunlu homofermantatif türleri sadece heksozu fermente edebilmektedirler ve glikoliz veya EMP kullanılarak yaklaşık %85 laktik asit üretmektedirler. Bu bakteriler pentozu fermente edememektedirler. Fakültatif heterofermantatif türleri EMP iz yolu kullanılarak heksozu fermente ederek laktik asit üretebilmektedirler ve pentozu uyarılmış pentoz fozfaz izyolu ile parçalara ayırabilmektedirler. Sonucunda asetik asit, etanol ve formik asit üretilmektedir. Zorunlu heterofermantatif türler ise aldolaza sahiptirler ve fosfolukonat izyolu ilse pentozu ve heksozu kullanabilmektedirler. Ürn olarak laktik asit, etanol ve CO₂ kullanılmaktadır (Sun ve diğ, 2014). Çizelge 2.4'te şaraptan elde edilen bazı *Lactobacillus* türleri ve fizyolojik özellikleri gösterilmektedir.

Bu grup bakteriler *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. trichodes*, *L. buchneri*, *L. diolivorans*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. jensenii*, *L. leichmanni*, *L. yamanashiensis*, *L. fructivorans* gibi türleri içermektedir (Fugelsang ve diğ, 2007).

Çizelge 2.4 : Şaraptan elde edilen bazı *Lactobacillus* türlerinin karakteristikleri (Fugelsang ve diğ, 2007).

Özellik	<i>L. brevis</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. kunkeei</i>	<i>L. plantarum</i>
Argininden amonyak üretimi	+	+	-	-
Katalaz	Değişken	+	Zayıf	Değişken
Glikozdan gaz üretimi	+	+	+	-
Eskülinin hidrolizi	Değişken	-	-	+
Glikozdan laktik asit üretimi	DL laktat	DL laktat	L laktat	DL laktat
Früktozdan mannitol üretimi	+	+	+	-
Fermantasyon:				
Arabinoz	+	-	-	Değişken
Früktoz	+	+	+	+
Laktoz	Değişken	Değişken	-	+
Mannitol	-	-	+	+
Maltoz	+	+	-	+
Melezitoz	-	Değişken	-	+
Riboz	+	+	-	+
Sakkaroz	Değişken	Değişken	+	+
Trehaloz	-	-	-	+
Ksiloz	Değişken	+	-	Değişken

2.1.3 *Lactococcus* cinsi bakteriler

Bu cins bakteriler Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. 0,5-1 µm değerleri arasında çapları bulunan küre veya oval hücrelerden oluşmaktadır. Bu grup bakteriler genellikle 10-40°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Ancak bazı türler inkübasyon süreleri 10-14 gün arasında uzatıldığı takdirde 7°C'nin altında da gelişme gösterebilmektedir(Sun ve diğ, 2014). Çizelge 2.5'te peynirden, deniz ve tatlı su balıklarının ince bağırsaklarından elde edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve sadece peynirden elde edilen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* türlerinin 25 ve 40°C sıcaklıklardaki ve MRS sıvı ve katı besiyerindeki gelişmeleri gösterilmektedir. . Türler %4,0 (w/v) NaCl varlığında gelişebilmektedirler ancak sadece *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* türü %2,0 NaCl bileşiğine tolere edebilmektedir. *Lactococcus* cinsi bakteriler en iyi gelişimi nötre yakın pH değerlerinde gösterebilmektedir ve 4,5 pH civarında gelişimleri durmaktadır. Homofermantatif mikroaerofilik olan bu grup bakterilerin gelişimi havalandırmadan etkilenmemektedir. Aerobik koşullarda yüksek toksisitesi olan oksijen bileşikler üretebilmektedir. Katalaz negatif olmasına karşın NADH oksidaz ve superoksit dismutaz enzimleri bulunmaktadır ve aerobik ve stres koşullarda bu enzimler düzenlenmektedir. Bu bakterilerin karmaşık ve değerli besinler gereksinimleri bulunmaktadır. Gelişme ortamlarını bitkiler, hayvanlar ve onların ürünleri oluşturmaktadır (Sun ve diğ, 2014).

Lactococcus cinsi bakterilerde 12 tür bulunur. Türler fizyolojik özelliklere göre farklılaşmaktadır (Liu ve diğ, 2014). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *cremoris* genellikle süt ürünlerinin uygulamalarında kullanılan türlerdendir. Aralarındaki tek farklar tuz tolerans özellikleri ve arginini hidroliz edebilme yeteneğidir (Liu ve diğ, 2014). Bazı türler ise patojen özellik gösterebilmektedir. *Lactococcus garvieae* bu tür bakterilerdendir. Bu tür bakteriler özellikle ölüme ve büyük ekonomik kayba yol açan balık patojenidir. Alabalık çiftliklerinde Streptococcosis hastalığına neden olduğu belirlenmiştir. Bu hastalık 15°C ve üzeri sıcaklıklarda büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Tatlısu ve deniz balıklarında da meningocephalitis ve sepsisemiye neden olmaktadır. Balık patojeniyle büyük bir alakası olmasına rağmen, büyükbaş hayvan ve süt ürünlerinde de memeli enfeksiyonuyla ilişkili olarak bulunabilmektedir (Compos

ve diğ, 2015; Kubilay ve diğ, 2005). Çizelge 2,6'da starter kültür olarak kullanılan bazı *Lactococcus* cinsi bakterileri gösterilmektedir

Çizelge 2.5 : Farklı kaynaktan elde edilen türlerin gelişimine sıcaklık etkisi (Itoi ve diğ, 2009).

Tür	Kaynak	25 °C kültür			40 °C kültür		
			MRS katı besiyeri			MRS katı besiyeri	
		MRS sıvı besiyeri	Aerobik	Anaerobik	MRS sıvı besiyeri	Aerobik	Anaerobik
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Marine balık ince bağırsağı	+	+	+	+	+	+
	Tatlı su balığı ince bağırsağı	+	+	+	+	-	+
	Peynir	+	+	+	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Peynir	+	+	+	-	-	-

.

2.1.4 *Leuconostoc* cinsi bakteriler

Bu cins bakteriler Gram pozitif, hareketsiz, spor üretmeyen, fakültatif anaerobik, elips ya da küre şeklinde hücresi olan bakterilerdir (Sun ve diğ, 2014). Heterofermantatif olan *Leuconostoc* grubu bakteriler glikozdan sadece D-laktik asit üretmektedir ve arginini amonyağa dönüştürememektedir (König ve diğ, 2009).

Çizelge 2.6 : Fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan *Lactococcus* türleri (Teuber, 1995).

Gıda ürünü	Starter kültürün bileşenleri
Peynir türleri (Çedar, Camembert, Tilsit)	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>ceremoris</i> %95-98 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> %2-5
Süzme peynir, fermente süt	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>ceremoris</i> %95 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>ceremoris</i> %5 veya <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>ceremoris</i> %85-90 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> %3 <i>Leuconostoc merenteroides</i> subsp. <i>ceremoris</i> %5
Kültüre edilmiş tereyağı, fermente süt, kreması alınmış süt	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>ceremoris</i> %70-75 <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> %15-20 <i>Leuconostoc merenteroides</i> subsp. <i>ceremoris</i> %2-5
Taette (İskandinav sütü)	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>ceremoris</i> (ipliksi suş)
Villi (Fin sütü)	<i>Oidium lactis</i> (yüzeyi kaplar) <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>ceremoris</i> (ipliksi suş)
Kazein	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>ceremoris</i>
Kefir	Kefir taneleri laktozu fermente eden maya, <i>Lb. Kefir</i> , <i>Lb. Kefiranofaciens</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> içerir.

Leuconostoc spp. çevresel organizmadır ve genellikle bitkisel materyallerde, süt ve süt ürünlerinde, et, şarap ve diğer gıda ürünlerinde bulunmaktadır. Bu ürünlerin duyu kalitesinin ve yapısının geliştirmesinde büyük rol oynamaktadır. Diasetil üretimi nedeniyle süt ürünlerine lezzet vermektedir. Bu grup bakterilerin suşları aynı zamanda peynir üretimi için starter kültür olarak kullanılmaktadır. Glikozdan gaz üretimi gerçekleştirirler ve bu sayede gıdanın yapısını değiştirirler. Gelişmelerinin yavaş olması ve asitlendirme özellikleri nedeniyle gıdada az miktarda bulunmaktadır. Eğer gıdada antibiyotik madde varlığı bulunuyorsa, bu grup bakteriler dominant olabilmektedirler. Şarap üretiminde de yer alırlar. *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* alkolik fermantasyon boyunca üzümünden izole edilen *Leuconostoc* cinsi bakteridir (König ve diğ, 2009).

Leuconostoc cinleri heterofermantatif *Lactobacilli* cinsiyle benzerlik göstermektedir. *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* türlerinin genel olarak aynı habitattan izole edildiği ve hemen hemen aynı karakteristik özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir. Belirlenen 13 türü bulunmaktadır. Bunlar *Leu. mesenteroides*, *Leu. carnosum*, *Leu. citreum*, *Leu. fallax*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. gelidum*, *Leu. inhae*, *Leu. kimchii*, *Leu. lactis*, *Leu. holzapfelii*, *Leu. pseudomesenteroides*, *Leu. palmae* ve *Leu. miyukkimchii* türleridir. (Sun ve diğ, 2014).

Bu cins bakteriler ekonomik açıdan en önemli bakterilerdir. Fizyolojik özellikler bu cins bakterilerin türlerini belirlemede kullanılmaktadır. Genellikle 16S rRNA dizisi kullanılarak identifikasyonu yapılır (Liu ve diğ, 2014).

Bu cins bakterilerin fermente gıdalardaki rolü hem pozitif hem de negatif olabilmektedir. Süt ürünlerindeki pozitif etkisi seneler önce ortaya çıkmış ve hala aksi bilinmemektedir. Tereyağı aromasından sorumludur ve süt ürünlerinde bu istenilen karakteristik özelliklerdendir. Aynı zamanda sebze ve tahıllarda da kullanılmaktadır. Gıdayı bozabilme ihtimalleri de negatif etkisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Paketlenmiş, soğutulmuş et ve et ürünlerinin bozulmalarından sorumlu tutulmaktadır (Liu ve diğ, 2014). Ancak bitki ve hayvanlara karşı hemolitik olmayan ve patojenik olmayan özellik göstermektedir (König ve diğ, 2009).

2.1.5 *Pediococcus* cinsi bakteriler

Bu cins bakterilerin ilk bulunması biranın bozulmasıyla ilişkilendirilerek olmuştur. Küresel şekli ve dörtlü oluşumu erken farkına varılmasındaki önemli karakteristik özeliği olarak belirlenmiştir (Liu ve diğ, 2014).

Bu gruptaki bakteriler tipik bir laktik asit bakterisi olup Gram pozitif, katalaz negatif ve oksidaz negatif özelliklerine sahiptir. Bu gruptaki türler fakültatif aerobik mikroaerofilik koşullarda gelişebilmektedir. Ayrıca bu bakteriler homofermantatif bakterilerdendir. Laktik asit üretirken CO₂ üretememektedirler. Ayrıca nitratı indirgeyememektedir. Hücreleri küresel veya nadiren ovaldir. Çap uzunlukları 0,6 -1,0 µm. değerleri arasında değişmektedir. Hareketsiz olan bu türler spor oluşturmamaktadır. Aynı zamanda genel olarak yüksek tuz konsantrasyonlarına [$>18\%$ NaCl (w/v)] tolere edebilme özelliğine sahiptirler. Gelişebildikleri pH değerleri de 9,0 kadar yüksektir ve pH 5,0'te gelişememektedir (Sun ve diğ, 2014).

Birçok türü et starteri olarak kullanılan *P. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır ancak tekrar sınıflandırılarak *P. acidilactici* olarak belirlenmiştir. *P. acidilactici*, *P. argentinus*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* ve *P. stilesi* *Pediococcus* türlerindendir. *Pediococcus* türleri arasında *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* ve *P. halophilus* gıda fermentasyonunda yaygın olarak kullanılan türlerdendir (Liu ve diğ, 2014; Sun ve diğ, 2014). Şarapla ilgili olan bazı türlerin farklı karakteristik özellikleri çizelge 2.7'de gösterilmektedir.

Bu gruptaki bakteriler genel olarak meyvelerde, fermente gıdalarda ve bitkisel ürünlerde bulunmaktadır. Ancak bira bozulmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda diasetil üretimi nedeniyle şarapta istenmeyen lezzet oluşturmaktadırlar. *P. halophilus* şarapta bulunmaz ancak soya sosu üretiminde kullanılmaktadır. *Pediococcus* türü bakteriler aynı zamanda peynir ve sucuk üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bakteriyosin üreterek etteki bozulmaya engel olabilmektedirler. *P. damnosus* bira üretiminde bozulmaya yol açan tür olarak karşımıza çıkmaktadır (König ve diğ, 2009). Şarapta olduğu gibi birada da bozulma diasetil üretimi ile olmaktadır. Kötü koku ve lezzet oluşumuna sebep olmaktadır. *P. dextrinicus* ve *P. inopinatus* türleri de biradan izole edilmiş türlerdir ancak sıkça rastlanmamaktadır. *P. dextrinicus* patojenik özelliği ve CO₂ üretmesi

özelliği nedeniyle tipik *Pediococcus* olarak düşünülmemektedir. *P.acidilactici*, *P.pentosaceus* ve *P.parvulus* türleri de bira işletmeleriyle ilişkilendirilmektedir ancak daha çok malta bulunmaktadır ve şıra oluşumu öncesinde ve 50°C'nin altında gelişmektedirler. Özellikle *P.dextrinicus* ve *P.inopinatus* türleri düşük alkol konsantrasyonlarında ve artan pH değerlerinde gelişebilmekte veya yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Holzapfel ve diğ, 2006).

Çizelge 2.7 : Şarapla ilgili olan bazı *Pediococcus* türlerinin karakteristik özellikleri (König ve diğ, 2009).

Karakteristikler	<i>P. damnosus</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
Gelişme:			
35°C	-	+	+
%6 NaCl	-	+	+
pH 8,0	-	-	+
Arginin hidrolizi	-	-	+
Asit eldesi:			
Arabinozdan	-	-	+

Pediococcus cinsleri diğer laktik asit bakterilerine kıyasla bitkisel maddelerin fermantasyonunda sıkça bulunmaktadır. Özellikle bu türler *Pediococcus acidilactici*, *P.pentosaceus*, *P.parvulus*, *P.inopinatus*, ve *P.dextrinicus* olarak belirlenmiştir. Bu türler özellikle birçok yeşillik, lahana turşusu, fermente fasulye, salatalık ve zeytin gibi gıdalarda kullanılmaktadır. Bu grup bakteriler tipik laktik asit bakterisi olmalarına karşın yeşil sebze fermantasyonu için özellikle *Pediococcus acidilactici* ve *P.pentosaceus* türleri starter kültür olarak seçilmektedir. Bu türler hububatların fermantasyonunda da kullanılmaktadır. Ayrıca özellikle Sudan'a özgü fermente darıların üretiminde de bu grup bakterilerden yararlanılmaktadır (Holzapfel ve diğ, 2006).

Bitkisel ürünlerin dışında özellikle *Pediococcus acidilactici* türü taze veya kürlenmiş et ve sucuk gibi proteinli gıdalarla ilişkilendirilmiştir. *Pediococcus acidilactici* ve *P.pentosaceus* fermente sucukla bulunmaktadır. Bu iki tür aynı

zamanda taze ve marine edilmiş balıklarda, Taylanda özgü fermente gıdalarda ve Malezyeya özgü gıda soslarında da karşımıza çıkmaktadır. Et ve et ürünleri *Pediococcus acidilactici* ve *P.pentosaceus* türleri için uygun gelişme substratı özelliği göstermektedir. Sucuğun yarı kuru fermantasyonunda ve diğer kürlenmiş ürünlerin fermantasyonları ve olgunlaşmaları boyunca önemli rolleri bulunmaktadır. *Pediococcus* türleri aynı zamanda vakum ve atmosferi değiştirilmiş ambalajların kullanıldığı et ve et ürünlerinde de bulunabilmektedir. *Pediococcus pentosaceus* suşlarının kuru kürlenmiş jambonda lipolitik aktivitesi belirlenmiştir. Ancak herhangi bir endopeptidaz aktivitesi gözlenmemiştir. Ancak bazı türler ette sitrik asit degradasyonu sonucunda diasetil üreterek bozulmaya yol açmaktadır. Diasetilin yoğun aroması nedeniyle etin lezzeti bozulabilmektedir (Holzapfel ve diğ, 2006).

2.1.6 *Streptococcus* cinsi bakteriler

Streptococcus cinsi bakteriler Gram pozitif, hareketsiz ve sıvı besiyerinde geliştikleri zaman çift veya zincir halinde düzenlenmiş küre veya oval şeklinde hücrelere sahip bakterilerdir. Bütün türleri fakültatif anaerobiktir ve bazen gelişimleri için ek olarak CO₂ gereklidir. Katı besiyerindeki gelişmeleri kan ve glikoz eklenmesiyle artırılmaktadır. Ancak sıvı besiyerindeki gelişimleri için glikoz veya diğer fermente edilebilen karbonhidratların eklenmesi esastır. Aynı zamanda pH'daki hızlı düşüş bu bakterileri inhibe etmektedir. Katalaz negatif ve homofermantatif olan bu türler aynı zamanda spor oluşturmamaktadırlar. Karmaşık ve besinsel değeri yüksek maddelere gereksinim duymaktadırlar. Fermantasyon sonucu karbonhidratları laktik aside dönüştürürler ancak gaz oluşturmamaktadırlar. Türlerin bazıları sakarozun varlığında geliştiği zaman hücre dışı polisakkarit üretmektedirler. Hücre çapları genellikle 0,8–1,2 µm arasındadır. Ancak zincir uzunlukları türe ve kültür koşullarına göre değişmektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 37°C'dir. Ancak maksimum ve minimum gelişme sıcaklıkları türlerine göre değişiklik göstermektedir. Birçok türü hayvanlar için patojen özellikte olup bazıları ölümcül olmaktadır (Sun ve diğ, 2014).

Bu tür bakteriler mikrobiyologlar tarafından en erken belirlenen türlerdendir. Bunun nedeni de birçok insan ve hayvan hastalıklarında hastalık nedeni olarak

belirlenmiştir. 1884 yılında ilk olarak *Streptococcus pyogenes* türü belirlenmiştir. Bu tür başlangıçta insanlarda iltihaplı lezyonlardan ve yaralardan izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda mastitis olan ineklerden ve zatürre olan insanlardan izole edilmiştir. Bu türlerin insan ve hayvan hastalıklarıyla ilgisi son yıllarda daha çok araştırılmaktadır (Sun ve diğ, 2014; Liu ve diğ, 2014).

Bu bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan ilk kıstas hemoliz aktivitesidir. Ancak türler arasındaki farklılıkları inkübasyon prosedürleri de etkilemektedir. Yaklaşık 40 yıl önce yapılan çalışmalarda bu bakteriler patojenite, yaşam alanı ve oksijen toleransı gibi kriterlere göre değerlendirilmiş ancak daha sonra moleküler çalışmalar sonucunda bu değerlendirmeler gözden geçirilip düzeltilmiştir. Günümüzde ise birçok teknolojik uygulama kullanılmaktadır. Özellikle DNA parmak izi kontrolü teknolojisi türler arasındaki farkları belirlemede başarılı bir şekilde uygulanan teknolojilerdendir. Bu gruba ait yaklaşık altmışa yakın tür bulunmaktadır. Bilinen *Streptococcus* türlerinden bazıları *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. constellatus* subsp. *pharynges*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. gordonii*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. iniae*, *S. intermedius*, *S. lutetiensis*, *S. macedonicus*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. oligofermentans*, *S. parasanguinis*, *S. parauberis*, *S. pasteurianus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. uberis* olarak karşımıza çıkmaktadır (Sun ve diğ, 2014; Liu ve diğ, 2014).

2.1.7 Weisella cinsi bakteriler

Laktik asit bakterisi üyesi olan *Weisella* cinsi bakterileri spor oluşturmayan, Gram pozitif, hareketsiz ve katalaz negatif bakterilerdir. Tek hareketli türü manyok fermantasyonundan izole edilen *W. beninensis*'dir. Fermente sebzeler, şeker kamışı, hayvan ve insanların sindirim sistemi gibi birçok değişik alana yayılmışlardır. B-glüten aktivitesi olan suşlar genelde insan dışkısından izole edilmekte ve fermente soya sütünde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada 4°C'de 48 saat boyunca gelişemezken, 37°C en hızlı gelişme gösterdikleri sıcaklıktır. Ancak düşük sıcaklıklarda birkaç hafta inkübasyon süresi uzatıldığı zaman gelişme gösterebilmektedirler. Ancak genel olarak baktığımızda optimum gelişme sıcaklığı 15°C olmakla beraber bazı

suşların en iyi gelişimi ise 42-45°C sıcaklıkları arasında olmaktadır (Lee ve diğ, 2012; Sun ve diğ, 2014). Heterofermanatif olarak bu türler karbonhidratı hem heksozmonofosfat ve fosfoketolaz yollarıyla fermente etmektedirler. Son ürünler ise CO₂, etanol ve asetat olmaktadır. *W. beninensis*, *W. cibaria* ve *W. thailandensis* türleri %4, 6,5 ve 10 NaCl varlığında gelişimi gözlenebilen türlerdendir (Sun ve diğ, 2014). Ek olarak bu tür bakteriler yaşam alanlarını diğer laktik asit bakterileriyle paylaşmaktadırlar. Aminoasitler ve peptitler, fermente edilebilir karbonhidratlar, yağ asitleri, nükleik asitler ve vitaminler gelişimlerini etkileyen faktörlerdendir (Björkroth ve diğ, 2006).

İnsan sağlığına faydası olan bu grup bakteriler çeşitli tarama testlerinden geçirilmektedir. Bu testler bu türlerin epitel hücrelere yapışma, gluklan üretme, bakteriyosin üretme, antimikrobiyal özellik gösterme, *Streptococcus mutans* biyofilmlerini engelleme gibi özelliklerini göz önüne sermektedir. Probiyotik olarak kullanılan bazı suçları ise *Edwardsiella*, *Pasteurella*, *Aeromonas* ve *Vibrio* gibi patojen cinslerine karşı iyi bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Sun ve diğ, 2014). İlk olarak 1993 yılında *Leuconostoc* cinsine benzer mikroorganizma olarak Yunan sucuklarında belirlenmiştir. *Weissella paramesenteroides* taze sebzelerde hakim olan en önemli türlerdendir. Yeşil sebze fermantasyonunda önemli rol oynamaktadır (Sun ve diğ, 2014). *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica* ve *Weissella viridescens* ise et ve et ürünleriyle ilgili olan türlerdendir. *Weissella viridescens* türü özellikle et ürünlere yeşil renk vermesiyle ilişkilendirilmektedir. Kürlenmiş veya pişirilmiş et ürünlerinin yeşillenmesinin sebebi hidrojen peroksit birikmesi olarak belirlenmiştir. Hidrojen peroksit düşük E_h değerlerinde oluşturulmaktadır. Hidrojen peroksit etteki nitrik oksit hemokromojen ve nitrik oksit miyogloblin ile etkileşime girmektedir. Sonuç olarak yeşil renkli okside edilmiş porfirin oluşmaktadır. Bu türlerle ilgili diğer problem ise ısıya dirençli suşların eti kontamine etmesidir. Bu türler 68°C sıcaklıkta 40 dakika boyunca yaşayabilmektedir. Bu özellik bozulma problemini artırabilmektedir. Sonucunda et bozularak, bozulmuş koku, tat, renkte bozulma ve gaz üretimi oluşmaktadır (Björkroth ve diğ, 2006). *Weissella confusa* türü şeker kamışı, havuç suyu ve çiğ sütte bulunmaktadır. *Weissella thailandensis* türü ise Tayland'da fermente balık ürünlerinden izole edilmiştir. Güneydoğu Asya'da ise bu bakterilere kontaminantlarda rastlanmıştır (Björkroth ve diğ, 2002).

Weisella türlerini klasik fenotip yoluyla belirleme kesinlikle imkansızdır. Doğru bir şekilde bu türlerin belirlenebilmesi için, farklı moleküler ve biyolojik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yöntemler tam hücre protein analizi, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi analizi ve denatüren gradyan jel elektroforezi analizidir (Sun ve diğ, 2014).

2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Metabolitleri

Laktik asit bakterilerinin gıda maddelerinin üretiminde ve olgunlaşmasında önemli bir payının olması ve koruyucu bir yöntem olarak kullanılması nedeniyle gıda teknolojindeki önemleri büyüktür. Gıdalarda doğal olarak bulunan veya başlangıç kültürü olarak ilave edilen laktik asit bakterilerinin gıdayı bozucu mikroorganizmaları veya gıda kaynaklı patojenleri engelleyici aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Bu aktivitelerin farklı mekanizmalar ile ilgili olduğu da bilinmektedir:

- Karbonhidratları fermente etmeleri sonucu oluşan maddeler; organik asitler
- Aerobik gelişmeleri sırasında üretilen maddeler; H₂O₂
- Antimikrobiyal kaynaklı proteinler; bakteriyosinler
- Bazı bakteriler tarafında oluşturulan metabolitler: diasetil, alkol ve CO₂ (Çon ve diğ, 2000).

2.2.1 Organik asitler

Organik asitlerin sebze, et ve süt gibi birçok üründe fermantasyon boyunca farklı bakteriler tarafından önemli miktarlarda üretildiği uygarlık tarihi boyunca bilinmektedir. Bu asitle gıdanın pH'ını düşürerek ham maddede bulunan veya çevreden bir şekilde gıdanın kontamine olmasına sebebiyet veren mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyici özellikleri bulunmaktadır. Bu sayede fermente gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi engellenip raf ömrü uzatılmış olmaktadır (Çelikyurt ve diğ, 2008).

İnsanların birçok fonksiyonun etkileyen gıdaların, güvenli olması çok önemlidir. Her geçen gün tüketici beğenisine göre üretilen ürünlere raf ömrünün artması için katkı maddeleri ilave edilmektedir. Ancak gıdada doğal katkı maddelerinin

kullanımı tercih edilmelidir. Bu amaçla biyokontrol yöntemi önerilmektedir. Fermantasyonla asitleştirme de bu yöntemlerdendir (Evren ve diğ, 2006). Birçok üründe kullanılan asitleştirme metodu son üründe güvenliği sağlamaktadır. Patojen veya bozulmaya neden olan herhangi bir mikroorganizmalar bu metodun kullanıldığı ürünlerde üretilen organik aside bağlı olarak inhibe etme gerçekleşmektedir. Laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve butirik laktik asit bakterileri tarafından asit üretilen organik asitlerdendir (Reis ve diğ, 2012).

