

**SERBEST VE MİKROENKAPSÜLE PROBİYOTİK
BAKTERİLERİN TİCARİ DONDURMA ÜRETİMİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

**A STUDY ON THE USE OF FREE AND
MICROENCAPSULATED PROBIOTIC BACTERIA IN THE
COMMERCIAL ICE CREAM PRODUCTION**

AYLA ŞENER

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Kadir HALKMAN

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Ayhan TEMİZ

Üye :.....
Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Üye :.....
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Üye :.....
Yrd. Doç. Dr. Ali TOPÇU

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

SERBEST VE MİKROENKAPSÜLE PROBİYOTİK BAKTERİLERİN TİCARİ DONDURMA ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Ayla ŞENER

ÖZ

Bu çalışmada destek materyali olarak aljinat ve pektin kullanılarak gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işlemlerinin, probiyotik bakterilerin asit, safra ve soğuk depolama koşullarına direnç özelliklerine etkileri ve mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin dondurma üretiminde kullanılabiliirliğı değerlendirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada; iki farklı *Lactobacillus acidophilus* suşu ile iki farklı *Bifidobacterium* türü ve altı farklı prebiyotik test edilmiştir. *L. acidophilus* LA-5 (LA-5) ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB-12) suşları asit ve safraya daha fazla dirençlilik göstermiştir. Bu iki suşun asit ve safraya direnç özelliklerinin gelişme ortamında sırasıyla inulin (INU) ve ksilooligosakkarit (KOS) bulunduğunda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Aljinat ve pektin mikrokapsüllerinin karakterizasyonu sonucu, aljinat ve pektin için optimum mikroenkapsülasyon koşulları saptanmış ve bu koşullarda aljinat ya da pektin kullanılarak LA-5 ve BB-12 hücrelerinin mikroenkapsülasyonları gerçekleştirilmiştir. Mikroenkapsüle bakteri hücrelerinin, serbest formdaki hücrelere göre asit ve safraya daha fazla direnç gösterdiği belirlenmiştir. Aside ve safraya dirençlilik açısından, aljinat ve pektin kullanılarak elde edilen mikrokapsüller arasında önemli bir fark görülmemiştir. Çalışmanın son aşamasında; serbest ve mikroenkapsüle LA-5 ve BB-12 ve bu probiyotik bakteriler için seçilen prebiyotik maddeler (sırasıyla INU ve KOS) kullanılarak dondurma üretimi gerçekleştirilmiştir. Dondurma üretimlerinde probiyotik bakterilerin enkapsülasyon işlemlerinde destek materyali olarak pektinin kullanılması tercih edilmiştir. Soğuk depolama süresince mikroenkapsüle ve serbest bakteri hücrelerinin bulunduğu dondurma örneklerinin canlı bakteri düzeylerinde önemli bir farklılık gözlenmemiş ve dondurma örneklerine uygulanan duyuşal analizler sırasında panelistler tarafından mikroenkapsüle bakteri hücrelerinin ilave edildiğı örnekler için önemli bir olumsuzluk ifade edilmemiştir. Duyusal analizler, dondurma üretiminde mikroenkapsüle probiyotik bakteri ve prebiyotik kullanımının dondurma örneklerinin duyuşal özelliklerini normal depolama süreleri içinde olumsuz yönde etkilemediğini ortaya çıkarmıştır. Araştırma sonuçları pektinin probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu için uygun bir materyal olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, prebiyotik, mikroenkapsülasyon, aljinat, pektin, emülsiyon metodu, dondurma

Danışman: Prof. Dr. Ayhan TEMİZ, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Bilimleri Anabilim Dalı

A STUDY ON THE USE OF FREE AND MICROENCAPSULATED PROBIOTIC BACTERIA IN THE COMMERCIAL ICE CREAM PRODUCTION

Ayla ŞENER

ABSTRACT

In this study, the effects of microencapsulation processes which are performed by using alginate and pectin as carrier materials on the acid, bile or cold storage resistance of probiotic bacteria and usage of microencapsulated probiotic bacteria in ice cream production were evaluated. In the study, two different strains of *Lactobacillus acidophilus*, two different *Bifidobacterium* spp. and six different prebiotics were tested. *L. acidophilus* LA-5 (LA-5) and *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB-12) showed more resistance to acid and bile. It was determined that the acid and bile resistance ability of these two strains was higher when inulin (INU) and xylooligosaccharide (XOS) was used in the growth media, respectively. As a result of characterization of alginate and pectin microcapsules, the optimum microencapsulation conditions were determined for alginate and pectin. Then, the cells of LA-5 and BB-12 were encapsulated by using alginate and pectin under these optimum conditions. It was found that microencapsulated cells of the probiotic bacteria had more acid or bile resistance than free cells. There was no significant difference between the alginate and pectin microcapsules in terms of acid and bile resistance of the strains. In the last part of the study, the ice cream production was carried out by using free or microencapsulated LA-5 and BB-12 and prebiotics, INU and XOS, respectively which were selected for these bacteria. In the ice cream production, the use of pectin was preferred as a carrier material for microencapsulation of probiotic bacteria. Throughout cold storage of ice cream samples, there was no significant difference between the viable bacterial cell numbers of the ice cream samples included microencapsulated and free cells. The experts of the sensory analyses did not declare any important drawback for the samples included microencapsulated bacteria. Sensory analyses showed that use of the microencapsulated probiotic bacteria and prebiotics in the ice cream production had no negative effect on the sensorial properties of the ice cream samples within the acceptable cold storage period. The results of the study indicated that pectin could be a suitable material for the microencapsulation of probiotic bacteria.

Keywords: Probiotic, prebiotic, microencapsulation, alginate, pectin, emulsion method, ice cream

Advisor: Prof. Dr. Ayhan TEMİZ, Hacettepe University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Food Science Section

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve birikimleri ile beni yönlendiren, karşılaştığım sorunların çözümünde yanımda olan, bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi aşamalarında büyük yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayhan TEMİZ'e,

Tez çalışmam boyunca bilgi, emek ve katkılarını esirgemeyen tez izleme komitesi üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İlbilge SALDAMLI ve Prof. Dr. Kadir HALKMAN'a,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyiminden yararlanmamı sağlayan, laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren, ilgi ve desteği ile yanımda olan Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a,

Tez çalışmamın dondurma üretimi aşamasında fabrika olanaklarını kullanmamı sağlayan ve çalışmama destek veren Algida Ürün Geliştirme Yöneticisi Sayın Bil ERGİN'e ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Gündüz CİN ve Osman CAN ile Algida-Unilever San ve Tic. Türk A. Ş, Çorlu fabrikasının diğer tüm çalışanlarına,

Chr. Hansen's dan kültürlerimin temin edilmesinde yardımcı olan Peyma-Chr.Hansen's Peynir Mayası San. ve Tic. A.Ş'den Sayın Müge KUYRUKLIYILDIZ'a,

Tez çalışmamı "Serbest ve mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin ticari dondurma üretiminde kullanılabilirliği üzerine bir araştırma" başlıklı ve 0601602009 nolu proje ile destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Mikroenkapsüle bakteri hücrelerimin floresans mikroskopunda görüntülenmesinde bana yardımcı olan ve zaman ayıran Sayın Sedat ODABAŞ'a,

Çalışmalarım boyunca hoşgörülerine sığındığım, her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm çok sevgili arkadaşlarım Adem DİNÇARSLAN, Dr. Betül VAZGEÇER, Yrd. Doç. Dr. Ali TOPÇU, Araş. Gör. Sine ÖZMEN TOĞAY, Araş. Gör. Ufuk BAĞCI ve burada isimlerini tek tek sıralayamadığım H. Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki ve H. Ü. Kimya Bölümü "Biopolymeric Systems Research Group" laboratuvarındaki tüm arkadaşlarıma,

Verdikleri destek ile beni her zaman ayakta tutan, bugünlere gelmemi sağlayan sevgili ailem, babam Şahin ŞENER'e, ağabeyim Yusuf ŞENER'e, ablalarım Sibel ŞENER ve Hülya BAYRAM'a ve en başta "CANIM ANNEM'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Probiyotik bakteri suşları	33
3.1.2. Besiyerleri, dilüsyon sıvıları ve çözeltiler	33
3.1.3. Prebiyotik maddeler	34
3.1.4. Diğer kimyasal maddeler	34
3.2. Metot	34
3.2.1. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 gelişimi üzerine etkileri	34
3.2.2. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> LA-5 gelişimi üzerine etkileri ...	35
3.2.3. Prebiyotiklerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15696 gelişimi üzerine etkileri	35
3.2.4. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 gelişimi üzerine etkileri	36
3.2.5. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın aside direnç özelliği üzerine etkisi	36

