

**ÖZET**  
**SÜT TEKNOLOJİSİNDE SİYALİDAZ KULLANIMI**

5 Mevcut buluş, bir siyalidaz enzimi kullanımı ile taze süt ürünleri gibi ekşi süt preparatlarının imalat yöntemleri ile ilgilidir. Yöntem dokunun modifikasyonunu, bilinen yöntemlerden daha avantajlı ve kolay bir şekilde sağlar. Buna ek olarak, yöntem preparatın dokusuna herhangi bir hasar vermeden veya olumsuz bir etki yaratmadan eklenen ekşi süt ürünlerinin protein içeriği miktarında bir azalmaya olanak sağlar.

**İSTEMLER**

1. Yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için bir yöntem olup, bir siyalidazın ve bir asitleştirici maddenin bir protein içeren bir siyalik aside eklenmesi, asitleştirmenin gerçekleşmesi ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içermektedir.  
5
2. İstem 1'e göre bir yöntem olup, burada söz konusu protein içeren siyalik asidin en azından bir kısmı, muamele görmüş proteini elde etmek için söz konusu siyalidaz ile ön-inkübasyon prosesine tabi tutulmasını, isteğe bağlı olarak muamele görmüş proteinin geri kazanımını, ayrıca söz konusu yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için kullanılan bir süt başlatıcı maddesine muamele görmüş proteinin eklenmesini içerir.  
10
3. İstem 2'ye göre bir yöntem olup, burada söz konusu siyalik asit içeren protein bir süt ürünüde mevcuttur, söz konusu yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanması için kullanılan isteğe bağlı olarak muamele görmüş süt ürününün geri kazanılması, muamele görmüş süt ürününün kurutulması ve söz konusu kurutulmuş muamele görmüş süt başlatıcı maddesinin bir süt başlatıcı maddesine eklenmesini içerir.  
15  
20
4. İstem 1'e göre bir yöntem olup, burada söz konusu siyalik asit içeren protein süt veya sulandırılmış süt gibi bir süt ürünüde bulunur.
5. İstem 4'e göre bir yöntem olup, burada söz konusu süt ürünü, azaltılmış bir protein ve/veya yağ içeriğine sahiptir.  
25
6. İstemler 1 ila 5'ten herhangi birine göre bir yöntem olup, burada söz konusu yoğurt veya içilebilir yoğurt, en az bir geliştirilmiş özelliğe sahip olan bir yoğurt veya içilebilir yoğurttur.  
30
7. İstem 6'ya göre bir yöntem olup, burada söz konusu en az bir geliştirilmiş özellik, bir geliştirilmiş yapı, bir geliştirilmiş doku, bir artan viskozite, bir geliştirilmiş ağız hissi ve bir azaltılmış sinerez arasından seçilir.  
35

8. İstem 1 veya istemler 4 - 7'den herhangi birine göre bir yöntem olup, burada söz konusu siyalidaz ve söz konusu asitleştirici madde, söz konusu protein içeren siyalik asite eşzamanlı olarak eklenir veya söz konusu siyalidaz asitleştirme sırasında ilave edilir.
- 5
9. İstem 1 veya istemler 4 - 7'den herhangi birine göre bir yöntem olup, burada söz konusu siyalidaz bir asitleştirme maddesi eklenmeden önce ve asitleştirme gerçekleşmeden önce protein içeren bir siyalik asite eklenir ve birlikte inkübe edilir.
- 10
10. İstemler 1 ila 9'dan herhangi birine göre bir yöntem olup, burada söz konusu yoğurt sert yoğurt veya karıştırılmış yoğurttur.
- 15
11. İstemler 1 ila 10'dan herhangi birine göre bir yöntem olup, burada söz konusu siyalidaz bir bakteriyel veya mantar siyalidazdır.
- 20
12. İstem 11'e göre bir yöntem olup, burada söz konusu siyalidaz, bir mantar siyalidaz, tercihen bir *Penicillium* siyalidaz, daha tercihan bir *Penicillium chrysogenum* siyalidazdır.
- 25
13. İstemler 1 ila 12'den herhangi birine göre bir yöntem olup, ayrıca laktaz, karboksipeptidaz, proteaz, aminopeptidaz, beta-galaktosidaz, esteraz, transglutaminaz, lipaz, fosfolipaz, izomeraz, oksidaz veya peroksidaz gibi bir başka enzimin eklenmesini veya galakto oligosakarit veya fruktoz oligosakarit gibi bir prebiyotiğin eklenmesini veya laktik asit bakterileri veya bifidobakteriler gibi bir probiyotik kültürün eklenmesini veya ayrıca bir aroma, tekstürleştirici veya stabilitörün eklenmesini içerir.
- 30
14. İstemler 1 ila 13'ten herhangi birine göre koruma talep edilen bir yöntemle elde edilebilen bir yoğurt veya içilebilir yoğurttur.
15. Yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için bir parça kiti kullanımı olup, burada söz konusu parça kiti bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesi içerir.

16. İstem 15'e göre kullanım olup, burada söz konusu parça kiti ayrıca bir başka enzim, bir prebiyotik veya bir probiyotik veya bir aroma veya bir tekstürleştirici veya bir stabilizör içerir.

## TARİFNAME

### SÜT TEKNOLOJİSİNDE SİYALİDAZ KULLANIMI

Buluş, siyalidazın karıştırılmış, sert veya içilebilir yoğurttaki kullanımı ile ilgilidir.  
5 Siyalidaz, örneğin bir süt ürününün dokusunu iyileştirmek veya sinerezi azaltmak için kullanılabilir.

#### **Buluşun Altyapısı**

10 Geleneksel olarak, ekşi süt preparatları, uygun bir sıcaklıkta her bir ürüne özgü bir asitleştirme maddesi ile sütü asitleştirmek suretiyle üretilmektedir. Fermente süt ürünleri, süttten veya süttten türetilen bir hammaddeyi, laktik asit bakterileri gibi belirli mikroorganizmalarla inkübe etmek suretiyle elde edilir. Hammadde genellikle ineğin sütüdür, ancak bufalo, at, deve, koyun veya keçi gibi diğer hayvanların sütü de krema  
15 veya peynir altı suyu olarak kullanılabilir. Süt tam yağlı süt olabilir, ancak kısmen veya tamamen yağsız süt olabilir.

Sınırlayıcı olmayan bir örnek olarak, yoğurt daha ayrıntılı olarak tarif edilmiştir.

20 Geleneksel olarak, yoğurt başlatıcı kültürler olarak *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* ile sütün inokülasyonu ile üretilir. Asitleştirme yoluyla sütü korumak geleneksel bir yöntemdir. Asitleştirmeden önce, süte gerekli ham maddeler (lezzetlendiriciler, aroma maddeleri ve tekstürleştiriciler gibi) eklenebilir ve süt daha sonra pastörize edilir ve homojenleştirilir. Süt, her bir ürüne özgü bir pH değerine  
25 asitleştirilir. Perakende kabındaki fiziksel duruma göre üç temel yoğurt türü bulunur: Sert yoğurt, karıştırılmış yoğurt ve içilebilir yoğurt. Sert yoğurt, bir perakende kabına koyulduktan sonra fermente edilir ve karıştırılmış yoğurt, paketlenmeden önce fermantasyon tankında neredeyse tamamen fermente edilir, karıştırma ve pompalama esnasında yoğurt jeli parçalanır. İçilebilir yoğurt, karıştırılan yoğurdun bir varyantı olup,  
30 burada jel parçalama adımı, bir sıvının üretilmesi için daha şiddetlidir, içilebilir bir ürün pektinlerin kullanımı ile koloidal olarak daha da stabilize edilir. Çoğu zaman, içilebilir yoğurt için bir proses, lezzetlendiriciler, aromalar, hidrokolloidler, meyve suyu ve benzeri içeren karıştırılmış yoğurda ikinci bir sulu fazın karıştırılmasını içerir. Her çeşit yoğurt, su ayırma fenomenini (sinerez) geçirir.

Geleneksel olarak sütteki kuru madde içeriği, ekşi süt ürünlerinin dokusunu ayarlamak amacıyla artırılır veya azaltılır. Kuru madde içeriği, buharlaştırma veya süttten ultra-veya nano-filtrasyon yoluyla veya tozların kullanımı ile suyun çıkarılmasıyla artırılabilir. Hammaddenin protein içeriği, örneğin süt, bitmiş ürünün dokusunu, ekşi süt preparatının dokusunun, protein içeriğini artırarak veya azaltarak, daha kıvamlı veya daha akıcı bir hale modifiye edilmesine olanak sağlamak için ekşi taze bir süt ürününü etkileyebilir. Ham maddenin protein içeriği, örneğin süt, suyu buharlaştırmayla veya protein tozu ilavesiyle uzaklaştırmak suretiyle artırılabilir. Protein tozu, süt tozu, peynir altı suyu proteini tozu veya kazein protein tozu gibi süttten kaynaklanabilir, ancak süttten kaynaklanmayan proteinler de kullanılabilir. Bu yöntemleri kullanarak sütün güçlendirilmesi, özellikle yoğurt gibi ekşi bir süt preparatı yağı alınmış veya yağdan arındırılmış süttten üretildiğinde yararlıdır. Yağ içeriği, nihai ürünün dokusu üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğundan, herhangi bir katkı yapılmadan üretilen az yağlı yoğurtlar suludur. Piyasa tercihi çok yapılandırılmış ekşi süt mamulleri üzerinde olduğundan, asitleştirme öncesi sütün takviye edilmesi avantajlıdır. Bununla birlikte, buharlaşma veya protein tozu katkısı kullanımı, nihai ekşi süt preparatının maliyet fiyatını artırır. Ayrıca, fermantasyon öncesinde süte toplam katıların yüksek konsantrasyonları ilave edildiğinde, bakteri gelişimini inhibe eden koşullar ortaya çıkabilir, bu da uzun fermantasyon sürelerine ve kötü asit oluşumuna neden olabilir.

20

Ürünün stabilitesi ve geliştirilmiş kıvamlaştırma için sıklıkla kullanılan önlemlerden biri, stabilizörler veya tekstürleştiricilerin (kimyasal olarak modifiye edilmiş nişasta, yerli nişasta, karragenon, guar sakızı, pektin, jelatin, vb.) ilave edilmesidir (Everett, DW, & McLeod, RE (2005) Int. Dairy J. 15, 1175-1183). Bununla birlikte, bu yiyecek katkı maddeleri, yoğurdun gerçek tadını ve aromasını olumsuz şekilde etkileyebilir. Buna ek olarak, bu hidrokolloidlerin kullanımı doğal olmayan bir görüntüye neden olur ve hiçbir ülkede buna izin verilmemektedir. Dolayısıyla, ikinci durumda, yoğurt üreticileri, nihai ürünlerin kabul edilebilir bir dokusunu garanti etmek için farklı teknolojilerden faydalanmalıdırlar. İçilebilir yoğurttaki protein agregalarının yapısı çok ağır hasar gördüğünden, homojen ve uniform bir ürün oluşturmak için protein floklarını koloidal olarak stabilize etmek için genellikle pektinler gibi hidrokolloidler eklenir.

Ekzopolisakkaritleri (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* veya her ikisi) üreten suşlar içeren yoğurt başlatıcı kültürlerinin kullanımı, yukarıda belirtildiği gibi süt-dışı tekstürleştiriciler için umut verici bir alternatiftir. Yoğurt bakterilerinden gelen

35

eksopolisakkaritler, doku oluşturan bileşenler olarak işlev görebilen, hücre içi sentezlenmiş ve hücre dışı salgılanan mikrobik polisakkaritlerdir. Yerinde, diğer bir deyişle ekopolizakar üreten suşlar içeren bir yoğurt başlatıcı kültürü ile aşılması yoluyla üretilen eksopolisakaritler, su tutma ve dolayısıyla viskoziteyi iyileştirmek ve böylece iyi bir nihai dokuyu garanti etmek için sinerezden kaçınma ve yoğurt yendiği zaman ağızdaki hissi etkilemeden değiştirme kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, *Streptococcus thermophilus* gibi termofilik laktik asit bakterileri tarafından sütteki ekpolisülkarit üretimi düşüktür ve yoğurt üretiminde geleneksel toplu proses teknolojileri kullanılarak gerçekleştirildiğinde stabil değildir. Ek olarak, aşırı miktarda ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri genellikle asitleştirmede zayıftır. Bu nedenle, endüstriyel bir süreçte istenmeyen yoğurt yapma süreci yavaşlar.