2.2.1.1 Laktik asit

Laktik asit, laktik asit bakterilerinin fermantasyonda son ürünü olarak bilinmektedir (Evren ve diğ, 2006). Bu asitler gıdada ya doğal olarak bulunmakta ya da yoğurt, zeytin, süt gibi ürünlerde mikrobiyal fermantasyon sonucu oluşmaktadır. Özellikle *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* gibi cinsler laktik asit bakterileri laktik asit üretmektedir. *Aspergillus flavus* suşları üzerinde engelleyici etkisi bulunmaktadır. Her bir suş için engelleyici minimum laktik asit konsantrasyonu farklı olmaktadır (Reis ve diğ, 2012).

Laktik asitlerinin engelleyici etkisi genellikle sitoplazmadaki ayrışmamış laktik asidin çözünürlüğü ve ayrışmış laktik asidin tuzunun çözünmezliği ile ilgilidir. Bu mekanizma zar içinde ve dışındaki pH farkını etkilemekte ve hücrenin büyümesi için gerekli enerjiyi azaltmaktadır. Genel olarak da asitleştirme, tatlandırma, pH-tampon maddesi veya ekmek, fırın ürünleri, çorba, şerbet, reçel, bira, mayonez, süt ürünleri gibi işlenmiş ürünlerde bakteri bozulmasını önlemek için kullanılmaktadır (Reis ve diğ, 2012). Özellikle GRAS statüsünde yer alan laktik asit ve (Na-, K- ve Ca-) tuzları salatalık turşusu ve zeytin salamurasında pH ayarlanmasında kullanılmaktadır. Dana karkaslarında da su ile püskürtme işleminde kullanılmaktadır. Ayrıca sütte bulunan ve patojen olan *Salmonella typhimurium* hücreleri hidroklorik asit yerine laktik asit kullanılarak pH 4'e düşürüldüğünde daha hızlı ölmektedir. Yine benzer şekilde hidroklorik asit yerine laktik asit kullanılarak pH 5,5'e ayarlandığında hücrelerin gelişimi daha da yavaşlamaktadır. Asetik asitle beraber kullanıldığında ise sinerjist bir etkiye sahiptir. Bu asidin ticari üretimi ise kazein, nişasta ve melasın fermantasyonu ile yapılmaktadır (Çelikyurt ve diğ, 2008).

Fermantasyon sırasından glikoz son ürün olan laktik aside dönüştürülür (Evren ve diğ, 2006). Homofermantatif laktik asit bakterileri, şekerleri fruktozdifosfat yolu (FDP) ile fermente ederek %90 veya %100 saf laktik asit üretmektedir. Fermantasyonun son aşamasında pirüvik asitin laktik aside indirgenmesi için gliseraldehit 3fosfatın dehidrogenasyonundan elde edilen NADH+H kullanılmaktadır (Çon ve diğ, 2000).

2.2.1.2 Asetik asit

Asetik asit, tuzu ve %5-40 asetik asit içeren sirke birçok gıdada Gram pozitif, Gram negatif, küf ve mayaların gelişimini engellemek veya yaşayabilirliklerini azaltmak amaçlı kullanılmaktadır. Genel olarak %0,2 kullanımda bakterilerin gelişimini engellemekte, %0,3 kullanımda ise bakteriyi öldürmektedir. Özellikle Gram negatif bakterilere etki etmektedir. Ancak bakteri üzerindeki etki pH'a bağlı olmaktadır. Bakteri öldürücü etkisi düşük pH'larda etkili olmaktadır. Salata soslarına, mayoneze antimikrobiyal madde olarak eklenmektedir ve karkas yıkaması için kullanılmasına da izin verilmektedir (Reis ve diğ, 2012).

Heterofermantatif *Lactobacillus* bakteriler tarafından üretilen ve asitleştirme için kullanılan asetik asit aromaya katkıda bulunmakta ve ekşi hamurda küf bozulmasını engellemektedir. Gıda endüstrisinde özellikle ısı, asetik asit ve tuzu kombinasyonlarının *Escherichia coli* O157:H7 bakterisinin inaktive edilmesine etkisi incelenmektedir. Gıda kaynaklı patojenlerin ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişmesini engellemek için sıkça kullanılan engel teknolojilerindendir. *Bifidobacterium* cinsleri tarafından üretilen asetik asit tuzu ise *Escherichia coli* O157:H7 bakterisine karşı konakçıyı korumakta ve bağırsak savunmasını geliştirmektedir. Etanolden fazlaca üretilmesi de sirke endüstrisinde asetik asit bakterilerini önemli kılmaktadır (Reis ve diğ, 2012). Diğer organik asitlerle karşılaştırıldığında ise pH 4,4 ile 5,2 arasında *Listeria monocytogenes*'in gelişimini engelleyici etkisi asetik asit > laktik asit > HCl şeklindedir. *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı asetik asidin antimikrobiyal etkisinin laktik aside oranla daha fazla olduğu bilinmektedir (Çelikyurt ve diğ, 2008).

Asetik asit ve tuzlarının günlük alım miktarları için bir kısıtlama yoktur. Genel olarak salamura et, balık, sebze, hardal, salata sosu, süsleme ürünleri, mayonez, ketçap ve bazı bebek mamalarında kullanılmaktadır (Çelikyurt ve diğ, 2008).

2.2.1.3 Propiyonik asit

Propiyonik asit üreten bakteriler laktatı propiyonat, asetat ve CO₂'ye dönüştürmektedir (Reis ve diğ, 2012). Bu bakteriler genellikle Gram pozitif, spor oluşturmeyen, çubuk şeklindeki bakterilerdir. Genellikle mezofil özellikte olup gelişme sıcaklıkları 25 ile 37°C arasındadır (Tangüler ve diğ, 2006). Heterofermantatif laktik asit bakterileri az miktarda propiyonik asit üretmektedir (Reis ve diğ, 2012). Bazı süt ürünlerinden *Propionibacterium* fermentasyonu ile elde edilebilmektedirler. Bunun dışında *Propionibacterium* ile küspe odun atıklarının fermentasyonu ya da bazı sentetik prosesler ile de üretilebilmektedirler (Çelikyurt ve diğ, 2008).

Propiyonik asit gıdada özellikle mantarlara karşı kullanılmaktadır. Ancak Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin yaşayabilirliklerini azaltma ve gelişmelerini kontrol etmede etkilidir. Mantar üretiminin kontrolü için peynirler, tereyağı, fırın ürünlerinde kullanılırken, bakteri ve mayaların gelişmesini engellemek için meyve suyu ve bazı taze meyvelerde kullanılmaktadır. Bu asitlerin etkileri pH değerindeki düşüşe bağlı olmaktadır. Özellikle düşük pH değerlerinde mantar üretimini azaltmaktadır. Asit derecesi %0,1-0,2 değerleri arasında olmasına rağmen, eğer pH 4.5'in altında ise mantar zarlarını etkilemekte ve amino asit alımını engellemektedir. Yine düşük pH değerlerinde, sodyum propiyonat, amonyum propiyonat gibi propiyonik asit tuzları mantar ve mayalara karşı benzer etkilidir. Ayrıca bu bakteriler B₁₂ vitamini üretimi için de kullanılmaktadır (Reis ve diğ, 2012). Propiyonik asit bakterileri esas olarak propiyonik asit üretimlerinin yanında asetik asit ve bakteriyosin üreterek gıdaların dayanıklılığını artırmaktadır (Tangüler ve diğ, 2006).

Yapılan çalışmalarda organik asitlerine etkinlikleri karşılaştırılmaktadır. Aynı pH derecesinde *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* ve diğer pek çok mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki sıralaması propiyonik asit > laktik asit > asetik asit şeklindedir. Çözünmemiş moleküllerin konsantrasyonu antimikrobiyal etki ile bağlantılı olmaktadır. Düşük pH derecesinde çözünmemiş

moleküllerin miktarı fazla olduğundan antimikrobiyal etki de fazla olmaktadır (Çelikyurt ve diğ, 2008).

2.2.1.4 Benzoik asit

Benzoik asit gıda endüstrisinde kullanılan en yaygın koruyuculardandır. Benzoik asit ve sonyum benzoat özellikle mantara karşı kullanılan maddelerdendir (Reis ve diğ, 2012). Biyolojik koruyucu kategorisinde yer almamasına rağmen pek çok gıdada koruyucu olarak kullanılan bu asitler yüksek pH aralığında da etki göstermektedir (Çelikyurt ve diğ, 2008). Süt ürünleri de doğal olarak benzoik asit içermektedir. Çünkü laktik asit bakterileri sütte bulunan bazı asitleri benzoik aside dönüştürmektedir. Özellikle *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus* suşları süt fermantasyonunda kullanılan ve benzoik asit üreten türlerdendir (Reis ve diğ, 2012).

2.2.2 Bakteriyosin

Bakteriyosinler birçok laktik asit bakterisi tarafından sentezlenebilen doğal antimikrobiyal maddelerdendir. Protein yapısında olup, genellikle kısa zincirli olan bu maddelerin üretiminden büyük oranda plazmid DNA sorumlu olmaktadır. Özellikle *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinsleri tarafından bu metabolitlerin üretimi oldukça yaygındır. Ancak bu cinsler içinde bulunan türler arasında bakteriyosin üretim sıklığı farklılık gösterebilmektedir. Örnek olarak *Lactococcus lactis*'in 45 suşundan 35'inin, *L. acidophilus*'un 52 suşundan ise 33'ünün bakteriyosin ürettiği bilinirken, diğer türlerde yalnız birkaç suşunun bakteriyosin ürettiği bilinmektedir (Çon ve diğ, 2000; Evren ve diğ, 2006). Bir bakteriyel maddenin bakteriyosin olarak belirlenebilmesi için bazı kriterlerin dikkate alınması gerekmektedir. Bunlar biyolojik yönden aktif bir proteine sahip olması, bakteri öldürücü etki göstermesi, dar bir inhibisyon spektrumuna sahip olması, belirli hücre reseptörlerine tutunması, üretimin ve konakçı-hücre bağışıklığının plazmid kökenli genetik determinantlara bağlı olması ve üretimin lethal biyosentez yoluyla gerçekleşmesidir (Gürsel, 1999). Bakteriyosinler özellikle gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Ancak biyokimyasal özellikleri ve etki spektrumları üreten mikroorganizmaya göre farklılık göstermektedir (Evren ve diğ, 2006). Çizelge 2.8' de bakteriyosin üreten organizma, ürettiği

bakteriyosin çeşidi ve etki ettikleri mikroorganizmalar gösterilmektedir. Bakteriyosin üretimi türlerden başka besiyeri bileşimi, pH değeri ve üretici suşun gelişme fazı gibi faktörlerden etkilenmektedir. Yapılan çalışmalarda en iyi üretimin MRS agara %2 maya ekstraktı eklenerek hazırlanan besiyerinde ve pH 5,5 değeriinde olduğu belirtilmektedir (on ve diğ, 2000). Ürün içeriği, besinler ögeler, ilave maddeler, iz miktardaki maddeler, sıcaklık, oksijen, redoks potansiyeli, zaman, mikrobiyal yük, fizyolojik durum, mikrobiyal çeşitlilik ve üretim prosesi de bakteriyosin üretimini etkileyen diğer faktörlerdir (Dinçer ve diğ, 2009).

Geçmiş yıllarda yapılan veya hala yapılmakta olan çalışmalarda belirtilmektedir ki bakteriyosinler gıda koruyucusu olarak oldukça faydalı özellikler göstermektedir. Eklendiği gıdada raf ömrünü uzatabilme, saklama koşulları altındaki sıcaklıklarda fazla koruma sağlanmakta, gıda kökenli patojenlerin besin zinciri ile dağılım riski azaltılabilmekte, gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirgenmekte, diğer kimyasal koruyucuların kullanımları azaltılabilmekte, koruma için daha az prosesin uygulanması sebebi ile ürünün organoleptik özellikleri ve besinsel değeri daha iyi korunabilmektedir. Genel olarak güvenli (GRAS) bulunmaktadırlar. Ökaryotik hücrelere karşı aktif olmamakta ya da toksik özellik göstermemektedirler. pH ve sıcaklığa karşı tolerans göstermektedirler. Gıda kökenli patojen ve çürükçül mikroorganizmalara karşı nispeten geniş spektrumda antimikrobiyel etki göstermektedirler. Ayrıca antibiyotik direnci bakteriyosinin bakteri öldürücü özelliğini etkilememektedir (Dinçer ve diğ, 2009).

Bakteriyosinler için farklı sınıflandırılmalar yapılabilmektedir. Özellikle Klaenhammer'in gram pozitif bakterileri dikkate alarak yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan bu sınıflandırmada, bakteriyosinler molekül büyüklüğü, kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabilitelerine göre 4 sınıfa ayrılmışlardır (Kurt ve diğ, 2005).

Çizelge 2.8 : Bakteriyosin sentezleyen bazı laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriyosin çeşitleri ve etki spektrumları (Çon ve diğ, 2000).

Bakteriyosin üretici organizma	Üretilen bakteriyosin	Etki spektrumu
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Laktosin B	<i>Lactobacillus</i>
	Laktosin F	<i>Lactobacillus</i> ve <i>Enterococcus</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helvetisin J	<i>Lactobacillus</i>
	Laktosin 27	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantarisin A	Laktik asit bakterileri
	Laktosin B	Laktik asit bakterileri, <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> sporları
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakasin A	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> ve <i>Listeri monocytogenes</i>
	Laktosin S	Laktik asit bakterileri
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram Pozitif Bakteriler
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Nisin	Gram Pozitif Bakteriler
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Diplokoksin	<i>Lactococcus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	D Laktostrepsins	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> ve <i>Lactobacillus</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediosin AcH	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> ve <i>Clostridium botulinum</i>

Grup I bakteriyosinler daha çok antibiyotik olarak adlandırılmaktadırlar. Yapılarında bilinen aminoasitlerden farklı olarak lantionin (Lan) ve metillantionin (MeLan) aminoasit türevlerini içermektedirler. Molekül ağırlıkları 5kDa'dan daha düşüktür. Bu grupta yer alan nisin, laktisin 3147A ve 3147B ile plantarisin C bakteriyosinlerinin ısı stabiliteyi yüksek olup, asidik pH'da 100°C'ye kadar stabiliteyi koruyabilmektedirler. Bu grupta yer alan bakteriyosinler antimikrobiyal özelliklerine ve kimyasal yapılarına göre I A ve I B olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Grup I A'da yer alan bakteriyosinler net pozitif yüke ve hidrofobik polipeptid yapıya sahiptirler. Membran aktif peptidler olup, bakteri zarında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Grup I B'deki bakteriyosinlerin esneklikleri grup IA'dakilere göre az olmaktadır. Bu gruptakiler yüksüz veya negatif olmaktadır. Belirli enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal özellik göstermektedirler. Nisin, lactocin S grup I A'da, actagardin, ancovenin ise grup I B'de bulunan bakteriyosinlerdendir (Kurt ve diğ, 2005).

Grup II bakteriyosinler ise grup I den farklı olarak lantionin içermeyizler. Isı stabilitesine sahip olup, molekül ağırlıkları 10 kDa'dan düşük olarak bilinmektedir. Bu gruptaki bazı bakteriyosinler 100°C'den 121°C'ye kadar olan sıcaklıklara karşı stabildirler. Antimikrobiyal aktiviteleri, membran aktif olmalarından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu grup 3 alt gruba ayrılmaktadır. Grup II A'daki bakteriyosinler özellikle *Listeria*'ya karşı etkili olmaktadır. Yapılarında bulunan peptidin N-terminalinin sonunda Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys aminoasit dizisine sahiptirler. Grup II B bakteriyosinler ise primer yapıları birbirinden farklı iki polipeptid içerirler. Daha etkin şekilde etki gösterebilmeleri için ikisinin de aktif olması gerekmektedir. Ancak tek başlarına da etkilerini sürdürebilmektedirler. İki polipeptidin aktif hale gelmesiyle, hücre zarında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Grup II C'deki bakteriyosinler ise A ve B dışında kalan bakteriyosinlerdir. Bu gruptakilerin birçoğu sistein aminoasit rezidüsü içermekte ve bu bakteriyosinlere tibiyotikler veya sistibiyotikler denilmektedir. Tiyo-aktif bakteriyosinler olup, aktiviteleri için indirgenmiş sistin rezidüsüne gereksinim duyarlar. Pediosin PA-1, Sakasin A grup IIA'da bulunan, Laktokoksin G,

Laktokoksin M grup II B’de bulunan, Asidosin B ve Enterosin B ise grup II C’de bulunan bakteriyosinlerdir (Kurt ve diğ, 2005).

Grup III bakteriyosinler ise 30 kDa’dan fazla molekül ağırlığına sahiptir. Isıya karşı duyarlı peptidlerden oluşmaktadırlar. Bu gruptekiler yeterince karakterize edilememişlerdir. Helvetisin V-1829 bu grupta yer alan bakteriyosindir (Kurt ve diğ, 2005).

Grup IV bakteriyosinleri ise büyük ve karmaşık maddelerdir. Aktiviteleri için karbonhidrat veya lipid bileşenlerine gereksinim duymaktadırlar (Kurt ve diğ, 2005).

Bakteriostatik etkisi bulunan laktosin 27 dışında olan bakteriyosinler hücrelere karşı genellikle bakterisidal etkili olarak rol oynamaktadır. Antimikrobiyal aktiviteleri yönünden iki gruba ayrılabilirler:

- a. Gram pozitif mikroorganizmaların genlerinin bir kısmını inhibe edenler: nisin, pediosin A ve pediosin ACH
- b. Sadece üretici suşlar ise yakın ilişkili türleri inhibe edenler: laktasin F, laktasin B (Çon ve diğ, 2000).

Bakteriyosinler gıdalarda katkı maddesi olarak kullanıldığı zaten bilinen özelliklerindendir Özellikle bu amaçla nisin kullanılmaktadır. Nisin asidik gıdalarda ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde aktif olmaktadır. Nisinin koruyucu katkı maddesi olarak kullanımına ilk kez krem peynirlerinde izin verildikten sonra, günümüzde 47 ülke tarafından güvenli gıda koruyucusu olarak kabul edilerek kullanılmaktadır. Gıdaya starter kültür sonucunda direkt olarak eklenebilmektedir. Bunun dışında ambalaj materyali ile birlikte de kullanılabilir. Bakteriyosinlerin doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da gıda ürünüde kullanılması açısından oldukça önemlidir. Araştırmalar da göstermektedir ki starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri veya yardımcı kültürler bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptir ve bu özellik de gıda patojenlerine ve gıda bozulmalarına karşı engelleyici etki göstermektedir. Özellikle fermente sucuk, fermente sebze ve süt ürünlerinde bakteriyosinlere rastlanmaktadır. Çedar peynirinde ve ekşi hamurda da üretildiği belirlenmiştir (Vuyst ve diğ, 2007; Kurt ve diğ, 2005). Genel olarak kullanılan

bazı bakteriyosinler, uygulandığı gıdalar ve etkileri Çizelge 2.9’da gösterilmektedir.

Sütteki laktik asit fermantasyonu ile peynir üretilmekte ve ürün gelişimi doğal olarak laktik asit bakteri florasına bağlı olarak oluşmaktadır. Starter kültürler ise ticari olarak belirlenmekte ve genel olarak mezofilik laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* ya da termofillerden *Streptococcus thermophilus*, *Lb. helveticus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda ev yapımı peynirlerde kullanılan izolatların bakteriyosin üretme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle bu izolatların *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *Salmonella paratyphi* üzerinde antimikrobiyal aktivite sergilediğini belirlenmiştir. Kaşar peynirinde ise laktisin 3147 bakteriyosinin *L. monocytogenes* üzerinde azaltıcı etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bunu dışında starter kültür olarak kullanılmayan laktik asit bakterilerinin de sayısının arttığı görülmüştür (Dinçer ve diğ, 2009).

Et ürünlerinde ise laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin, et fermantasyonunun erken aşamalarında *L. monocytogenes* bakterisinin sayısını azalttığı bilinmektedir. Güney Yunanistan’daki geleneksel fermente sucuklarda *Lb. plantarum* ve *Lb. sakei* türlerini baskın olarak bulunmuştur. Özellikle Sınıf II A bakteriyosinleri arasında yer alan pediosin PA1 ve AcH in taze ve fermente etlerde *L. monocytogenes* kontaminasyonunu engellemek için kullanıldığı bilinmektedir. Buzdolabı koşullarında saklanmakta olan, hazır et ürünlerinde de uzun raf ömrü istenmektedir. Bu nedenle koruyucu kültür ilavesi yapılmaktadır. Burada özellikle laktik asit bakteri türleri tercih edilmektedir. Nedeni ise bakteriyosin üretimi ve ortam pH’sını indigeme kapasiteleri olmaktadır. Bu sayede *Clostridium botulinum* inhibe edilmektedir (Dinçer ve diğ, 2009).

Taze meyve ve sebzeler de laktik asit bakterisi suşları içeren gıdalardandır. Özellikle bu gruptaki ürünleri fermente meyve suları ve hormonlanmış ürünler ile birlikte, yağlar, salatalık (turşu) ve lahana (turşu ve Kore ye özgü olan Kimchi) gibi ürünlerde bulunmaktadır. Bazı bu tür gıdalarda ise bakteriyosin üreten suşlar kullanılmaktadır. Özellikle fermente havuçlardan nisin benzeri metabolitler üreten *L. lactis* suşları izole edilmiştir. Aynı suş salatalardan da izole edilmektedir (Dinçer ve diğ, 2009).

Çizelge 2.9 : Bazı bakteriyosinlerin uyguladığı gıdalar ve etkileri (Kurt ve diğ, 2005).

Bakteriyosin	Uygulanan gıda	Etkileri
Nisin A	Yeniden şekillendirilen et ürünleri	Bakteriyel inaktivasyon
Nisin A	Ricotta peynirinde <i>L. monocytogenes</i> 'in kontrolü için kullanılmıştır.	<i>L. monocytogenes</i> 'i 8 haftada etkili bir şekilde inhibe etmiştir.
Pediosin AcH	Pediosin AcH sentezleyen <i>L. plantarum</i> WHE 92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreyleneştir	<i>L. monocytogenes</i> 'in gelişimini engellemiştir.
Enterosin 4	Enterosin sentezleyen <i>E. faecalis</i> INIA4, Manchego peyniri üretiminde kullanılmıştır	<i>L. monocytogenes</i> Ohio 'yu inhibe ederken, <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A'yı inhibe etmemiştir
Linisin M-18	<i>B. lines</i> kırmızı peynir üretiminde starter olarak kullanılmıştır	<i>L. ivanovi</i> ve <i>L. monocytogenes</i> 'te 2 log düşüşe neden olmuştur
Pediosin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır	Bu tür ürünlerde kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir
Pediosin AcH	Tavuk etine pediosin preparatı ilave edilmiştir	5°C'de 28 gün <i>L. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir

Bakteriyosinlerin etki alanlarının sınırlı olması nedeniyle gıdalardaki etkileri de sınırlıdır. Özellikle Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde etkilidir. Dolayısıyla Gram pozitif olan patojen mikroorganizmalar düşünüldüğünde, sadece nisin kullanımıyla gıda güvenliğinin sağlanamayacağı açıktır. Bu nedenle, nisinle birlikte diğer gıda koruyucu maddelerin veya proseslerin kullanılması gerekmektedir. Gram negatif bakterilerin dış zarlarının bütünlüğü bozulduğunda bakteriyosinlere karşı oldukça hassasiyet göstermektedirler. Bu nedenle nisinle beraber hücre zarını bozabilecek trisodyum fosfat veya EDTA gibi çelatların kullanılmasının engelleyici etki yapabileceği bilinmektedir. Nisinle birlikte sodyum klorid, sarımsak ekstraktı, potasyum sorbat, bazı organik asitler, sodyum sitrat ve sodyum laktat, kitosan ve bunu gibi birçok katkının kullanımıyla nisinin antimikrobiyal etkisinin arttığı belirlenmiştir. Nisin etkisini artırmak için katkı maddelerinin yanı sıra bazı prosesler de uygulanmaktadır. Yüksek basınç ve yüksek voltaj elektrik alan pulslarının (PEF) uygulanması bu proseslerdendir. Örneğin 100 IU/ml nisinle birlikte 155-400 MPa basınç uygulamasının *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Staphylococcus aureus*'u inaktive ettiği belirlenmiştir. Diğer antimikrobiyal özellik artırıcı işlem ise nisinin gıda yüzeyine uygulanan filmlerde kullanımınıdır. Bu tür antimikrobiyal biyofilmler, temas ettikleri gıda yüzeyinde mikrobiyal gelişimi etkilemektedir. Nisin, biyofilmlerden gıda yüzeyine belli oranlarda geçerek, yüzeyde mikrobiyal gelişimi engelleyebilmektedir (Kurt ve diğ, 2005).

Bakteriyosinin gıdadaki kullanımları ve yaraları dışında sindirim kanalında *H. pylori*'ye karşı laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir. Ancak midede proteolitik enzimler tarafından degrades edilebilmektedir. Ancak probiyotik bakteriler sindirim kanalında bölgesel olarak üretilmektedir. Ticari suçlardan olan *Lactobacillus casei*'den de izole edilmektedir (Vuyst ve diğ, 2007).

2.2.3 Hidrojen peroksit

Bazı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri H_2O_2 üretimleriyle ilişkilendirilmektedir. Bu madde laktik asit bakterileri gibi katalaz negatif mikroorganizmalar tarafından aerobik şartlarda üretilmektedir. Ksantin oksidaz, glukoz oksidaz, askorbik asit, sülfidril oksidaz, pirüvat oksidaz, NADH oksidaz

ve α -gliserofosfat oksidaz veya laktat oksidaz vasıtası ile katalizlenen reaksiyonda atmosferik oksijenin doğrudan indirgenmesi ile meydana gelmektedir. Bu maddenin üretimi 5 ve 7°C’de en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Özellikle birçok *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türü aerobik şartlar altında önemli miktarlarda H₂O₂ üretmektedir (Çon ve diğ, 2000).