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

	sayfa
3.2.6. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> LA-5'in aside direnç özelliğine etkisi.....	37
3.2.7. Prebiyotiklerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine etkisi	37
3.2.8. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'nin aside direnç özelliğine etkisi	38
3.2.9. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın safraya direnç özelliği üzerine etkisi	38
3.2.10. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> LA-5'in safraya direnç özelliğine etkisi	39
3.2.11. Prebiyotiklerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15696'nın safraya direnç özelliği üzerine etkisi	39
3.2.12. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'in safraya direnç özelliğine etkisi	40
3.2.13. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine etkisi	40
3.2.14. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> LA-5'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine etkisi	40
3.2.15. Prebiyotiklerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15696'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine etkisi	41
3.2.16. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi	41
3.2.17. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri	41
3.2.18. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> LA-5'in β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri	42
3.2.19. Prebiyotiklerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15696'nın β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri	43
3.2.20. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'in β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri	43
3.2.21. Aljinat mikrokapsüllerin hazırlanması ve karakterizasyonu .	43

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

	<u>sayfa</u>
3.2.22. Pektin mikrokapsüllerin hazırlanması ve karakterizasyonu .	45
3.2.23. Probiyotik bakterilerin aljinat mikrokapsüller içerisine mikrokapsülasyonu	46
3.2.24. Probiyotik bakterilerin pektin mikrokapsüller içerisine mikrokapsülasyonu	47
3.2.25. Mikroenkapsüle edilen probiyotik bakterilerin floresan mikroskopunda gözlemlenmesi	47
3.2.26. Mikrokapsül içerisindeki probiyotik bakteri düzeyinin belirlenmesi	48
3.2.27. Mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin aside direnç özelliği	48
3.2.28. Mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin safraya direnç özelliği	49
3.2.29. Dondurma üretimi	50
3.2.30. Dondurma örneklerine uygulanan kalite kontrol testleri	52
3.2.30.1.Viskozite ölçümleri	52
3.2.30.2.Kuru madde analizi	52
3.2.30.3.Erime hızı testi	52
3.2.31. Dondurma örneklerinin mikrobiyolojik analizleri	53
3.2.32. Dondurma örneklerinde duyu muayene	54
3.2.33. İstatistiksel analizler	54
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	55
4.1. Prebiyotiklerin Probiyotik Bakteri Gelişimi Üzerine Etkileri	56
4.1.1. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 gelişimi üzerine etkileri	56
4.1.2. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> LA-5 gelişimi üzerine etkileri ...	59
4.1.3. Prebiyotiklerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15696 gelişimi üzerine etkileri	61

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

	<u>sayfa</u>
4.1.4. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 gelişimi üzerine etkileri	63
4.2. Probiyotik Bakterilerin Aside Direnç Özellikleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi	66
4.2.1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi	66
4.2.2. <i>L. acidophilus</i> LA-5'in aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi	68
4.2.3. <i>B. bifidum</i> ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi	69
4.2.4. <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'nin aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi	71
4.3. Probiyotik Bakterilerin Safraya Direnç Özellikleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi	72
4.3.1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi	72
4.3.2. <i>L. acidophilus</i> LA-5'in safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi	74
4.3.3. <i>B. bifidum</i> ATCC 15696'nın safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi	75
4.3.4. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'in safraya direnç özelliğine etkisi	76
4.4. Probiyotik Bakterilerin Soğuk Depolama Sıcaklıklarına Direnç Özellikleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi	77
4.5. Probiyotik Bakterilerin β -galaktosidaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi	81
4.6. Mikroenkapsülasyon İşlemleri İçin Probiyotik Bakteri Seçimi ve Seçilen Bakteriler İçin Uygun Prebiyotik Maddenin Belirlenmesi	83
4.7. Aljinat Mikrokapsüllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	84
4.7.1. Aljinat konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi	86
4.7.2. CaCl_2 konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi	86

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

	<u>sayfa</u>
4.7.3. Karıştırma hızının mikrokapsül boyutuna etkisi	88
4.8. Pektin Mikrokapsüllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	88
4.8.1. Pektin konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi	90
4.8.2. CaCl ₂ konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi	91
4.8.3. Karıştırma hızının mikrokapsül boyutuna etkisi	91
4.9. Probiyotik Bakterilerin Aljinat Mikrokapsüller İçerisine Mikroenkapsülasyonu	92
4.10. Probiyotik Bakterilerin Pektin Mikroküreler İçerisine Mikroenkapsülasyonu	94
4.11. Mikrokapsül İçerisindeki Probiyotik Bakteri Düzeyinin Belirlenmesi	96
4.12. Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Aside Direnç Özelliği	96
4.13. Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Safraya Direnç Özelliği ...	101
4.14. Serbest ve Mikroenkapsüle Probiyotik Bakteri Kullanılarak Dondurma Üretimi ve Dondurma Örneklerine Uygulanan Analizler	103
4.14.1. Dondurma örneklerine uygulanan kalite kontrol testleri	104
4.14.2. Dondurma örneklerinin mikrobiyolojik analizleri	105
4.14.3. Dondurma örneklerinde duyuşal değeriendirme	107
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	114
6. KAYNAKLAR	121
EKLER	133
ÖZGEÇMİŞ	139

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
Şekil 2.1. Probiyotiklerin önerilen sağlık faydalarının şematik gösterimi ..	11
Şekil 2. 2. Aljinatın kimyasal yapısı	24
Şekil 2. 3. Pektinin kimyasal yapısı	26
Şekil 3.1. Mikroenkapsülasyon düzeneğinin şematik gösterimi	44
Şekil 4.1. Prebiyotik maddelerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri	58
Şekil 4.2. Prebiyotik maddelerin <i>L. acidophilus</i> LA-5 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri	60
Şekil 4.3. Prebiyotik maddelerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15969 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri	63
Şekil 4.4. Prebiyotik maddelerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri	65
Şekil 4.5. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun aside direnç özelliği üzerine FOS ve INU'nın etkileri	67
Şekil 4.6. <i>L. acidophilus</i> LA-5 suşunun aside direnç özelliği üzerine FOS ve INU'nın etkileri	69
Şekil 4.7. <i>B. bifidum</i> ATCC 15696 suşunun aside direnç özelliği üzerine GOS ve SOS'un etkileri	70
Şekil 4.8. <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 suşunun aside direnç özelliği üzerine GOS ve SOS'un etkileri.....	71
Şekil 4.9. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun safraya direnç özelliği üzerine INU ve FOS'un etkileri	73
Şekli 4.10. <i>L. acidophilus</i> LA-5 suşunun safraya direnç özelliği üzerine INU ve FOS'un etkileri	74
Şekil 4.11. <i>B. bifidum</i> ATCC 15696 suşunun safraya direnç özelliği üzerine GOS ve SOS'un etkileri	75
Şekil 4.12. <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 suşunun safraya direnç özelliği üzerine KOS ve SOS'un etkileri.....	77
Şekil 4.13. Aljinat mikrokapsüllerinin basit ışık mikroskopunda 4x objektifi kullanılarak elde edilen farklı görüş sahalarındaki (a,b,c,d) görüntüleri	85