Geçmişte, ekşi süt ürünlerinin yapısını arttırmak için enzim yardımcı prosesler tarif edilmiştir. Süt preparatlarının, özellikle ekşi süt preparatlarının imalatında doku değiştiren bir transglutaminaz enziminin kullanılması bilinmektedir. Soğuk ekşi süt ürünlerinde (yoğurt, sert tip yoğurt, viili, fermente süt gibi) ekstrakte preparatlarında, bir transglütaminaz enzimi kullanılması, dokuyu sertleştirecek, dokuyu daha ince olacak şekilde değiştirip sinerezi azaltacaktır. WO2007/060288 ve buradaki referanslar, bir süt ürününün asitleştirilmesi sırasında transglütaminazın kullanımını tarif etmektedir. Ekşi süt preparatlarının üretiminde transglutaminaz kullanımının yüksek maliyeti büyük bir dezavantajdır. Transglutaminazı üretmek zor olduğundan, bu enzimin maliyeti yüksektir.

Ekşi süt preparatlarının, özellikle düşük yağlı preparatların dokusunu değiştirmek için yapılan tüm çalışmalara rağmen, henüz ekşi süt preparatlarının hazırlanmasında pahalı yağsız süt tozu ilavesinin yaygın kullanımını azaltabilecek tatmin edici bir yöntem geliştirilmemiştir. Dahası, karıştırılmış yoğurt, sert yoğurt veya içilebilir yoğurt gibi ekşi süt ürünleri gibi mevcut ekşi süt ürünlerinin özelliklerini geliştirmek için (diğer bir deyişle, pahalı doku geliştirici katkı maddelerinin ortak kullanımını azaltmadan) tatmin edici bir yöntem geliştirilmemiştir.

### **Buluşun Kısa Açıklaması**

Şaşırtıcı bir şekilde, bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanması prosesinde bir siyalidaz enziminin eklenmesinin, yoğurt veya içilebilir yoğurt dokusuna herhangi bir

hasar veya olumsuz etki yapmaksızın, protein içeriğinde bir azalmaya veya kullanılan stabilizatörler veya tekstürleştiricilerin (pektin gibi) miktarında bir azalmaya olanak tanıdığı bulunmuştur. Dolayısıyla, siyalidaz kullanımı, nihai dokuyu etkilemeden ekstra protein eklenmesini azaltabilir. Alternatif olarak, bir siyalidaz enzimi eklenerek sertlik veya viskozite arttırılabilir veya sinerez azaltılabilir. Siyalidaz süte ilave edilebilir ve isteğe bağlı bir ısıyla muamele edilmeden önce uygun bir sıcaklıkta inkübe edilebilir. Alternatif olarak, siyalidaz, fermentatif asitleştirme sırasında, isteğe bağlı olarak sütün ısıyla muamele edilmesinden sonra eklenebilir. Siyalidaz ayrıca, yoğurt veya içilebilir yoğurdun bir fraksiyonunu veya yoğurt veya içilebilir yapımında ilave edilen ek süt proteinin ön muamelesi için kullanılabilir.

### Şekillerin açıklaması

Şekil 1: Karıştırılmış yoğurt için 1 hafta sonraki Brookfield ölçümleri. Yoğurt, siyalidazla (noktalar) muamele edilmemiş kontrol yoğurduyla (üçgenler) karşılaştırıldı.

### Buluşun detaylı açıklaması

$\kappa$ -kazein sütteki kazein misellerinin bir parçasıdır ve bilinen pozisyonlarda siyalik asit kalıntıları içeren bir glikoproteindir (Cases et al., J Food Sci (2003) 68, 2406-2410). Glikozilasyon ve siyalik asit içeriğindeki farklılıklardan dolayı  $\kappa$ -kazein popülasyonunda bir mikro-heterojenlik olduğu bilinmektedir (Robitaille et al., Food Res Int (1995) 28, 17-21). Birçok çalışma, *Clostridium perfringens*'den türetilen siyalidazı kullanarak siyalik asit kalıntılarının uzaklaştırılmasının etkisini tarif etmektedir. İncelenen parametreler, kazein miselin ısı ve kimozin bozunmasına karşı stabilitesidir. Gibbons et al. (Biochim Biophys Acta (1962) 56, 354-356) saflaştırılmış  $\kappa$ -kazein solüsyonlarını kullandı ve siyalik asit kalıntılarının uzaklaştırılmasının  $\kappa$ -kazein üzerindeki kimozinin eylemini etkilemediğini gösterdi. Vreeman et al. (Biochem J (1986) 240, 87-97), kimozinin, saflaştırılmış  $\kappa$ -kazein fraksiyonlarına glikosilasyonlu veya glikosilasyonsuz kinetik davranışını karşılaştırmışlar ve deglimosile edilmiş  $\kappa$ -kazeinin, kimozin için daha iyi bir substrat olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, Minkiewicz et al. (Pol J Food Nutr Sci (1993), 243, 39-48) yapay olarak sulandırılmış bir kazein misel sistemini kullanarak, siyalik asit kalıntılarının kazein misellerin ısı kararlılığına katkıda bulunduğunu göstermiş ve bu daha sonra Robitaille et al. (Food Res Int (1995) 28, 17-21) tarafından onaylanmıştır. Robitaille et al. (Food Res Int (1993) 26, 365-369), ayrı bir çalışmada, siyalik asit

tortularının  $\kappa$ -kazeinden uzaklaştırılmasının pıhtılaşma süresi üzerinde önemli bir etkisi olmadığını fakat kaymak sertliğinin azaldığını gösterdi. WO02074097, siyalidaz (nöraminidaz) varlığında kappa-kazininin peynir üretimine yönelik süt pıhtılaşmasını desteklemek için kısmi enzimatik deglikosilasyonunu tarif eder. Bununla birlikte, bu  
5 yayınlardan hiçbiri, ekşi süt preparatlarının üretimi için siyalidazın kullanımını açıklamamakta veya önermemektedir.

WO2008/101893 sayılı patent başvurusunda filamentli mantar *Penicillium chrysogenum*'dan yeni bir siyalidaz üretilmesi ve gıda uygulamalarında kullanılması  
10 açıklanmaktadır. Bununla birlikte, bu siyalidazın ekşi süt preparatlarının üretimi için spesifik kullanımı açıklanmamaktadır.

Mevcut buluş, bir siyalidaz enzimi kullanımı ile yoğurt veya içilebilir yoğurt imal etmek için bir yöntemdir. Yöntem dokunun modifikasyonunu, bilinen yöntemlerden  
15 daha avantajlı ve kolay bir şekilde sağlar. Buna ek olarak, yöntem eklenen protein içeriğinde (anlamlı) bir azalmaya veya yoğurt veya içilebilir yoğurdun dokusuna herhangi bir hasar vermeden veya olumsuz bir etki yaratmadan eklenen stabilizatörler veya tekstürleştiricilerin miktarında bir azalmaya olanak sağlar.

20 Bu, imalatın, geleneksel bir protein seviyesindeki imalattan daha düşük hammadde maliyet seviyesine neden olur.

Teoriye bağlı kalmaksızın, bir kazein miselinde, siyalik asitin miselin dış tarafında bulunduğu ve kazein miselinin toplam yüküne katkıda bulunduğu düşünülmektedir.  
25 Siyalidaz, siyalik asidi kazein miselinden çıkarırken aynı zamanda misel yüzeyinden negatif yükü giderir ve kazein miselinin koloidal yapısını değiştirir. Farklı bir yük ile, pH değişimiyle indüklenen agregasyon prosesleri de değişir ve sonuç olarak, asitleştirme üzerinde farklı bir agrega türü oluşturulabilir. Bu, siyalidaz muamelesinden sonra daha güçlü bir protein ağı veya daha az protein içeren eşit derecede güçlü bir ağ haline gelir.  
30 Ve bu etki fermentatif veya kimyasal asitleştirme yolundan bağımsızdır.

Birinci uygulamada, buluş, bir siyalidazın ve bir asitleştirici maddenin bir protein içeren bir siyalik aside eklenmesi, asitleştirmenin gerçekleşmesi ve isteğe bağlı olarak üretilen  
35 yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren bir yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için bir yöntem sağlamaktadır.

“Asitleştirici madde” terimi, bir mikrobiyolojik başlatıcı veya bir kültür, bir kimyasal asitleştirme maddesi veya bunların karışımlarını belirtir. Asitleştirme, en azından bir ürüne özgü kültür ile fermentasyon ve/veya organik veya inorganik asitler gibi kimyasal asitleştirme maddeleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Mikrobiyal başlatıcı veya kültür bir veya daha fazla farklı mikrobik tür içerebilir. Daha tercihen, mikrobiyal başlatıcı veya kültür, bir veya daha fazla bakteri türü, daha tercihen bir veya daha fazla laktik asit bakteri türünden oluşur.

- 10 Ekşi süt preparatları, bakterilerin kullanımı ile örneğin *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ve ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. örneğin *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ve/veya *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter orientalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* sp.
- 15 ve/veya *Pediococcus* türleri veya çeşitli türlerin kombinasyonlarının gibi laktik asit bakterileri ile hazırlanabilir. Örnek olarak yoğurt, tipik olarak, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'u başlatıcı kültürler olarak kullanarak bunların süt inokülasyonu ile hazırlanır. Başka bir örnek olarak, twarog, tipik olarak, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp. veya *Streptococcus thermophilus*
- 20 kullanarak hazırlanır. Uzman kişi, belirli bir ürünün bilgisine dayanarak, doğru tür(ler)de kültür(leri) seçebilmektedir. Başlatıcı kültüründeki türler tam olarak tanımlanamayabilir ve mayalar veya filamentli mantarlar gibi mantarları da içerebilir.
- 25 Uzman kişi, en uygun mikrobiyolojik başlatıcıyı veya kültürü seçebilmektedir.

- Kimyasal asitleştirici madde bir asit, daha tercihen organik asit, örneğin sitrik, asetik, formik, propionik veya laktik asit veya başka bir organik asit veya bunların kombinasyonları olabilir. Alternatif olarak, asitleştirme, glukono-delta-lakton kullanarak gerçekleştirilebilir. Siyalidaz enziminin eklenmesi ve başlatıcı maddesinin protein kaynağındaki protein muhteviyatının isteğe bağlı bir şekilde ayarlanması (diğer bir deyişle protein içeren siyalik asit içeren, örneğin sınırlandırıcı olmamakla birlikte süt veya sulandırılmış süt gibi madde; başlatıcı maddesi, yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için kullanılan maddedir), asitleştirme, karşılık gelen yoğurt veya geleneksel olarak üretilen içilebilir yoğurt ürünleri ile aynı şekilde, her belirli durum ve/veya her biri

özel ürün için uygun bir asitleştirme maddesinin kullanılmasıyla ve uygun reaksiyon koşulları ile gerçekleştirilebilir. Başlatıcı maddesine (örneğin süt veya sulandırılmış süt) siyalidaz ile muamele, isteğe bağlı bir ısıl prosesden önce gerçekleştirilebilir. Siyalidaz ile işlenmiş süt, asitleştirmeden önce ısıtılabilir. Alternatif olarak, isteğe bağlı bir ısıl prosesden sonra siyalidaz eklenebilir. Siyalidaz daha sonra tercih edilen bir asitleştirici madde kullanılarak asitleştirme sırasında kullanılabilir. Tercih edilen bir uygulamada, siyalidaz muamelesi asitleştirme öncesi gerçekleştirilir, diğer bir deyişle, tercih edilen bir uygulamada, buluş, bir siyalidazın ve bir asitleştirici maddenin bir siyalik asit içeren proteine ilave edilmesini, asitleştirmenin gerçekleşmesine olanak sağlanmasını ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için bir yöntem temin eder; burada söz konusu siyalidazın söz konusu asitleştirici madde eklenmeden önce ilave edilir ve burada söz konusu siyalidaz ve protein içeren söz konusu siyalik asit, serbest siyalik asit elde etmek için yeterli bir süre inkübe edilir ve yeterli serbest siyalik asit elde edilmesinden sonra söz konusu asitleştirici madde eklenir.