H₂O₂ birçok mikroorganizmanın sporları ve vejetatif hücreleri üzerinde öldürücü etkiye sahip oksitleyici bir bileşiktir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas* spp. üzerinde engelleyici etkisi bulunmaktadır (Evren ve diğ, 2006). Ayrıca soğutma sıcaklığında psikotrop ve patojen mikroorganizmaları engelleyebilmektedir. Tek başına inhibitör madde olarak görev almaktadır. Çiğ sütlerde oluşan laktoperoksidaz sisteminde de etkinlik göstermektedir. Sütlerde hem bakteri hem de fungilere karşı etki göstermektedir. Sığır sütlerinde de doğal olarak oluşabilen inhibitör sistemidir. Bu maddenin ilavesi ile birçok gıdada istenmeyen mikroorganizma inhibe edilmektedir. Bu etki maddenin konsantrasyonu, işlem süresi, mikrobiyal yük, sıcaklık, pH, inorganik iyonlar, UV ve diğer koruyucularla mikroorganizmaların muamele edilmesi gibi birçok faktöre bağlıdır. Oda sıcaklığında zayıf bir oluşum göstermelerine rağmen yüksek sıcaklıklarda etkisi güçlü olmaktadır. İnhibitör etkisinin yanında fermente etlerde son ürünlerde acılaşmayı ve solmayı arttırdığı için duyusal özelliklerini etkilemektedir (Çon ve diğ, 2000; Reis ve diğ, 2012).

Oksijen metabolitlerinin bakteri öldürücü etkisi sadece bakteri hücrelerini oksitleme özelliğiyle ilişkilendirilmemektedir. Hücre proteinlerini ve nükleik asitlerin yapılarını bozmaları da etkisine katkıda bulunmaktadır. Yani sadece istenmeyen mikroorganizmaları öldürmez, diğer bileşenlerle de reaksiyona girerek engelleyici etkiye katkıda bulunmaktadır (Vuyst ve diğ, 1994).

2.2.4 Karbondioksit

Heterofermantatif laktik asit bakterileri şekerin fermentasyonu sonucunda ürettikleri laktik asit, asetik asit ve alkol gibi maddelerin yanında CO₂ de üretmektedirler (Çon ve diğ, 2000).

Laktik asit bakterileri aerobik solunum yapan bakterilerdir. Diğer mikroorganizmalara kıyaslandığında CO₂’ye dayanıklılıkları fazla bulunmuştur. Bu maddenin aeroblar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi birçok nedenle

ilişkilendirilmiştir. Bunlardan biri karbondioksitin dekarboksilz ve süksinat dehidrogenazın inhibasyonu olarak düşünülmektedir. Diğer ise dakarboksilasyon veya TCA siklusu enzimlerinin inhibasyonu olarak düşünülmektedir. Ette bozulmaya da sebep olan 5 tür bakterinin CO₂ varlığında solunum aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Fakültatif anaerobların gelişmesi ise bu maddeyle değişmemektedir. (Çon ve diğ, 2000).

2.2.5 Diasetil

Diasetil pruvattan laktik asit bakterisi tarafından sentezlenen son metabolik ürünüdür. Bu madde tereyağı için bilinen en iyi aroma maddesidir. Lezzet oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Evren ve diğ, 2006). pH 7,0 değerinden az ise diasetilin aktif, 7,0 değerinden çok ise diasetilin inaktif olduğu bilinmektedir (Çon ve diğ, 2000).

Özellikle *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin bazı türleri ve suşları tarafından oluşturulan tereyağı kokulu sıvı bir bileşiktir. Süt ürünlerine ilaveten kırmızı ve beyaz şarap, kavrulmuş kahve ve diğer bazı fermente gıdalarda da oluşabilmektedir (Çon ve diğ, 2000). Özellikle şarap yapımında malolaktik fermantasyon sırasında ortaya çıkmaktadır. Diasetilin birikmesi ise malolaktik fermantasyonuna göre değişmektedir. malolaktik fermantasyonu çok hızlı olduğunda diasetil üretimi düşük olmaktadır. Bakterilerin çoğalma hızı düşük olduğunda ise diasetil üretimi fazla olmaktadır. Bunun dışında diasetilin şaraptaki miktarı maya ve bakteri kalıntılarının diasetil redüktaz aktivitesi tarafından da etkilenebilmektedir. Genellikle miktarları 5-10 mg/L olmaktadır (Geredeli ve diğ, 2005).

200 mg/mL düzeyinde mayalar ve Gram pozitif bakteriler için, 300 mg/mL düzeyinde ise laktik olmayan Gram pozitif bakteriler için durdurucu etkisi bulunmaktadır (Evren ve diğ, 2006). Gram negatifler için etkisi lethal, pozitifler için ise gelişmeyi durdurucudur. Ancak antimikrobiyal özellik gösteren değerleri, katılan kültürün ürettiği değerlerden büyük olduğu için, tek başına koruyucu etkide önemli rol oynamamaktadır. Ancak diğer antimikrobiyal maddelerle düşünüldüğünde önemli olabileceği de bilinmektedir (Çon ve diğ, 2000).

2.2.6 Etanol

Etanol diğeri bir adıyla etil alkol gıdalarda yaygın olarak kullanılmakta ve uygun miktarda olduğı takdirde etkili bir antimikrobiyal madde olmaktadır. Çoğı patojene karşı gelişimi engelleyici etkisi bulunmaktadır. Bakteri sporlarına karşı ise etki gösterememektedir (Çon ve diğ, 2000).

Alkolün konsantrasyonu, uygulama süresi ve molekül ağırlığı mikroorganizmalar üzerindeki engelleyici etkisini değıştirebilmektedir. Birçok gıdada etkili olduğı konsantrasyon %70 olarak bilinmektedir. Uzun süreli dezenfeksiyon için ise uygun konsantrasyon %50 olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise bu etkiler azalmaktadır. Bakteri öldürücü etkisi ise bakterinin proteinlerini denatüre etmesiyle ilişkilendirilmektedir. Bunun dışında zardaki lipid yapıyı bozup zarın işlevliğinin kaybedilmesine neden olmaktadır. Organik asitler tarafından inaktive edilmesi nedeniyle gıda koruyucu maddesi olarak tavsiye edilmemektedir ancak antimikrobiyal maddelerin etkinliğini artırdığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada *S. aureus* bakterisine karşı su aktivitesi düşürülerek alkol kullanılmış ve etkinlik yüksek bulunmuştur (Çon ve diğ, 2000).

2.2.7 Reuterin

Reuterin düşük molekül ağırlığında ve yüksek çözünürlükte olan bir maddedir. Heteromentatif *Lactobacillus reuterii* türü tarafından üretilmektedir. Bakteri, maya ve küflere karşı yaygınca kullanılmaktadır. Özellikle *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* ve *Trypanosoma* cinsleri üzerinde durdurucu etkisi bulunmaktadır (Evren ve diğ, 2006; LEroy ve diğ, 2004).

Gliserol fermantasyonu ürünü olan bu madde DNA sentezini sağlayan ribonükleaz enzimini baskılamaktadır. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus collinoides* ve *Lactobacillus coryniformis* reuterin üretici bakterilerdir. Bazı durumlarda da laktik asit bakterisi kültürüne gliserol eklendiğinde fazla reuterin üreterek antifungal aktivite artmaktadır (Blagojev ve diğ, 2012).

2.3 EPS Genel Özellikleri

Ekzopolisakkaritler (EPS) bakteriyel hücre yüzeyinde kapsül şeklinde bulunan veya hücre dışına salgılanan hücre dışı polisakkaritlerdir (Ai ve diğ, 2016). Genel de hücre yapışmasında ve korumasında görev almaktadır. Yapılarındaki çeşitlilik ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle, EPS gıda endüstrisinde kıvamlaştırıcı, sabitleyici, jelleştirici, emülgatör ve su bağlayıcı madde olarak yaygınca kullanılmaktadır. EPS'lerin yeni uygulamaları ise biyoçökeltici, biyoemici madde, ağır metal yok edici gibi uygulamalar içermektedir. Son zamanlarda ise EPS'lerin çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktiviteler içerdiği belirlenmiştir (Surayot ve diğ, 2014).

Polisakkarit sentezlenmesi bakteri şuşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişmektedir. EPS oluşumunda UDP-glukoz-dehidrogenaz, glukozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi polisakkarit sentezine has olmayan birçok enzim görev almaktadır. Sentez hem hücre dışında hem de membranda olabilmektedir (Yılmaz ve diğ, 2007). Birçok bakteriyel suş bakteriyel yüzeye yapışabilen ve c-EPS diye isimlendirilen ekzopolisakkarit üretirken, birçoğu da çevreye salgılamaktadır ve bu da r-EPS olarak isimlendirilmektedir (Wang ve diğ, 2014). EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği benimsenmektedir (Yılmaz ve diğ, 2007).

EPS'ler genel olarak şekerlerin monosakkarik kalıntılarından veya şeker türevlerinden oluşmaktadır ve bitkiler, algler, fungi ve bakteriler tarafından üretilmektedir. (Dilna ve diğ, 2015). Laktik asit bakterileri genel olarak güvenli olarak kabul edildiği için (GRAS), laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin mükemmel bir ticari potansiyele bulunmaktadır (Maina ve diğ, 2008). EPS üreten birçok suşun r-EPS ürettiği belirlenirken, birçok laktik asit bakterisi suşunun ise hem c-EPS hem de r-EPS ürettiği belirlenmiştir (Wang ve diğ, 2014). Ekzopolisakkarit üretebilen laktik asit bakterileri Çizelge 2.10'da gösterilmektedir.

Çizelge 2.10 : Ekzopolisakkarit üretebilen laktik asit bakterileri (Milci ve diğ, 2005).

Laktik asit bakterileri			
<i>Lactobacillus</i> Cinsi	<i>Streptococcus</i> Cinsi	<i>Lactococcus</i> Cinsi	<i>Leuconostoc</i> Cinsi
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus subrinus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>ceremois</i>	<i>Lactococcus mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> spp.		spp.
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>thermophilus</i>		<i>mesenteroides</i>
spp. <i>lactis</i>			
<i>Lb. delbrueckii</i>			
spp. <i>bulgaricus</i>			

Laktik asit bakterilerinin ürettiği ekzopolisakkaritler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Homopolisakkaritler tek çeşit monosakkaritten oluşmakta ve fruktan ve glukana yapılarını içermektedir. Glukanlar dekstran, mutan ve b-D-glukandan, fruktanlar ise levan ve inülin benzeri yapılardan oluşmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* dekstran üreten en değerli laktik asit bakterisidir. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* ve *Streptococcus sangius* ise glukana sentezleyen laktik asit bakterilerindendir. Homopolisakkaritler yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerdir. D-glikoz, D-galaktoz ve L-ramnoz ve nadir olarak N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoronik asit içeren kısımların tekrarlanması sonucu açığa çıkan yapılar ise heteropolisakkaritlerdir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen polimerlerin çoğu bu özelliğindedir. Heteropolisakkaritler hücre içine sentezlenmekte daha sonra hücre dışına çıkarak hücrenin etrafını sarmaktadır. Bu işlemler için de birçok enzime gerek duyulmaktadır. *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* heteropolisakkarit üreten başlıca laktik asit bakterilerindendir. Suş dışında inkübasyon sıcaklığı ve

süresi de ekzopolisakkarit üretimini etkileyen en önemli etkenlerdendir. Optimum sıcaklığın belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu faktörler dışında pH da önemli bir etkidir. Her bakteri için optimum pH belirlenmesi gerekmektedir (Milci ve diğ, 2005; Yılmaz ve diğ, 2007). Stres koşulları altında hücreleri korumak maksadıyla EPS üretimi artmaktadır. Yapılan çalışmalarda stres faktörü olarak ortama NaCl eklenmiştir. İncelenen tüm suşlar 28 °C’de NaCl varlığında iyi gelişme göstermiştir. *Leu. mesenteroides* subps. *pseudomesenteroides* 406 suşunun %5 NaCl varlığında 28°C’de 24 saatlik inkübasyon sonrası, optimum koşullara göre daha fazla EPS ürettiği ancak biyokütle üretiminin en az seviyede olduğu belirtilmiştir. Fakat *Leu. citreum* 52 suşunun %1 NaCl konsantrasyonunda 1,68 g/L EPS ürettiği tespit edilmiştir. Bakteri çeşidi de önemli bir etkidir. Farklı bakterilerin türlerinin kombinasyonları da bazen EPS üretimini artırmakta etkili olmaktadır. Bunların dışında azot kaynağı, vitamin, oksijen seviyesi karbonhidrat kaynağı EPS üretimini etkileyen faktörlerdendir (Soyuçok ve diğ, 2016). Çizelge 2.11’de bazı bakteriler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, üretici cinsler ve bazı üretim koşulları belirtilmektedir.

Ekzopolisakkarit üretiminden sonra maddenin izolasyonu gerekmektedir. İzolasyon aşamaları ve kullanılan bazı metodlar şu şekildedir:

- Mineral giderme: Ultrafiltrasyon, Diyaliz
- Protein giderme: Enzimatik hidroliz, İyon değişimi kromatografisi
- Mono-disakkarit giderme: Diyaliz
- Kapsül EPS çıkarma: Ultrasonikasyon, Isı muamelesi, Kimyasal muamele
- EPS ekstraksiyon: Çöktürme
- EPS fraksiyonlarını hazırlama: Kurutma
- EPS miktarını ölçme: HPLC, NIR, Fotometrik (Mende ve diğ, 2016)
- Biyofilm olarak da isimlendirilen EPS’ler bakterilerin koloniler olarak büyümesine yardım etmektedir. Bu EPS’ler ya bakteri yüzeyine tutulu olarak kalırlar ya da yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda serbest olarak bulunurlar. Biyofilm özelliği gösteren EPS’ler bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler. Yine biyofilm bakteriyi yalnızca dış ortamdan koruyarak yaşayabilmesi için değil aynı

zamanda genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar hazırlamaktadır (Yılmaz ve diğ, 2007).

Çizelge 2.11 : Bakteriler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, üretici cinsler ve bazı üretim koşulları (Donot ve diğ, 2012).

Ekzopolisakkarit	Mikrobiyal suşlar	Substrat	EPS miktarı (g ^L ⁻¹)	Gelişme koşulları
Selüloz	<i>Acetobacter xylinum</i>	Fruktoz/ Glukoz	7-23,6	pH= 4-5 30°C 40 saat
Alginat	<i>Pseudomonas aerugina</i>	Ksiloz	0,4	30-37°C 1 bar 72 saat
Dekstran ve diğerleri	<i>Leuconostoc</i> spp.	Sakkaroz	8,17	pH= 5,5 35°C 1 bar
Kurdlan	<i>Agrobacterium</i>	Glukoz/ Sakkaroz	5,02-76	pH= 7,5 30°C 5gün
Cellan	<i>Shingomonas</i>	Nişasta	13,2-35,7	pH= 7-7,5 30-32°C
Hiyalüronik asit	<i>Streptococcus</i> spp.	Glukoz	5,0-10,0	pH= 7 37°C
Ksantan	<i>Xanthomonas campestris</i>	Melas	53	pH= 7 28°C 1 bar 24 saat
Levan	<i>Erwinia</i> spp.	Sakkaroz	15	pH= 5.6-5.8 37°C 1 bar 3 gün
Diğer EPS ler	<i>Geobacillus</i> spp.	Sakkaroz/ Maltoz	0,114	pH= 6,8-9,8 54-87 °C

Ayrıca fiziksel, kimyasal ve reolojik özellikleri nedeniyle tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri, atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Yılmaz ve diğ, 2007).

Günümüzde gıdaların özellikle süt ürünlerinin yapımında laktik asit bakterilerinden ve ürettikleri ekzopolisakkaritlerin fonksiyonel özelliklerinden yararlanılmaktadır. Birçok fermente süt yapımında kullanılan birçok laktik asit bakterisinin ekzopolisakkarit ürettiği bilinmektedir. Viskozite artırıcı, yapı düzenleyici, su bağlayıcı, stabilite ve emülsifiye edici gibi özellikleri nedeniyle süt ürünlerinin yapısını olumlu yönde değiştirmektedir. Özellikle yoğurt üretiminde yapının düzenlenmesi, viskozite ve su tutma kapasitesinin geliştirilmesi üzerinde etkisi bulunan heteropolisakkaritler kullanılmaktadır. Özellikle bu amaçla *Str. Salivarius* spp. *thermophilus* ve *Lb. Delbrueckii* spp. *bulgaricus* suşları yoğurt yapımında yapıyı düzeltmek, viskoziteyi artırmak ve serum ayrılmasını azaltmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda polisakkarit üreten suşların kullanılmasıyla yoğurtta viskozitenin arttığı belirlenmiştir. Düşük yağlı peynirlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek amacıyla da kullanılmaktadırlar. Ekzopolisakkaritler su tutma kapasitesinin yüksekliği nedeniyle yağ oranı az sert peynirlerde kusurları önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Milci ve diğ, 2005).

Ekzopolisakkaritler yoğurt ve peynirin yanı sıra kefir ve ekşi hamur gibi bazı fermente ürünlerinde de özelliklerini olumlu yönde etkilemektedirler. *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilen dekstran fırıncılık katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. EPS'nin hamura katılmasıyla gluten yumuşayarak yapı gelişmekte, raf ömrü uzamakta ve son üründe hacim artışı meydana gelmektedir. Ekmek kalitesi de bu sayede gelişmektedir. *Lactobacillus* cinslerinden üretiler polimerlerin hamurun su absorpsiyonu, hamur reolojisi ve işlenebilirliğini, ekmek hacmi ve ekmeğin bayatlamaması gibi hamurun ve ekmeğin teknolojik özelliklerini olumlu etkileyebileceği belirtilmektedir (Soyuçok ve diğ, 2016).

Başka çalışmalarda ise EPS içeren çözeltilerin farklı değerleri kullanılarak yağ oranı azaltılmış kek üretilmiştir. EPS miktarının sertlik, yapışkan ve esneklik

özelliğini etkilediği ve yağ ve EPS oranının artmasıyla beğenirlik değerinin arttığı gözlemlenmiştir (Soyuçok ve diğ, 2016).

Laktik asit bakterilerinin ürettikleri ekzopolisakkaritlerin insan sağlığı üzerinde de faydalı etkileri bulunmaktadır. Fermente süt ürünlerinin de insan sağlığına sağladığı yararlar laktik asit bakterilerinin hücre duvarlarında bulunan polisakkaritlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Günümüzde de kullanılmaya devam edilen birçok probiyotik bakteri ekzopolisakkarit üretebilmektedir. Ekzopolisakkarit eklenen gıdaların viskozitelerinin yüksek olması, bu gıdaların sindirim sisteminde kalış süresini uzatmaktadır. Böylece probiyotik bakterilerin kolonizasyonu gerçekleşmekte ve bağırsak florası düzenlenmektedir. *Lc. lactis* spp. *ceremoris* B40, *Lb. Sake* 0-1, *Str. Salivarius* spp. *thermophilus* Sfi 20 ve *Lb. Helveticus* 59 suşları tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin fekal kökenli mikroorganizmalar tarafından parçalanmadığı belirlenmiştir. Bu maddelerin, kolesterolü düşürdüğü, antitümör ve antiülser aktivitesine de sahip olduğu bilinmektedir. İlaç sanayisinde de kaplama materyali olarak pek çok fizyolojik aktivitelere katkıda bulunmaktadırlar. 40.000-70.000 Da gibi düşük mol ağırlıklı olanlar tıpta en çok kullanılanlardır. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstrankalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılmaktadır (Milci ve diğ, 2005; Yılmaz ve diğ, 2007).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri izolatları

Tez çalışmasında kullanılmış olan ve bozadan izole edilmiş 11 (on bir) çeşit laktik asit bakterisi Çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 : Tez çalışmasında kullanılan laktik asit bakterileri.

Kod	Laktik Asit Bakteri Türleri
A15	<i>Streptococcus macedonicus</i>
A47	<i>Lactococcus lactis</i>
D41	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F39	<i>Lactococcus lactis</i>
E32	<i>Lactococcus garvieae</i>
C19	<i>Weissella confusa</i>
E42	<i>Pediococcus parvulus</i>
B2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
25A	<i>Lactobacillus brevis</i>
E55	<i>Leuconostoc citreum</i>
C55	<i>Lactobacillus coryniformis</i>

3.1.2 Buğday suyu hazırlanması

Buğday suyu, buğday ve distile su 1:2 oranında olmak üzere hazırlanır. 500 gr buğday tanesi ve 1000 ml distile su karıştırılır ve 1 saat boyunca kaynatılır. Homojen bir sıvı elde etmek amacıyla süzülür. %1’lik şekerli buğday suyu hazırlamak için 90 ml buğday suyuna 0,9 g sakkaroz katılır. 121°C’de 15 dakika boyunca otoklavda steril edilir

3.1.3 Soya suyu hazırlanması

Soya suyu, soya ve distile su 1:2 oranında olmak üzere hazırlanır. 500 gr soya tanesi ve 1000 ml distile su karıştırılır ve 1 saat boyunca kaynatılır. Homojen bir sıvı elde etmek amacıyla süzülür. 121°C’de 15 dakika boyunca otoklavda steril edilir. %1’lik şekerli soya suyu hazırlamak için 90 ml soya suyuna 0,9 g sakkaroz katılır. 121°C’ de 15 dakika boyunca otoklavda steril edilir.

3.1.4 Besiyeri ve çözeltiler

Bu çalışmada MRS broth, MRS agar, Modifiye MRS ve peptonlu su gibi besiyerleri kullanılmıştır. Bu farklı besiyerleri farklı maddelerin farklı oranlarda distile suya eklenmesiyle hazırlanmaktadır. Çizelge 3.2’de MRS broth, MRS agar, Modifiye MRS ve peptonlu suyun içeriği ve miktarları gösterilmektedir.

3.2 Metot

3.2.1 Bakteri suşlarının numunelere ekimi

Buğday suyu ve M-MRS’ye 10^6 - 10^8 düzeyinde tüm suşlarından alev eşliğinde ekim yapılır. Her suştan paralel ekim yapılır. 30°C’de 24 saat günlük inkübatörde (Genlab Inc., 160/CLAD/F/D) inkübasyona bırakılır.

3.2.2 Numunelerin pH ölçümü

pH metrede (Genlab Inc., 160/CLAD/F/D) buğday suyu ve soya suyu numunelerinin pH ölçümü yapılmış ve kaydedilmiştir.

3.2.3 Ekzopolisakkarit eldesi ve oluşan ekzopolisakkarit (toplam karbonhidrat) tayini

24 saatlik inkübasyondan sonra; numuneler santrifüjlenir (Eppendorf Centrifuge, 5804 R, Germany). Elde edilen EPS’deki toplam karbonhidrat miktarının tayini fenol sülfürik asit yöntemi (T80 UV-Vis Spektrofotometre, PG Instrument Ltd. UK) kullanılarak yapılmıştır. EPS 4 ml fosfat tamponu içinde homojenize edilmiş, üzerine 5 ml %5’lik fenol 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda tüplere 5 ml derişik sülfürik asit eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Meydana gelen renk değişimi spektrofotometre cihazında 487 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Çizelge 3.2 : MRS broth, MRS agar, Modifiye MRS ve peptonlu suyun içeriği ve miktarları.

Bileşen	Modifiye-MRS (gr)	MRS agar (gr)	MRS broth (gr)	Peptonlu su (gr)
Kazeinden elde edilen pepton	5	-	-	-
Et ekstraktı	4	-	-	-
Maya ekstraktı	2	-	-	-
Sükroz	50	-	-	-
K ₂ HPO ₄	1	-	-	-
Tween 80	0.5	-	-	-
Di-amonyum hidrojen sitrat	1	-	-	-
Na-asetat	2.5	-	-	-
MgSO ₄	0.1	-	-	-
MnSO ₄	0.02	-	-	-
MRS agar granülü	-	68.2	-	-
MRS broth granülü	-	-	52.2	-
Etten elde edilen pepton	-	-	-	1
NaCl	-	-	-	8.5
Distile su	500 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

3.2.4 Differansiyel tarama kalorimetre (DSC) analizi

Termal yöntemler, sıcaklık ile bir sistemin kütle, reaksiyon hızı veya hacim gibi bazı özellikleri arasındaki dinamik ilişkinin incelenmesine dayanır (Beşergil, 2002).

Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) en yaygın kullanılan termal yöntemlerden biridir. Diferansiyel termal yöntemler doğal veya yapay

maddelerin bileşimlerinin tayininde kullanılır. Ekzopolisakkarit gibi polimerik maddelerin tanımlanmasında çok geniş bir uygulama alanı bulunur. Bir polimerin ısıtılması süresince karşılaştığı çeşitli değişiklikler (geçişler) bir termogramla izlenebilir (Beşergil, 2002).

Karışımlarda DSC termogramındaki her pik karışımda bulunan bir maddenin erime noktasını gösterir. Eğer iki pik varsa bunlardan düşük sıcaklıkta olanı kristalin geçişi, yüksek sıcaklıktaki ise erime noktasını gösterir. Diferansiyel tarama kalorimetrede örnek ve referansın sıcaklıkları yine düzenli bir hızla artırılır, ancak her ikisinin sıcaklığının aynı olması için örnek veya referansa dışardan gereken miktarda ısı ilavesi yapılır. İlave edilen ısı (kaydedilir) örnekte oluşan endotermik veya ekzotermik reaksiyonlar sonucu kaybedilen veya kazanılan ısıyı karşılar. DSC’de ısıtıcılar örnek ve referans kaplarının çok yakınına yerleştirilmiştir. Termokuplar bir sıcaklık farkı algıladığında, örnek ve referansdan soğuk olanın sıcaklığı diğeri ile aynı seviyeye gelecek miktarda ısı verilir. Isıtma hızı örnek sıcaklığının fonksiyonu olarak kaydedilir (Beşergil, 2002)

Bu çalışmada 10-20 mg numune pan denilen bir metaryele tartılır ve tartımdan sonra kapakla sıkıştırılarak analize uygun hale getirilir. Sıcaklık değişkeni 10°C /min olacak şekilde nitrojen gazı atmosferinde 0°C’den 200°C’ye kadar sıcaklık uygulanır. Örnek ve referansın sıcaklıkları düzenli bir hızla artırılır, ancak her ikisinin sıcaklığının aynı olması için örnek veya referansa dışardan gereken miktarda ısı ilavesi yapılır. İlave edilen ısı (kaydedilir), örnekte oluşan endotermik veya ekzotermik reaksiyonlar sonucu kaybedilen veya kazanılan ısıyı karşılar. Diferansiyel scanning kalorimetrede ısıtıcılar örnek ve referans kaplarının çok yakınına yerleştirilmiştir. Sıcaklığa bağlı olarak DSC eğrisi elde edilir.

3.2.5 Fiziksel ve kimyasal analizler

Bu analizler buğday ve soya suyunun bileşenlerini ve bazı aşamalardan önce ve sonra pH değerini belirlemek amacıyla yapılan analizleri içermektedir.