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

	<u>sayfa</u>
Şekil 4.14. Aljinat konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi.....	86
Şekil 4.15. CaCl_2 konsantrasyonunun aljinat mikrokapsül boyutuna etkisi	87
Şekil 4.16. Karıştırma hızının aljinat mikrokapsül boyutuna etkisi	88
Şekil 4.17. Pektin mikrokapsüllerinin basit ışık mikroskopunda 4x objektifi kullanılarak elde edilen farklı görüş sahalarındaki (a,b,c,d) görüntüleri	89
Şekil 4.18. Pektin konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi	90
Şekil 4.19. CaCl_2 konsantrasyonunun pektin mikrokapsül boyutuna etkisi	91
Şekil 4.20. Karıştırma hızının pektin mikrokapsül boyutuna etkisi	92
Şekil 4.21. Aljinat mikrokapsüllerin floresans mikroskopunda 20x objektifi kullanılarak elde edilen görüntüleri; (a) Mikroenkapsüle <i>L.acidophilus</i> LA-5 hücreleri (b) Mikroenkapsüle <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 hücreleri	93
Şekil 4.22. Pektin mikrokapsüllerin floresans mikroskopunda 20x objektifi kullanılarak elde edilen görüntüleri. (a) Mikroenkapsüle <i>L.acidophilus</i> LA-5 hücreleri (b) Mikroenkapsüle <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 hücreleri	95
Şekil 4.23. Aljinat içerisine enkapsüle edilmiş <i>L. acidophilus</i> LA-5'in aside direnç özellikleri	97
Şekil 4.24. Pektin içerisine enkapsüle edilmiş <i>L. acidophilus</i> LA-5'in aside direnç özellikleri	98
Şekil 4.25. Aljinat içerisine enkapsüle edilmiş <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'nin aside direnç özellikleri	99
Şekil 4.26. Pektin içerisine enkapsüle edilmiş <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'nin aside direnç özellikleri	99
Şekil 4.27. Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş <i>L. acidophilus</i> LA-5'in safraya direnç özelliği	101
Şekil 4.28. Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'nin safraya direnç özelliği	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
Çizelge 2.1. Japonya ve Avrupa'da üretilen ticari probiyotik süt ürünleri (Scheinbach, 1998)	6
Çizelge 2. 2. İnsanlarda probiyotik olarak kullanılan <i>Lactobacillus</i> türleri (Sanders and Klaenhammer, 2001)	13
Çizelge 2. 3. Gıda bileşenlerin enkapsülasyonu için kullanılan bazı kaplama materyalleri (Shahidi and Han, 1993)	23
Çizelge 3.1. Aljinat mikrokapsüllerin hazırlanmasında kullanılan formülasyonlar	45
Çizelge 3.2. Pektin mikrokapsüllerin hazırlanmasında kullanılan formülasyonlar	46
Çizelge 4.1. Denenen prebiyotik maddelerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri	57
Çizelge 4.2. Denenen prebiyotik maddelerin <i>L. acidophilus</i> LA-5 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri	59
Çizelge 4.3. Denenen prebiyotik maddelerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15969 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri	62
Çizelge 4.4. Denenen prebiyotik maddelerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri	64
Çizelge 4.5. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi	79
Çizelge 4.6. Prebiyotiklerin <i>L. acidophilus</i> LA-5'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi	79
Çizelge 4.7. Prebiyotiklerin <i>B. bifidum</i> ATCC 15696'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi	80
Çizelge 4.8. Prebiyotiklerin <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'nin soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi	80
Çizelge 4.9. Çalışmada kullanılan probiyotik bakteri suşlarının β -galaktosidaz aktiviteleri üzerine prebiyotiklerin etkisi	82

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

	<u>sayfa</u>
Çizelge 4.10. Kuru formdaki aljinat ve pektin mikrokapsüller içerisindeki probiyotik bakteri düzeyleri	96
Çizelge 4.11. Dondurma örneklerinin kuru madde ve viskozite değerleri	104
Çizelge 4.12. Dondurma örneklerinin erime hızları	105
Çizelge 4.13. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeyleri (log kob/ml)	106
Çizelge 4.14. Depolamanın dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeylerine etkisi	107
Çizelge 4.15. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama renk ve görünüş puanları	108
Çizelge 4.16. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama yapı ve kıvam puanları	109
Çizelge 4.17. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama tat ve koku puanları	110
Çizelge 4.18. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama toplam kabul edilebilirlik puanları	112

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: American Type Culture Collection
FOS	: Fruktooligosakkarit
GLU	: Glukoz
GOS	: Galaktooligosakkarit
IDF	: International Dairy Federation
INU	: İnulin
KOS	: Ksilooligosakkarit
LAK	: Laktuloz
MRS Agar	: Lactobacillus Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE
MRS Broth	: Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE
ONP	: ortho-nitrophenol
ONPG	: 2-Nitrophenyl β -D-galactopyronoside
RCA	: Reinforced Clostridial Agar
RCM	: Reinforced Clostridial Medium
SOS	: Soya oligosakkariti
TPS	: Tamponlanmış Peptonlu Su

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından
0601602009 nolu proje ile desteklenmiştir.

Probiyotik mikroorganizmaları içeren fonksiyonel gıdaların popüler olduğu günümüzde, bu tez kapsamında gerçekleştirilen dondurma üretimlerinin üniversite-sanayi işbirliği ile üretilmesi, çalışmanın uygulamaya yönelik olması adına önemli bir değerdir. Bu bağlamda verdikleri destek için Algida-Unilever-San. ve Tic. Türk A. Ş'ne ve tüm personeline teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Gıdalar, günümüzde lezzet ve besin içeriklerinin yanı sıra, fonksiyonel yararlar sağlayıp sağlamadıkları açısından da değerlendirilmektedir. Gelişen yaşam standartları ve sağlıklı gıda tüketimi bilincinin gelişmesi sonucu ortaya çıkan tüketici talebinin sürekli artmasıyla birlikte, son yıllarda fonksiyonel gıdalara olan ilgi de artmış ve bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Marketlerde önemli bir yer kaplayan fonksiyonel gıdaların sayısı önemli düzeyde artmakta olup fonksiyonel gıda ürünü çeşitliliğini arttırmak amacıyla birçok çalışma gerçekleştirilmektedir.

Probiyotikler, fonksiyonel gıdalar kavramı içinde önemli bir yer tutmakta, gösterdikleri sağlık faydaları nedeniyle üzerinde yoğun çalışmaların devam ettiği dinamik bir araştırma konusu niteliğini sürdürmektedir.

Probiyotiklerin sağlık üzerine birçok olumlu etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Probiyotikler, yeterli düzeyde alındığında bağırsak sistemindeki mikrobiyal dengeyi iyileştirerek insan veya hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalardır. Probiyotikler, antimikrobiyal etki ve antagonistik aktivite göstererek gastro-intestinal enfeksiyonların kontrol edilmesine yardımcı olmakta, β -galaktosidaz gibi önemli sindirim enzimlerinin üretimi ile birlikte laktoz kullanımını iyileştirmekte ve serum kolesterol düzeyinin azaltmasına yardımcı olmaktadır. Bunların yanı sıra, probiyotiklerin antitümör ve antikanserijenik aktivite gösterebilmeleri, immunomodülatör özellikleri ve anti-alerji fonksiyonları da diğer terapötik faydaları arasında yer almaktadır. Kalsiyum, çinko, demir, manganez, bakır ve fosfor gibi mineral ve iz elementlerin biyo-yararlanımını arttırmaları, proteinlerin sindirimini kolaylaştırmaları ve vitamin sentezi gerçekleştirmeleri de sağlık üzerinde gösterdikleri olumlu etkileri arasında değerlendirilmektedir.

Sözü edilen tüm bu sağlık faydalarını gerçekleştirebilmeleri için, probiyotiklerin canlı olarak belli bir düzeyde kolona (kalın bağırsağa) ulaşmaları gerekmektedir. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF; International Dairy Federation), sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterebilmesi için üründe son kullanma tarihinde ve tüketim anında az 10^7 kob/g bakterinin aktif olarak bulunmasını önermektedir (Sultana et al., 2000).

Probiyotiklerin, sağlık üzerine olumlu etkilerini göstermeleri için kolona ulaşmaları gereken canlılık düzeylerini azaltan bir takım faktörler bulunmaktadır. Gıdanın  retimi sırasında dondurma ya da karıştırma gibi proses gereği uygulanması gereken bazı işlemler probiyotiklerin canlılıkları üzerine olumsuz etkiler gösterebildiği gibi, gıdanın depolanması sırasında sıcaklık, ortamdaki oksijen miktarı, ortam asitliği gibi faktörler etkisiyle de probiyotiklerin canlılık düzeylerinde azalmalar görülebilmektedir. Gıdanın tüketimi sonrasında ise, probiyotiklerin kolona ulaşana kadar izledikleri yol boyunca karışlaştıkları mide asitliği ve safranin olumsuz etkileri sonucu canlılıklarında yine önemli kayıplar gerçekleşebilmektedir.