Bir yoğurt veya içilebilir yoğurt imalatında kullanılan protein kaynağı, bir siyalik asit içeren protein olabilir. Bir "siyalik asit içeren protein", genellikle bir hayvansal kökenli, bir peptid zincirine bağlı bir veya daha fazla siyalik asit grubu içeren bir proteindir. Protein içeren bir siyalidazın diğer kaynakları, bitki, mantar, maya ve bakterilerdir. Siyalik asitin peptid zincirine tutturulması doğrudan veya glikosil grupları vasıtasıyla olabilir. Genellikle 'proteinleri içeren siyalik asit' glikosile edilmiş olup  $\alpha$ 2-3 bağlı veya  $\alpha$ 2-6 bağlı terminal siyalik asitler içerir. 'Protein içeren siyalik asit', glisomakropeptit (GMP) veya proteoz pepton gibi küçük bir peptid veya kappa-kazein gibi daha büyük bir protein olabilir. Protein içeren siyalik asit, tipik olarak bir başlatıcı maddesinin, diğer bir deyişle bir süt veya sulandırılmış süt gibi bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanması için bir temel olarak kullanılan maddenin bir parçasıdır.

Tipik olarak, reaksiyon koşulları, üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun spesifik türüne dayanılarak seçilir. Bu koşullar, asitleştirmenin ilerlemesine izin vermek için seçilir. Aynı zamanda, koşullar, uygulanan siyalidazın, siyalik asit içeren protein üzerinde reaksiyonunu gerçekleştirmesine olanak sağlamak için en azından belli bir süre aktif olması şeklindedir. Yoğurt gibi tipik bir ekşi süt preparatının asitleştirilmesi, başlatıcı kültürün 42°C'de pastörize süte eklenmesi ve 4-5 saat inkübasyonu ile başlar. Bu süre

zarfında, preparatın pH'ı 6.5-6.7'den 4.0-4.5'e düşecektir. Siyalidaz başlatıcıta veya asitleştirme prosesi sırasında ilave edilebilir.

Asitleştirme prosesi sırasında yeterli zaman olmadığında, örneğin asitleştirme prosesi  
5 asit ilavesi ile gerçekleştirildiğinde, siyalidaz prosesi tercihen asitleştirme öncesinde gerçekleştirilir. Tipik olarak, siyalidaz muamelesi, 37 derece Celsius gibi yükseltilmiş sıcaklıkta minimum 1 saat veya 8 derece Celsius gibi düşük bir sıcaklıkta daha uzun sürecektir. Belirgin bir şekilde, inkübasyon süresi, siyalidaz dozajını arttırarak veya azaltarak ayarlanabilir. Bu durum, siyalidazın ısıl prosesle inaktive edilmesi gereken  
10 prosesler için de geçerlidir. Genellikle yoğurt için süt fermantasyonu öncesinde (örneğin 5 dakika 90-95°C) uygulanan ısıl proses, enzimi inaktive etmek için yeterlidir. Yine başka bir tercih edilen uygulamada buluş, bir siyalidazın ve bir asitleştirici maddenin bir siyalik asit içeren proteine ilave edilmesini, asitleştirmenin gerçekleşmesine ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri  
15 kazanılmasını içeren bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlama yöntemi sunar ve aşağıdaki adımları içerir:

- siyalidaz ile uygun bir başlatıcı maddesinin (örneğin süt veya sulandırılmış süt), serbest siyalik asit elde etme amaçlı koşullar altında inkübe edilmesi
- siyalidaz ile muamele görmüş başlatıcı maddesinin bir ısı muamelesine tabi  
20 tutulması (örneğin 90-95 derece Celsius'da 2-5 dakika)
- siyalidaz ve ısı ile muamele görmüş başlatıcı maddesine bir asitleştirme maddesi eklenmesi
- asitleştirmenin gerçekleşmesine ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasına olanak sağlanması.

25

Hazırlanan özel preparatlara bağlı olarak bir geri kazanma adımının eklenmesi gerekebilir. Örnek olarak yoğurt üretimi anlatılmaktadır. Perakende kabındaki fiziksel duruma göre üç temel yoğurt türü bulunur: sert yoğurt, karıştırılmış yoğurt ve içilebilir yoğurt. Sert yoğurt için, aşılınmış süt bir perakende kutusuna konduktan sonra  
30 fermente edilir. Karıştırılmış yoğurt, paketlenmeden önce bir fermantasyon tankında neredeyse tamamen fermente edilir; karıştırma ve pompalama esnasında yoğurt jeli parçalanır. Karıştırılmış yoğurt üretildiğinde, üretilen yoğurt nihai ambalajına aktarılmalıdır (diğer bir deyişle, geri kazanılması gerekir). Sert yoğurt üretildiğinde bu türlü bir geri kazanım gerekli olmayacaktır. Başka bir deyişle, bir geri kazanım adımının  
35 gerekli olup olmadığı, üretilen spesifik preparatın miktarına bağlıdır. Teknikte uzman

kişi, bir geri kazanım adımının dahil edilmesinin gerekip gerekmediğini belirleme yeteneğine sahiptir.

İçilebilir yoğurt için, proses, kabaca karıştırılmış yoğurt prosesi ile aynı yolu izler. Ancak  
5 fermentasyondan sonra yoğurt jeli parçalanır ve yapıyı tamamen parçalayan büyük ölçüde bir kesme prosesine tabi tutulur. Stabil bir ürün elde etmek için, pektin gibi bir başka sulu fazda çözülen bir stabilizatör ilave edilebilir. Bu ayrı sulu fazın nispi hacmi önemli olabilir, hacim olarak yüzde 50'den fazla olabilir. Bu faz, (asitleştirilmiş) sudan oluşabilir veya lezzetlendiriciler, meyve suyu, aromalar, lifler, diğer hidrokolloidler ve  
10 (modifiye) nişastalar ve benzeri gibi diğer bileşenleri içerebilir. İçilebilir yoğurtlar, fermente edilmeden önce sulu bir faz (su, isteğe bağlı olarak aroma ve diğer isteğe bağlı içerikler ile) ile seyreltilen sütten hazırlanabilir. Benzer bir şekilde asitlendirilmiş sütlü içecekler hazırlanır; burada laktik asit bakterileri ile fermentasyon yerine, laktik asit, sitrik asit veya başka bir gıda sınıfı asit gibi bir kimyasal asit ilavesiyle asitleştirme  
15 yapılır.

Buluşun bir yönüne göre, başlatıcı maddesinin bir fraksiyonuna, siyalidaz kullanarak ayrı ayrı muamele edilebilir ve ürüne asitleştirmeden önce veya sonra (tercihen önce) ilave edilebilir. Bu fraksiyon son preparata eklenmeden önce ilk olarak daha fazla  
20 işlenebilir. Örneğin, siyalidaz, seçilecek bir asitleştirici madde kullanarak asitleştirme sonrası bir yoğurt veya içilebilir yoğurdu üretmek üzere bir preparatın içerisine eklenebilen siyalidazla muamele görmüş yağsız süt tozunu üreten siyalidazla muamele görmüş yağsız sütün kurutulmasından önce yağsız süte muamele etmek için kullanılabilir. Veya protein içeren bir (önceden izole edilmiş) siyalik asit siyalidaz ile  
25 muamele görmüş bir proteini üretmek üzere prosesden geçirilir ve bu protein bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanmasında kullanılır. Buluş, dolayısıyla, aynı zamanda, bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanması için bir yöntem olup, bir siyalidaz ve bir asitleştirici maddenin bir protein içeren bir siyalik aside eklenmesi ve asitleştirmenin gerçekleştirilmesine olanak sağlanması ve isteğe bağlı olarak yoğurt veya içilebilir  
30 yoğurdun geri kazanılmasını, ki burada söz konusu siyalik asit içeren proteininin en azından bir kısmı söz konusu siyalidaz ile ön-inkübasyon prosesine tabi tutulur; isteğe bağlı olarak muamele görmüş proteinin geri kazanılmasını ve ayrıca muamele görmüş proteinin söz konusu yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için kullanılan bir süt başlatıcı maddesine eklenmesini içermektedir. Alternatif olarak, buluş, bir siyalik asit

içeren proteinden bir yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için aşağıdaki adımları içeren bir yöntem sunmaktadır:

- muamele görmüş proteini elde etmek için protein içeren siyalik asitin en azından bir bölümünün bir siyalidaz ile inkübe edilmesi
- 5 – isteğe bağlı olarak muamele görmüş proteinin geri kazanılması
- bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için uygun bir başlatıcı maddesine prosesden geçirilmiş protein eklenmesi
- asitleştirme maddesi eklenmesi
- asitleştirmenin gerçekleşmesine olanak sağlanması ve isteğe bağlı olarak
- 10 üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılması. Tercihen, söz konusu başlatıcı maddesi, protein ihtiva eden siyalik asit içerir. İsteğe bağlı olarak, ilave siyalidaz asitleştirme öncesi veya sırasında ilave edilebilir.

Buluş, aynı zamanda, bir siyalidaz ve bir asitleştirici maddenin bir protein içeren bir siyalik aside eklenmesi, asitleştirmesinin gerçekleşmesine olanak sağlaması ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılması; burada söz konusu siyalik asit içeren protein, isteğe bağlı olarak süt başlatıcı maddesinin içinde yer alır, muamele görmüş süt başlatıcı maddesinin geri kazanılması, muamele görmüş süt başlatıcı maddesinin kurutulması ve söz konusu kurutulmuş muamele görmüş süt başlatıcı maddesinin, söz konusu yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanması için kullanılan bir (muamele edilmemiş) süt başlatıcı maddesine eklenmesini içeren bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlama yöntemi sunar. Alternatif olarak, buluş ayrıca bir siyalik asit içeren proteinden bir yoğurt veya içilebilir yoğurdu hazırlamak için aşağıdaki adımları içeren bir yöntem sunmaktadır:

- 25 – bir süt başlatıcı maddesinin siyalidaz ile inkübe ederek muamele görmüş bir süt başlatıcı maddesi elde edilmesi
- isteğe bağlı olarak muamele görmüş süt başlatıcı maddesinin geri kazanılması
- isteğe bağlı olarak muamele görmüş süt başlatıcı maddesinin kurutulması
- söz konusu (isteğe bağlı olarak kurutulmuş) muamele görmüş süt başlatıcı maddesinin bir (muamele edilmemiş) süt başlatıcı maddesine eklenmesi
- 30 – asitleştirici madde eklenmesi
- asitleştirmenin gerçekleşmesine ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasına olanak sağlanması. Tercihen, söz konusu başlatıcı maddesi, protein içeren siyalik asit içerir. İsteğe bağlı olarak, ilave

siyalidaz, asitleştirme öncesi veya sırasında ilave edilebilir. Tercihen süt başlatıcı maddesi, süt veya sulandırılmış süttür.

5 Buluşa göre olan bir yöntemde, hammadde sütü bu şekilde veya önceden işlenmiş ve/veya istenen şekilde fraksiyonlara ayrılan ham madde şeklinde genellikle protein kaynağını oluşturmaktadır. Bu bağlamda, genel olarak bir başlatıcı maddesi ve spesifik olarak bir hammadde sütü, örneğin bir hayvandan elde edilen sütün, örneğin bir inek, manda, koyun veya keçi, bu şekilde veya çeşitli şekillerde işlenmiş hali anlamına gelir. Süt örneğin yağsız süt, düşük yağlı, laktoz içermeyen veya düşük laktozlu süt haline 10 gelmek üzere yağ veya laktozu çıkarılarak işlenebilir. Bu bağlamda hammadde sütü, örneğin, yoğurt, viili ve fermente süt üretimi için kullanılan ön işlenmiş veya işlenmemiş sütleri de ifade eder.