3.2.5.1 Protein tayini

Protein tayini için Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem yakma ve destilasyon olmak üzere başlıca iki kademedir meydana gelmektedir: örneğin yakılması ve destilasyon. Kjeldahl balonun yerleştirilen örnek derişik sülfürik asit ve katalizör ilavesiyle ısıtılır. Tüm organik madde yanana dek yakma işlemine devam edilir. Kjeldahl balonunun içindekilere konsantre sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildiğinde amonyum gaz halindeki amonyağa dönüşür ve bir asit içine destile edilir. Oluşan amonyak bilinen miktarda ayarlı H_2SO_4 çözeltisi ve metil kırmızısı indikatörü karışımı içinde veya metilen mavisi metil kırmızısı indikatörü içeren %2-4'lük borik asit içinde tutulur. Eğer amonyak borik asit içinde tutulduysa direkt titrasyon yapılır. Oluşan amonyak borik aist içinde borat halinde tutulur ve ayarlı HCl asit çözeltisiyle titre edilir.

Örneğin yakılması için 0,5 gr toz halindeki örnek yakma tüpünde tartılır, katalizör ve 25 ml H_2SO_4 ilave edilir. Yakma işlemi renk açık yeşile döndükten sonra 30 dakika daha sürdürülür. Balon soğumaya bırakılır. Destilasyon işlemi için 250 ml'lik erlenmeyere 25 ml %4'lük borik asit çözeltisi ve 2 damla indikatör çözeltisi konulur. Yoğunlaştırıcının ucu bu erlenmeyerin içine batırılır. Yakma tüpüne 50 ml su ilave edilir. Tüp destilasyon ünitesindeki yerine oturtulur ve 130 ml NaOH çözeltisi akıtılır. Isıtmaya başlanır ve yaklaşık 150 ml destilat toplanana dek devam edilir.

3.2.5.2 Kül tayini

3-5 g örnek kül krozerine tartılır. 425°C sıcaklığındaki kül fırınına yerleştirilerek fırın kapağı açık tutulur ve 45 dakika beklenir. Sıcaklık 485°C'ye çıkarılır ve kapak yarım kapatılır. 45 dakika sonra sıcak 550°C'ye çıkarılır ve kapak tam kapatılır. Yakma işlemi açık gri kül elde edilene kadar sürdürülür. Krozeler maşa yardımıyla desikatöre alınır ve oda sıcaklığına gelince tartılır.

3.2.5.3 Nem tayini

1-2 g örnek önceden etüvde sabit tartıma getirilmiş, desikatörde soğutulmuş ve tartılmış metal kaba tartılır. 135°C'deki etüvde kapağı yarı açık vaziyette 2 saat kurutulur. Sürenin sonunda kapak kapatılarak desikatöre alınır ve oda sıcaklığına gelince tartımı yapılır.

3.2.5.4 Yağ tayini

Örnek sıvı olduğu için analizden önce etüvde belirli bir neme ulaşınca kadar kurutulur. 2-5 g tartılan örnek filtre kağıdı üzerinde tartılır ve katlanarak zarf haline getirilir. Bu zarf ikinci filtre kağıdının içine yerleştirilir ve zarfın bir ucu katlanır. Açık kalan diğer ucun üzerine bir pamuk parçası konularak, yukarıda kalacak şekilde ekstraksiyon haznesine yerleştirilir. Ekstraksiyon balonuna haznenin hacmi kadar petro eteri ilave edilir ve aparak birleştirilir. Su banyosu üzerinde yoğunlaşma hızı dakikada 150 damla olacak şekilde ısıtma yapılır. Buharlaşma ile yoğunlaşan çözgen kaybı nedeniyle zaman zaman ekstraksiyon haznesine çözgen ilave edilir. Ekstraksiyon yaklaşık 5 saat sürdürülür. Su banyosu kapatılır, soğuduktan sonra ekstraksiyon balonu uzaklaştırılır ve çözgen buharlaştırıcıda kuruluğa dek uçurulur. Yine de kalıntı miktarda eter kalabileceği için bir süre su banyosunda veya su buharında koku kesilene dek tutulur. Oda sıcaklığına geldikten sonra erlenin dışı kurulanır ve tartım yapılır.

3.2.6 İstatistik analizi

EPS üreten suşlar arasındaki farklılık ve üretilen ortam arasındaki farklılık Minitab17 uygulamasında tek yollu varyans analizi ve TUKEY testi sonucu gruplandırma yapılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kimyasal ve Fiziksel Analiz Sonuçları

Soya ve buğday suyu örneklerinin protein, nem, yağ ve kül analiz sonuçlarında belirlenen kuru madde miktarları Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 : Soya ve buğday suyu örneklerinin kuru madde miktarları.

Örnek	Kül (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Karbonhidrat (%)
Buğday suyu	0,19	0,7	0,7	4,4
Soya suyu	0,7	5	3,4	2,5

Çizelge 4.2’de buğday ve soya suyunun inkübasyondan önce şekersiz ölçülen pH değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 : Buğday ve soya suyunun pH değerleri.

Örnek	Ph
Buğday suyu	6,47
Soya suyu	6,56

Bu sonuçlara göre soya suyunun protein ve yağ oranı buğday suyuna göre yüksek olarak belirlenmiştir. Soya kendi bünyesinde %38-40 gibi yüksek oranda protein depolamaktadır. %18 oranında da yağ bulunmaktadır. Buğday ise %10-14 değerlerinde protein oranına sahiptir. %2-3 arasında ise yağ oranına sahiptir. Soya tane olarak daha fazla protein ve yağ miktarına sahip olduğu bilinmektedir. Bu sonuçlar da bunu desteklemektedir. Soya ve buğday gelişim için yüksek pH değerinde toprak istemektedir. Ancak su ile seyreltilmesi nedeniyle pH düşüklüğü beklenen bir sonuçtur (Anaç ve diğ, 2003; Sancar, 2012).

4.2 Mikrobiyal Analiz Sonuçları

Bakterilerin sayımı için yapılan yayma plak yöntemi sonucu belirlenen miktarlar Çizelge 4.3'te gösterilemektedir.

Çizelge 4.3 : Bakteri sayımı sonuçları.

Kod	Miktar (cfu/ml)
A15	$112 * 10^8$
A47	$100 * 10^8$
D41	$80 * 10^8$
F39	$100 * 10^8$
E32	$60 * 10^8$
C19	$80 * 10^8$
E42	$10 * 10^7$
B2	$10 * 10^8$
25A	$36 * 10^7$
E55	$9 * 10^7$
C55	$2 * 10^8$

Miktar olarak en fazla bulunan suş A15 yani *Streptococcus macedonicus*, en az bulunan suş ise C55 yani *Lactobacillus coryniformis* olarak belirlenmiştir.

Bakteri suşlarının ekimi şekerin etkisini ölçmek amaçlı şekerli soya ve şekersiz soyaya yapılmıştır. Ancak ürün etkisini ölçmek amaçlı aynı zamanda şekerli buğdaya ekim yapılmıştır. Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6 sırasıyla şekerli soya, şekersiz soya ve şekerli buğday örneklerinde laktik asit bakterilerinin oluşturduğu EPS miktarları ve pH değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.4 : Şekerli soyada üretilen EPS miktarı ve pH değeri.

Şekerli Soya	pH	EPS (g/l)	Ortalama (g/l)
A15	4,23	0,5	0,51
		0,52	
A47	4,31	0,64	0,66
		0,68	
D41	3,87	0,77	0,71
		0,65	
F39	3,91	0,76	0,75
		0,74	
E32	4,01	0,68	0,67
		0,66	
C19	5,52	1,19	1,21
		1,23	
E42	3,91	0,78	0,70
		0,62	
B2	4,79	0,73	0,695
		0,66	
25A	4,60	0,60	0,66
		0,72	
E55	4,50	0,73	0,705
		0,68	
C55	4,06	0,52	0,565
		0,61	

Çizelge 4.5 : Şekersiz soyada üretilen EPS miktarı ve pH değeri.

Şekersiz Soya	pH	EPS (g/l)	Ortalama (g/l)
A15	4,06	0,48	0,49
		0,50	
A47	4,12	0,54	0,535
		0,53	
D41	4,04	0,51	0,50
		0,49	
F39	4,09	0,50	0,52
		0,54	
E32	4,12	0,52	0,515
		0,51	
C19	5,74	1,32	1,215
		1,11	
E42	4,04	0,42	0,50
		0,48	
B2	4,76	0,52	0,525
		0,53	
25A	5,71	0,59	0,64
		0,69	
E55	4,75	0,51	0,505
		0,50	
C55	4,17	0,39	0,42
		0,45	

Çizelge 4.6 : Şekerli buğdayda üretilen EPS miktarı ve pH değeri.

Şekerli Buğday	pH	EPS	Ortalama
A15	3,29	0,52	0,505
		0,49	
A47	3,20	0,44	0,44
		0,44	
D41	3,22	0,45	0,45
		0,45	
F39	3,33	0,43	0,44
		0,45	
E32	3,40	0,50	0,46
		0,42	
C19	5,66	0,45	0,455
		0,46	
E42	3,30	0,45	0,465
		0,48	
B2	3,56	0,49	0,47
		0,45	
25A	3,40	0,47	0,46
		0,45	
E55	3,61	0,48	0,47
		0,46	
C55	3,43	0,47	0,465
		0,46	

Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6’da görünen değerlere göre pH farklılık göstermesine rağmen her üründe azalma göstermiştir. Bu da laktik asit bakterilerinin fermantasyon süresince asit üreterek pH’ın düşmesine neden olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Yapılan bir araştırmada yulaf bazlı %2.2 protein, %1.6 yağ ve %8.8 şeker içeren bir besiyerinde *Lactobacillus brevis*’in fermantasyon sonunda pH’ı 7.2’den 4.0’a düşürdüğü belirlenmiştir (Martensson ve diğ, 2003). Şeker kullandıkça fermantasyon sonundaki pH laktik aside bağlı olarak düştüğü için şekerli soyada son pH değerinin

4.6 olması bu çalışmayla benzerlik göstermektedir. Ayıca buğdayda tahıl olması açısından yulafla benzerlik göstermektedir. Burdaki düşüş de 3.40 olmaktadır. Bu değerde beklenen bir değer olarak düşünülmektedir. Bunun dışında soyanın buğdaya göre genel olarak daha fazla EPS üretimine elverişli olduğu görülmektedir. Bunu nedeni daha yağlı bir yapıya sahip olması veya diğer besinler değerlerindeki farklılıklar olarak düşünülebilmektedir. Şekerin etkisi de net bir şekilde görülmektedir. Şekerli soyada EPS üretimi bakteri şekeri kullandığı için şekersiz soyaya göre fazla olmaktadır. Çizelge 4.7’de cins ve türlere göre EPS üretim miktarları listelenmektedir.

Soya ürünlerinden en fazla üretim *Weisella confusa* bakterisi tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak buğdayda en fazla EPS üretimi ise *Streptococcus macedonicus* tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi her mikroorganizmanın kendine özgü gelişme faktörlerinin olması ve ürün farklılıkları olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada taylanda özgü bir gıdadan izole edilen *Weisella confusa* suşunun şeker pekmezi ve beyaz şeker kullanıldığında konsantrasyonlara göre oluşan EPS miktarları araştırılmıştır. En uygun sıcaklık ve pH belirlenmiş ve en yüksek EPS üretiminin ilk pH 7,0, sıcaklık ise 30°C olduğunda ve şeker konsantrasyonu da %5 olduğunda gerçekleşmiştir. Şekerle birlikte EPS üretiminin de arttığı görülmüş ancak şeker konsantrasyonunun 55-60 g/l olduğu zaman önemli bir düşüş olduğu farkedilmiştir (Tayuan ve diğ, 2011). Şekerli ve şekersiz soyada üretilen EPS miktarları karşılaştırıldığında ise değerlerin birbirine yakın olduğu sadece *Weisella confusa* suşunda görülmektedir. Bunun nedeni karşılaştırılan çalışmaya göre şeker miktarı olarak düşünebilmektedir. %2 Sakkaroz içeren MRS besiyerinde geliştirilen Hindistan’a özgü fermente bir gıdadan izole edilen *Weisella confusa* KR780676 suşunun 30 °C’de 48 saat inkübasyon sonucunda 17,2 g/l EPS ürettiği belirlenmiştir (Kavitate ve diğ, 2016).

Lactobacillus plantarum (laboratuvardan alınmış) BC-25 suşunun kullanıldığı bir çalışmada MRS’de 36°C’de 18 saat inkübasyon sonucu elde edilen saf EPS miktarı 0,30480 g/l olarak bulunmuştur (Zhou ve diğ, 2016). Soya ve buğdayda yapmış olduğumuz çalışmada ise genel olarak EPS miktarları daha fazla bulunmuştur. Bunun nedeni ise besinsel içerik farklılığıdır. Yağ, şeker ve protein miktarının EPS üretim miktarını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir.

Çizelge 4.7 : Tür ve cinslere göre elde edilen EPS miktarları.

Cins	Tür	Şekerli buğday (g/l)	Şekerli soya (g/l)	Şekersiz soya (g/l)
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus macedonicus</i>	0,505	0,51	0,49
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	0,44	0,66	0,535
	<i>Lactococcus lactis</i>	0,44	0,75	0,52
	<i>Lactococcus gravieae</i>	0,46	0,67	0,515
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,45	0,71	0,50
	<i>Latcobacillus plantarum</i>	0,47	0,695	0,525
	<i>Latcobacillus brevis</i>	0,46	0,66	0,64
	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	0,465	0,565	0,42
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	0,47	0,705	0,505
<i>Weissella</i>	<i>Weissella confusa</i>	0,455	1,21	1,215
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>	0,465	0,70	0,50

Laktoz(40g/l), maya ekstrakt (40g/l), amonyum sülfat (5.5g/l), magnezyum sülfat (0.1g/l), manganez sülfat (0.05g/l) ve tween 80 (%1) içeren besiyerinde *Lactobacillus plantarum* RJF4 (çürük taylanda özgü meyveden izole edilmiş) tarafından 37 °C’de 72 saat inkübasyon sonucunda üretilen EPS miktarı ise 3.5 g/l olarak bulunmuştur (Dilna ve diğ, 2015). Besinsel içerik, sıcaklık ve inkübasyon süresi farklılıkta etken olmuştur.

Elma suyundan izole edilen *Pediococcus parvulus* 2.6. ayrı ayrı 20g/l glikoz, fruktoz ve maltoz içeren 3 SMD sıvı besiyerinde 28 °C’de 2 gün sonunda sırayla 8,2 mg/l, 3mg/l ve 5,22mg/l EPS ürettiği belirlenmiştir (Velasco ve diğ, 2007). İspanya’da yapılan bir çalışmada elma suyunda izole edilen *Pediococcus parvulus* 2.6’nın MRS besiyerinde 30 °C’de 5 gün gelişimi sonucunda oluşan EPS üretim miktarının şeker arttıkça arttığı belirlenmiştir (Velasco ve diğ, 2006). Bu çalışmamızda da şekerli ve şekersiz soyada EPS üretim miktarı arasında fark açıkça görülmektedir

Belçika’da yapılan bir çalışmada süt ürünlerinden ve tahıl ürünlerinden 174 laktik asit bakterisi izole edilmiş ve EPS üretim verimleri incelenmiştir. *Lactococcus lactis* ve *Leuconostoc citreum* 50g/l şeker ilave edilen sütte gelişim göstermiştir. 37 °C’de 12 saat sonunda *Lactococcus lactis* diğerinden farklı olarak kapsüle benzer polisakkarit üretmiştir. *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc citreum*’a göre neredeyse 10 kat daha az EPS üretmiştir (Meulen ve diğ, 2007).

Çine özgü fermente turşudan izole edilen *Leuconostoc citreum* SK24.002 100 g sükroz, 10 g maya ekstraktı, 1 ml Tween 80, 20 g/l K₂HPO₄, 0,02 g/l CaCl₂, 0,2/l g MgSO₄.7H₂O, 0,01/l g NaCl, 0,01/l g MnSO₄.H₂O, 0,01/l g Fe SO₄.7H₂O (pH 6,9) içeren besiyerinde 37°C’de 12 saat inkübasyon sonunda 41,6 g/l EPS ürettiği belirlenmiştir (Miao ve diğ, 2015). Besinsel ortamın yanı sıra sıcaklığın artırılması bakteri için stres ortamı yaratmış olabilmekte ve buna bağlı olarak EPS üretim miktarı artmış olabilmektedir.

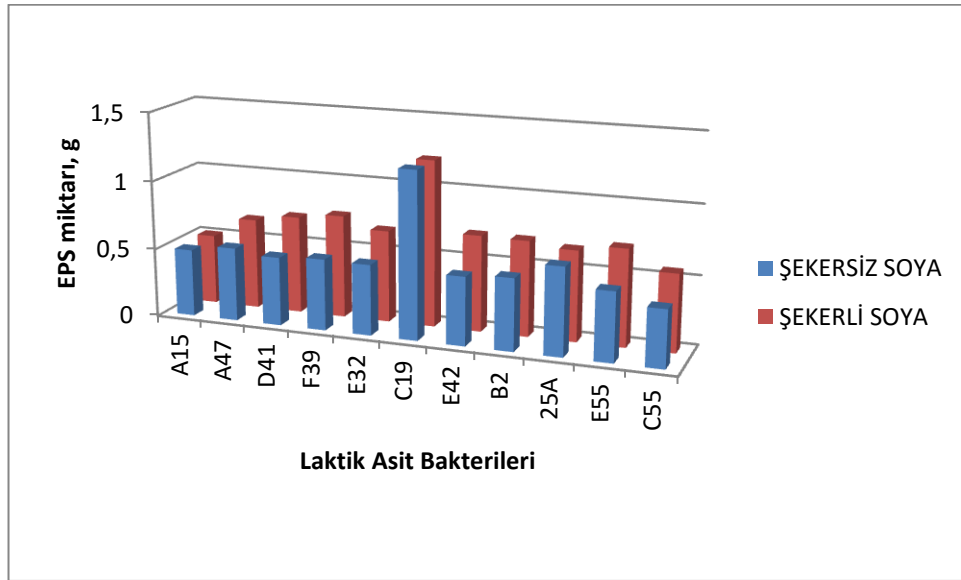
Başka bir çalışmada Nijerya’ya özgü gıdalardan izole edilen 191 suşun %5 yağsız süt, %0,35 maya ekstraktı, %0,35 pepton ve %5 glükoz içeren medyaya ekilerek 24 saat boyunca at 30°C’ de EPS üretim miktarları incelenmiştir. Waradan izole edilen *Lactococcus gravieae* en zayıf üretim aktivitesi gösteren suşlardan olmuştur. *Lactococcus gravieae* OGWI 1,5 mg/l üretirken *Lactococcus gravieae* OGFNI hiçbir üretim aktivitesi göstermemiştir. Yoğurttan izole edilen *Lactobacillus brevis* LBY2’nin 0,08g/l EPS ürettiği belirlenmiştir (Adebayo-tayo ve diğ, 2008). 1,5 mg/l bizim çalışmamızda üretilen EPS miktarlarından çok düşüktür. Burda da bileşenlerden yağın ve üretim koşullarının etkisi mevcuttur diyebiliriz.

12 saat boyunca süt besiyerinde (10% yağsız milk, 1% peptone, 5% yeast extract) at 42°C’de inkübasyon sonucunda Yunanistan’a özgü peynirden elde edilen 33 adet *Streptococcus macedonicus* suşundan hiçbirisi EPS üretememiştir (Georgalaki ve diğ,

2000). Ancak literatürde EPS ürettiği bilinmektedir. Burdaki etken ise ortam koşulları olarak düşünülebilmektedir.

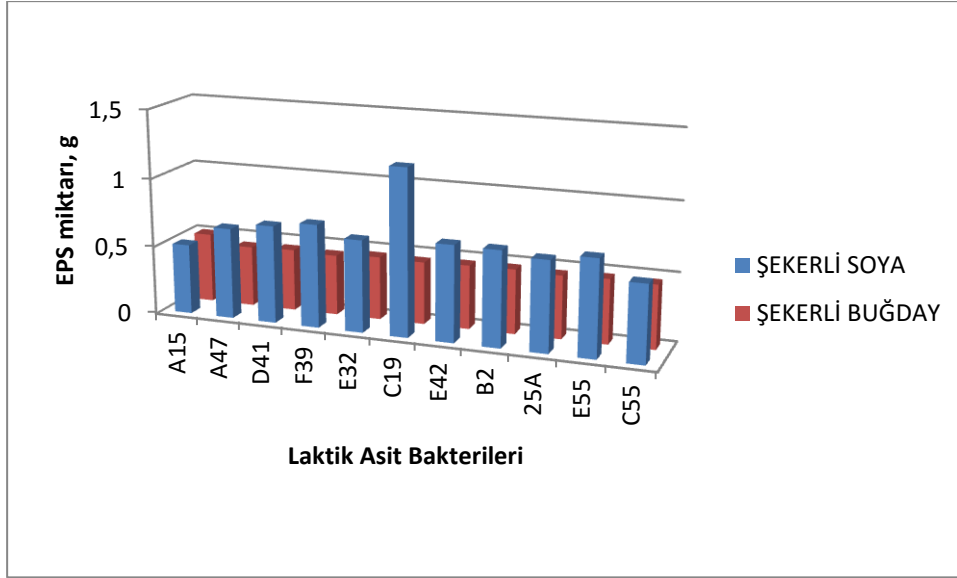
4.3 İstatistik Analiz Sonuçları

Şekil 4.1’de şekerli soya ve şekersiz soyaya ekim yapılan laktik asit bakterilerin ürettiği EPS miktarlarının farkı görülmektedir. Yapılan tek yollu varyans analizleri sonucunda, $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde şekerli soya ve şekersiz soyaya ekim yapılan laktik asit bakterilerin ürettiği EPS miktarlarının arasında önemli bir farkın olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1 : Şekerli soya ve şekersiz soyada laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS miktarları.

Şekil 4.2’de şekerli soya ve şekerli buğdayda ekim yapılan laktik asit bakterilerin ürettiği EPS miktarlarının farkı görülmektedir. Yapılan tek yollu varyans analizleri sonucunda, $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde şekerli soya ve şekerli buğdayda ekim yapılan laktik asit bakterilerin ürettiği EPS miktarlarının arasında önemli bir farkın olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2 : Şekerli soya ve şekerli buğdayda laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS miktarları.

Şekerli soyaya ekilen laktik asit bakterilerinin inkübasyon sonunda ürettiği EPS'ler karşılaştırıldığında, *Weissella confusa* en fazla EPS üreten ve *Streptococcus macedonicus* ise en az EPS üreten laktik asit bakterisidir. TUKEY testi sonucunda, *Weissella confusa*, *Lactococcus lactis* ve *Streptococcus macedonicus* için üretilen EPS miktarı $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Diğer 8 suş incelendiğinde ise istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. Çizelge 4.8'de şekerli soyada üretilen EPS miktarları için TUKEY testi sonucu gösterilmektedir.

Şekersiz soyaya ekilen laktik asit bakterilerinin inkübasyon sonunda ürettiği EPS'ler karşılaştırıldığında, *Weissella confusa* en fazla EPS üreten, *Lactobacillus coryniformis* ise en az EPS üretendir. TUKEY testi sonucunda, *Weissella confusa*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus coryniformis* için üretilen EPS miktarı $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Diğer 8 suş incelendiğinde ise istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. Çizelge 4.9'da şekersiz soyada üretilen EPS miktarları için TUKEY testi sonucu gösterilmektedir.

Şekerli buğdaya ekilen laktik asit bakterilerinin inkübasyon sonunda ürettiği EPS'ler karşılaştırıldığında, *Streptococcus macedonicus* en fazla EPS üreten, *Lactobacillus lactis* ise en az EPS üretendir. Tüm bakterilerin ürettiği EPS miktarı $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Soya ile

karşılaştırıldığında bu farkın sebebi soya ve buğdayın bileşen farkı olarak düşünülmüştür. Çizelge 4.10'da şekerli buğdayda üretilen EPS miktarları için TUKEY testi sonucu gösterilmektedir.

Çizelge 4.8 : Şekerli soya için TUKEY testi sonucu.

Bakteri	Ortalama	Gruplama
C19	1,210	A
F39	0,750	B
D41	0,710	BC
E55	0,705	BC
E42	0,700	BC
B2	0,695	BC
E32	0,670	BC
25A	0,660	BC
A47	0,660	BC
C55	0,565	BC
A15	0,510	C

Çizelge 4.9 : Şekersiz soya için TUKEY testi sonucu.

Bakteri	Ortalama	Gruplama
C19	1,215	A
25A	0,640	B
A47	0,535	BC
B2	0,525	BC
F39	0,520	BC
E32	0,515	BC
E55	0,505	BC
D41	0,500	BC
A15	0,490	BC
E42	0,450	BC
C55	0,420	C

Çizelge 4.10 : Şekerli buğday için TUKEY testi sonucu.

Bakteri	Ortalama	Gruplama
A15	0,505	A
B2	0,470	A
E55	0,470	A
C55	0,465	A
E42	0,465	A
25A	0,460	A
E32	0,460	A
C19	0,455	A
D41	0,450	A
A47	0,440	A
F39	0,440	A

4.3 DSC Analizi Sonuçları

DSC analizi sonuçları termogram şeklinde EK A, EK B, EK C, EK D, EK E, EK F, EK G, EK H, EK I, EK J VE EK K 'de gösterilmektedir.

Bazı termogramlarda iki tane endotermik pik görülmektedir. Bu sıcaklık kristalin geçişini ifade etmektedir. Bu sıcaklıkta ise madde viskoz hale geçmektedir. İkinci endotermik pik ise erime noktasını göstermektedir. Bu sıcaklık bozulma sıcaklığı olarak ele alınmaktadır. Hiçbir termogramda ekzotermik pik görülmemektedir. Bu da hiçbir EPS'nin kristalleşmediğini ifade etmektedir. Erime noktasından sonrası endotermik pik ise oksidasyonu ifade etmektedir. Literatürde bulunan sonuçlar saflaştırılmış EPS'lerin sonuçları olduğu için termogramlar bu çalışmada daha fazla görülmektedir. Bu çalışmada safsızlık nedeniyle birbirini takip eden birden fazla erime noktaları tespit edilmiştir.

Şekil A.1, Şekil A.2 ve Şekil A.3 25A'nın sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS 25A tarafından şekerli soyada üretilen olmuştur.