Probiyotik mikroorganizmaların kullanımı özellikle süt ve süt ürünleri olmak üzere çeşitli fermente gıda ürünlerinde yaygındır. Probiyotik gıdalar arasında tüketiciler tarafından en çok tanınan ürün yoğurt olmakla birlikte krema, ayran, süt tozu, dondurulmuş tatlılar, içecekler, bebek mamaları, şekerlemeler, hububat ürünleri ve çikolata gibi ürünlerin formülasyonlarında da probiyotik mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar ayrıca tablet, kapsül ve dondurularak kurutulmuş preparatlar şeklinde de pazarlanmakta ve tüketilmektedir (Shortt, 1999; Shah, 2001).

Dondurma, besin değerinin yüksek olması ve sindiriminin kolaylığı yanında sevilen tat ve aroması ile ferahlatıcı niteliği sayesinde tüketimi oldukça fazla olan ve toplumun hemen hemen her kesimi tarafından sevilerek tüketilen bir süt ürünüdür. Ayrıca, dondurmanın yoğurt gibi probiyotik bakterilerin canlılıklarını ve gelişimlerini olumsuz etkileyecek düşük pH'ya sahip olmaması da bu ürünü probiyotik bakterilerin kullanımı için cazip hale getirmektedir. Ancak literatürde dondurma işleminin canlı bakteri sayısında 0,5 - 1 log arasında kayba neden olabileceği belirtilmektedir (Christiansen et al., 1996; Hagen and Narvhus, 1999; Davidson et al., 2000). Bunun yanı sıra dondurma miksinin karıştırılması esnasında uygulanan mekanik etkinin bakteri hücrelerinde hasara neden olabileceğine de değinilmektedir (Hagen and Narvhus, 1999). Dondurma prosesinin belirli bir aşamasında dondurma karışımına istenen overrun değerini vermek amacıyla belli miktarda hava uygulanmasının, üründeki oksijen düzeyini arttırması nedeniyle anaerobik ve mikroaerofilik karakterdeki probiyotik bakteriler için toksik etki oluşturacağı da açıktır. Bu durum özellikle anaerobik olan bifidobakteriler için

önemli ve kritik bir sorun teşkil etmektedir (Hagen and Narvhus, 1999; Shah, 2000).

Probiyotiklerin canlılık düzeylerindeki azalmanın önüne geçmek veya en aza indirmek amacıyla, uygun bakteri suşu seçimi, gıda üretim proseslerinin modifikasyonu, depolama koşullarının iyileştirilmesi ve kontrol edilmesi ile uygun ambalaj seçimi gibi bazı önlemler alınmakla birlikte, probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu şeklinde önlem alma çalışmaları son yıllarda büyük bir önem kazanmıştır.

Mikroenkapsülasyon, hücre hasarını ve hücre kaybını azaltmak amacıyla hücrelerin uygun bir taşıyıcı destek materyali içine hapsedilme işlemidir (Krasaekoopt, 2003). Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu, gıda işleme ve depolama sırasında hücre kaybını azaltmak ve vücutta karşılaştıkları stres ortamlarına dirençlerini artırarak, yüksek sayıda kolona ulaşmalarını sağlamak amacıyla uygulanmaktadır. Enkapsülasyon yöntemi ile probiyotik bakterilerin hem gıda içerisinde hem de vücuda alındıktan sonra bağırsak bölgesine ulaşana kadar canlılığını büyük oranda koruduğu bildirilmektedir.

Bu tez çalışmasında probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonlarında taşıyıcı destek materyali olarak aljinat ve pektinin kullanılabilirliği değerlendirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan dört farklı probiyotik bakterinin (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ve *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696), gelişme özellikleri üzerine farklı prebiyotik maddelerin etkileri ile bu bakterilerin asit ve safra dirençliliği gibi çeşitli teknolojik özellikleri incelenmiştir. Probiyotik bakterilerin pektin içerisine mikroenkapsülasyonunda farklı işlem parametrelerinin etkileri belirlenerek, mikroenkapsülasyon koşulları optimize edilmeye çalışılmıştır. Belirlenen optimum mikroenkapsülasyon koşullarında enkapsüle edilen probiyotik bakteri hücreleri ve serbest bakteri hücreleri kullanılarak dondurma üretimleri gerçekleştirilmiş, probiyotik bakterilerin depolama boyunca üründe canlı kalma düzeyleri ile ürünün yapısal ve duyu özellikleri üzerine etkileri değerlendirilerek, pektin içerisine enkapsüle edilen probiyotiklerin dondurma üretiminde kullanılabilirliği tartışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Gıdaların beslenme gereksinimlerini karşılamalarının yanı sıra, sağlık boyutunun olduğu da yeni bir kavram değildir. Tıbbın babası sayılan Hipokrat'ın yaklaşık 2500 yıl önce söylediği “Gıdalar ilacınız, ilacınız gıdalar olsun” sözü bu olgunun oldukça eski dönemlere dayandığını doğrular niteliktedir.

Fonksiyonel gıdalar, gıda pazarının her geçen gün hızla gelişen ve üzerinde sıklıkla durulan önemli bir alanıdır. Fonksiyonel gıdalar genel olarak “temel besin sağlamanın ötesinde sağlık kalitesini artıran gıdalar” olarak tanımlanmaktadır. Daha geniş bir tanımlama ile fonksiyonel gıdaları “temel besin gereksinimlerini karşılamamanın ötesinde sağlık üzerine olumlu etkileri olan, biyoaktif gıda bileşenlerinden biri veya birkaçını içeren gıdalar” olarak tanımlanmak mümkündür. Fonksiyonel gıdaların sağlık kalitesinin yükseltmesinde etkilerinin olduğu ancak görevlerinin hastalık tedavi etmek olmadığı unutulmaması gereken önemli bir noktadır (Sanders, 1998).

Fonksiyonel gıda terimi ilk kez Japonya’da kullanılmaya başlanmış ve yasal olarak “Food for Specified Health Use (FOSHU)” terimi ile ifade edilmiştir. Bu terim Japonya’da “tüketiminden sonra sağlık üzerinde iyileştirici bir etkisinin olması beklenen, içerisindeki bazı maddeleri uzaklaştırılmış veya içerisine bazı öğelerin belirli bir amaçla eklendiği ve resmi kullanımının onaylandığı gıdalar” olarak tanımlanmaktadır. FOSHU ürünlerinin etiketlerinde özel bir sembol bulunmakta, böylece tüketicinin bu ürünleri diğer ürünlerden kolaylıkla ayırt etmesi hedeflenmektedir. FOSHU ürünleri, tüketicinin diyetinde kolaylıkla yer alabilmekte ancak, geleneksel gıdalardan farklı bir şekilde sunulmasına (örneğin hap olarak) yasal olarak izin verilmemektedir. Şu anda kabul edilen FOSHU ürünlerinin birçoğu bağırsak mikroflorasını geliştirmek amacıyla oligosakkaritleri veya laktik asit bakterileri gibi probiyotik mikroorganizmaları içeren gıdalar şeklindedir (Yücecan, 2001).

Fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi amacıyla izlenen yolda öncelikle gıdadaki fonksiyonel bileşen ile vücuttaki bir veya daha fazla hedef fonksiyon arasındaki spesifik ilişkinin ve bu ilişkilere yönelik etki mekanizmaları ile ilgili geçerli kanıtların tanımlanması, söz konusu fonksiyonel etki ile ilgili biyo-göstergelerin

tanımlanması, nitelendirilmesi, doğrulama çalışmalarının yapılması, fonksiyonel özellik gösteren gıda bileşeninin güvenilir tüketim miktarının belirlenmesi, fonksiyonel özellik gösteren gıda bileşeninin iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı göstergelerinin veya bir veya daha fazla hedef fonksiyonların geliştirilmesine yönelik hipotezlerle ilgili yeni insan çalışmalarının yapılması gerekmektedir (Roberfroid, 2000).

Fonksiyonel gıdalar günümüzde gıda marketlerinin önemli bir parçasını oluşturmakta ve özellikle bağırsak sisteminin aktivitesi ve dengesini iyileştirmek amacıyla yaygın olarak satın alınıp tüketilmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar da bu yönde sağlık üzerine birçok olumlu etkilere sahip olmalarından dolayı fonksiyonel gıda üretiminde kullanılmakta ve bu mikroorganizmaları içeren gıda formülasyonları üzerinde önemle durulmaktadır. Özellikle Japonya ve Avrupa'da probiyotik katkılı süt ürünleri ve içecekler hızla büyüyen bir endüstri niteliğinde olmuştur. Çizelge 2. 1 'de Japonya ve Avrupa'da üretilen ve marketlerde yerini almış probiyotikli fermente süt ürünlerine çeşitli örnekler verilmiştir (Scheinbach, 1998).