15 Bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanması için kullanılan sütün bir ön işlenmiş süt fraksiyonundan elde edilmesi de mümkündür. Örneğin, süt; siyalidaz ile muamele edilmeden önce yağsız süt tozunun bir sıvıda çözülmesi (diğer bir deyişle sulandırılmış süt elde edilmesi) ve tercih edilen bir asitleştirme maddesi ile asitleştirme yoluyla elde edilebilir. Başka bir deyişle, başlatıcı maddesi tercihen süt örneğin, yağsız süt, tam yağlı süt, krema veya bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşur. Başka 20 uygulamalarda süt başlatıcı maddesi, tamamen veya kısmen kuru süt fraksiyonlarından, örneğin tam yağlı süt tozu, yağsız süt tozu, kazein, kazeinat, toplam süt proteini veya ayran tozu veya bunların herhangi bir kombinasyonu ile hazırlanır. Başka bir deyişle, başlatıcı maddesi, yağsız süt, tam yağlı süt, krema veya bunların herhangi bir kombinasyonundan veya tamamen veya kısmen kurutulmuş süt 25 fraksiyonlarından örneğin; tam yağlı süt tozu, yağsız süt tozu, kazein, kazeinat, toplam süt proteini veya ayran tozu veya bunların herhangi bir kombinasyonundan seçilebilir.

Buluş, bu nedenle, bir siyalidazın ve asitleştirici maddenin, protein içeren bir siyalik asit ilavesiyle asitleştirmenin gerçekleşmesine ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya 30 içilebilir yoğurdun geri kazanılmasına dayanan bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlama yöntemi sunar; burada söz konusu protein içeren siyalik asit, süt veya sulandırılmış süt gibi bir süt başlatıcı maddesinde bulunur. Tercihen, söz konusu süt başlatıcı maddesi düşük yağlı, yağsız, düşük proteinli veya proteinsiz süttür.

Süt, örneğin kromatografik ayırma ve/veya mikro, nano veya ultra-filtreleme yoluyla, farklı miktarlarda farklı bileşen içeren fraksiyonlara bölünebilir ve bu fraksiyonlar, sırayla, süt veya farklı karışımlar şeklinde protein içeriğini ayarlamak için kullanılabilir.

- 5 Yukarıda tarif edildiği gibi şaşırtıcı bir şekilde, siyalidaz enziminin bir yoğurt veya içilebilir yoğurt yapma prosesi içine eklenmesinin, yoğurt veya içilebilir yoğurdun protein içeriğinde preparatın dokusu üzerinde herhangi bir hasar veya olumsuz etki yapmaksızın bir azalmaya veya stabilizatörlerin ve/veya tekstürleştiricilerin miktarında bir azalmaya olanak tanıdığı bulunmuştur. Bu nedenle, siyalidaz kullanımı, ekşi bir süt
- 10 preparatına, yoğurt veya içilebilir yoğurdun nihai dokusunu etkilemeden ilave protein eklenmesini azaltabilir.

- Bu, örneğin az yağlı veya yağsız yoğurt, diğer bir deyişle yağı alınmış veya yağdan arındırılmış sütten üretilen bir yoğurt üretiminde çok yararlıdır. Yağ içeriği, nihai ürünün
- 15 dokusu üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğundan, hiç katkı yapılmadan üretilen az yağlı veya yağ içermeyen yoğurtlar incedir. Piyasa tercihi çok yapılandırılmış ekşi süt mamulleri üzerinde olduğundan, sütün asitleştirmeden önce takviye edilmesi avantajlıdır. Bu türlü takviye, tipik olarak, hidrokolloidler gibi protein veya tekstürleştiricilerin eklenmesiyle elde edilir. Siyalidaz eklenmesinden dolayı, eklenen
- 20 protein veya tekstürleştirici miktarı (örneğin pektin, nişasta veya jelatin miktarı), nihai ürünün özelliklerini olumsuz bir şekilde etkilemeksizin azaltılabilir.

- Tercihen, söz konusu azaltma en az %10, %20 veya %30'dur. Daha fazla tercih edilen, protein veya tekstürleştirici veya stabilizör ekleme/miktarında en az %40, 50 veya 60
- 25 oranında bir azalma olmasıdır.

- Stabilizatörler ve/veya tekstürleştiriciler açısından aşağıdaki örnek sağlanmaktadır. Asitleştirilmiş süt ürünleri ve içilebilir yoğurtlar tipik olarak protein floklarını stabilize etmek ve sinerezi önlemek için pektin kullanarak hazırlanır. Bir asitlendirilmiş sütlü
- 30 içecek, örneğin sulandırılmış süte veya ham (isteğe bağlı olarak suyla seyreltilmiş) süte bir pektin+şeker çözeltisi eklenerek hazırlanır. Elde edilen madde karıştırılır. Asit ve/veya meyve suyu ilave ederek pH 3.8-4.2'ye getirilir. Elde edilen karışım homojenize edilir, 5 ila 15 saniye boyunca 90°C'ye ısıtılır, ortam sıcaklığına soğutulur ve aseptik olarak doldurulur. Prosese bir siyalidaz eklenmesi (örneğin, sulandırılmış süt veya ham

(isteğe bağlı olarak suyla seyreltilmiş) süt) eklenen pektin miktarında bir azalmaya olanak sağlar.

Buluş, dolayısıyla, bir siyalidazın ve asitleştirici maddenin, protein içeren bir siyalik asit ilavesiyle asitleştirmenin gerçekleşmesine ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasına dayanan bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlama yöntemi sunar; burada söz konusu protein içeren siyalik asit, süt veya sulandırılmış süt gibi bir süt başlatıcı maddesinde bulunur; burada söz konusu süt başlatıcı maddenin, protein ve/veya yağ içeriği azaltılmıştır. Alternatif olarak, buluş, bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin protein içeren bir siyalik asit içerisine eklenmesini, asitlendirmenin gerçekleşmesini ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren bir yöntem sağlar; buradaki söz konusu protein içeren siyalik asit, azaltılmış protein sütü, düşük yağlı süt, yağsız süt, düşük proteinli sulandırılmış süt, düşük yağlı sulandırılmış süt veya yağsız sulandırılmış süt gibi azaltılmış bir protein içeriği ve/veya yağ içeriğine sahip olan bir süt başlatıcı maddesinde bulunur.

'Azaltılmış protein'e sahip bir yoğurt veya içilebilir yoğurt, geleneksel yoğurt veya içilebilir yoğurda kıyasla, üretim sürecinde daha az ek proteinin ilave edildiği ekşi süt preparatlarını da kapsayabilir. Bu uygulamada protein içeren siyalik asitin siyalidaz ile muamelesi, azalmış proteine sahip yoğurt veya içilebilir yoğurdun yapısını geliştirecektir, şöyle ki nihai yoğurt veya içilebilir yoğurdun kabul edilebilir bir yapıya ulaşması için hiç protein veya azaltılmış ek protein gerekli değildir.

Bir yoğurt türü ürünün protein içeriği ağırlık olarak %0.5 kadar düşük olabilir. Daha tercihen, protein içeriği ağırlık olarak %2 ila 3 aralığındadır. Protein içeriği için gerçek bir üst sınır yoktur, ancak uygulamada %10'luk bir protein içeriği nadiren aşılacaktır. Tercih edilen bir uygulamada, protein içeriği ağırlık olarak %0,5 ila 10 arasında olacaktır.

30

Buluşun bir başka uygulamasında, yöntem, bundan başka, bu amaca uygun sıvı ilavesiyle protein kaynağının protein içeriğini azaltmak için bir adımı içermektedir. Bu durumda, yöntem aşağıdaki adımları içerir: süt süzüntüsü, peynir altı suyu, laktoz fraksiyonu, bunların bir konsantresi veya süt süzüntüsü, peynir altı suyu, laktoz fraksiyonu ve/veya bunların bir konsantresini içeren bir karışım gibi protein içeriğini

35

azaltmak için müsait bir sıvının bir protein kaynağına ilavesi, siyalidaz enziminin ve bir asitleştirme maddesinin protein kaynağına ilavesi, elde edilen ürünün asitleştirilmesi ve elde edilen ürünün geri kazandırılmasına yöneliktir. Buluşa göre bir yöntemin bir avantajı, yukarıda tarif edilen, bilinen yöntemlerin kullanımından daha düşük (ilave) protein içeriğine sahip sütün kullanılmasını sağlar.

Yine başka bir uygulamada buluş, bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin bir protein içeren bir siyalidaz ve asitleştirici bir madde ilave edilerek asitleştirmenin gerçekleşmesi ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlama yöntemi sunar; söz konusu yoğurt veya içilebilir yoğurt, en azından bir geliştirilmiş özelliğe sahip bir yoğurt veya içilebilir yoğurtur. Tercihen, söz konusu en az bir geliştirilmiş özellik, bir geliştirilmiş yapı, bir geliştirilmiş doku, bir artan viskozite, bir geliştirilmiş ağız hissi ve bir azaltılmış sinerez arasından seçilir.

"Geliştirilmiş yapı" ve "geliştirilmiş doku" terimleri, bir ürünün görünüşünün ve dokusunun artmış kalitesini ifade eder. Mevcut buluşa göre "geliştirilmiş yapı" ve "geliştirilmiş doku" genel olarak nihai yoğurt veya içilebilir yoğurdunun artan bir viskozitesi ile ilgilidir.

"Artan viskozite" terimi, bir maddenin akmaya karşı artmış bir direncini ifade eder. Mevcut buluş ile ilgili olarak, viskozite, bir Brookfield cihazının veya bir reometrenin kullanılması da dahil olmak üzere bu uygulamanın örneklerinde tarif edilen yöntemler veya teknikte bilinen viskoziteyi ölçmek için herhangi bir başka geleneksel yöntem, örneğin bir posthumus hunisi veya bir Bostwick Kıvamölçer ile ölçülür.

"Ağız hissi" terimi, bir maddenin ağızda algılandığı şekildeki dokusuna veya yapısına karşılık gelir. Ağız hissi, eğitilmiş bir duyu paneli veya eğitilmiş kişilerden oluşan (geniş) bir set kullanılarak belirlenebilir.

"Sinerez" terimi, bir jelin sıvıyı tuttuğu veya sızdırdığı sürece değişmektedir. Sinerez, ekşi süt karışımının toplam miktarına kıyasla sızan sıvı miktarını ölçerek nicelendirilebilir. Ekşi süt preparatlarında sinerezin ölçülmesine yönelik diğer yöntemler teknikte tarif edilmiştir (Amatayakul et al. (2006) Int. J. Dairy Technol. 59, 216-221).

35

Belirli bir özelliğin geliştirilmiş olup olmadığı, buluşa göre olan bir yöntemle elde edilen bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun özel bir özelliğinin, siyalidaz muamelesi yapılmamış ve diğer türlü aynı şekilde hazırlanacak olan bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun aynı özellikliği ile karşılaştırılması ile belirlenir.

5

Bu buluş, böylece, bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin bir protein içeren bir siyalik asit ve asitleştirme maddesine eklenmesini içeren yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlama yöntemi sunar, asitleştirmenin gerçekleşmesi ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılması sağlanır, burada söz konusu olan, diğer şekilde hazırlanan ile karşılaştırılabilir siyalidaz olmayan ile karşılaştırıldığında en az bir gelişmiş özelliğe sahiptir.