B2 ve D41 bozadan farklı kişiler tarafından izole edilen aynı türe ait suşlardır. Şekil B.1, Şekil B.2 ve Şekil B.3 B2'nin sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Şekil K.1, Şekil K.2 ve Şekil K.3 D41'in sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS, B2 için şekerli soyada üretilen olurken, D41 için de şekerli soyada üretilen olmuştur.

Şekil C.1, Şekil C.2 ve Şekil C.3 E32'nin sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS E32 için şekerli buğdayda üretilen olmuştur.

Şekil D.1, Şekil D.2 ve Şekil D.3 E42'nin sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS E42 için şekerli buğdayda üretilen olmuştur.

Şekil E.1, Şekil E.2 ve Şekil E.3 E55'in sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS E55 için şekerli soyada üretilen olmuştur.

Şekil F.1, Şekil F.2 ve Şekil F.3 A15'in sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS A15 tarafından şekersiz soyada üretilen olmuştur.

A47 ve F39 bozadan farklı kişiler tarafından izole edilen aynı türe ait suşlardır. Şekil G.1, Şekil G.2 ve Şekil G.3 A47'nin sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Şekil J.1, Şekil J.2 ve Şekil J.3 F39'un sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS A47 için şekerli soyada üretilen, F39 için şekersiz soyada üretilen olmuştur.

Şekil H.1, Şekil H.2 ve Şekil H.3 C19'un sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS C19 tarafından şekersiz soyada üretilen olmuştur.

Şekil I.1, Şekil I.2 ve Şekil I.3 C55'in sırayla buğdayda, şekerli soyada ve şekersiz soyada üretilen EPS'nin termogramını göstermektedir. Sonuçlara göre en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS C55 için şekersiz soyada üretilen olmuştur.

Çizelge 4.11'de en iyi termal stabiliteye sahip EPS'lerin üretim ortamları ve erime sıcaklıkları gösterilmektedir. Her suş için en iyi termal stabiliteye sahip EPS'ler karşılaştırıldığında ise en iyi termal stabiliteye sahip olan EPS C55'in şekersiz soyada ürettiği EPS'dir. Her suş için en fazla stabiliteye sahip olan 11 EPS'nin 5'i şekerli soyada üretilen EPS, 4'ü şekersiz soyada üretilen EPS, kalan diğer 2'si ise şekerli buğdayda üretilen EPS'dir.

Çizelge 4.12'de en az termal stabiliteye sahip EPS'lerin üretim ortamları ve erime sıcaklıkları gösterilmektedir. Her suş için en az termal stabiliteye sahip EPS'ler karşılaştırıldığında ise en az termal stabiliteye sahip olan EPS C55'in şekerli soyada ürettiği EPS'dir. Her suş için en az stabiliteye sahip olan 11 EPS'nin 5'i şekerli soyada üretilen EPS, 4'ü şekersiz soyada üretilen EPS, kalan diğer 2'si ise şekerli buğdayda üretilen EPS'dir.

Çizelge 4.13'de literatürde çalışılan EPS'lerin DSC'de belirlenen bozulma sıcaklıkları gösterilememektedir. Literatürde bu çalışmada çalışılan bakterilerden sadece *W. confusa* ve *Lb. plantarum* türlerine rastlenmiştir ve bozulma sıcaklıkları farklı bulunmuştur. Bunun nedeni çalışılan ortamın farklılığı, izole edilen ortamın farklılığı, EPS üretim koşulları ve safsızlık olarak düşünülmektedir.

Çizelge 4.11 : En iyi termal stabiliteye sahip EPS'lerin üretim ortamları ve erime sıcaklıkları.

EPS	Bozulma Sıcaklığı (°C)
B2-Şekerli soya	165,94
D41-Şekerli soya	117,44
C19-Şekersiz soya	134,36
25A-Şekerli soya	116,15
A15-Şekersiz soya	198,06
A47-Şekerli soya	187,98
F39-Şekersiz soya	161,38
C55-Şekersiz soya	198,37
E32-Şekerli buğday	140,9
E42-Şekerli buğday	192,12
E55-Şekerli soya	187,12

Çizelge 4.12 : En az termal stabiliteye sahip EPS'lerin üretim ortamları ve erime sıcaklıkları.

EPS	Bozulma sıcaklığı (°C)
B2-Şekersiz soya	111,51
D41-Şekersiz soya	110,77
C19-Şekerli soya	106,72
25A-Şekersiz soya	98,06
A15-Şekerli soya	113,37
A47-Şekerli buğday	121,67-904
F39-Şekerli buğday	116,7
C55-Şekerli soya	78,46
E32-Şekerli soya	95,52
E42-Şekerli soya	114,44
E55-Şekersiz soya	102,97

Çizelge 4.13 : Literatürde çalışılan EPS'lerin DSC sonuçları.

Mikroorganizma	Kristallenme sıcaklığı (°C) ve entalpisi(J/g)	Erime sıcaklığı (°C) ve entalpisi (J/g)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LPL061 (Han ve diğ, 2015)	173,79-37,88	224,09-80,43
Tibet kefir (Chen ve diğ, 2015)		131,46-209,6
<i>Enterococcus faecalis</i> (Venkatesh ve diğ, 2016)	167	270
<i>Bacillus licheniformis</i> (Singh ve diğ, 2011)	223,64-538,51	295,05-61,79
<i>Amphidinium carterae</i> (Mandai ve diğ, 2011)	116,51-2042,58	217,17-120,62
<i>Weisella confusa</i> (hindistana özgü fermente gıdadan izole edilmiş- %2 sakkarozlu MRS) (Kavitate ve diğ, 2016)		274.65-74.33

Çizelge 4.13 (devam): Literatürde çalışılan EPS'lerin DSC sonuçları

<i>L.plantarum</i> YW11 (Tibet kefirinden izole edilmiş. SDM-semi-defined besiyeri) (Wang ve diğ, 2015)		143,6-217,8
<i>L.Plantarum</i> KF5 (Tibet kefirinden izole edilmiş, 50 ml sıvı peynir altı suyu besiyeri) (Wang ve diğ, 2010)		86,35-133,5

5. SONUÇ

Bu çalışmada bozadan izole edilen 11 suşun şekerli soya suyu, şekersiz soya suyu ve şekerli buğday suyuna ekilmesiyle hem şekerin hem de substrat farkının EPS üretimine etkisi araştırılmıştır.

Buğday suyu ve soya suyu hazırlanması için belirli oranlar hammaddeler su ile kaynatılmıştır. Şekerli örnekler için şeker sonradan eklenmiştir. Oluşan bu sıvının bileşenlerini belirlemek amaçlı protein, yağ, kül ve nem analizleri yapılmıştır. Sonuçlara göre pH değerleri önemli ölçüde azalma göstermiştir. Bu tamamen laktik asit bakterilerine kendilerine özgü olan asit üretilip pH düşürme özelliklerine bağlı olmaktadır. Elde edilen EPS'lerin toplam karbonhidrat miktarı tayini fenol sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir. EPS miktarları karşılaştırıldığında ise buğday suyunda üretilen soya suyundakine göre daha az belirlenmiştir. Şekerli ve şekersiz soyada üretilen EPS miktarları karşılaştırıldığında ise şekersiz soya suyunda üretilen EPS miktarı daha az kaydedilmiştir. Ancak istatistiksel açıdan buğday ve soyada üretilen EPS'ler arasında fark önemli bulunurken, şekerli soya ve şekersiz soyada üretilen EPS'ler arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

EPS üretimi ortamdan, sıcaklıktan ve mikroorganizma çeşidinden etkilenmektedir. Bu çalışmada da şekerin etkisi net bir şekilde görülmektedir. Soya ürünlerinden en fazla üretim *Weissella confusa* bakterisi tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak buğdayda en fazla EPS üretimi ise *Streptococcus macedonicus* tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi her mikroorganizmanın kendine özgü gelişme faktörlerinin olması ve ürün farklılıklarıdır. Burda da mikroorganizmanın etkisine dikkat çekilebilmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar ile bu çalışmadaki sonuçlar karşılaştırılmıştır. DSC analizi ile EPS'lerin yüksek sıcaklıktaki bozulmaları yani termal kararlılıkları test edilmiştir. Bu sayede gıdada uygulanabilirliği belirlenmiş ve değerlendirilmiştir. Her bir EPS'nin bozulma sıcaklığının farklı olduğu

belirlenmiştir. Safsızlık nedeniyle termogram litaretürdeki çalışmalara göre daha farklı bulunmuştur.

EPS teknoloji iyi bir araştırmayla ve her faktörün değerlendirilmesiyle maksimuma ulaşabilecek bir polisakkarittir. Hem insana hem gıdaya faydası net olarak kavrandıktan sonra, optimum ve maksimum koşullar incelenerek daha verimli şekilde elde edilebilir. Bu sayede doğal bir koruyucu olan laktik asit bakterisi hem daha sağlıklı, hem daha kaliteli, hem de daha güvenli bir ürün oluşumunu sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Ai, L., Guo, Q., Ding, H., Guo, B., Chen, W., & Cui, S.W.** (2016). Structure characterization of exopolysaccharides from lactobacillus casei LC2W from skim milk. *Food hydrocolloids*, 56, 134-143.
- Adebayo-tayo, B.C., & Onilude, A.A.** (2008). Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some nigerian fermented foods for EPS production. *World Applied Sciences Journal*, 4(5), 741-747.
- Ana, H., & Ertürk, Y.E.** (2003). Soya fasülyesi. *T.E.A.E.- Bakış*, 2 (6), 1-4.
- Beşergil, B.** (2002). Enstrümental Analiz. In *Termal Analiz Yöntemleri* . Retrieved from http://www.bayar.edu.tr/besergil/23_BOLUM_6.pdf
- Boeck, T.D., Rubiano, L.A.S., Nadal, I., Monedero, V., Martinez, G.P., & Yebra, M.J.** (2010). Sorbitol production from lactose by engineered Lactobacillus casei deficient in sorbitol transport system and mannitol-1-phosphate dehydrogenas. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 85, 1912-1992. doi: 10.1007/s00253-009-2260-9.
- Björkroth, J., & Holzapfel, W.** (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *Prokaryotes*, 4, 267-319.
- Björkroth, K.J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W.H., & Korkeala, H.J.** (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology*, 5, 141-148.
- Blagojev, N., Skrinjar, M., Moracanin, S.V., & Soso, V.** (2012). Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters* 17(3), 7219-7226.
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z.** (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15-21
- on, A.H., & Gökalg, H.Y.** (2000). Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30 (4-5), 180-190.
- Compos, G.L., Urda, M.A., Blanco, M.M., Gibello, A., Cutuli, M.T., Alonso, V.L., Sanchez, F.M., & Garayzabal, J.F.F.** (2015). Lactococcus garvieae: a small bacteria and a big data world. *Health Information Science and System*, 3(1), 55-64.

- Çelikyurt, G., & Arıcı, M.** (2008). Gıda Koruyucusu Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Organik Asitler ve Önemi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Mayıs 21-23, Erzurum, Türkiye.
- Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., & Nampoothiri, K.M.** (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health benefit properties from probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF₄. *Food Science and Technology*, 64, 1179-1186.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., & Karaca, H.** (2009). Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. *GIDA Dergisi*, 35, 55-62.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., & Schorr-Galindo, S.** (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* 87, 951-962.
- Erten, H., Ağırman, B. Gündüz, C.P.B., Çarşamba, E., Sert, S., Bircan, S. & Tangüler, H.** (2014). Importance of Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Food Processing. In A. Malik et al. (Eds.), *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*, (pp. 351-360). New York.
- Evren, M., Albayram, C., & Apan, M.** (2006). Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddeler. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Mayıs 24-26, Bolu, Türkiye.
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., & Evren, S.** (2011). Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9 (1), 11-17.
- Forssten, S.D., Lahtinen, S.J. & Ouwehand, A.C.** (2011). The intestinal microbiota and probiotics. In J.J. Malago ve diğ (Eds.), *Probiotic Bacteria and Enteric Infections*, (pp. 41-63). Finland: :Springer Netherlands
- Fugelsang, K.C., & Edward, C.G.** (2007). Lactic Acid Bacteria. In *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*. (2nd ed., Vol. 2, pp.29-44). New York: Springer
- Georgalaki, M.D., Sarantinopoulos, P., Ferreira, E.S., Vuyst, L., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E.** (2000). Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasser cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 817-825.
- Geredeli, S., & Anlı, E.** (2005). Şaraptaki laktik asit bakterilerinin molalaktik fermentasyondaki önemleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(1), 1-14.
- Gerekova, P., Petrulakova, Z., & Sturdik, E.** (2011). Importance of lactobacilli for bread making industry. *Acta Chimica Slovaca* 4(2), 118-135
- Guzzo J., & Desroche, N.** (2009). Physical and Chemical Stress Factors in Lactic Acid Bacteria. In H. König ve diğ (Eds.), *Biology of*

Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine (ed.1, Vol.1, pp.293-306). Berlin: Verlag

- Gülmez, M., & Güven, A.** (2002). Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 8(1), 83-89
- Gürsel, A.** (1999). Laktik ve propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler ve süt teknolojisi alanındaki uygulamalar. *GIDA* 24(6), 399-410.
- Halasz, A.** (2009). Lactic Acid Bacteria. In R. Lasztityaytexas (Eds.), *Food Quality and Standards* (Vol. 3, pp. 70-83). Retrieved from <http://www.eolss.net/sample-chapters/c10/e5-08-06-04.pdf>
- Hammes, W.P., & Hertel, C.** (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (3rd ed., Vol.4, pp.320-403). New York: Verlag.
- Han, Y., Liu, E., Liu, L., Zhang, B., Wang, Y., Gui, M., & Wu, R.** (2015). Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. *Carbohydrate Polymers*, 115, 230-237.
- Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W., Back, W., & Dicks, L.M.T..** (2006). The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (3rd ed., Vol.4, pp.229-266). New York: Verlag.
- Idler, C., Venus, J., & Kamm B.** (2015). Microorganisms for the production of lactic acid and organic lactate. In B. Kamm (Eds.), *Microorganisms in Biorefineries, Microbiology Monographs* 26 (1st ed., Vol.26, pp. 225 273). Berlin: Verlag
- Itoi, S., Yuasa, K., Washio, S., Abe, T., Ikuno, E., & Sugita, H.** (2009). Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 867-874.
- Kavita, D., Devi, P.B., Singh, S.P., & Shetty, P.H.** (2016). Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *International Journal of Biological Macromolecules* 86, 681-689.
- König, H., & Fröhlich J.** (2009). Lactic acid bacteria. In H. König ve diğ (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (1st ed., Vol.1, pp.3-29). Berlin: Verlag
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., & Diler, Ö.** (2005). *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1(1), 39-48.
- Kundakçı, A., & Ergönül B.** (2006). Probiyotik Gıda Nedir? Ne Değildir?. *Türkiye 9.Gıda Kongresi*, Mayıs 24-26, Bolu, Türkiye.

- Kurt, Ş. & Zorba, Ö.** (2005). Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 77-83.
- Lee, K.W., Park, J.Y., Jeong, H.R., Heo, H.J., Han, N.S., & Kim, J.H.** (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faece. *Anaerobe*, 18, 96-102.
- Leroy F., Falony, G., & Vusty L.D.** (2008). Lastest developments in probiotics. In F. Toldra (Eds.), *Meat Biotechnology* (1st ed., Vol.10, pp.217-229). Newyork: Verlag
- Leroy, F., & Vuyst L.D.** (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78. doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y.** (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In H. Zhang, and Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*, (1st ed., Vol.2, pp.103-203). Netherlands: Springer.
- Maina, N.H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., & Virkki, L** (2008). NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*, 343, 1446-1455.
- Mandai, S.K., Singh, R.P., & Patel, V.** (2011). Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Secreted by a Toxic Dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and Its Probable Role in Harmful Algal Blooms (HABs). *Microbial Ecology*, 62(3), 518-527.
- Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., Gonzalez, J.M.D., Converti, A. & Oliveira, S.** (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 70-83.
- Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D.** (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal* 52, 57-71.
- Meulen, R.V., Tudor, S.G., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Valdez, G.F., & Vuyst, L.** (2007). Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 250-258.
- Miao, M., Huang, C., Jia, X., Cui, S.W., Jiang, B., & Zhang, T.** (2015). Physicochemical characteristics of a high molecular weight bioengineered α -D-glucan from *Leuconostoc citreum* SK24.002. *Food Hydrocolloids*, 50, 37-43.
- Milci, S. & Yaygın, H.** (2005). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *GIDA*, 30(2), 123-129.
- Martensson, O., Duenas-Chasco, M., Irastorza, A., Öste, R., & Holst, O.** (2003). Comparison of growth characteristics and

exopolysaccharideformation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat based, nondairy medium. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 36, 353-357.

- Monedero, V., Martinez, G.P., & Yebra M.J.** (2010). Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Applied Microbiology and Biotechnolog*, 86, 1003-1015. doi: 10.1007/s00253-010-2494-6.
- Novik, G., Sidarenka, Q., Kiseleva, E., Kolomiets, E. & Dey E.S.** (2014). Probiotics. In S.K. Brar ve diğ, *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* (1st ed., Vol.9, pp187-234). New York: Verlag
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., & Penna, A.L.B.** (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews Journal*, 4, 124-140.
- Rönka, E., Malinen, E., Saarela, M., Koski, M.R., Aarnikunnas, J., & Palva, A.** (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology* 83, 63-74.
- Sağdıç, O., Küçüköner E., & Özçelik, S.** (2004). Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(3-4), 221-228
- Sancar, B.** (2012). Ekmeklik buğdayda kalite. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28(5), 441-446.
- Singh, R.P., Shukla, M.K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C.R.K., & Jha, B.** (2011). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1019-1026.
- Soyuçok, A., Ekiz, T., & Kılıç, G.B.** (2016). Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemli. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 332 344.
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., & Zhang, H.** (2014). Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. In H. Zhang, & Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*, (1st ed., Vol.2, pp.103-203). Netherlands: Springer.
- Surayot, U., Wang, J., Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Tabarsa, M., Lee, Y., Kim, J.K., Park, W., You, S.** (2014). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structural analysis molecular weight effect on immunomodulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 233-240
- Tangüler, H., Erten, H., & Yılmaztekin, M.** (2006). Propiyonik Asit Bakterileri ve Bakteriyosin Üretimi. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Mayıs 24-26, Bolu, Türkiye.

- Tayuan, C., Tannock, G.W., & Rodstong, S.** (2011). Growth and exopolysaccharides production by *Weissella* sp. From low cost substitutes for sucrose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3693-3701.
- Teixeria, P.** (2014). *Lactobacillus brevis*. In C.A. Batt (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, (1st ed., Vol.2, pp.418-424). New York: Verlag.
- Teuber, M.** (1995). The genus of *Lactococcus*. In B.J.B. Wood ve diğ (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, (1st ed., Vol. 1, pp. 173-234). New York: Springer.
- Velasco, S., Arsköld, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Radström, P., & Niel, E.W.J.** (2006). Enviromental factors influencing growth of and exopolysaccharides fromation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology* 111, 252-258.
- Velasco, S.E., Yebra, M.J., Monedero, V., Ibarburu, I., Duenas, M.T., & Irastorza, A.** (2007). Influence of the carbohydrate source on β glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology* 115, 325-334.
- Venkatesh, P., Balraj, M., Ayyanna, R., Ankaiah, D., & Arul, V.** (2016). Physicochemical and biosorption properties of novel exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis*. *Food Science and Technology*, 68, 606-614.
- Verse, M.D., & Schrezenmeir, J.** (2008). Probiyotik, prebiyotik, and synbiotics. In T. Scheper ve diğ (Eds), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (1st ed., Vol.111, pp.1-66). Berlin: Verlag.
- Vuyst, L.D., & Leroy, F.** (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199
- Vuyst, L.D., & Vandamme, E.** (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In L.D. Vuyst (Eds.), *Bacteriosins of Lactic Acid Bacteri* (1st edi., Vol.3, pp. 91-142). Belgium: Chapman & Hall.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M.** (2014). Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 71-78.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., & Bai, X.** (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895-903.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., & Yang, Z.** (2015). Characterization of az exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.

- Xiao, J., Yang, Z., & Zhang, Y.** (2014). Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In H. Zhang and Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*, (pp. 303-350).
- Yılmaz, M. & Çelik, G.Y.** (2007). Bakteriyel ekstraselüler polisakkaritler (EPS). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 7-13.
- Yüksekdağ, Z.N., & Beyatlı, Y.** (2003). Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 1(2), 49-69.
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., & Arendt, E.K.** (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1121-1135. doi: 10.1007/s00253-015-7172-2.
- Zhou, K., Zeng, Y., Yang, M, Chen, S., He, L., & Ao, X.** (2016). Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. *Carbohydrate Polymers*, 144, 205-214.

EKLER

EK A: 25A'nın ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK B: B2'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK C: E32'nin ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK D: E42'nin ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK E: E55'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK F: A15'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK G: A47'nin ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

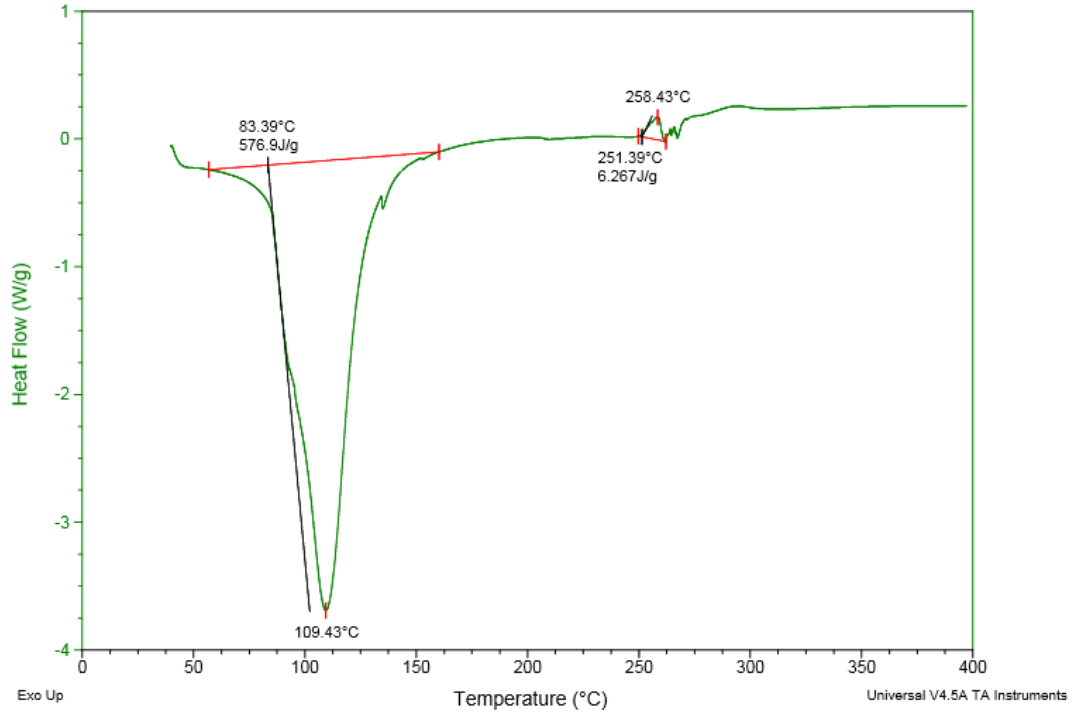
EK H: C19'un ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK I: C55'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

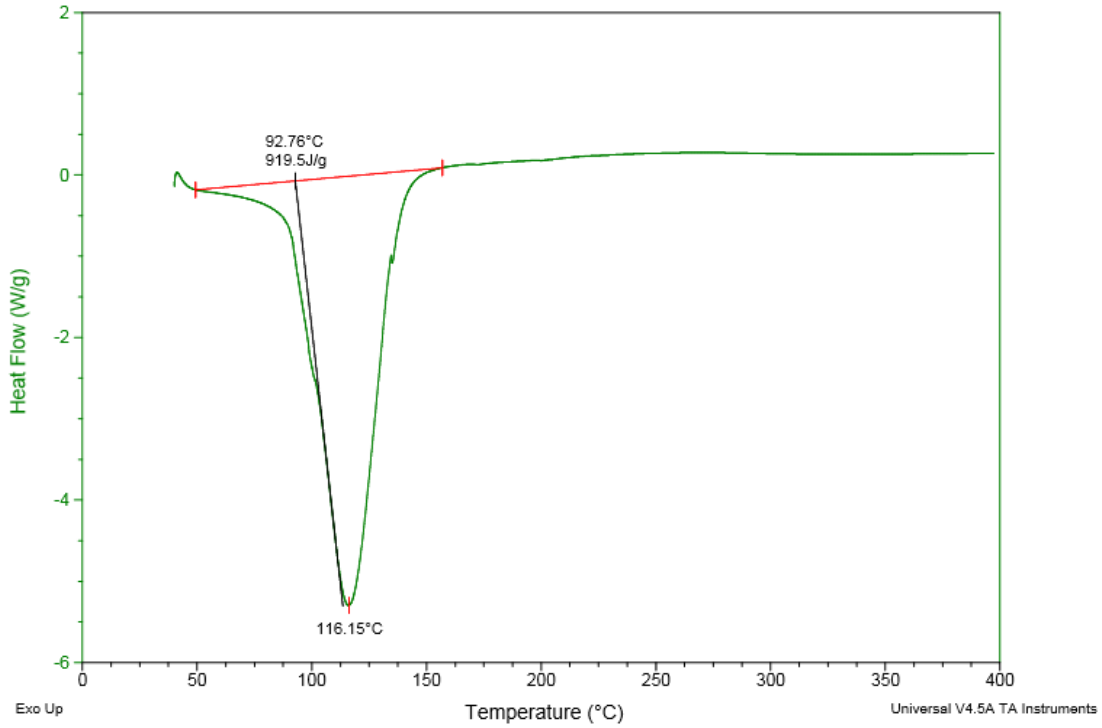
EK J: F39'un ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