İnsan gastrointestinal sistemi, çok karışık ve dinamik bir ekosisteme sahiptir. Gastrointestinal sistem, insanda mikroorganizmaların en yoğun kolonize olduğu vücut bölgesi niteliğindedir. Yetişkin bir insanın gastrointestinal sisteminde 400'den fazla bakteri türünün bulunduğu ve düzeylerinin yaklaşık 10^{12} kob/gr olduğu tahmin edilmektedir (Savage, 1977; Mitsuoka, 1982; Fooks et al., 1999; Isolauri, 2004).

Mide mikroflorası ağırlıklı olarak Gram-pozitif ve fakültatif anerobik olan streptokoklar ve laktobasiller ile çeşitli funguslardan oluşmaktadır (Richardson, 1996). Midenin asidik pH özelliği nedeniyle bu bakterilerin sayıları 10^3 /ml'den daha düşük düzeylerde kalmaktadır. İnce bağırsak, mide ile kolon arasında geçiş kanalı oluşturmaktadır. İnce bağırsağın üst yarısında (jejunum) 10^3 - 10^4 /ml düzeyinde streptokoklar ve laktobasiller bulunurken, ince bağırsağın alt yarısında (ileum) Gram-negatif ve anaerobik bakteriler baskın olarak 10^6 - 10^7 /ml düzeyinde bulunmaktadır. Bağırsak hareketleri ve safra tuzlarının inhibitör etkileri ince bağırsaktaki bakterilerin aşırı gelişimin engelleyen önemli faktörlerdir.

Çizelge 2.1. Japonya ve Avrupa'da üretilen ticari probiyotik süt ürünleri (Scheinbach, 1998)

Ürün	Üretilen Ülke	Organizmalar
ACO-yogurt	İsviçre	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i>
Cultura-AB	Danimarka	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
AB-yogurt	Danimarka	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , yoğurt kültürü
Biogarde	Almanya	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i>
Bifighurt	Almanya	<i>B. longum</i> , <i>S. thermophilus</i>
Gefilac	Finlandiya	<i>L. casei</i> GG (rhamnosus)
Yakult	Japonya	<i>L. casei</i>
Miru Miru	Japonya	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i>
Mil Mil E	Japonya	<i>B. bifidum</i> , yoğurt kültürü
Biokys	Slovakya	<i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Ofilus	Fransa	<i>B. bifidum</i> / <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i>
Gaio	Danimarka	<i>E. faecium</i> , <i>S. thermophilus</i>
LC1	Avrupa	<i>L. acidophilus</i> La1
Symbalance*	İsviçre	<i>L. reuteri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i>
Probiotic plus	Almanya	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bifidus</i> , LA7
Oligofructose*		
ProCult3	Almanya	<i>B. longum</i> BB536
Actimel Orange	Almanya	<i>L. acidophilus</i>
Fysiq*	Hollanda	<i>L. acidophilus</i> Gililand

*Fruktooligosakkarit içermektedir

Diğer gastrointestinal bölgelerin aksine, insan kalın bağırsağı kompleks ve yoğun popülasyonlu bir mikrobiyal ekosisteme sahiptir. Mikrobiyal kolonizasyonun en yoğun olduğu bölge olan kalın bağırsakta yaklaşık 400 bakteri türünün bulunduğu ve sayılarının ise 10^{11} - 10^{12} /g arasında olduğu belirtilmektedir (Fooks et al., 1999; Isolauri, 2004). Bağırsak florasını oluşturan bakteriler arasında; *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* ve *Proteus* cinsleri yer almaktadır (Naidu, Bidlack and Clemens, 1999; Holzapfel and Schillinger, 2002).

Bağırsak sistemi mikroflorası, bağırsağın bölgelerine göre farklılık göstermekte, ayrıca beslenme, genetik yapı, çeşitli hastalıklar, konakçının yaşı, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı gibi bazı yapısal ve fizyolojik durumlar ile çevresel faktörlerden dolaylı veya dolaysız olarak etkilenebilmektedir (Holzapfel and Schillinger, 2002; Ziemer and Gibson, 1998).

İntestinal mikrofloranın metabolik aktiviteleri arasında ekzojen ve endojen karbon ve enerji kaynaklarının fermentasyonu önemli bir yer tutmaktadır. Fermentasyon boyunca hem bağırsak sistemine hem de sistematik fizyolojiye olumlu veya olumsuz etkilere sahip bileşikler üretilebilmektedir (Scheinbach, 1998; Isolauri et al., 2004). Farklı çeşitlerdeki oligosakkaritlerin metabolizması sonucu, kısa zincirli yağ asitleri üretilmekte ve böylece de özellikle konakçının bağırsak hücreleri (kolonositler) için enerji kaynağı sağlanmaktadır. Bunlardan butirik asit, bağırsak epiteli için başlıca enerji kaynağı niteliğinde olup, kolonda mukoza sağlığının korunmasında önemlidir. Bazı bağırsak mikroflora üyeleri ise aynı zamanda proteinler ve aminoasitler gibi diğer maddeleri kullanmakta ve bunların fermentasyonu sonucu tümör tetikleyiciler ve destekleyiciler gibi çeşitli toksik maddelerin üretimine neden olabilmektedirler. Bağırsak mikroflorasının çeşitli üyeleri vitamin üretme (özellikle K vitamini) özelliğine de sahiptirler. İntestinal mikrofloranın diğer önemli bir fonksiyonu ise, vücuda giren mikroorganizmalara karşı koruma sağlama ve mukozal savunma bariyerinin önemli bir bileşeni niteliğinde olmasıdır (Scheinbach, 1998; Isolauri et al., 2004; Del Piano et al., 2006).

Bağırsak sistemindeki bakterilerin bir bölümünü potansiyel zararlı bakteriler, bir bölümünü yararlı bakteriler, bir bölümünü ise zararlı ya da yararlı etkileri olmayan diğer bakteriler oluşturmaktadır. Bağırsak sistemindeki zararlı bakteriler gıda bileşenlerinden aminler, indol, hidrojen sülfid ya da fenoller gibi çeşitli zararlı maddeleri üretmekte ve bağırsak sorunlarına neden olmaktadırlar. *Clostridium*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Campylobacter* ve çeşitli *Bacteroides* türleri bu yönde zararlı bakteriler arasında sayılabilmektedir (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Sözü edilen bu zararlı bakterilerin dışında, insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olan ve hastalıklara karşı koruyucu etkilere sahip oldukları düşünülen yararlı bakteriler de bulunmaktadır. Genel olarak “probiyotikler” olarak ifade edilen

bu tür bakterilere bifidobakterler ve laktobasilleri örnek olarak göstermek mümkündür (Gibson and Roberfroid, 1995).

Sağlıklı bir bireyin bağırsak sisteminde mikrobiyal bir denge söz konusudur. Bağırsak sistemindeki mevcut mikrobiyal dengenin olumsuz yönde bozulması, diğer bir ifadeyle zararlı bakterilerin sayısının artarak baskın hale gelmesi, bir takım bağırsak sorunlarına yol açmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin fermente süt ürünlerinde kullanımıyla gösterdikleri sağlık faydaları, ilk olarak Rus biyolog Metchnikoff tarafından yaşam süresini uzatmak için laktobasillerle fermente edilmiş süt ürünlerinin (yoğurt) tüketilmesini tavsiye etmesiyle gündeme gelmiştir (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001; Holzapfel and Schillinger, 2002; Turgut ve Çakmakçı, 2003). Metchnikoff, Bulgar çiftçilerinin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde *Lactobacillus* spp. türlerinin bulunması ve bunların bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi olduğunu belirtmiştir (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Probiyotik mikroorganizmalar, pek çok araştırmacı tarafından çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. “Probiyotik” terimi Yunanca’dan türeyen bir kelime olup, “yaşam için” anlamını taşımaktadır. Probiyotik terimi ilk kez Lilley ve Stillwell tarafından bir mikroorganizma tarafından salgılanan ve bir başkasının gelişimini uyarıcı maddeleri tarif etmek amacıyla kullanılmıştır (Naidu, Bidlack and Clemens, 1999). Parker tarafından 1974’de “bağırsak mikrobiyal dengesine katkıda bulunan organizmalar ve maddeler” olarak tanımlanmış, ancak bu tanım “maddeler” teriminin antibiyotikler gibi kimyasalları da kapsamaması nedeniyle yetersiz kalmıştır. Daha sonraki aşamada, probiyotik etkisinin zorunlu bileşeni olarak canlı hücrelerin önemini vurgulamak için probiyotiklerin tanımı genişletilmiştir. Fuller, 1989’da probiyotikleri “bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirerek konakçı hayvanı olumlu yönde etkileyen canlı mikrobiyal besin katkısı” olarak tanımlamış, bu tanım günümüzde kullanılan probiyotik tanımına da temel oluşturmuştur (Fooks et al., 1999; Saarele et al., 2000). Havenaar ve Huis in’t Havenaar ise, Fuller’in bu tanımını genişleterek probiyotikleri “insan ya da hayvanlara uygulandığında mevcut mikrofloranın özelliklerini iyileştirerek konakçıyı olumlu etkileyen tek ya da karışık canlı mikroorganizma kültürleri” olarak tarif etmiştir (Klaenhammer and

Kulen, 1999). Günümüzde genel olarak probiyotikler “yeterli miktarda alındığında bağırsak sistemindeki mikrobiyal dengeyi iyileştirerek insan veya hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar” şeklinde tanımlanmaktadır.