10

Tarif edildiği gibi, siyalidazın yoğurt veya içilebilir yoğurdun hazırlanmasında kullanılması sinerezin azalmasına yol açacaktır. Dolayısıyla, alternatif bir uygulamada, bu buluş, bir yoğurt ve içilebilir bir yoğurt içindeki sinerezi düşürmek için bir yöntem ve diğer türlü söz konusu yoğurt ve içilebilir yoğurdun bilinen herhangi bir yöntemle üretilmesini sağlar. Yoğurt durumunda bu türlü bir yöntem asitleştirmeyi ve isteğe bağlı olarak ekşi süt ürününün geri kazanılmasını içerir.

15

Siyalidazın ve asitleştirici maddenin bir süt başlatıcı maddeye eklenme sırasına göre, bunların aynı veya iki farklı giriş vasıtasıyla aynı anda (eşzamanlı olarak) ilave edilebileceği belirtilmektedir. Ayrıca, ilk olarak siyalidazın eklenmesi ve isteğe bağlı olarak, peynir altı suyu proteini denatüre eden, sütü pastörüze eden ve siyalidazı inaktive eden bir ısı adımından sonra, belirli bir zaman sonrasında asitleştirici maddenin ilave ediliği bir proses gerçekleştirmesine olanak sağlanması mümkündür. Ayrıca siyalidazı asitleştirme sırasında ilave etmek de mümkündür.

20

Dolayısıyla bu buluş bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin protein içeren bir siyalik asit içerisine eklenmesini, asitlendirmenin gerçekleşmesini ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren bir yöntem sağlar; burada söz konusu siyalidaz ve söz konusu asitleştirme maddesi eşzamanlı olarak eklenir veya burada söz konusu siyalidaz asitleştirme sırasında ilave edilir. Tercihen, siyalidaz asitleştirme öncesi de eklenebilir.

30

35

Yine başka bir tercih edilen uygulamada, yukarıda tarif edilen yöntemlerin herhangi birine göre üretilen ekşi süt preparatı, yoğurt veya içilebilir yoğurttur.

Yoğurt ya sert veya karıştırılmış yoğurt olabilir.

5

Alternatif olarak daha fazla tercih edilen bir uygulamada, yukarıda tarif edilen yöntemlerin herhangi birine göre üretilen ekşi süt preparatı içilebilir yoğurdudur.

Siyalidaz ile ilgili olarak aşağıdaki bilgiler sağlanmaktadır.

10

Siyalidazlar (nöraminidazlar, EC 3.2.1.18), glikoproteinler, glikolipidler, gangliosidler, polisakaritler ve sentetik moleküllerdeki teminal, indirgeyici olmayan, siyalik asit bağlantısını hidroliz eder. Siyalidazlar, döterostomat soyundan (Echinodermata'dan Memeli'ye kadar) olan hayvanlarda ve ayrıca çoğunlukla hayvan komensalleri veya patojenler olarak bulunan çeşitli mikroorganizmalarda görülür. Siyalidazlar ve bunların siyalil substratları bitkilerde ve diğer metazonların çoğunda yoktur. Bakteriler arasında bile, siyalidaz düzensiz olarak bulunur, dolayısıyla ilişkili türler veya bir türün suşları bu özellikte farklılık gösterir. Siyalidazlar virüslerde ve protozoada da bulunmuştur.

20

Siyalidaz aktivitesi çeşitli insan hücrelerinde, dokularda ve vücut sıvılarında tespit edilmiştir. Genel olarak, memeli siyalidazları stabil değildir ve membrana bağlı enzimlerde zardan ayrıldığında daha kararsızlaşırlar. Siyalidaz aktivitesi, hücrelerin sitozol, lizozomları ve plazma membranlarında bulunur. Plazma membran siyalidazlar genellikle 'gangliosid siyalidaz' olarak adlandırılır ve enzim spesifikliği büyük oranda membran gangliosidleri ile sınırlandırılmıştır. Sitozolik ve lizozomal siyalidazlar, glikoproteinleri ve oligosakaritleri hidrolize eder. İnsan siyalidazları, katepsin A ve  $\beta$ -galaktosidaz da dahil olmak üzere birçok başka protein ile yüksek moleküler kütle kompleksinde oluşur. Çok proteinli kompleksleşme, *in vitro* bütünlük ve siyalidazın katalitik aktivitesi için önemlidir.

30

Siyalidaz ayrıca *Clostridium*, *Vibrio*, *Corynebacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Arthrobacter*, *Actinomyces* ve *Streptomyces* türleri de dahil olmak üzere çeşitli bakteriyel suşlarda bulunur. Mikrobiyal siyalidazlar ekstrasellüler çevreye, membrana bağlı, periplazmik veya sitoplazmik olarak salgılanabilirler, burada bunlar, eksprese eden türe ve bunların çeşitli işlevlerine bağlıdır.

35

Bakteriyel siyalidazlar 5-7 arasında optimum pH ile çeşitli substrat spesifikliğı göstermektedir. Substrat bağlantı özelliğı, bakteri siyalidazları arasında da farklıdır. Genel olarak, bazı istisnalar dışında,  $\alpha$ 2-6 izomerinin üzerinde  $\alpha$ 2-3 bağlantılı terminal siyalik asitlerin bir klevajı tercih edilmektedir.

Bakteriyel siyalidazlar, moleküler büyüklüğe ve  $\text{Ca}^{2+}$  ihtiyacına bağılı olarak iki familyada sınıflandırılabilir. 42 kDa civarında moleküler ağırlığa sahip siyalidazlar "küçük" bir siyalidaz familyasına aittir. *Clostridium perfringens*, *C. sordelli*, *Salmonella typhimurium* ve *Micromonospora viridifaciens* enzimlerini içerirler ve aktivite için katyona gerek duymazlar. Bu enzimler arasında anlamlı dizi homolojisi gözlenmiştir ve benzer bir üçüncül yapıya sahiptirler. Daha yüksek bir molekül ağırlığına sahip siyalidazlar, örneğin *Vibrio cholerae* gibi "geniş" bir siyalidaz ailesine aittir ve tam aktivite için  $\text{Ca}^{2+}$  gerektirirler. Dizi analizi, viral ve "küçük" bakteriyel siyalidaz ile az bir homoloji ortaya koymaktadır.

Fekal ve oral izolatlarda birçok siyalidaz üreten patojenik olmayan suşlar tanımlanmıştır. İnsan kalın bağırsaklarında bu bakteri enterik bakterilere aittir ve anaerobları, örneğin *E.coli*, *Enterococcus faecalis* ve normal mukozanın yüzeyindeki mukusta bulunan glikoproteinleri tamamen bozabilen *Ruminococcus* ve *Bifidobacterium* sp içeren bir grup müsin oligosakkarit degradasyon bakterileri içerir. Müsin indirgeyici grup içindeki siyalidaz üretimi yapıcıdır ve sialo-glikoproteinler ve gangliosidler üzerinde etki yapar.

Siyalidazları içeren mikroorganizmalar, genellikle, konakçılar olarak yüksek hayvanlarla, örneğin parazitlerle temas halinde yaşar. Burada, konakçı siyalik asitlerin süpürüleceğı bir karbon kaynağı olarak kullanılmasını sağlayan bir beslenme fonksiyonuna sahip olabilirler. Bazı mikrobik patojenler için, siyalidazların virülans faktörleri olarak işlev gördüğü düşünölmektedir. Bununla birlikte patojenezde faktörler olarak siyalidazların rolü tartışmalıdır. Bir yandan, *Clostridium perfringens* gibi patojenik mikrobiyal türün etkisini doğrulamaktadırlar. Öte yandan, bu enzimler, yüksek hayvanlar da dahil olmak üzere birçok patojenik olmayan türün karbonhidrat katabolizmasında yaygın olan faktörlerdir. Bununla birlikte, doğrudan toksik etki göstermezler (Traving *et al.*, Celi Mol Life Sci (1998) 54, 1330-1349). Bunun yerine, zararlı etkileri fizyolojik olmayan koşullar altında konak siyalik asitler tarafından

indüksiyon üzerine diğer toksik faktörlerle birlikte konakçıya salınan büyük miktarda enzime bağlıdır.

5 Memeli, bakteriyel ve viral siyalidazların aksine fungal siyalidazlar daha az çalışılmıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda ipliksi mantar *Penicillium chrysogenum*'dan salgılanan bir siyalidaz gıda sınıfı mantar *Aspergillus niger*'de aşırı miktarda eksprese edilmiştir ve gıda uygulamalarında kullanılmaya uygundur (WO08101893).

Tercihen, buluşa göre bir yöntem, bir bakteri veya mantar siyalidazı kullanır.

10

Tercih edilen bir uygulamada, buluş, bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin protein içeren bir siyalik asit içerisine eklenmesini, asitlendirmenin gerçekleşmesini ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren bir yöntem sağlar; burada söz konusu siyalidaz, bir mantar siyalidaz, daha tercihen bir *Penicillium* siyalidaz ve daha tercih edilen şekilde bir *Penicillium chrysogenum* siyalidazdır. Örneklerdeki yoğurt veya içilebilir yoğurt, gıda sınıfı mantar *Aspergillus niger* içinde aşırı eksprese edilen *Penicillium chrysogenum*'dan bir siyalidaz ile hazırlanır (WO08101893). Söz konusu *Penicillium chrysogenum* siyalidaz başka bir (mikro) organizmada eşit derecede üretilir. Yine başka bir tercih edilen uygulamada, buluş, bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin protein içeren bir siyalik asit içerisine eklenmesini, asitlendirmenin gerçekleşmesini ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren bir yöntem sağlar, burada söz konusu siyalidaz tercihen bir fungal siyalidazdır ve pH 5.5 ile pH 7.5 arasında optimum bir pH değerine sahiptir. Böyle bir siyalidazın bir örneği WO08101893'te tarif edildiği gibi *Penicillium chrysogenum* siyalidazdır ve burada siyalidaz deney bölümünde kullanılmaktadır.

15

20

25

30

Buluşta kullanılan siyalidaz tercihen bir fermantasyon tarafından üretilen enzim olabilir. Fermantasyon tarafından üretilen siyalidaz, bakteri, maya veya mantardan elde edilebilir. Tercihen fermantasyon tarafından üretilen siyalidaz, filamentli bir mantardan elde edilir. Daha çok tercihen, fermantasyon tarafından üretilen siyalidaz, filamentli mantar *Aspergillus niger*'de üretilen mantar *Penicillium chrysogenum*'dan gelmektedir.

Bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun üretimi için kullanılan siyalidaz miktarı; uygulama, substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon pH'ı ve bir üretim prosesinde dalgalanabilen diğer parametrelere göre ayarlanabilir. Tipik olarak, bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun üretimi için kullanılan siyalidaz miktarı 1 mg/l ile 1 g/l arasındadır.

Burada açıklanan yöntemlerin herhangi birine göre bir yoğurt veya içilebilir yoğurdun imalatı sırasında ilave bir içerik eklenebilir. Böyle bir ilave içerik siyalidaz ile muamele edilmeden önce veya sonra ekşi süt preparatına ilave edilebilen ve tercih edilen bir asitleştirici madde kullanılarak asitleştirme öncesinde veya sonrasında ilave edilebilen bir meyve preparatı, tat, protein, yağ, probiyotik bakteri, prebiyotik ve şekerleri içerir.

Buluşun yöntemi, aromalı ve aromalı olmayan yağlı ve yağsız ve homojenleştirilmiş ve homojenize edilmemiş taze ürünler imal etmek için uygundur. Ayrıca laktoz içermeyen ve düşük laktoz ürünlerin üretimi için de uygundur. Bu adımlara ilaveten, buluşa ait yöntem, tercihen, reçel ve/veya şeker ilavesi ve/veya ısıl proses (pastörizasyon sonrası) gibi nihai ürünün gerçekleştirilmesi için gereken diğer imalat adımlarını da içermektedir.