EK K: D41'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı

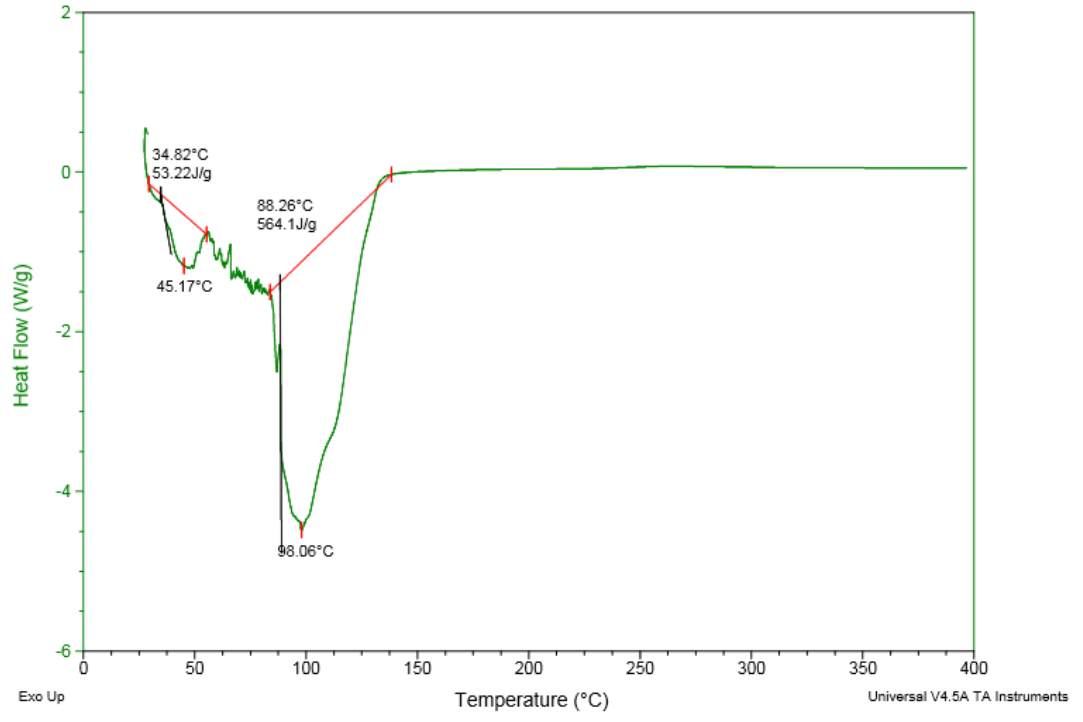
EK A: 25A'nın ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil A.1 : 25A'nın buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

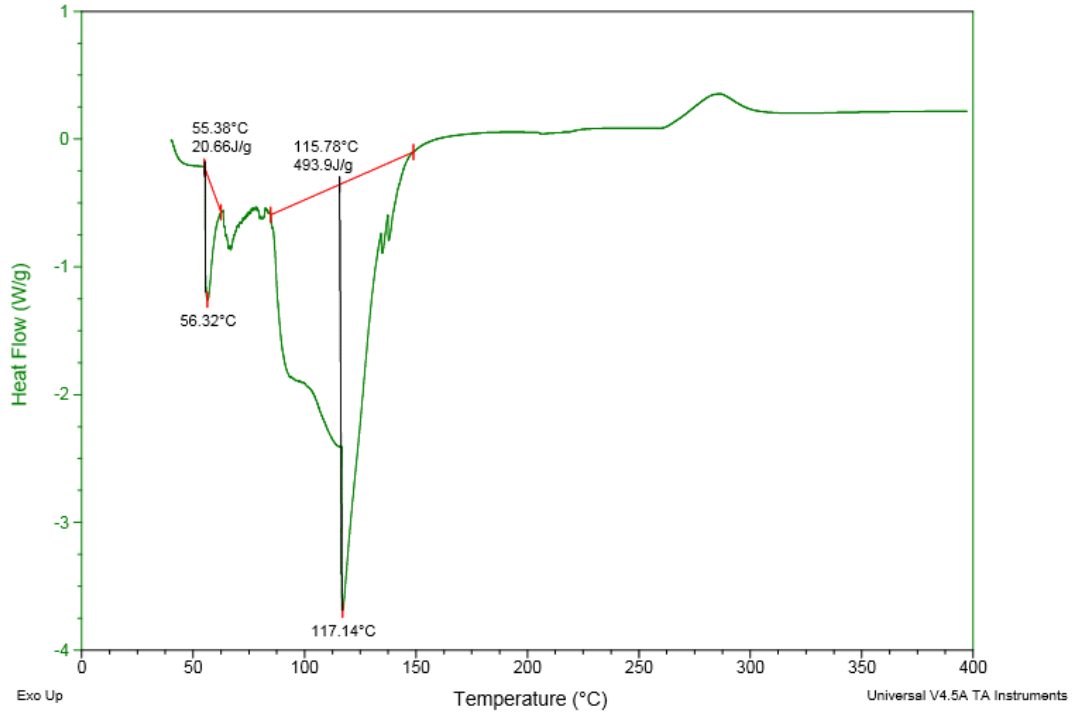


Şekil A.2 : 25A'nın şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

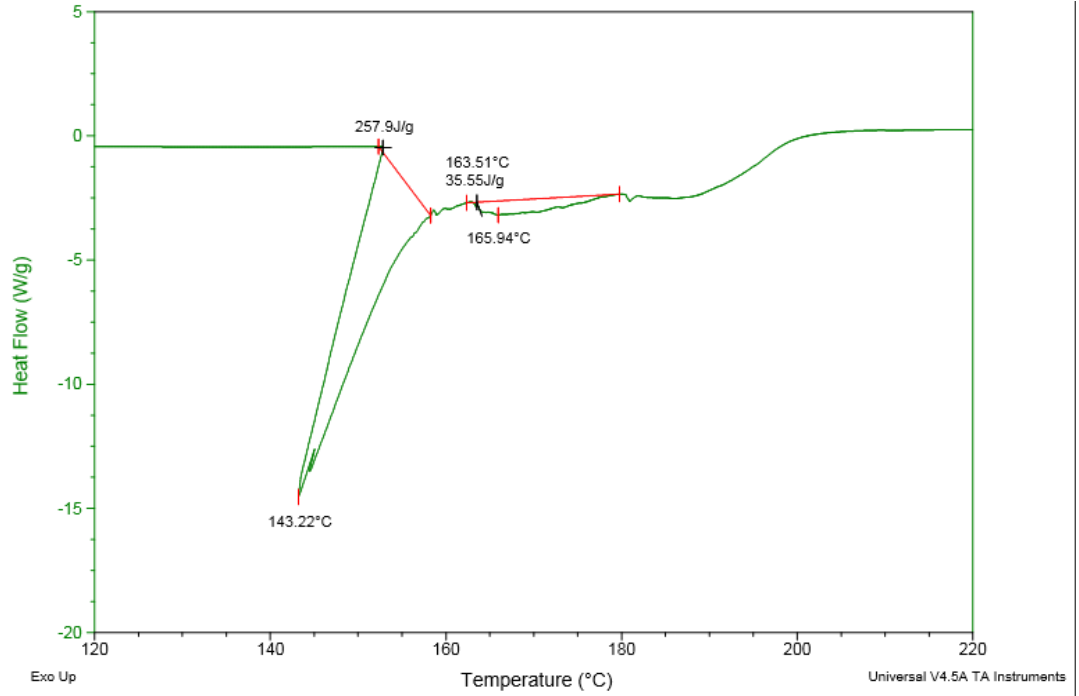


Şekil A.3 : 25A'nın şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

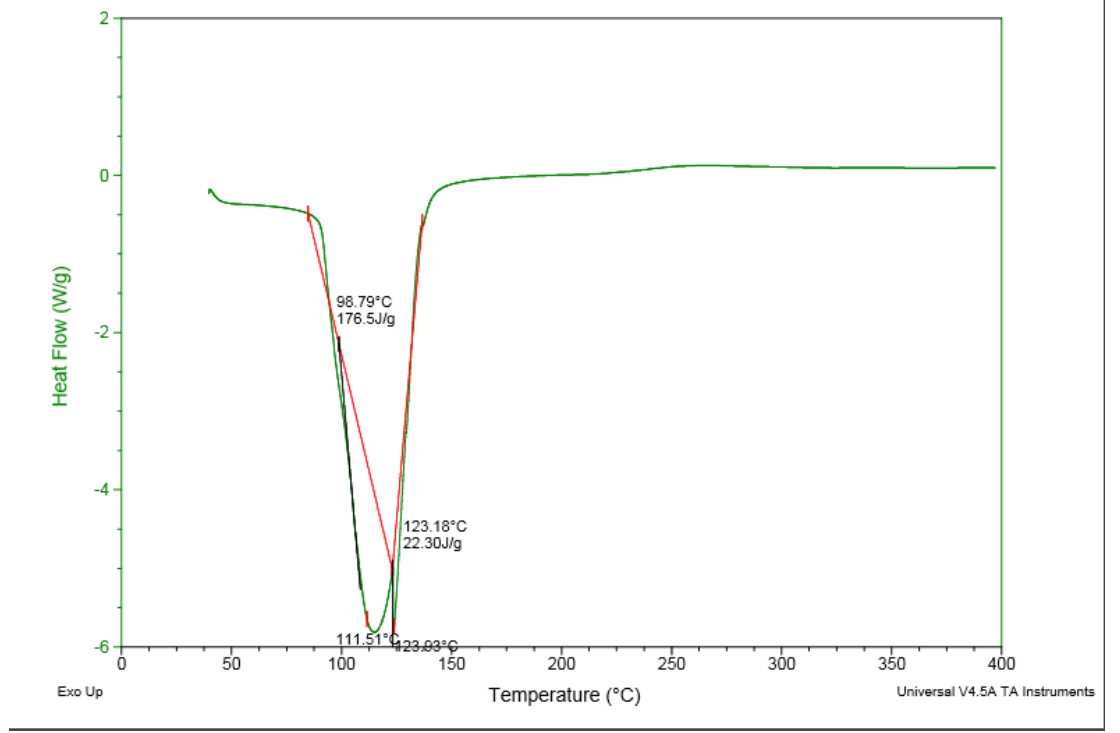
EK B: B2'nin ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil B.1 : B2'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

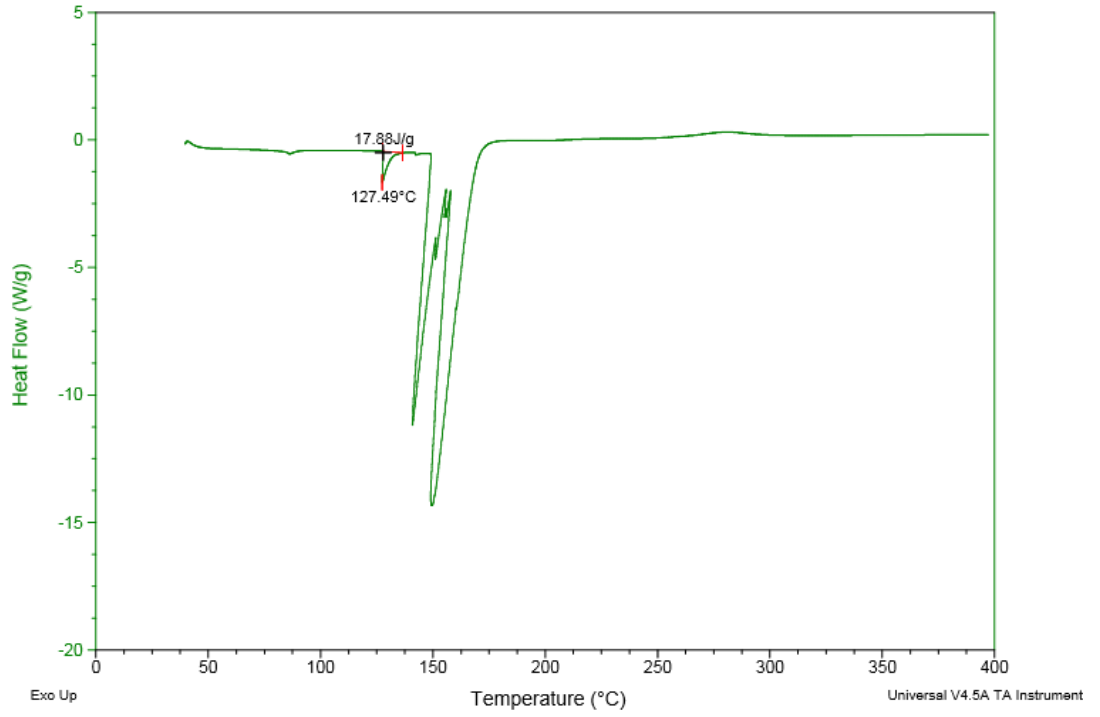


Şekil B.2 : B2'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

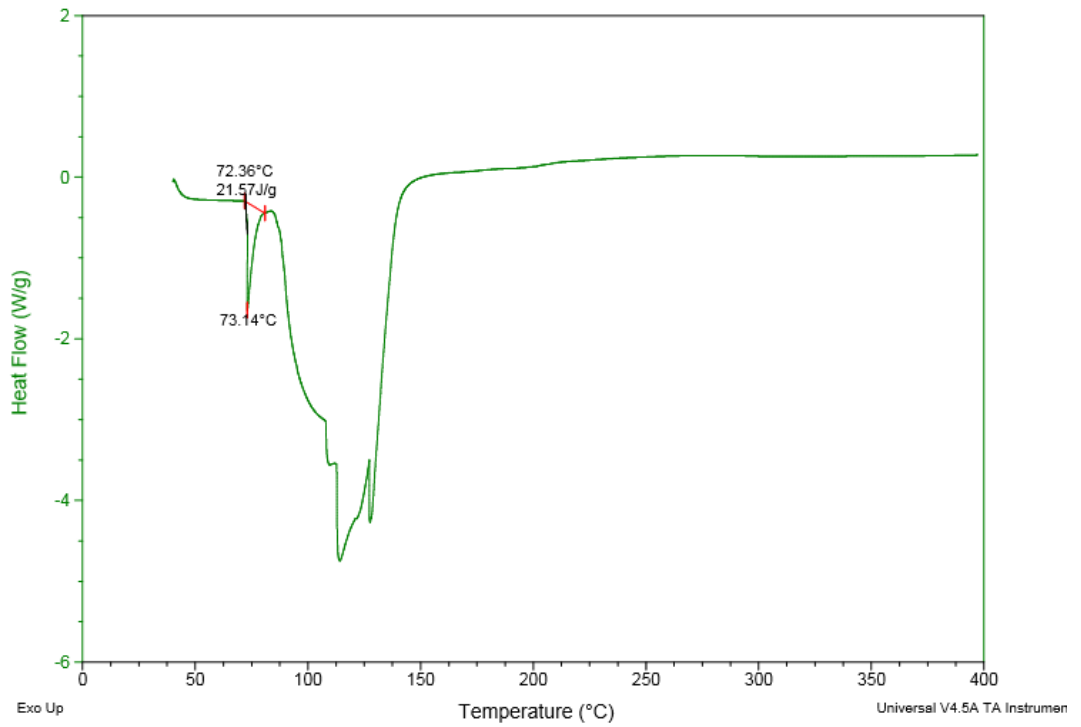


Şekil B.3 : B2'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

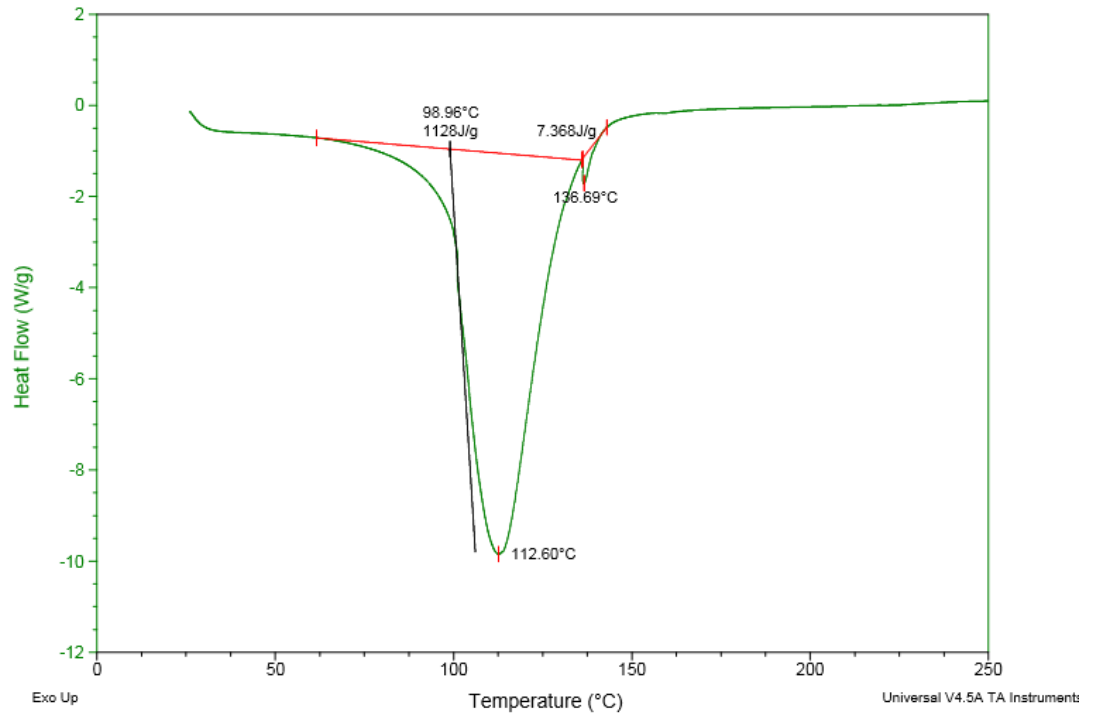
EK C: E32'nin ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil C.1 : E32'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

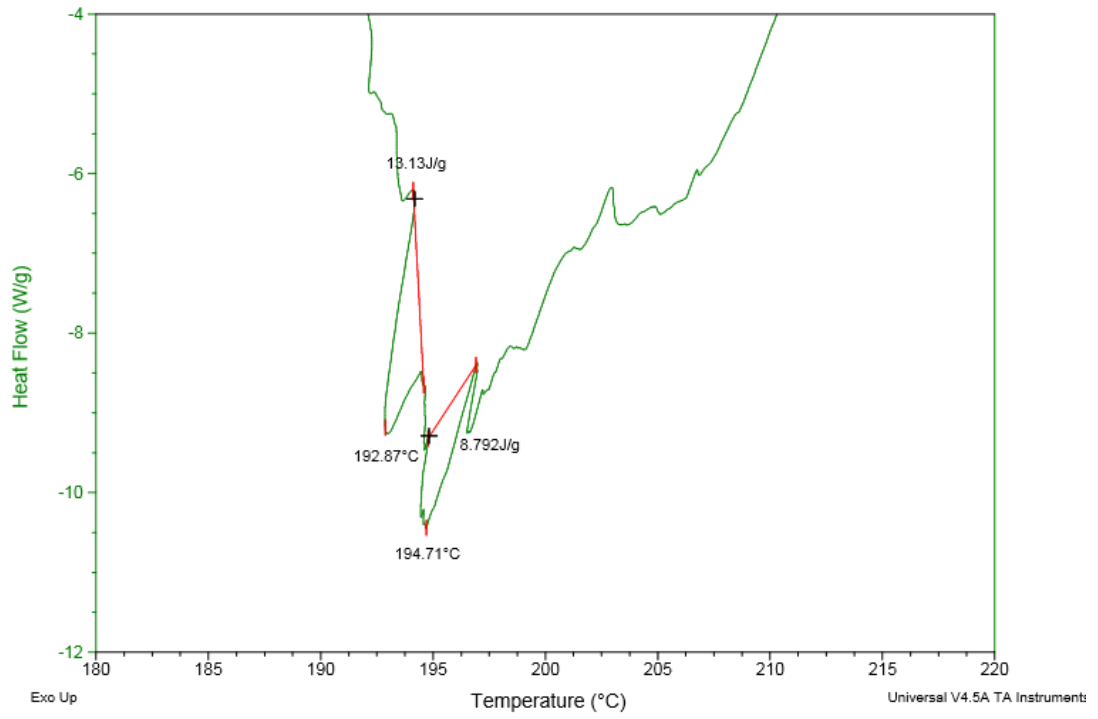


Şekil C.2 : E322'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

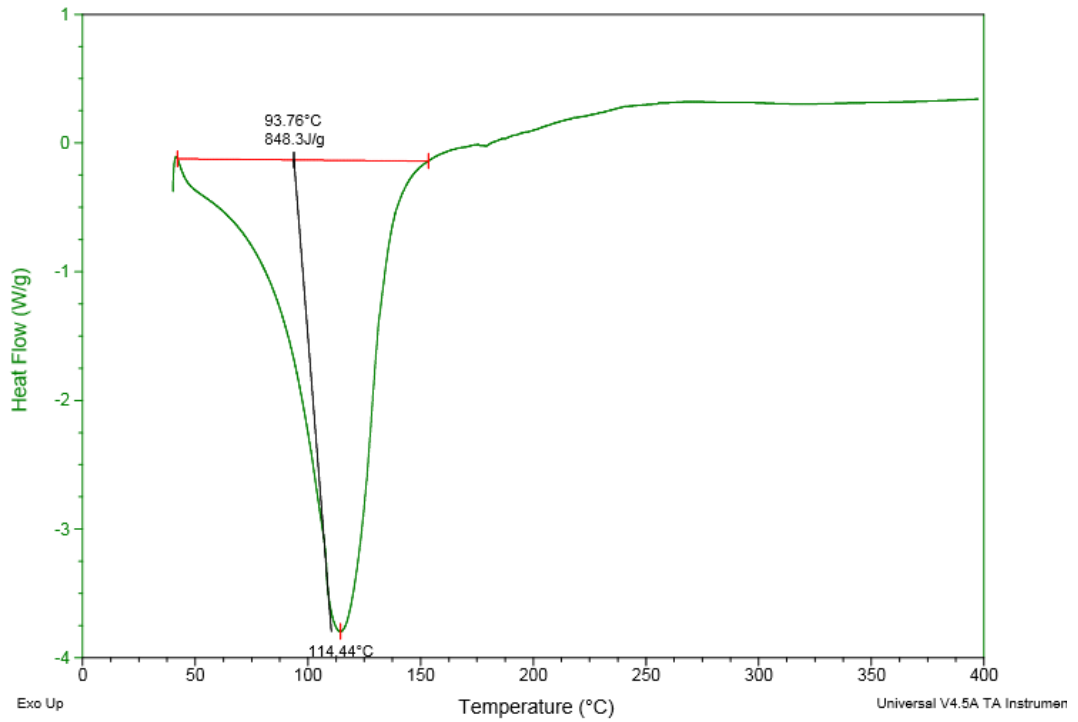


Şekil C.3 : E32'nin şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

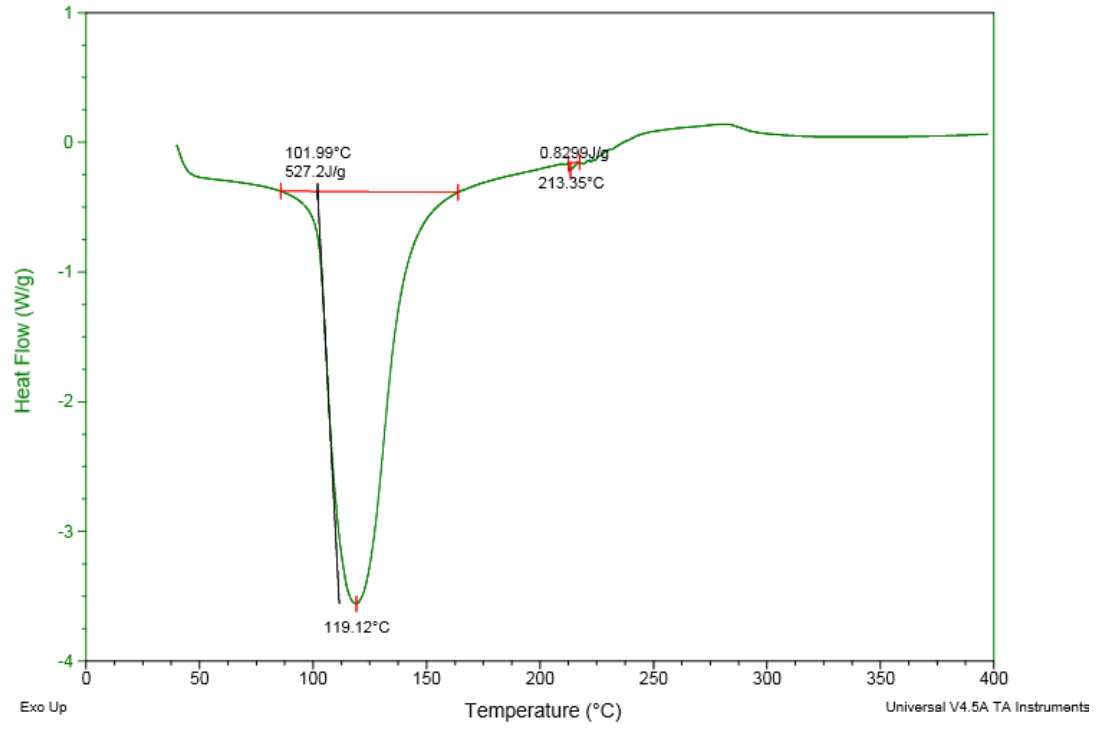
EK D: E42'nin ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil D.1 : E42'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