Probiyotik kavramı içerisinde bilinmesi ve göz önünde bulundurulması gereken bir diğer kavram ise “prebiyotik” terimidir. Prebiyotikler, mide ve ince bağırsakta sindirilmeden kalın bağırsağa geçen ve burada bulunan *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. gibi probiyotik bakterilerin gelişmelerini ve aktivitelerini destekleyen gıda bileşenleridir (Can ve Özçelik, 2003; Yıldırım ve ark., 2003). Bir gıda bileşeninin prebiyotik grubu içinde yer alabilmesi için; mide ve ince bağırsakta hidrolize ve absorbe olmaması, bağırsakta bulunan yararlı bakteriler tarafından kullanılabilmesi, sağlığı iyileştirici yönde bağırsak florasını değiştirebilmesi ve insan ve hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyebilmesi gerekmektedir (Yıldırım ve ark., 2003). Prebiyotik özelliğe sahip en önemli gıda bileşenleri arasında fruktooligosakkaritler, inülin, glukooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, ksilooligosakkaritler, izomaltooligosakkaritler, gentiooligosakkaritler, laktuloz, laktosukroz, polidekstroz, pirodekstrin, raffinöz ve dirençli nişasta sayılabilir (Ziemer and Gibson, 1998; Can ve Özçelik, 2003; Yıldırım ve ark., 2003).

Herhangi bir mikroorganizmanın probiyotik kapsamında incelenebilmesi ve bu amaçla kullanılabilmesi için sahip olması gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Bunları aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür (Hagen and Narvhus, 1999; Klaenhammer and Kulen, 1999; Shortt, 1999; Saarela et al., 2000; Çakır ve Çakmakçı, 2004);

- İnsan orijinli olmalı,
- Gıda ve klinik amaçlı kullanımlarda güvenli olmalı, yani patojen olmamalı ve toksin üretmemeli,
- Asit ve safra tuzlarına dirençli olmalı,
- Bağırsak epitel hücrelerine tutunabilme özelliğine sahip olmalı,
- Sağlık üzerine olumlu etkileri klinik çalışmalarla kanıtlanmış olmalı,
- *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium difficile* gibi patojenlere karşı antagonistik aktiviteye sahip olmalı,
- Antimikrobiyal bileşikler oluşturabilmeli,
- Bağırsak sistemindeki normal flora ile rekabet edebilmeli ve bağırsak

mikroflorasını stabilize edebilmeli,

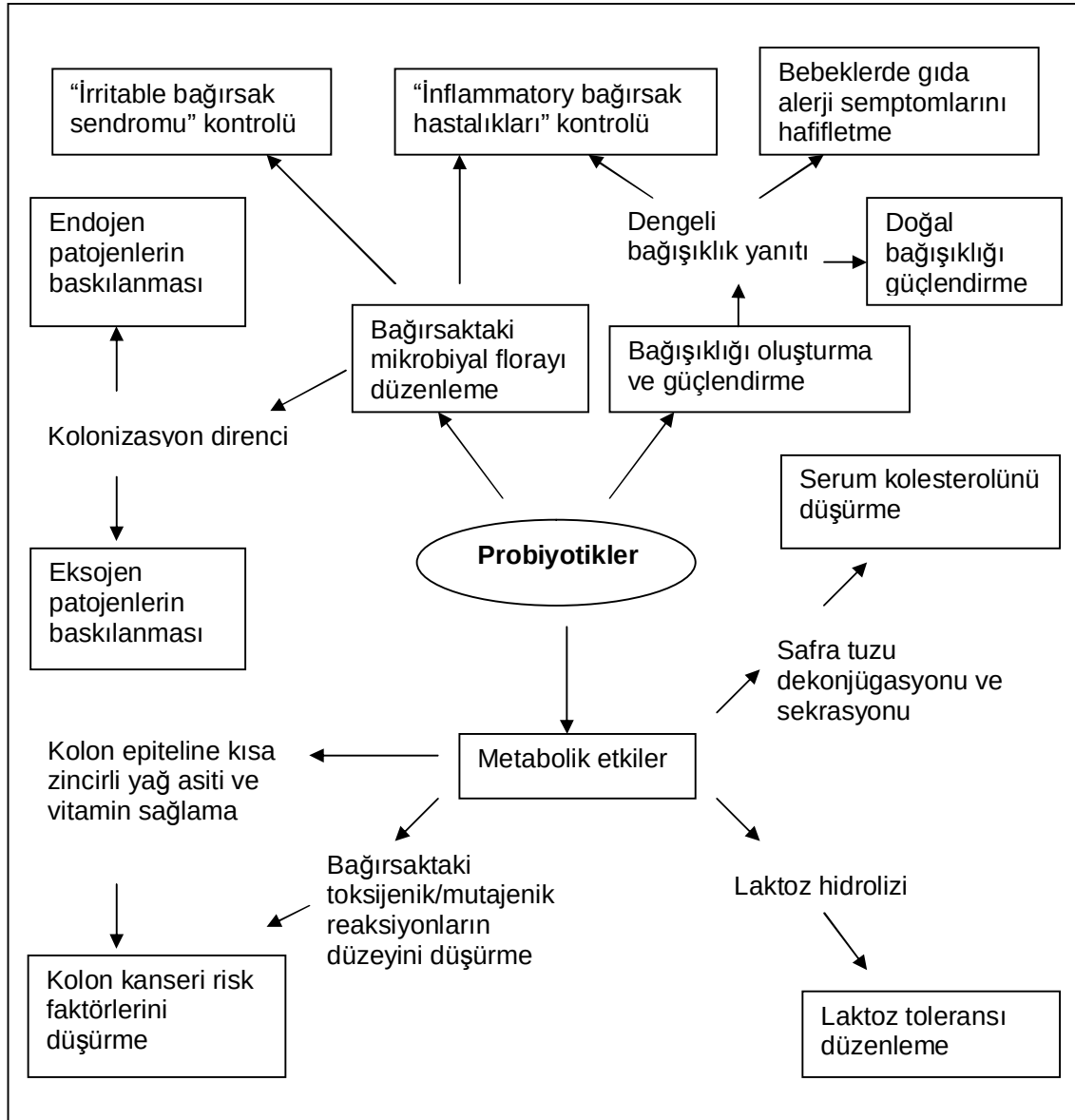
- Teknolojik açıdan üstün özellikleri olmalı (üründe canlı kalabilme yeteneği, depolama koşullarına direnç, faj dirençliliği, büyük ölçekte üretime uygunluk, oksijene direnç yeteneği, üründe olumsuz değişiklikler oluşturmaması)

L. acidophilus ve *Bifidobacterium* spp. gibi probiyotik bakterilerin diyetle birlikte alınan canlı kültürlerinin insan sağlığı üzerine çeşitli terapötik ve besinsel faydalar sağladıkları belirtilmektedir (Kurmman and Rasic, 1991; Ishbashi and Shimamura, 1993; Kalantzopoulos, 1997 ; Shah and Lankaputhra, 1997; Scheinbach, 1998; Hagen and Narvhus, 1999 ; Klaenhammer and Kulen, 1999; Shortt, 1999 ; Schiffrin and Blum, 2001; Shah, 2001; Holzapfel and Schillinger, 2002; Saarela et al., 2002; Tuohy et al., 2003). Kalsiyum, çinko, demir, manganez, bakır ve fosfor gibi mineral ve iz elementlerin biyo-yararlanımını arttırmak, proteinlerin sindirimini arttırmak ve vitamin sentezi gerçekleştirmek probiyotiklerin besinsel faydaları sayılabilir.