Yine başka bir tercih edilen uygulamada, buluş, bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin protein içeren bir siyalik asit içerisine eklenmesini, asitlendirmenin gerçekleşmesini ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren bir yöntem sağlar, burada yöntem ayrıca laktaz, karboksipeptidaz, proteaz, aminopeptidaz, beta-galaktosidaz, esteraz, transglutaminaz, lipaz, fosfolipaz, izomeraz, oksidaz veya peroksidaz gibi bir başka enzimin eklenmesini veya ayrıca galakto oligosakarit veya fruktoz oligosakarit gibi bir prebiyotiğin eklenmesini veya ayrıca laktik asit bakterileri veya bifidobakteriler gibi bir probiyotik kültürün eklenmesini veya ayrıca bir aroma, tekstürleştirici veya stabilizatörün eklenmesini içerir. Aromaların örnekleri meyve, vanilya veya şekerdir. Stabilizatörlere örnek olarak nişasta, karaginan, zamlar, pektin, jelatin veya hidrokolloidler verilebilir. Stabilizatörler ayrıca tekstürleştirme özellikleri için de kullanılabilir. Ek olarak, peynir altı suyu protein konsantresi veya kazein gibi süttten türetilmiş tekstürleştirici maddeler de kullanılabilir. Tekstürleştirme için mikro parçacıklı protein de kullanılabilir.

Tercih edilen bir yönü itibarıyla, buluş, bir yoğurt veya içilebilir yoğurt hazırlamak için bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesinin protein içeren bir siyalik asit içerisine eklenmesini, asitlendirmenin gerçekleşmesini ve isteğe bağlı olarak üretilen yoğurt veya içilebilir yoğurdun geri kazanılmasını içeren, ayrıca laktaz eklenmesini içeren bir yöntem sağlar. Tercih edilen bir laktaz, *K. lactis* laktazıdır (örneğin, DSM'den Maxilact®).

Farklı bir uygulamada, buluş, burada tarif edilen bir yönteme göre elde edilebilen bir yoğurt veya içilebilir yoğurdu sağlamaktadır. Tercihen, bu tür ürünlerden herhangi biri düşük yağlıdır veya yağ içermez. Daha da fazla tercih edilen, bu tür ürünlerden herhangi biri düşük laktoza sahiptir veya laktoz içermez. Bu özelliklerin tercih edilen kombinasyonları: düşük yağ ve düşük laktoza sahip veya düşük yağa sahip ve laktozsuz veya yağsız ve düşük laktoza sahip veya yağsız ve laktozsuzdur.

15 Yoğurt, sert yoğurt veya karıştırılmış yoğurttur.

Bir başka çok tercih edilen uygulamada, ekşi süt preparatı içilebilir yoğurttur.

Tercihen, bu türlü bir yoğurt veya içilebilir yoğurt, geliştirilmiş bir yapı, geliştirilmiş doku, artırılmış bir viskozite, geliştirilmiş bir ağız hissi ve tercihen nispi düşük protein seviyesinde bir sinerez ile karakterize edilebilir. Buluşa göre bir yoğurt veya içilebilir yoğurt, bir siyalidazın veya bir siyalidazın bölümlerinin saptanması ile de tespit edilebilir. Bir siyalidazla prosesden geçirilmiş ekşi süt preparatının geleneksel bir ekşi süt preparatından ayrılmasının bir diğer olasılığı, nihai üründeki serbest siyalik asit miktarını ölçmektir. Siyalidazla prosesden geçirilmiş ekşi süt preparatı, nihai üründe oligosakkarite veya proteine bağlı olmayan yüksek miktarda serbest siyalik asidine sahip olacaktır. Ekşi süt mamullerinde bulunan serbest siyalidaz içeriği, bu suretle 2 misli, tercihen 5 misli, daha tercihen 10 misli veya daha fazla artabilir. Nihai preparatta serbest siyalik asit konsantrasyonu bu nedenle 0.1 mg/kg'dan yüksek, tercihen 0.5 mg/kg'dan yüksek, daha tercihen 1 mg/kg'dan yüksek, 2 mg/kg'dan yüksek, 5 mg/kg'dan yüksek, en çok tercih edilen şekilde 10 mg/kg'dan yüksektir.

Bir başka yönden, buluş, bir siyalidaz ve bir asitleştirme maddesini içeren bir parça kiti kullanılmasını sağlamaktadır. Tercihen bu türlü bir bileşim veya kit, başka bir enzim veya

bir prebiyotik veya bir probiyotik veya bir aroma veya bir tekstürleştirici veya bir stabilizatör içerir.

5 Uygun enzim örnekleri laktaz, karboksipeptidaz, proteaz, aminopeptidaz, beta-galaktosidaz, esteraz, transglutaminaz, lipaz, fosfolipaz, izomeraz, oksidaz veya peroksidazdır. Tercih edilen bir laktaz, *K. lactis* laktazıdır (örneğin DSM'den Maxilact).

Uygun prebiyotik örnekleri, galakto oligosakarit veya fruktoz oligosakkarittir.

10 Uygun probiyotik örnekleri laktik asit bakterileri veya bifidobakterilerdir. Uygun aroma örnekleri meyve, vanilya veya şekerdir.

Uygun stabilizatör örnekleri, nişasta, modifiye nişasta, karaginan, sakızlar, pektin, jelatin veya diğer hidrokolloidlerdir.

15 Uygun tekstürleştiriciler; stabilizatörler, peynir altı suyu tozu, yağsız süt tozu, süt protein konsantresi tozu, peynir altı suyu protein konsantresi, kazein veya mikro parçacıklı proteindir.

20 Yukarıda tarif edilen bileşim veya parça kiti, ekşi bir süt preparatının hazırlanması için çok yararlıdır. Alternatif olarak, bu türlü bir bileşim veya parça kiti, bir yoğurt veya içilebilir yoğurttaki sinerezi azaltmak için kullanılır. Tercihen söz konusu yoğurt veya içilebilir yoğurtta az miktarda ilave protein ve/veya düşük laktoz bulunur veya laktoz içermez. Tercih edilen bir uygulamada, söz konusu kit, bundan başka, söz konusu siyalidazın, protein içeren bir siyalik asit içeren bir başlatıcı maddesine ilave edildiği ve siyalidazla muamele görmüş proteini elde etmek için inkübe edilmesine ve daha sonra söz konusu siyalidaz ile muamele görmüş başlatıcı maddesinin bir asitleştirme adımına tabi tutulmasına ilişkin talimatları içermektedir (diğer bir deyişle asitleştirmeye yalnızca siyalidaz muamelesinden sonra izin verilir). Başlatıcı maddenin asitleştirilmesi için bir başlatıcı kültüründen yararlanılmışsa, söz konusu siyalidaz muamelesi, söz konusu başlatıcı kültür ilave edilmeden önce gerçekleştirilir veya söz konusu siyalidaz başlatıcı kültür ile birlikte veya eklenmesinden hemen sonra ilave edilir.

35 Aşağıdaki örnekler mevcut buluşu göstermektedir. Hiçbir şekilde istemleri sınırlamaya yönelik değildir.

## ÖRNEKLER

### Örnek 1

5

#### **Siyalidaz ZJW kullanarak küçük ölçekli fermente yağsız süt hazırlama**

*Penicillium chrysogenum*'dan bir siyalidaz enziminin klonlanması, ekspresyonu ve saflaştırılması daha önce WO08101893'te tarif edilmiştir. Bu siyalidaz, filamentli mantar *Aspergillus niger*'den üretilen ve ekşi süt preparatlarının üretiminde siyalidazların etkisinin örneklerini elde etmek için kullanılan ZJW olarak adlandırılmıştır. 40 gram yağsız süt tozu (Nilac, NIZO, Hollanda), 400 ml musluk suyu içinde çözülmüş ve dört adet 100 ml kapaklı şişe üzerine dağıtılmıştır. 4 şişeye, Tablo 1'de tarif edildiği gibi muamele edildi. Siyalidaz ZJW, sırasıyla 10 ve 50 mg/l şişelerde 2 ve 3. şişelere ilave edildi. 2 ve 3. şişeler, daha sonra 40 Santigrat derecede 4 saat inkübe edildi. Bundan sonra bütün şişeler gece boyunca buzdolabında saklandı. Ardından, 0.004 U/l başlatıcı kültürü Delvo®-YOG CY-121 (DSM Food-Specialties, Hollanda; CY = klasik yoğurt kültürü; tanımlanmış kültür) ilave edilmeden önce, tüm şişeler 30 dakika boyunca 40 Santigrat dereceye ısıtıldı. 4. şişedeki başlatıcı kültürü ile birlikte 10 mg/l siyalidaz ZJW ilave edildi.

20

	add ZJW	inkübe	depolama	CY121 ilave	ZJW ilave	inkübe
1	0	0	O/N 4°C	.004 U/l	0	5saat 40°C
2	10 mg/l	4saat 40°C	O/N 4°C	.004 U/l	0	5saat 40°C
3	50 mg/l	4 saat 40°C	O/N 4°C	.004 U/l	0	5saat 40°C
4	0	0	O/N 4°C	.004 U/l	10 mg/l	5saat 40°C

Tablo 1: Yağsız süttten ekşi bir süt preparatı hazırlamak için kullanılan koşullar

	Nihai pH	% sinerez	Depolama modülü (G') (Pa)	Verim noktası (G'=G") (% suş)
1	4.17	18	16	70
2	4.21	11	51	100
3	4.18	1	127	130
4	4.2	10	28	80

Tablo 2: Tablo 1'de açıklanan deney sonuçları. Viskozite kuvvetlice arttırılmıştır ve siyiridazla ekşi bir süt preparatı yapıldığında sinerez azaltılır.

40 Santigrat derecede 5 saat inkübe edildikten sonra, asitlendirilmiş yağsız süttten  
5 oluşan şişelerde jel benzeri bir yapı oluştu. Şişeler yapıyı kırmak için çalkalandı ve pH  
ölçüldü. Farklı şişeler arasında pH'da anlamlı fark bulunamadı (Tablo 2). Tüm şişeler 4  
derece santigrat derecede üç gün boyunca saklandı. Bu süreden sonra viskozite bir  
reometre (Anton Paar, Graz, Avusturya tarafından Physica MCR 301) ile ölçülmüştür.  
Sabit bir frekansta (10 Hz) ve artan genlikte ( %0.01'den %1000'e) sabit bir sıcaklıkta  
10 5°C'de salınım ölçümü olan bir gerinim süpürme prosesi, mil olarak bir PP50 plakası  
kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 2'de, depolama modülü ( $G'$ , Pascal, Pa cinsinden ifade edilmiştir), malzemenin  
doku mukavemetinin bir ölçüsüdür; ne kadar yüksekse, malzeme o kadar güçlüdür.  
15 Numune üzerinde bir salınım hareketi geçirerek ve stres tepkisini ölçerek elde edilir.  
Verim noktası, depolama modülünün kayıp modülünden ( $G''$ , malzemenin belirli salınım  
hareketi altında dağılan gerilme miktarının ölçüsü) daha küçük olduğu genliktir. Bu  
noktadan itibaren madde daha fazla sıvıya benzer davranır. Bu, maddenin  
mikroyapısının parçalandığı noktaya karşılık gelir ve üzerine yüklenen stres ile başa  
20 çıkamaz. Verim noktası ne kadar yüksek olursa malzeme akışına başlamadan önce  
malzemeye uygulanabilecek deformasyon o kadar yüksek olur.

Dokudaki bir fark, insan algısı tarafından açıkça görülebildi ve doku mukavemetinde  
( $G'$ ) artış, siyalidaz ile muamele görmüş numuneler ve kontrol numuneleri arasında  
25 reometre ile ölçüldü. Viskozite, 2 ve 4. şişelerdeve özellikle 3. şişede anlamlı derecede  
yüksekti. Ayrıca, numuneler siyalidaz ile muamele edildiğinde verim noktası daha  
yüksekti. Siyalidazın belirgin olarak doku mukavemeti üzerinde açık bir pozitif etkisi  
vardır.

30 4 Santigrat derecede 2 hafta depolandıktan sonra, tabaka kalınlığını (cm olarak) toplam  
ürünün yüksekliğine (cm cinsinden) bölünerek ve yüzde olarak ifade edilerek (Tablo 2),  
tüm şişelerde sinerez oluşumu ölçüldü. Sonuçlar, asitleştirme öncesi veya asitleştirme  
sırasında ekşi süt ürünlerinin siyalidazla prosesden geçirilmesinin, geliştirilmiş bir  
yapıya ve azalmış sinereze yol açtığını açıkça göstermektedir.