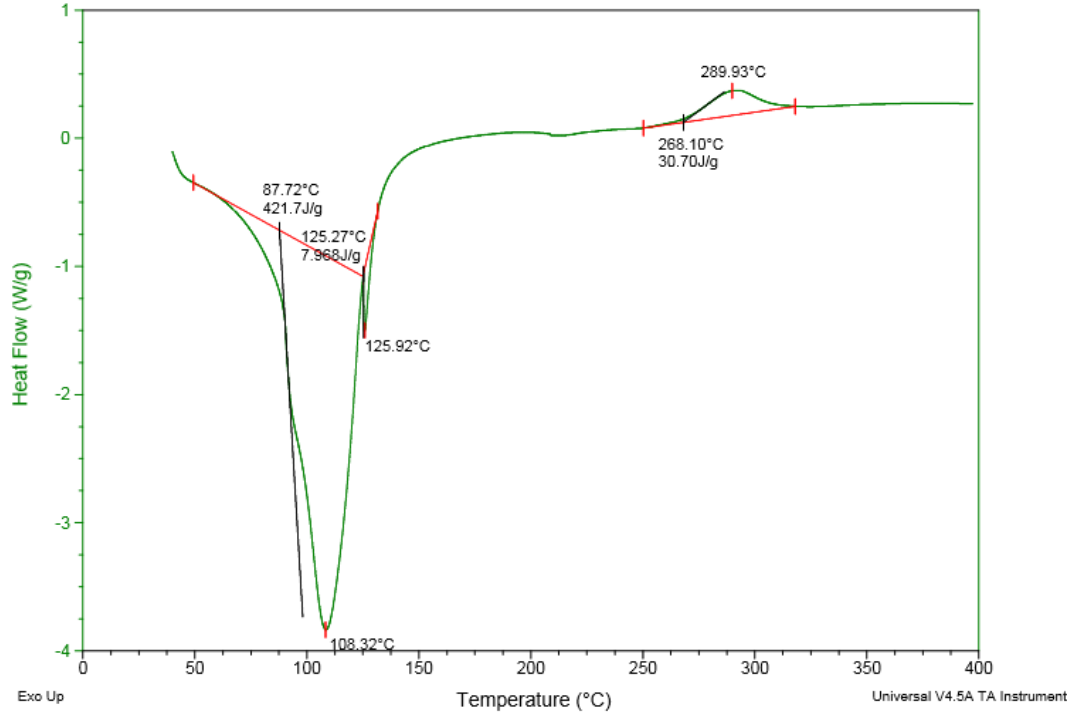


Şekil D.2 : E42'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

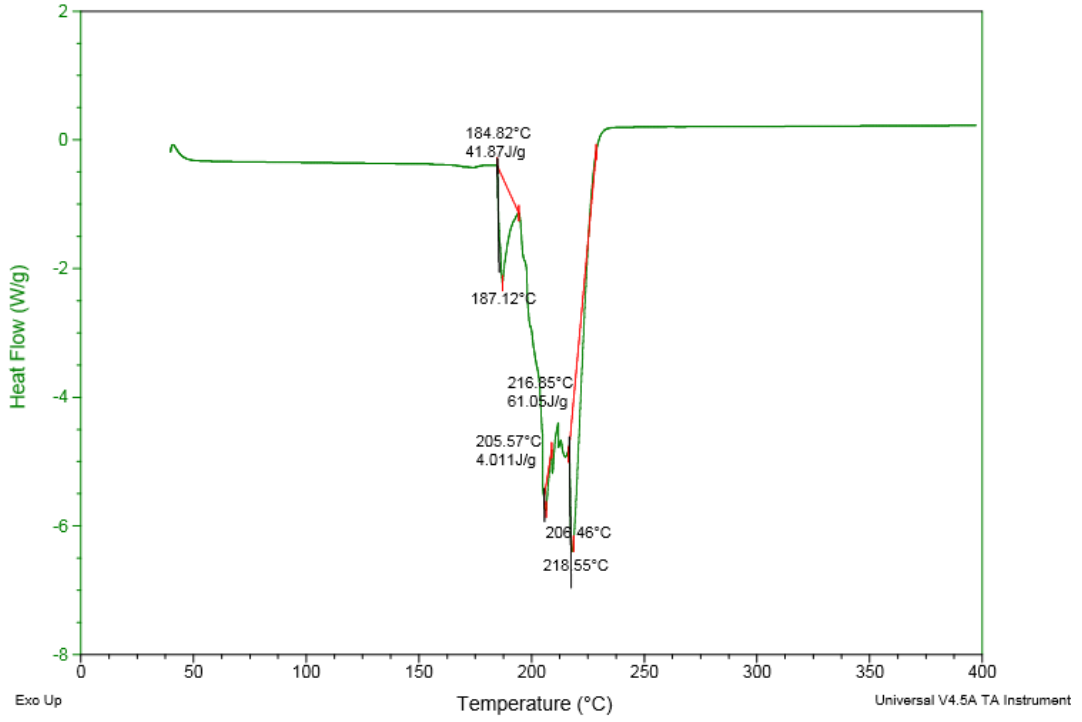


Şekil D.3 : E42'nin şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

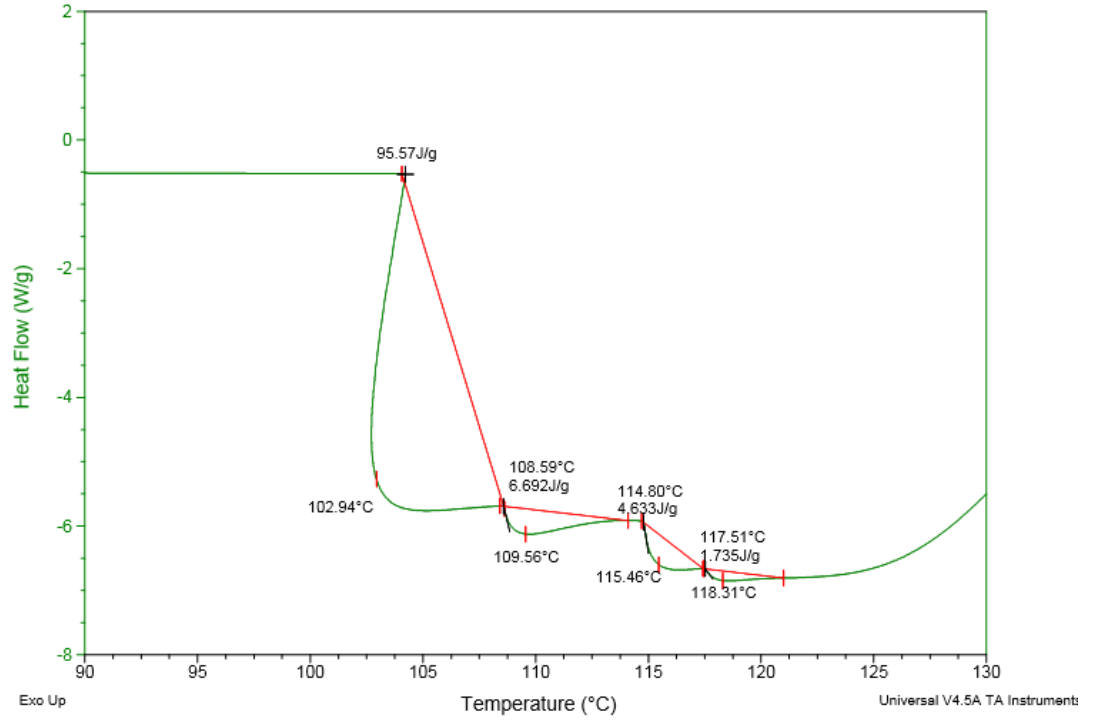
EK E: E55'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil E.1 : E55'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

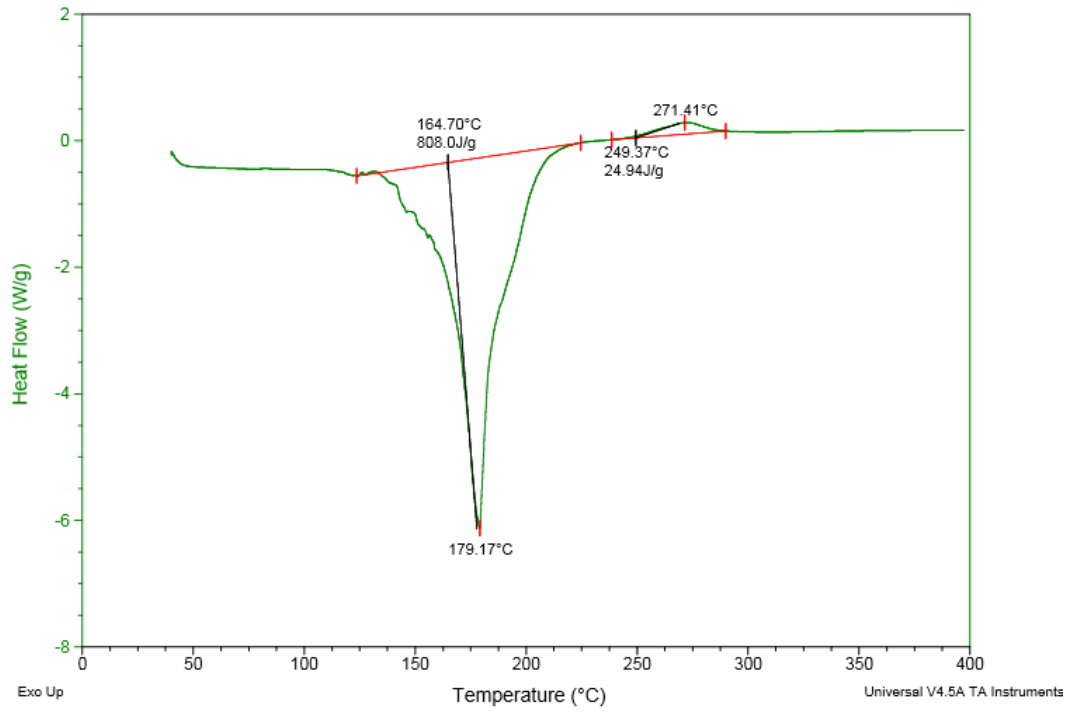


Şekil E.2 : E55'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

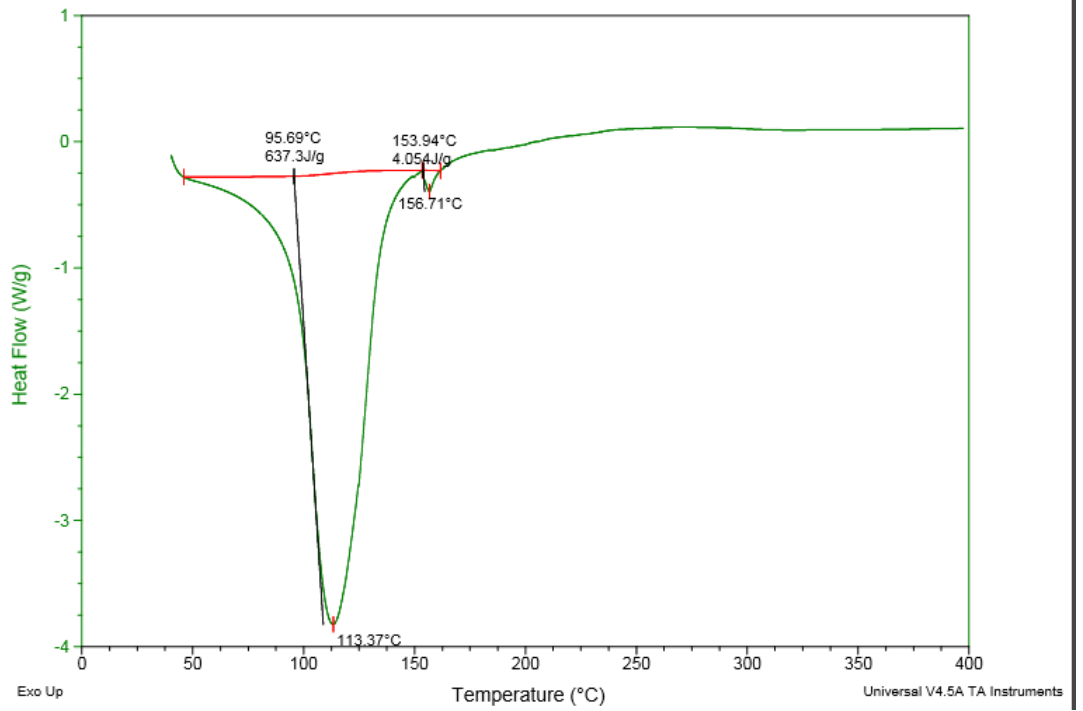


Şekil E.3 : E55'in şekeriz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

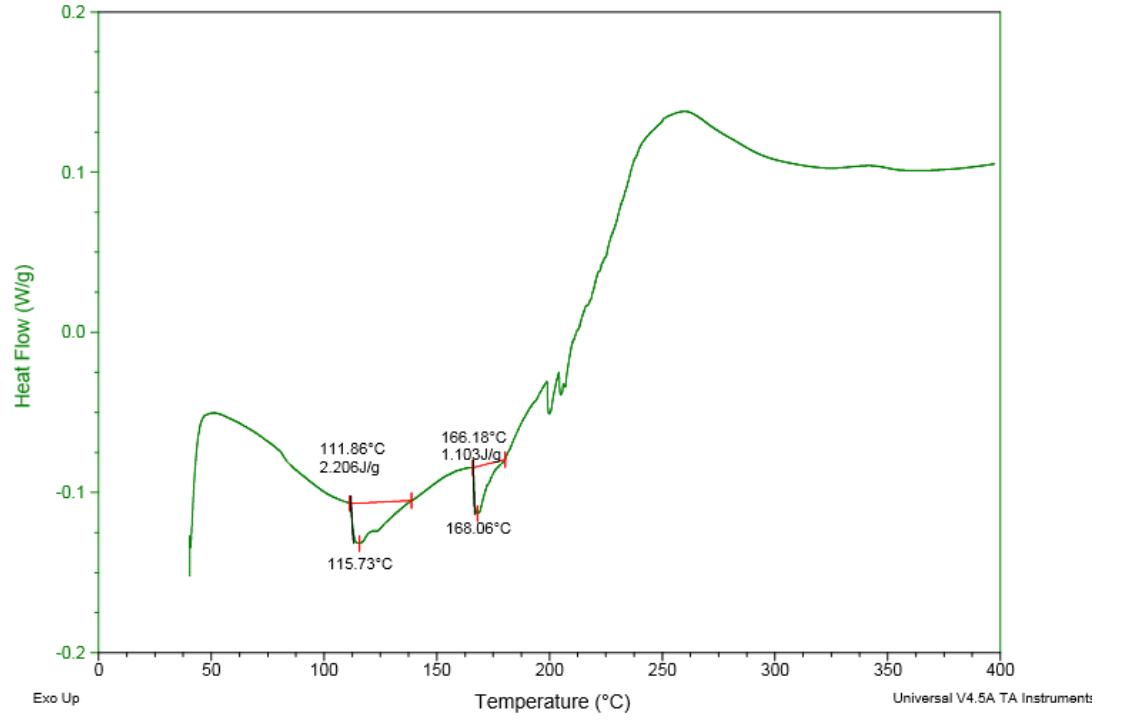
EK F: A15'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil F.1 : A15'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

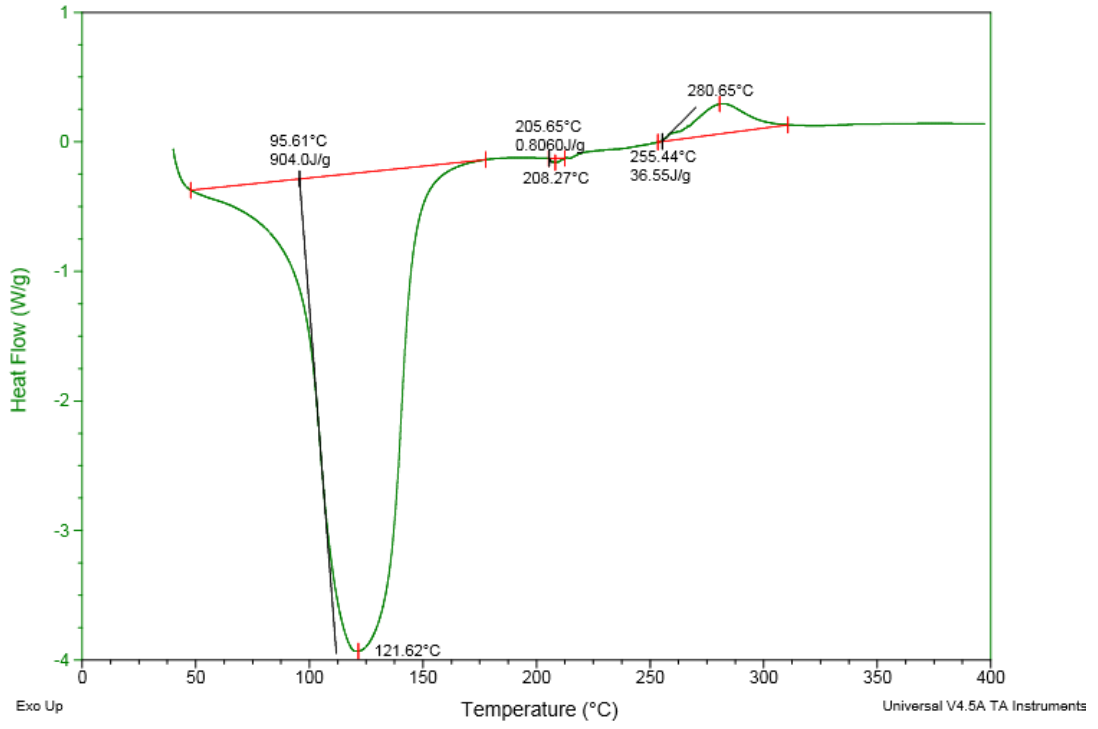


Şekil F.2 : A15'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

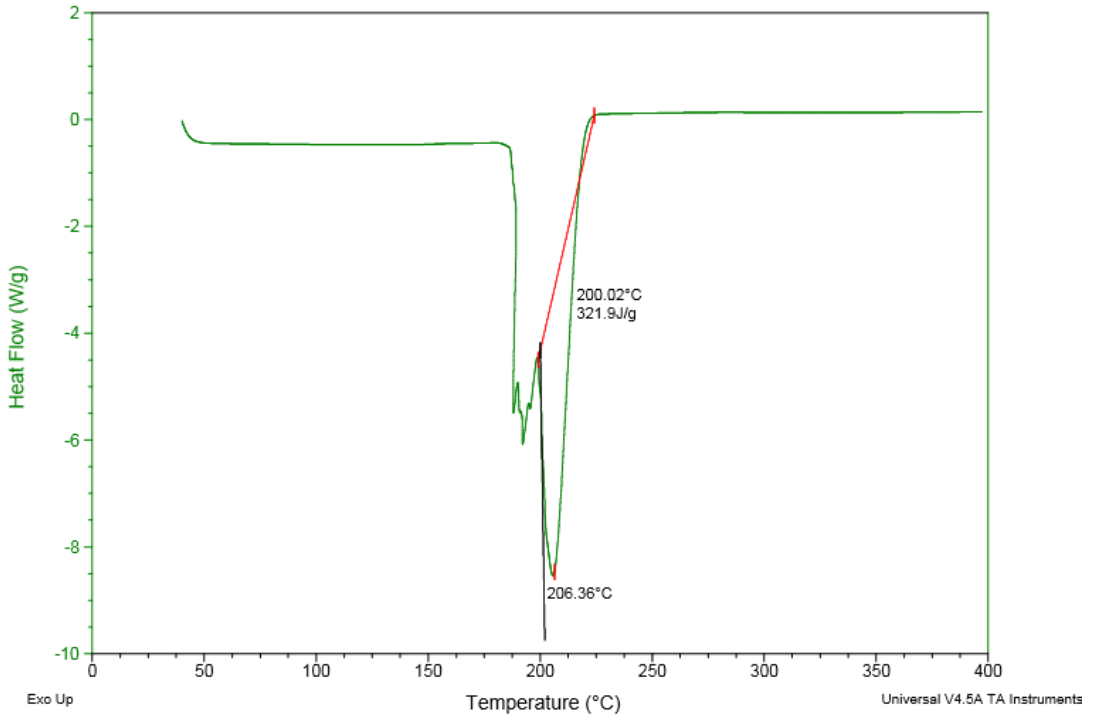


Şekil F.3 : A15'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

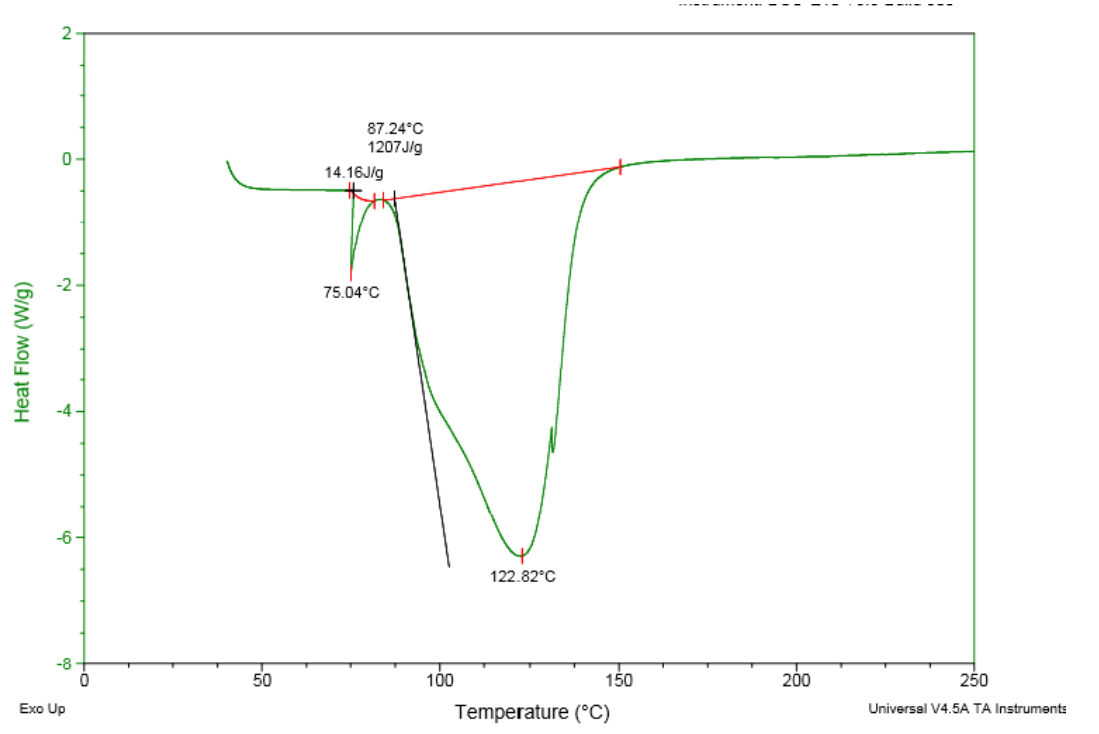
EK G: A47'nin ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil G.1 : A47'nin buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

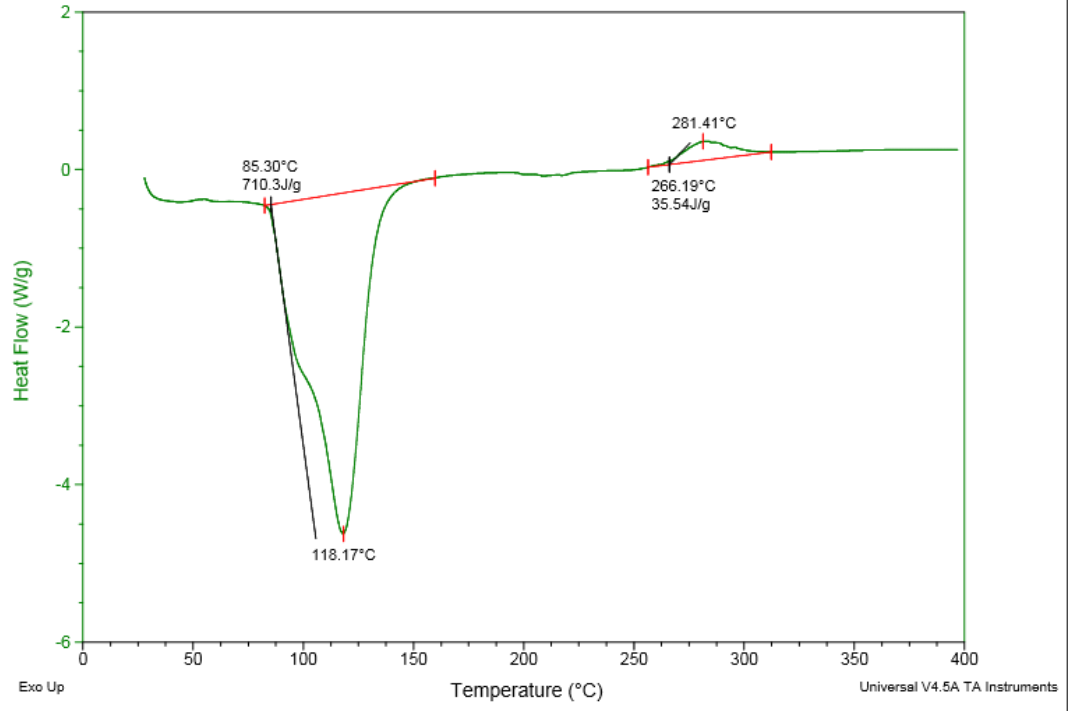


Şekil G.2 : A47'nin şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

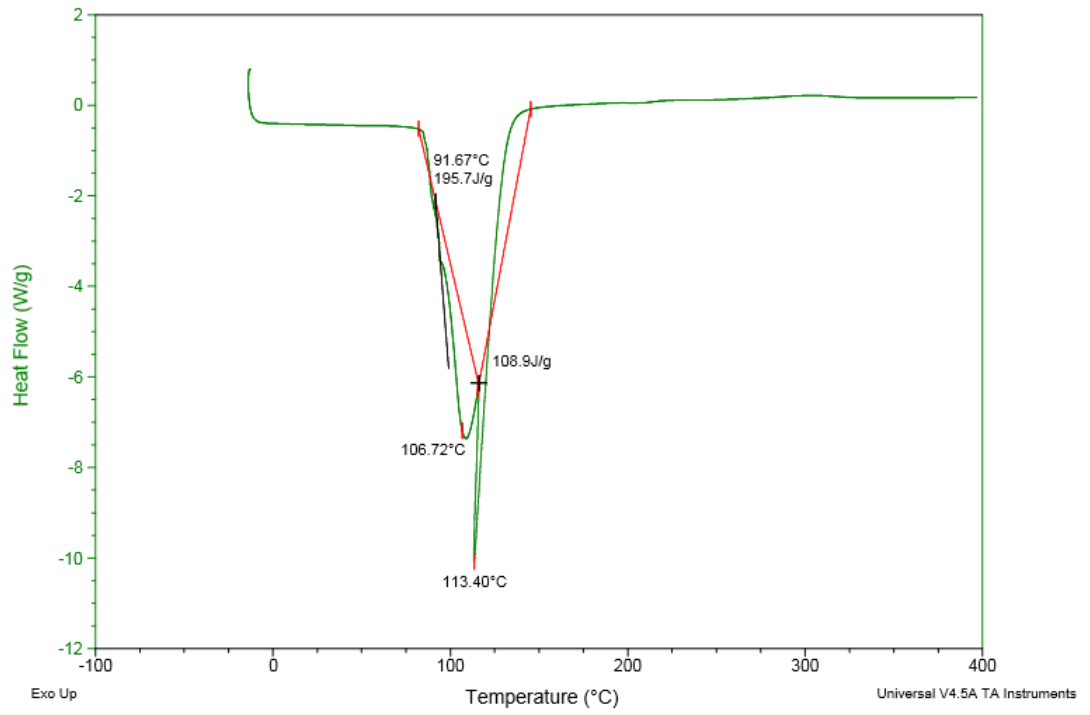


Şekil G.3 : A47'nin şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

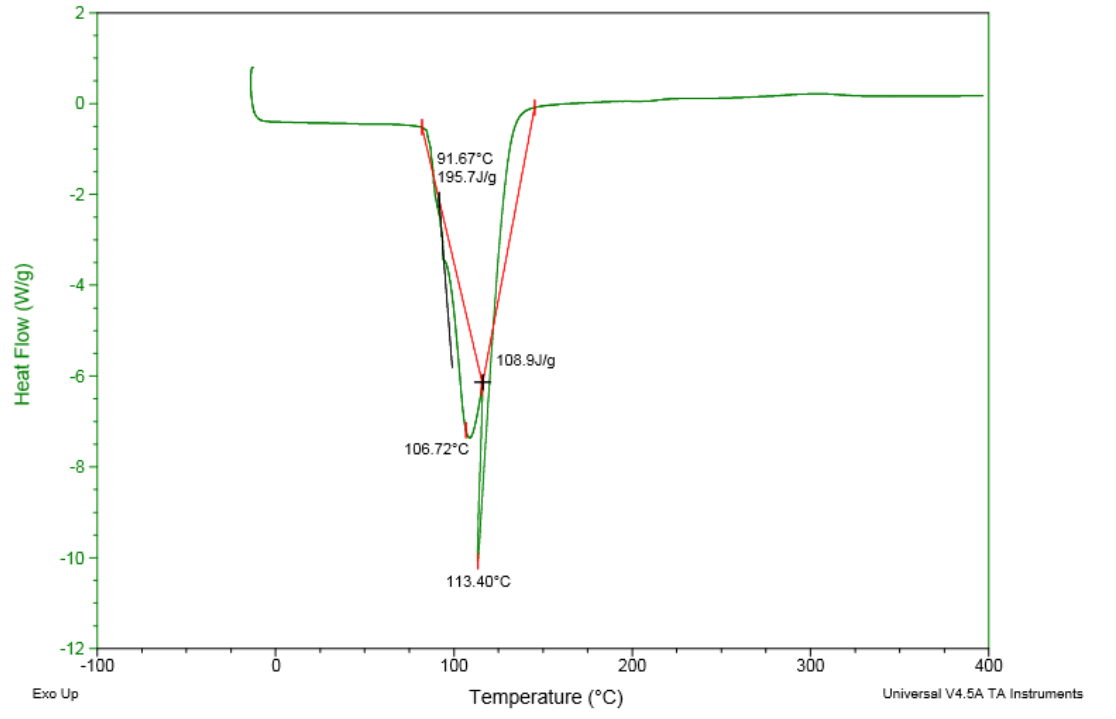
EK H: C19'un ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil H.1 : C19'un buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