Terapötik faydaları arasında ise; gastro-intestinal enfeksiyonları kontrol etmesi, antimikrobiyal etki göstermesi, antagonistik aktivite göstermesi, böbrek rahatsızlıklarını gidermesi, β -galaktosidaz gibi önemli sindirim enzimlerinin üretimi ile birlikte laktoz kullanımını iyileştirmesi, serum kolesterol düzeyini azaltması, antitümör ve antikanserijenik aktivite göstermesi, immunomodülatör özellikleri ve anti-alerji fonksiyonları gibi birçok sağlık faydaları yer almaktadır. Probiyotiklerin sözü edilen bu faydaları Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmeye çalışılmıştır (Saarela et al., 2002).

Probiyotik mikroorganizmalar bağırsak florasında yeteri düzeyde bulunduklarında bağırsak rahatsızlıklarını önleyici etki göstermektedirler. Bu mikroorganizmalar bazı patojenlerin kolonizasyonunu ve üremelerini önlemekte ve bağışıklık sistemini güçlendirmektedirler. Vücutta β -galaktosidaz enzim sentezinin eksikliğinden dolayı görülen "laktoz intolerans" rahatsızlığının giderilmesi ya da hafifletilmesinde önemli rol üstlenirler. *L. acidophilus* laktosidin, asidofilin, asidolin, laktolin ve laktasin B adı verilen doğal bazı antimikrobiyal maddeleri üretmekte, bifidobakterler ise laktik asit ve asetik asit gibi doğal zayıf asitler üreterek bağırsak sisteminde asitliği arttırmakta ve böylece de bazı patojen bakterilerin gelişimini engellemekte,

bağırsak pH'sını düzenlemekte ve bağırsak rahatsızlıklarının azalmasında etkili olmaktadır (Nahaisi, 1986).



Şekil 2.1. Probiyotiklerin önerilen sağlık faydalarının şematik gösterimi (Saarela et al., 2002).

Probiyotik bakteriler pütraktif bakterilerin gelişmesini engelleyerek, bunların nitrozaminleri ve diğer kanserojen bileşikleri oluşturmalarını önlemekte, dolayısıyla kanser riskini azaltmaktadırlar. Bütün bu olumlu etkilerinin yanında, probiyotik bakterilerin kan serumu kolesterol düzeyini azaltıcı etki gösterdikleri, kalp-damar hastalıklarını engelleyebildikleri, iyi huylu kolesterol düzeyini arttırdıkları belirtilmektedir.

Probiyotiklerin etki mekanizmaları ile ilgili çeşitli açıklamalar bulunmaktadır. Ancak yine de hangi patojenlere karşı hangi probiyotiklerin etkili olduğunun tam olarak belirlenmesi için daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Probiyotiklerin muhtemel etki şekilleri aşağıda özetlenmiştir (McNaught and MacFie, 2001; Çakır ve Çakmakçı, 2004).

1. İnhibe edici maddeler üretirler (organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler)
2. Tutunma bölgelerini bloke ederler ve patojenlerle bu bölgeler için rekabete girerek patojenlerin intestinal sistemde yerleşmelerini engellerler
3. Besin maddeleri için rekabet ederler
4. Patojenlerin toksin reseptörlerini yıkıma uğratırlar
5. Bağışıklık sistemini güçlendirirler

Bu mekanizmaların en etkili olanı, enteropatojenlerin konakçının bağırsak sisteminde koloni oluşturmasını önlemek amacıyla bağırsak epitel yüzeyindeki tutunma bölgeleri için rekabet oluşturmalarıdır. Bağırsak epiteline tutunarak enteropatojenlerin bu bölgelerde koloni oluşturmasını önleyen probiyotikler ayrıca, antagonistik etki yapmakta, besin elementleri için rekabet ortamı oluşturmakta ve bağışıklığı teşvik etmektedir. Probiyotik bakteriler propiyonik asit, asetik asit, bütirik asit ve laktik asit gibi antibakteriyel etkiye sahip organik asitleri üretmektedirler. Çözünmeyen formdaki yağ asitleri (propiyonik asit, asetik asit ve bütirik asit), patojen bakterilerin hücre duvarını geçerek hücre içine diffüze olmakta ve hücre içinde çözünür forma dönüşerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Laktik asit üretimi ile kalın bağırsaktaki pH düzeyi düşürülerek istenmeyen zararlı bakterilerin gelişimi sınırlandırılmaktadır.

Probiyotik bakterilerin büyük bir çoğunluğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakteri cinsleri içinde yer almaktadır. İnsan ve hayvan bağırsak sisteminin normal florasında da yer alan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gıda ve yem üretimlerinde probiyotik amaçlı olarak yaygın bir şekilde başvurulmuş bakterilerdir. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. gallinarum*, *L. crispatus* ile *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis* probiyotik olarak en sık kullanılan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*

türleridir. Bunların dışında *Streptococcus thermophilus*, *Propionibacterium freundenreichii*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii* ve *E. coli* Nissle probiyotik amaçlı kullanılan diğer mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Hagen and Narvhus, 1999; Shortt, 1999; Shah, 2001; Holzapfel and Schillinger, 2002).

Laktobasiller, Gram-pozitif, çubuk şekilli, hareketsiz, spor oluşturmeyen ve mikroaerofilik bakterilerdir. Mikroaerofilik bakteriler olmaları nedeniyle katı besiyeri üzerinde yüzey gelişimleri genellikle anaerobik ortam ya da oksijen basıncı düşürülmüş ve % 5-10 CO₂ ortam sağlanarak geliştirilir (Kandler and Weiss, 1986). İnsanların ve yüksek hayvanların gastrointestinal mikrobiyotasının önemli bir parçasını oluşturan laktobasillerin birçok türü probiyotik olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2. 2) (Sanders and Klaenhammer, 2001).

Çizelge 2. 2. İnsanlarda probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* türleri (Sanders and Klaenhammer, 2001)

Zorunlu Homofermentatif Türler	Fakültatif Heterofermentatif Türler	Zorunlu Heterofermentatif Türler
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. amylovarus</i>	<i>L. paracasei</i> spp. <i>tolerans</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>		
<i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i>		

L. acidophilus probiyotik bakteri olarak gıda formülasyonlarında oldukça yaygın olarak kullanılan *Lactobacillus* türlerinden bir tanesidir. Genellikle 0.6-0.9 x 1.5-6 µm boyutlarında olan *L. acidophilus*'un birçok suşu sellobiyoz, fruktoz, galaktoz, glukoz, laktoz, maltoz, mannoz, salisin, sukroz, rafinoz, trehaloz ve eskulini fermente edebilmektedir. Mannitolu kullanamazlar. Gelişebildikleri sıcaklık değerleri 35-40 °C arasındadır, ancak 45 °C gibi yüksek sıcaklıkta da

gelişebildikleri görülmektedir. Optimum gelişme pH aralığı 5.5-6.0'dır (Rogosa, 1974; Kandler and Weiss, 1986).

Bifidobacterium ilk kez Pasteur Enstitüsü'nden Henri Tissier tarafından 1900'de yeni doğan bebeklerin dışkılarından izole edilmiş ve gözlemlenmiştir. Tissier bu bakteriyi sıra dışı Y şekline sahip olmasını temel alarak *Bacillus bifidus communis* olarak isimlendirmiştir (Hoover, 1999). Bifidobakterler daha sonra *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bacterium*, *Tisseria*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Actinobacterium*, *Cohnistreptothrix* ve *Corynebacterium* gibi çeşitli bakteri cinsleriyle ilişkilendirilmiştir (Mitsuoka, 1984; Hoover, 1999). Orla-Jensen tarafından, 1924'de bu bakteriler ayrı bir cins olarak tanımlanmış, ancak bu değişim "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"nin dokuzuncu baskısında yapılabilmektedir (Rogosa, 1974, Hoover, 1999). Bundan önce bifidobakterler, *Lactobacillus* cinsi içinde incelenmiştir. *Bifidobacterium*, özellikle yüksek konsantrasyonda ornitin bulunan hücre duvarı çeşidi ile *Streptomyces* ve *Nocardia* gibi diğer aktinomisetlerden taksonomik olarak ayrılır (Hoover, 1999). Bugün bu cins, Actinomycetaceae grubuna dahil olup 31 türü vardır ve bunların 12 tanesi insanlarda görülmektedir (Scardovi, 1986; Crociani et al., 1996). İnsan kökenli türler arasında beş tanesinin (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* ve *B. longum*) probiyotikli süt ürünlerinin üretimi için süt endüstrisinde kullanımı dikkat çekmektedir (Tamime et al., 1995).