## **Örnek 2**

### **Siyalidaz ZJW kullanarak yoğurt hazırlama**

- 5 1.5 litrelik homojenize edilmiş yarı yağsız inek sütü (%1.5 yağ, %3.5 protein) bir su banyosu içinde 85°C'de 30 dakika ısıtıldı. Süt buzlu su kullanılarak hızla 42°C'ye soğutuldu. Siyalidaz ZJW, 10 mg/L'lik bir seviyede süte ilave edildi ve 42°C'de 2 saat inkübe edildi. Bir kontrol numunesine (siyalidaz içermez) aynı şekilde muamele edildi. Daha sonra süt, 4U/1000L seviyesinde başlatıcı kültür Delvo®-YOG CY-121 (DSM
- 10 Food-Specialties, Hollanda) ile inoküle edildi. Sert yoğurt için, aşılınmış süt, fermantasyon öncesinde 42°C'de nihai paketine döküldü. Karıştırılmış ve içilebilir için, fermantasyon 3 litrelik kaplarda gerçekleşti. Yoğurt pH4.5'e ulaştığında proses durduruldu ve bu yaklaşık 4 saat sürdü. Fermentasyondan sonra, yoğurt, karıştırılmış yoğurt üretimi için basınç olmaksızın bir homojenleştirici (APV Homojenleştirici Rannie)
- 15 içerisine pompalanmıştır. İçilebilir yoğurt için 100 barda bir homojenizasyon gerçekleştirildi. Tüm yoğurtlar küçük kaplarda 5°C'de minimum 4 gün tutuldu.

- Nisbi viskozite, 30 rpm'de Helipath yöntemi (azalan bir milden yoğurt boyunca saat yönünde nüfuz ettiği yerde) kullanılarak bir T-B mili ile bir Brookfield DV-III Viskometre
- 20 (Brookfield, ABD) vasıtasıyla ölçüldü. Direnç sürekli olarak ölçülerek ve viskozite için bir değer geri hesaplayarak mPas (mili Pascal saniye) cinsinden verilir.

- Şaşırtıcı bir şekilde, viskozite, siyalidazla muamele görmüş numunelerde muamele edilmemiş numunelerdekinden daha yüksekti. Fark, en iyi şekilde %35'ten fazla
- 25 viskozite artışı ile karıştırılmış yoğurt için görülmüştür (Şekil 1).

- Örnekler organoleptik olarak değerlendirildi ve tüm değerlendiriciler siyalidaz ile muamele görmüş karıştırılmış yoğurt numunesini daha fazla ağız hissine sahip ve daha kalın olarak nitelendirmişlerdir.

30

## **Örnek 3**

### **Siyalik asit içeriğinin ölçümü**

BioVision'ın Siyalik Asit Test Kiti (CA, ABD), çeşitli biyolojik numunelerde serbest siyalik asit ölçmek için basit ve kullanışlı bir yöntem sağlar. Kit, serbest siyalik asitin oksitlendiği ve Oxi-Red probunun geliştirilmesi ile flüoresan (Ex/Em = 535/587 nm) ve absorbansa (O.D. = 570 nm) neden olan bir enzim bağlı reaksiyonu kullanır. Kit, ~ 1  
5 µM konsantrasyonda algılama hassasiyeti ile 0.1 ila 10 nmol doğrusal aralıkta siyalik asiti ölçer.

Numuneler, serbest siyalik asit için test edilebilir veya Biovision kiti kullanılarak bağlı siyalik asidi ölçmek üzere hidrolize edilir. Toplam siyalik asit ölçümü için, önce hafif asit  
10 koşullarında hidroliz yapılmalıdır. Ekşi bir süt preparatından alınan numune, yaklaşık 1 mg protein/ml'lik bir konsantrasyonda 80 Santigrat derecede 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde hidrolize edilir. Siyalik asit tayini için numuneler uygun zamanlarda çıkarılır ve analiz edilinceye kadar -20°C'de saklanır. Hidrolizatın pH değerinin yaklaşık 5.5'e ayarlanması ve deproteinasyon ile isteğe bağlı temizleme veya ölçümü bozabilecek  
15 bileşenleri uzaklaştıran diğer yöntemler sonucunda, siyalik asit içeriği Biovision kiti kullanılarak ölçülür.

Serbest siyalik asit ölçümü için, numuneler isteğe bağlı olarak deproteinasyon veya ölçmeyi bozabilen bileşenleri uzaklaştıran diğer yöntemlerle temizlenir ve Biovision kiti  
20 kullanılarak doğrudan ölçülür.

Alternatif olarak, bir HPLC yöntemi kullanılarak siyalik asit seviyeleri belirlenebilir. Siyalik asit düzeylerini belirlemek için bir HPLC yöntemi Dionex Company (Dionex teknik notu 41; <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5053-tn41.pdf>) tarafından tarif  
25 edilmiştir. Kısaca aşağıdaki prosedür uygulanır. Ekipman: Dionex'in (Amsterdam, Hollanda) tüm ürünleri GS50 Quaternary HPLC pompasından, Termal Bölmeli bir AS50 Enjektöründen, bir ED50 elektrokimyasal detektöründen ve bir Chromeleon Kromatografi veri sisteminden oluşan Dionex BioLC; ölçme koşulları: Amino Trap guard sütunu ve Borate Trap ön sütununa sahip CarboPac PA20 HPLC sütunu, 10 µL'lik bir  
30 enjeksiyon hacmi ve 20°C'lik bir tepsi sıcaklığı, 30°C'de bir sütun sıcaklığı ve 3 fazdan oluşan bir gradyan kullanılarak 0,5 ml/dakikalık bir akış hızında çalışır: 0.1M NaOH içinde damıtılmış su, 500 mM NaOH ve 1 M NaOAc.

Bir siyalik asit solüsyonu ile bir kalibrasyon eğrisi yapılmıştır: 25 mg siyalik asit (Fluka  
35 01398), 25 ml'lik volumetrik bir şişe içine iki kez tekrar tartıldı ve damıtılmış su içinde

çözündürüldü. Bu çözeltiler, su ile 1 ila 7.5 mg/l konsantrasyonda seyreltildi ve yukarıda tarif edildiği gibi HPLC içinde çalıştırıldı.

Süt veya yoğurt numuneleri su ile 25 kez seyreltilmiş ve 5 dakika 13000 rpm'de santrifüje tabi tutulmuştur. Saf süpernatandan yaklaşık 0.5 ml bir Nanosep ultra filtrasyon kartuşuna (10 KD) aktarılmış ve en az 30 dakika 14000 g'de santrifüjlenmiştir, 250 µL berrak süzüntü bir 300µL enjeksiyon şişesine aktarılmıştır. Siyalik asit seviyeleri daha sonra yukarıda tarif edildiği gibi belirlenmiştir.

#### 10 **Örnek 4**

##### **Yoğurt fermantasyonu öncesi veya sırasında siyalik asit salınımı ve asitleştirme oranı üzerine etkisi**

15 Yoğurt, %4.35 protein elde etmek için tam yağlı sütten (1469 g, Albert Heijn) artı yağsız süt tozundan (Promex - Friesland-Campina, 31 g) yapıldı, inkübasyon iki seviyede (0.143 ve 0.286 mg enzim/g süt proteini, 10 veya 20 mU/L'ye karşılık gelir) ve pastörizasyon öncesi (4 saat 40°C) veya fermantasyon sırasında gerçekleştirildi. Kullanılan enzim ZJB partisi 0009 idi.

20

Yoğurt başlatıcı kültürü olarak Delvo-Yog CY-121 (160µL/L) kullanılarak örnek 2'de tarif edildiği gibi hazırlandı. Yoğurtlardaki siyalik asit seviyeleri HPLC ile ölçülmüş (bakınız örnek 3) ve aşağıdaki tabloda verilmiştir. Asitleştirme sırasındaki pH değeri bir pH metre ile ölçülmüştür; değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

25

Tablo 3

Numune	Siyalik asit (mg/kg)	Fermantasyon sırasında pH				
		0 saat	2 saat	3 saat	4 saat	4.45 saat
Kontrol	26,9	6.55	5.97	5.25	4.77	4.57
Pastörizasyon öncesi düşük siyalidaz	40,2	6.57	5.94	5.21	4.77	4.55
Pastörizasyon öncesi yüksek	94,1	6.58	5.93	5.26	4.75	4.58

Numune	Siyalik asit (mg/kg)	Fermentasyon sırasında pH				
		0 saat	2 saat	3 saat	4 saat	4.45 saat
siyalidaz						
Fermentasyon sırasında düşük siyalidaz	70,0	6.57	5.94	5.25	4.73	4.57
Fermentasyon sırasında yüksek siyalidaz	121	6.57	5.94	5.21	4.74	4.57

Bu, siyalik asitin, nötr pH'da sütte ve pH kademeli olarak düştüğü zaman yoğurt fermentasyonu sırasında hidrolize edilebileceğini kanıtlamaktadır. Aynı zamanda siyalidaz muamelesinin asitleştirme oranını etkilemediğini de kanıtlıyor.

5

### **Örnek 5**

#### **Süt inkübasyon denemeleri**

- 10 Birkaç süt kaynağı, siyalik asit salınım oranının saptanması için siyalidaz ile inkübe edilmiştir. Süt kaynakları yağsız süttü (Albert Heijn, Hollanda, %4 protein); Yağsız Süt Tozu (SMP; Promex-Friesland-Campina, su içinde %4 süt proteini ile standartlaştırılmıştır) ve Süt Protein Konsantresi (MPC; TMP Milei, Leutkirch, Almanya), su içinde %4 süt proteini üzerinde standartlaştırılmıştır). Tüm süt kaynakları, 15 30°C'de ve süt ise 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon seviyeleri, ancak 20 mU/L'de yapılan normal yağsız süttten bir inkübasyon dışında, 80 mU siyalidaz/litre süttü. Tabloda salınan siyalik asit seviyeleri, HPLC ile belirlendiği gibi verilmiştir (bakınız örnek 3), ve mg/L'olarak ifade edilmiştir.

20

Tablo 4

Süre (saat)	Süt 30°C 20mU/L	Süt 30°C 80 mU/L	SMP 30°C 80mU/L	MPC 30°C 80mU/L	Süt 4°C 80 mU/L
0	20.4	22.6	21,4	1,5	22.6
0.5	64.7				

Süre (saat)	Süt 30°C 20mU/L	Süt 30°C 80 mU/L	SMP 30°C 80mU/L	MPC 30°C 80mU/L	Süt 4°C 80 mU/L
1	77.3	126	122	84	
2	85,0	138	147	101	111
4	101	151	157	114	121
6	116*	162	171	126	128
24	153	186	198	166	143
48					156

\* 8 saatte

Bu, tüm süt kaynaklarında siyalik asitin makul bir zaman çerçevesinde büyük miktarlarda salınabileceğini kanıtlar.

## 5 **Örnek 6**

### **Yoğurt testi**

10 Taze yağsız süttten (NIZO, Hollanda'dan Ede, < %0.1 yağ) + düşük ısıli SMP'yi (yağsız süt tozu, parti BEO1007773/s 1-02-055, Ingredia Fransa) 2 veya 5 kg'lık partilerde yoğurtun dört varyantı yapılmıştır.

1. Ref %4.35 protein (A bu şekilde ve B 30°C'de 5 saat tutuldu)
2. %4.35 siyalidazlı protein (23mU/L)
3. %3.9 siyalidazlı protein (21 mU/L)
- 15 4. %3.6 siyalidazlı protein (19mU/L)

20 Süt, siyalidaz (parti NID/ZJW0007, 6.5mU/g süt proteini) ile 30°C'de 6 saat inkübe edildi, 92°C'de 10 dakika pastörize edilerek 37°C'ye soğutuldu ve %0.004 Delvo®-YOG CY-121 kullanılarak aşılındı ve 37°C'de pH 4.6'ya ulaşana kadar yaklaşık 7 saat fermente edildi. Sonra ürünler kısa bir süre elle karıştırıldı ve 25°C'ye soğutuldu ve daha sonra hız 1'de bir Power Gen kesme cihazı (Fisher Scientific) kullanılarak parçalandı ve 12 saniye boyunca 2 mm'lik yarık üzerine kıvrıldı, tank alttan üste kesildi. Ürünler polipropilen kaplara dolduruldu.