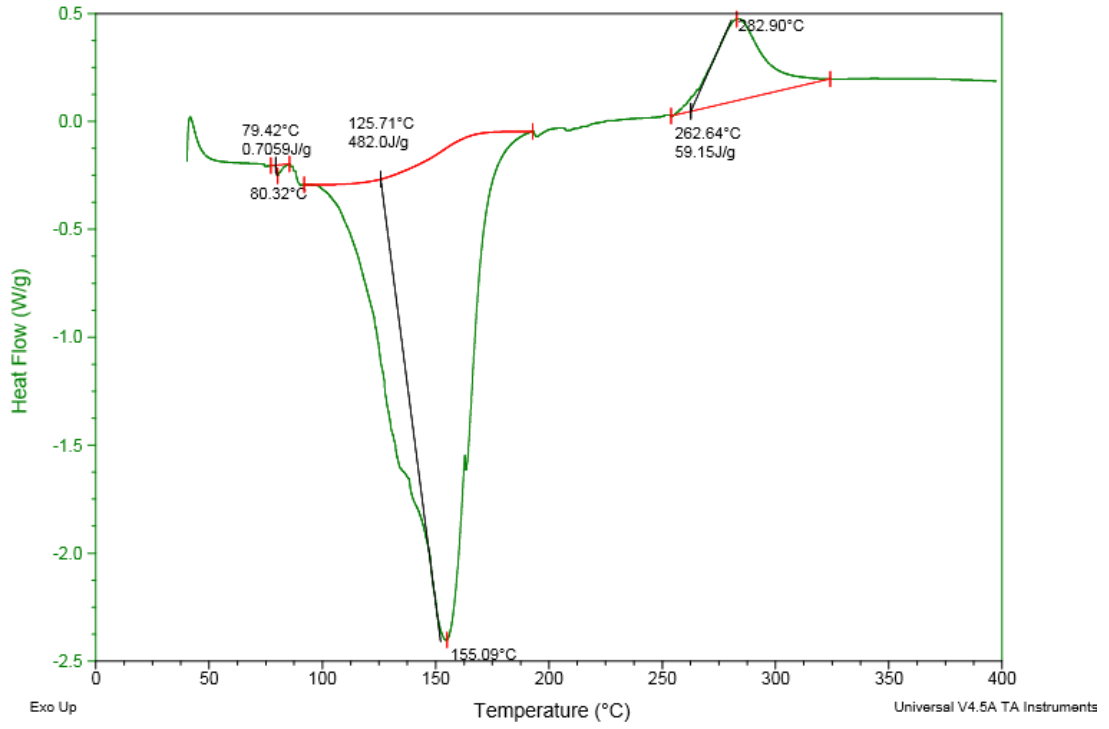


Şekil H.2 : C19'un şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

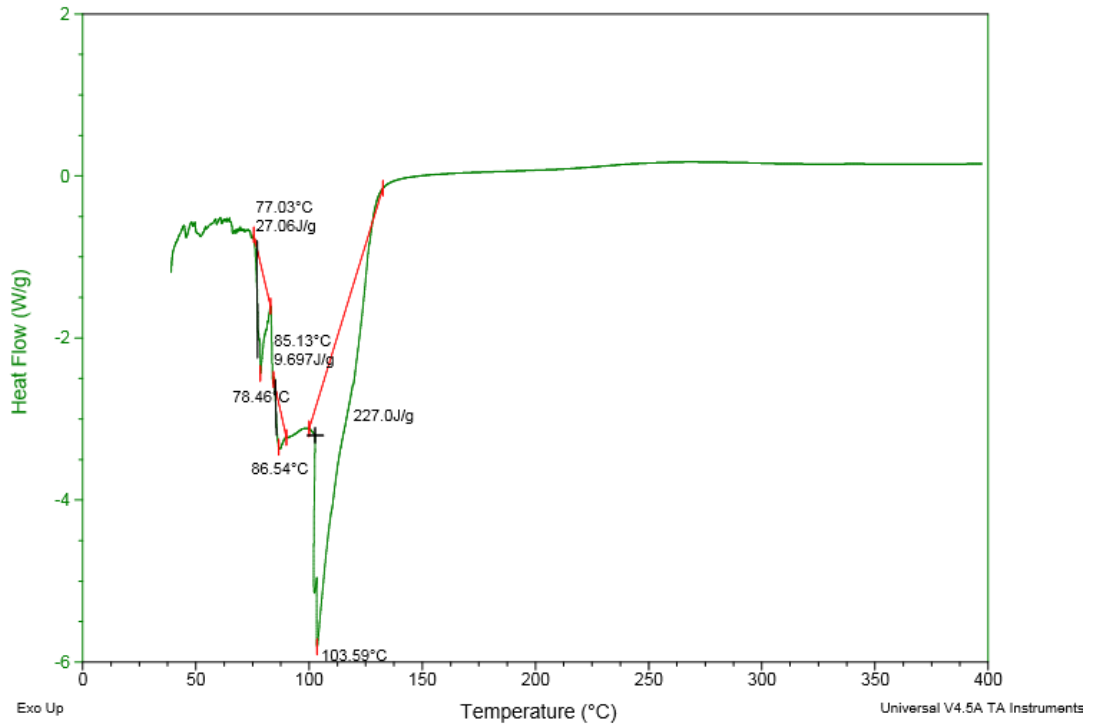


Şekil H.3 : C19'un şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

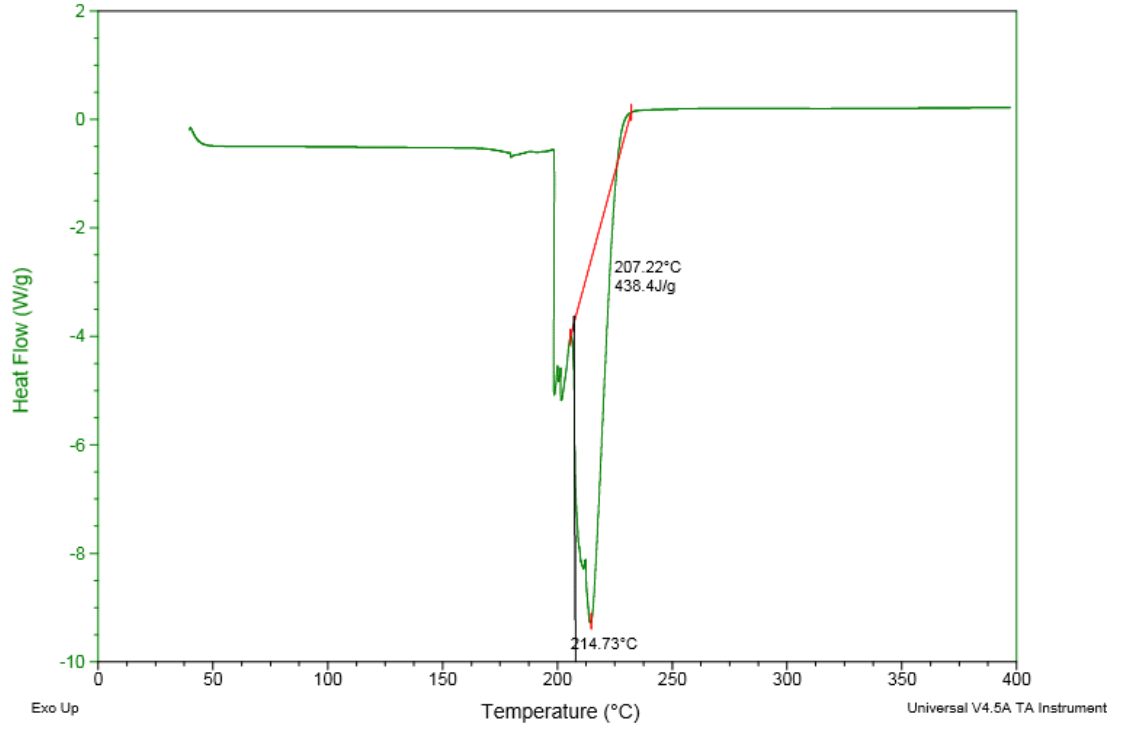
EK I: C55'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil I.1 : C55'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

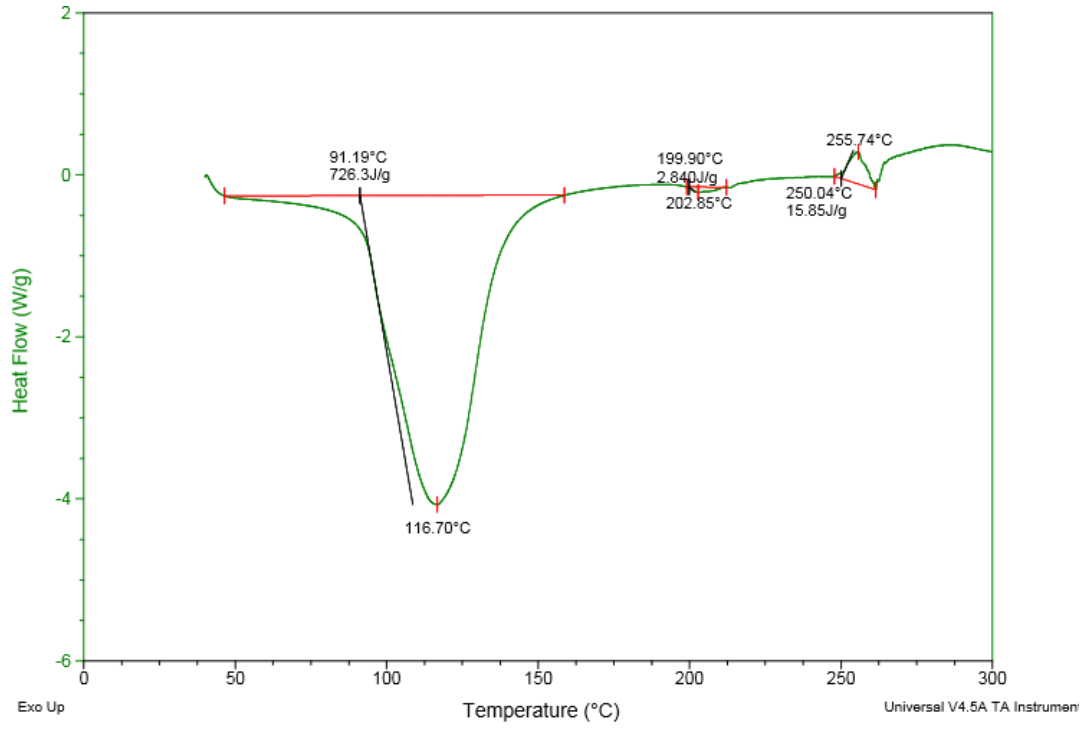


Şekil I.2 : C55'in şekerli soya ürettiği EPS'ye ait termogram.

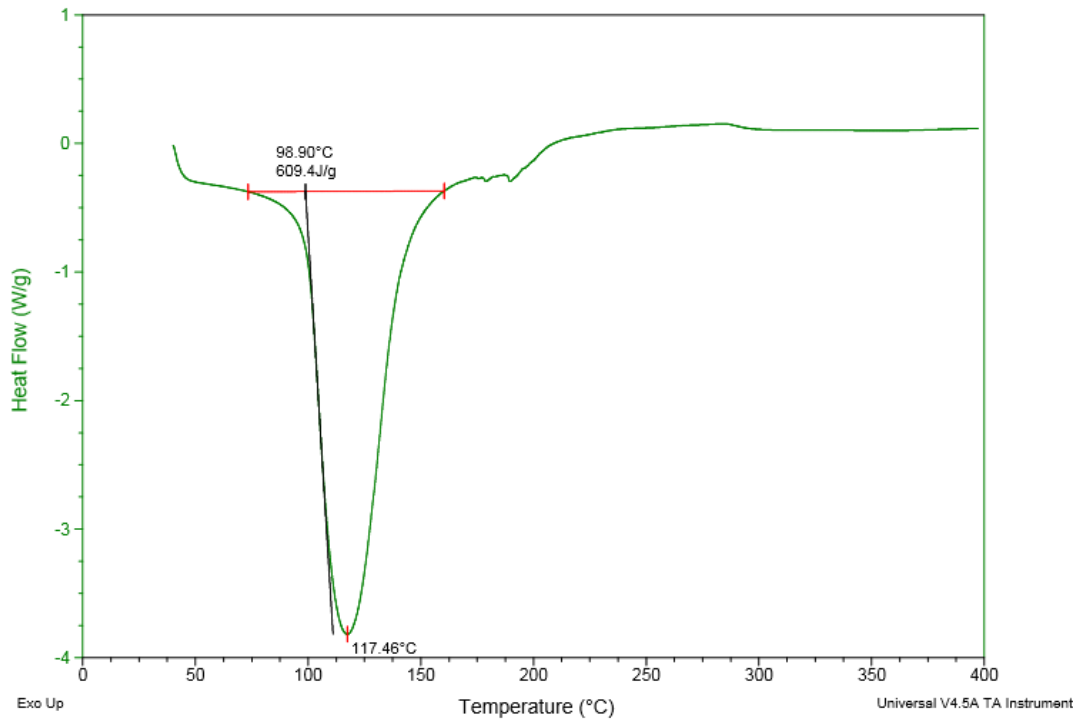


Şekil I.3 : C55'in şekersiz soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

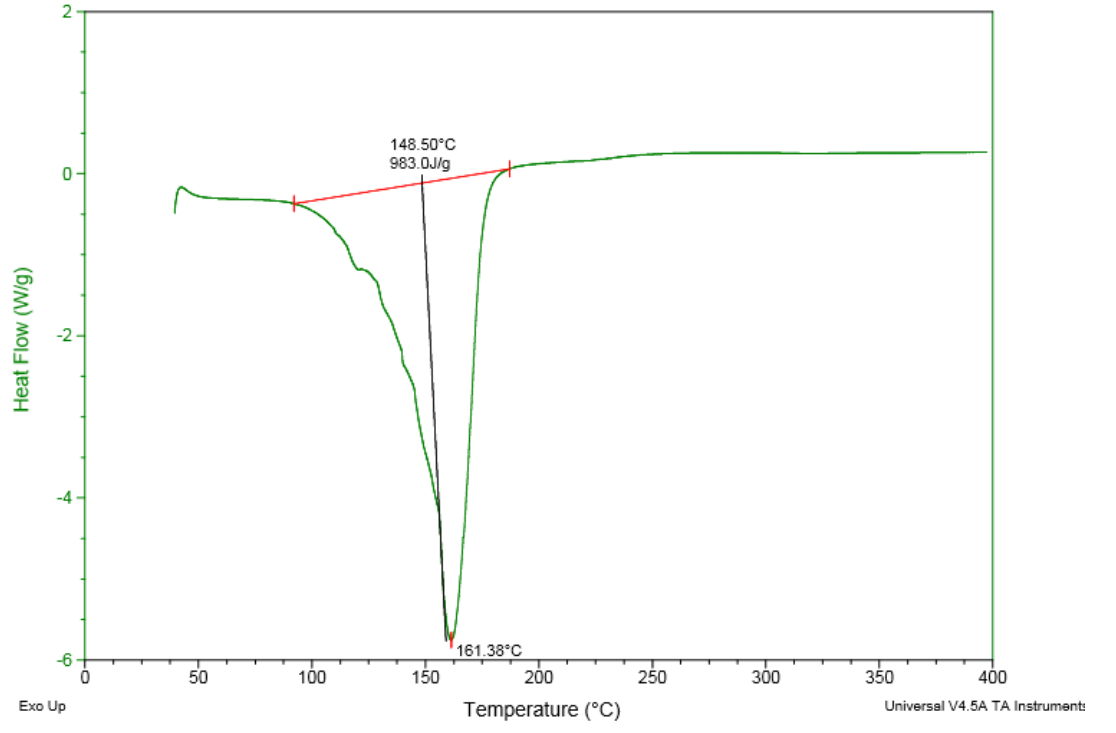
EK J: F39'un ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil J.1 : F39'un buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.

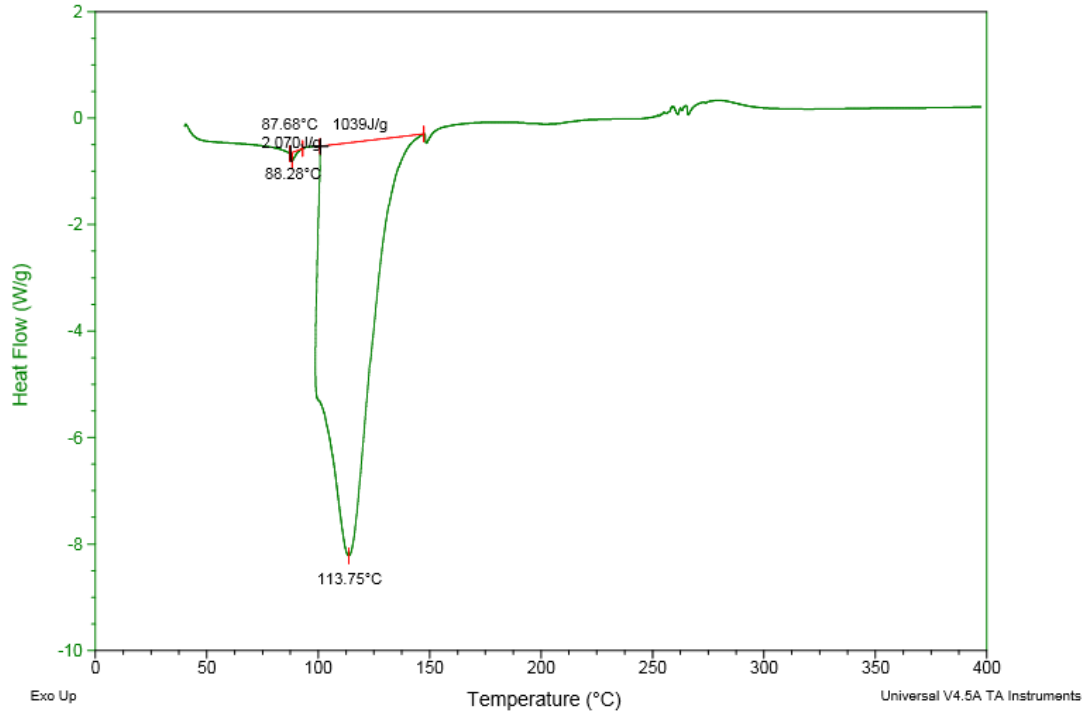


Şekil J.2 : F39'un şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

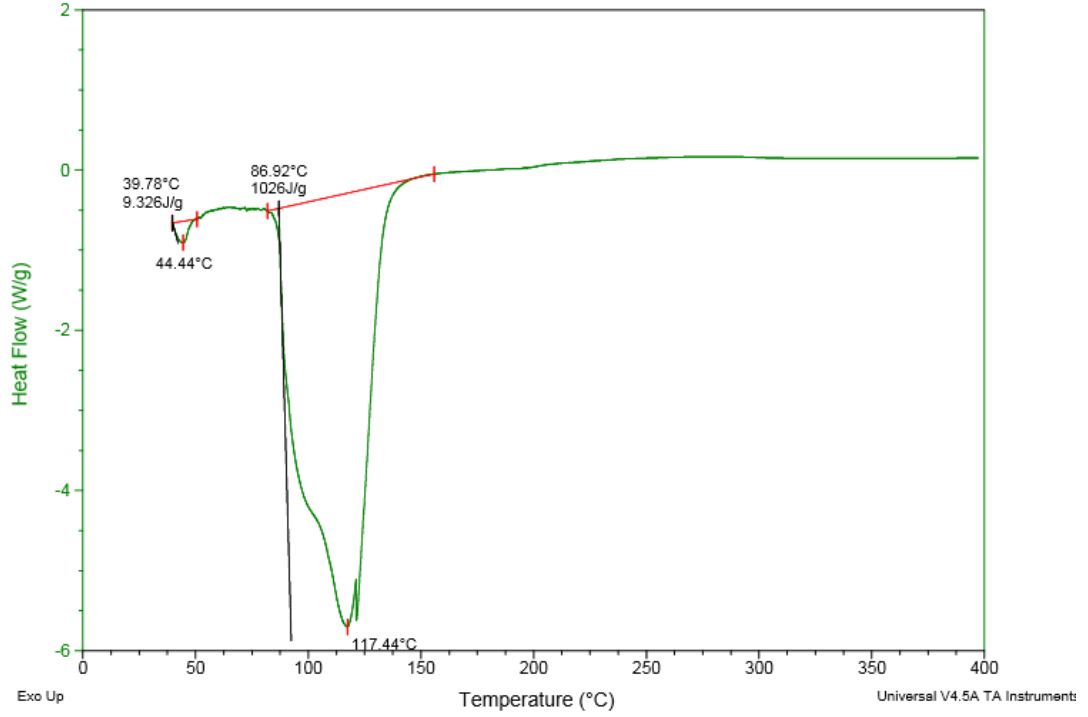


Şekil J.3 : F39'un şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

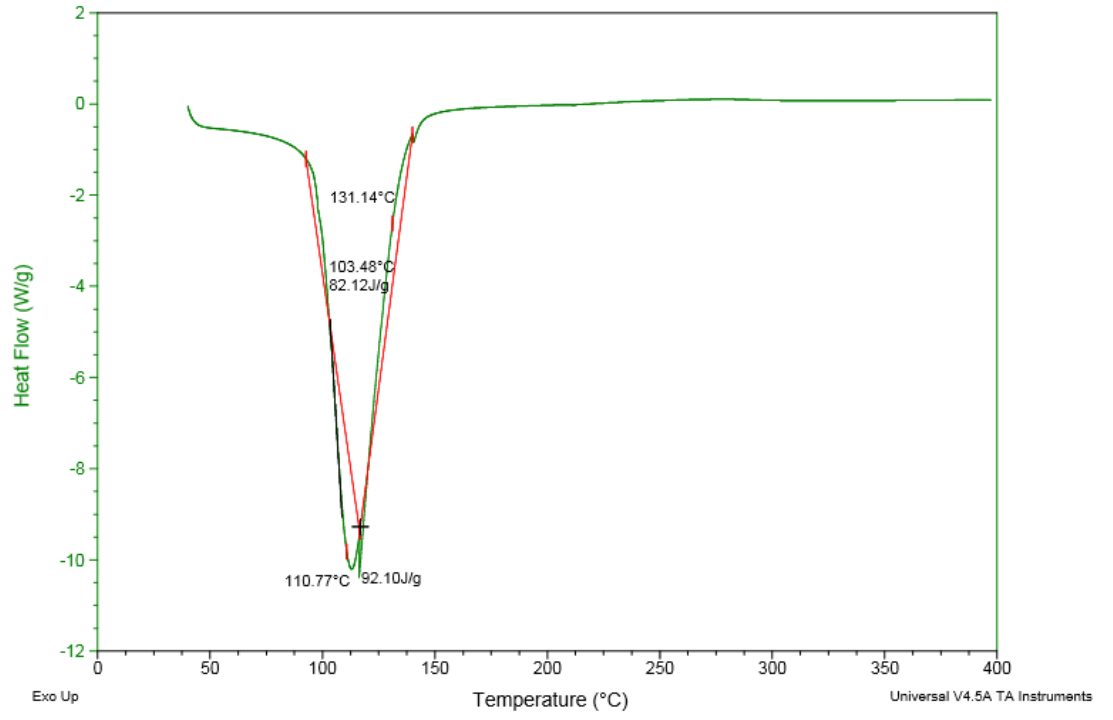
EK K: D41'in ürettiği EPS'nin DSC sonuç termogramı



Şekil K.1 : D41'in buğdayda ürettiği EPS'ye ait termogram.



Şekil K.2 : D41'in şekerli soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.



Şekil K.3 : D41'in şekerless soyada ürettiği EPS'ye ait termogram.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad : İlkey Kıрма
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul/1992
E-posta : kirma@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metaluji Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** : 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 01/2015-02/2016 tarihleri arasında Opera Pasta Unlu Mamuller San. ve Tic. Ltd. Şirketi'nde üretim stajı yaptı.
- 07/2013-08/2013 tarihleri arasında Tat Gıda Sanayi A.Ş. Maret İşletmesi'nde üretim ve laboratuvar stajı yaptı.