Parçacıkların kırılmasından hemen sonra, ürünün viskozitesi bir Haake RV20 Rotavisco analizcisi kullanılarak MV2p geometrisi ile 1 dakika  $64 \text{ s}^{-1}$ 'de değerlendirildi. 10 saniye kesme prosesinden sonra analizör tarafından bildirilen viskozite değeri 5 aşağıdaki tabloda verilmektedir. Siyalik asit seviyeleri, fermantasyondan önce süt ürünleri üzerinde HPLC (bakınız örnek 3) ile tespit edildi.

Tablo 5

Numune	Nihai üründeki siyalik asit içeriği (mg/L)	Viskozite (Haake) $25^{\circ}\text{C}$ $64\text{s}^{-1}$ 'de, sonra $10''$ , mPa.s olarak
1A - % 4.35 protein enzim yok tutma yok	24	206
1B - % 4.35 protein enzim yok	25	238
2 - %4.35 protein enzim ile	124	428
3 - %3.9 protein enzim ile	113	219
4 - %3.6 protein enzim ile	104	189

10 Bu tablo, sabit koşullar altında parçalandıktan hemen sonra, siyalidazla muamele görmüş süttten yapılan yoğurdun, referansa kıyasla daha yüksek bir viskoziteye sahip olduğunu (örnek 1 ve 2'yi karşılaştırır) ve siyalidazla prosese muameler görmüş sütle yapılan yoğurt ürünlerinin daha düşük bir süt protein seviyesine sahip olduğunu (örnekler 3 ve 4) ancak daha yüksek bir protein seviyesine referans olarak 15 karşılaştırılabilir bir viskoziteye sahip olduğunu göstermektedir.

### Örnek 7

#### Yoğurt testi

20

Bu testte, %3.9 protein seviyesinde siyalidaz ile prosesden geçirilmiş tam yağlı süttten elde edilen yoğurt, %4.35'lik bir protein seviyesinde normal tam yağlı süttten yapılan yoğurt ile karşılaştırılmıştır.

Yağsız süt tozu (Promex - Friesland-Campina) ticari pastörize tam yağlı sütte (%3.5 yağ, Albert Heijn, Hollanda) çözülmüştür. Bu karışım, aşağıdaki tabloda verilen varyasyonlar ile 4°C'de 18 saat süreyle inkübe edildi ve bunu takiben 30°C'de 5 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra süt 85°C'de 30 dakika boyunca pastörize edildi. Daha sonra süt 42°C'ye getirildi ve pH değeri 4.8 veya 4.6 olana kadar Delvo®-YOG CY221 (hafif EPS şekillendirme) ile aşılandı (tabloya bakınız). Ürün, bir kez daha yüksek basınçlı bir homojenleştiriciden (Rannie, APV, Danimarka) geçirilerek basınçsız olarak, bardaklar içine doldurularak doğrudan ve daha fazla soğutulmadan parçalandı ve 4°C'de saklandı.

Ürünlerin viskozitesi çeşitli süreler sonrasında Brookfield viskozimetre ile karakterize edildi: 0 gün (20°C), 3, 7, 21 gün (tümü 4°C). Aşılama öncesi sütteki siyalik asit seviyeleri HPLC ile tespit edildi, örnek 3'e bakınız. Tüm detaylar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 6

#	% protein	Enzim [mU/L]	pH'de Kırılma	Siyalik asit [mg/L]	gün 7'de pH	Günde Viskozite [Brookfield, mPa.s]			
						0 (20°C)	3	7	21
1	4.35	-	4.6	26	4.29	3040	5113	7180	6755
2	3.9	80	4.8	188	4.43	3265	5230	6291	-
3	3.9	80	4.6	191	4.29	2276	4112	5080	5698
4	3.9	20	4.6	136	4.23	2668	5084	5182	6216

Bu tablo, siyalidaz muamelesinden sonra, düşük protein seviyesindeki yoğurdun viskozitesinin, yüksek proteinli enzimsiz ürünün viskozitesi ile eşleştirildiğini göstermektedir. Ayrıca, bugüne kadar asitleştirmenin şimdiye kadar ilerlemediğinde, yoğurdun daha erken bir aşamada parçalanabildiğini gösterir. Özellikle asitleştirmenin son aşamasının oldukça yavaş olduğu göz önüne alındığında, proses süresinde de bir avantaj sağlar: 1., 3. ve 4. ürünlerin nihai pH değerine gelmesi için 5 saat 30 dakika sürdüğü durumlarda, 2. ürün sadece 4 saat 30 dakika zaman almıştır.

## **Örnek 8**

### **İçilebilir yoğurt testi**

- 5 Yoğurt, parçalanma noktasına kadar Delvo®-YOG CY220 kültürünün kullanılması haricinde önceki örnekte anlatılanla aynı şekilde, normal ticari yağsız sütte (%3.5 protein, Albert Heijn) yapılmıştır. Süt, ısı muamelesinden önce, sütün litresi başına enzim 80mU siyalidaz ile parti ZJW0006 kullanılarak, ilk önce 24 saat boyunca 4°C'de, daha sonra 5 saat boyunca 30°C'de inkübe edildi. Fermantasyon ürünü manuel
- 10 karıştırılarak ilk önce parçalandı ve bundan sonra 100 Bar'lık bir basınçta bir yüksek basınçlı homojenizatörden (Rannie, APV, Danimarka) pompalandı ve şişelere dolduruldu ve 4°C'de saklandı. Süt numunelerinin siyalik asit seviyeleri, örnek 3'te tarif edildiği gibi HPLC ile belirlendi.
- 15 2 hafta sonra viskozite bir 17 ml fincan ve mili ayarı kullanılarak bir Physica MCR301 reometresi (Anton Paar, Vienna, Avusturya) ile tespit edildi. Numune, 12 veri noktası toplanarak, 1 dakika boyunca 20s<sup>-1</sup> kesilme hızında kesildi. Verilen viskozite değeri, bu 12 noktanın ortalama üçlü bir ölçümüdür. Sinerez, ürünü 50 ml kapalı tüplerde 20 gün bekletmeye bırakarak ve bu süre zarfında ortaya çıkan berrak üst katmanın hacmini
- 20 ml/50ml olarak ifade ederek tespit edildi. Tüm değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 7

	Siyalik asitmg/L	Viskozite mPa.s	günde ml/50ml olarak sinerez			
			4	7	14	21
Referans	19	61	3	5	8	10
Siyalidaz ile	149	317	1	1	3	6

- 25 Bu tablodan siyalidazla muamele görmüş sütte yapılan içilebilir yoğurdun daha yoğun olduğu ve sinerezin referanstan önemli ölçüde daha az olduğu açıktır. Daha yüksek bir viskozite, 8 kişilik bir panelde test edildiği şekilde duyusal olarak belirgindir.

## **Örnek 9**

- 30 **İçilebilir yoğurt**

- Bir sonraki içilebilir yoğurt seti aşağıdaki gibi yapılmıştır: Yağsız süt (Albert Heijn, %3.5 protein) su ile %3.2 veya 2.6 proteine seyreltildi, her bir parti siyalidazla (0.572 mg enzim/g süt protein, 8.5 mg enzim/ml çözeltisi içeren parti ZJW0006) inkübe edildi. Dört parti süt, 42°C'de Delvo®-YOG CY220 ile yoğurt haline getirildi. Yoğurt manuel olarak karıştırılarak kırıldı, pektin çözeltisi (Genu Pectin YM 115-H, CPKelco, Kopenhag, Danimarka) %0.3'lük (w/v) nihai bir seviyeye ilave edildi ve 100 Bar'da yüksek basınçlı bir homojenleştirici (Rannie , APV, Danimarka) ile homojenize edildi.
- 10 Süt örneklerinin siyalik asit seviyeleri, örnek 3'te tarif edildiği gibi HPLC ile belirlendi. Viskozite, örnek 8'de tarif edildiği gibi belirlendi.

Tablo 8

	Protein seviyesi (% w/v)	Siyalik asit mg/L	Viskozite Pa.s
Referans	2.6	18	0.14
Enzim ile	2.6	134	0.38
Pektin ile ref	2.6	18	1.26
Enzim + pektin ile	2.6	134	1.51
Referans	3.2	21	0.48
Enzim ile	3.2	151	0.52
Pektin ile ref	3.2	21	1.93
Enzim + pektin ile	3.2	151	2.33

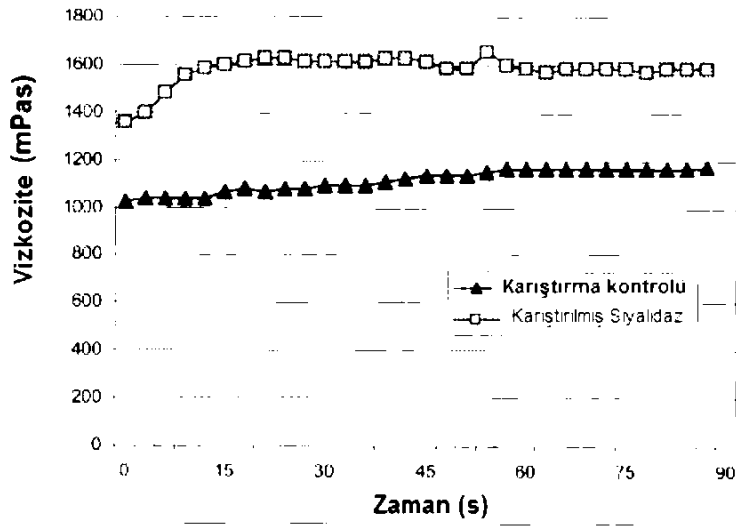
- 15 Bu tablodan, siyalidaz ile muamele görmüş süttten yapılan içilebilir yoğurdu daha viskoz olduğu açıktır, bu mevcut pektinden bağımsız bir etkidir. Küçük bir duyusal test, siyalidaz ve pektin içeren ürünlerin daha dolgun bir ağız hissi olarak algılandığını kanıtlamıştır. Siyalidaz muamelesinden sonra aynı zamanda daha az sinerez görülmüştür (nicelenmemiştir).

20

### **Örnek 10**

### **Sert yoğurt**

Sert yoğurt, örnek 7'de tarif edilen ile aynı prosese göre tam yağlı süttten (%3.5 protein, Albert Heijn) hazırlandı. Siyalidaz prosesi için süt siyalidazla (0.572 mg enzim/g süt proteini, parti ZJW0006, 8.5 mg enzim/ml solüsyonu ihtiva eder) 24 saat boyunca, 5 ardından 5 saat boyunca 30°C'de inkübe edildi. Bu, sütte 156 mg siyalik asit / L ile sonuçlandı, böylece referans 20 mg / L'ye sahip oldu. Süt numunelerinin siyalik asit seviyeleri, örnek 3'te tarif edildiği gibi HPLC ile tespit edildi. Aşılardan sonra süt bardaklara dolduruldu, kapatıldı ve bir ısıtıcı içinde 42°C'de 5 saat bırakıldı. Daha sonra ürün 4°C'de saklandı. 7. günde sıklık, 10 mm derinliğe nüfuz eden yarım inçlik 10 bir prob ve 1 mm/s hızla doku analizi (SMS TA-X2 Stable MicroSystems Godalming, Surrey, BK) ile değerlendirildi. Gramda sıklık o derinlikte kaydedilir. Kontrolün sağlamlığı 37g idi; siyalidaz ile muamele görmüş 4 süt numunesi ortalaması 38g idi.



Şekil 1