Bifidobacterium türleri, Gram-pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen ve değişken hücre morfolojilerine sahip, zorunlu anaerobik, çubuk şeklinde bakterilerdir (Scardovi, 1986). İnsanların ve hayvanların normal bağırsak mikrofloralarının önemli bir parçasıdır ve konakçının sağlığında yararlı rol oynamaktadırlar (Hoover, 1993; Yaeshima, 1996; Holzapfel et al., 1998). Gelişme sıcaklıkları 20 – 46 °C arasında olup, optimum gelişme sıcaklığı 37 – 43 °C arasındadır. Gelişmesi için optimum pH aralığı ise 6.5-7.0 iken, pH 4.5-5.0 altında ve 8.0-8.5 üzerinde gelişemedikleri belirtilmektedir (Scardovi, 1986). Ancak, bifidobakterler arasında asite direnç özellikleri açısından büyük bir değişim olduğuna da değinilmektedir (Pochart et al., 1992; Clark et al., 1993; Clark and Martin, 1994).

Probiyotik mikroorganizmaların kullanımı özellikle süt ve süt ürünleri olmak üzere çeşitli fermente gıda ürünlerinde yaygındır. Probiyotik gıdalar arasında tüketiciler

tarafından en çok tanınan ürün yoğurt olmakla birlikte krema, ayran, süt tozu, dondurulmuş tatlılar, içecekler, bebek mamaları, şekerlemeler, hububat ürünleri ve çikolata gibi ürünlerin formülasyonlarında da probiyotik mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar ayrıca tablet, kapsül ve dondurularak kurutulmuş preparatlar şeklinde de pazarlanmakta ve tüketilmektedir (Shortt, C., 1999; Shah, 2001). Ancak, tablet ve kapsül şeklindeki preparatlar, tüketicide ilaç kullanma hissi uyandırması nedeniyle, daha çok gıda ile birlikte alınmaları tercih edilmektedir.

Probiyotik bakterilerin sağlık üzerine olumlu etkilerini gösterebilmeleri için belirli düzeyde canlı hücrenin vücuda alınması gerekmektedir. Bu amaçla insanların günde 10^6 - 10^9 canlı hücre tüketmesi gerektiği belirtilmektedir (Lee and Salminen, 1995). Üründe bulunması gereken probiyotik bakteri düzeyinin ise, yaklaşık 10^8 kob/g ve üzerinde olması gerektiği ifade edilmektedir (Shortt, 1999). Bazı kaynaklarda ise tüketim anında üründe en az 10^7 kob/g canlı bakterinin bulunması gerektiğine değinilmektedir (Lee and Salminen, 1995; Shah, 2000). Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF; International Dairy Federation) ise, sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterebilmesi için üründe son kullanma tarihinde ve tüketim anında az 10^7 kob/g bakterinin aktif olarak bulunmasını önermektedir (Sultana et al., 2000).

Probiyotiklerin gıdada ve gıdanın tüketiminden sonra konakçıda canlı kalma ve çoğalma yetenekleri probiyotik yararlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Probiyotik bakterilerin gıdada canlılığını koruması büyük önem taşımaya karşın, yapılan çeşitli çalışmalar ürünün raf ömrü süresince bakterilerin belli düzeylerde canlılığını yitirdiğine işaret etmektedir (Hekmat and McMahon, 1992 ; Kraesaekoopt et al., 2003).

Probiyotiklerin gıdadaki canlılıklarını etkileyen başlıca faktörler arasında kullanılan tür ya da suşa ait özellikler, ortamda bulunan bakteri türleri arasındaki etkileşimler, inokülasyon düzeyi, ürünün asitliği, laktik asit ve asetik asit konsantrasyonu, depolama sırasında asit üretimi, depolama sıcaklığı, üründeki oksijen düzeyi, ambalajın oksijen geçirgenliği, üründeki diğer starter bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ve üründeki besin yetersizliği sayılabilir (Hekmat and McMahon, 1992; Saarela et al., 2000 ; Shah, 2000; Shah, 2001). Bu faktörlerden

kaynaklanan probiyotiklerin canlılığı ve stabilitesindeki azalma, çeşitli uygulamalarla önlenmeye ya da en aza indirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar arasında gıdada kullanılmak üzere asit ve tuza dayanıklı suşların seçimi, oksijen geçirgenliği olmayan ya da düşük oksijen geçirgenliği olan ambalaj kullanımı (plastik ambalaj yerine cam ambalaj kullanımı gibi), iki basamaklı fermentasyon uygulamak, stres adaptasyonu sağlamak, askorbik asit ilavesi ile üreme faktörleri ve prebiyotik kullanımı yer almaktadır (Shah and Lankaputhra, 1997; Adhikari et al., 2000; Shah, 2000; Picot and Lacroix, 2004).

Probiyotikler bakterilerin en çok kullanıldığı ürün olan yoğurtlarda, probiyotiklerin, özellikle de bifidobakterilerin, zayıf canlılık gösterdikleri belirtilmektedir (Reuter, 1990; Iwana et al., 1993; Shah and Lankaputhra, 1997). *L. acidophilus* asite tolere edebilen bir tür olmasına rağmen asidik koşullar altında sayılarında hızlı düşüşler gözlenmektedir. Bifidobakterlerin ise, *L. acidophilus* kadar aside dirençli olmadıkları belirtilmektedir. *L. acidophilus* pH 4.0'ın altında gelişebilirken, *Bifidobacterium* spp. türlerinin pH 5.0'in altında gelişimleri yavaşlamaktadır. Bu bakterilerin yoğurtta düşük canlılık göstermelerinin en önemli nedeninin yoğurdun yüksek asitlik değerine sahip olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir.

Yoğurt gibi diğer bazı ticari süt ürünlerinin raf ömrü boyunca probiyotik bakterilerin canlı popülasyonlarını yeterli düzeyde koruyamadığı ve dondurulmuş yoğurt ve dondurmada kullanılan probiyotik mikroorganizmaların üründe raf ömrü boyunca daha yüksek canlılık gösterdiğine işaret edilmektedir (Hekmat and McMahon, 1992; Christiansen, et al., 1996; Hagen and Narvhus, 1999; Heenan et al., 2004). Ancak dondurulmuş yoğurtlarda uygulanan dondurma işleminin canlı bakteri sayısında 0,5-1 log arasında kayba neden olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca, depolama sırasındaki sıcaklık dalgalanmalarının üründe buz kristallerinin oluşmasına neden olduğu ve bunun da bakteri hücrelerinin canlılıklarında azalmalar meydana gelmesine neden olduğu belirtilmektedir (Davidson et al., 2000). Dondurulmuş yoğurtlar ve dondurulmuş fermente sütü tatlılarda kültür bakterilerinin canlı sayılarındaki azalmanın donma zararı dışında asit, şeker konsantrasyonu ve oksijen toksisitesi gibi faktörler nedeniyle de gerçekleşebildiği belirtilmektedir. Bu tür ürünlerde hücre hasarı ve kaybının azaltılması amacıyla genelde mikroenkapsülasyon tekniği önerilmektedir (Shah, 2000).

Ravula ve Shah (1998) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, yoğurt bakterileri ile probiyotik bakterilerin (*L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp.) dondurma işlemi ve asidik koşullar altında canlı kalabilme özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada yoğurt bakterileri kullanılarak yoğurt üretimi gerçekleştirilmiş, probiyotikler ise dondurma işleminin hemen öncesinde ürüne eklenmiştir. Yoğurt bakterilerinin ve probiyotiklerin dondurulmuş tatlıdaki canlılıkları 12 hafta boyunca takip edilmiştir. Dondurma işleminden önce ve sonra, yoğurt bakterileri ile probiyotik bakterilerin canlılıklarında önemli bir değişme gözlenmemiştir. Yoğurt bakterilerinin canlılıklarında depolama boyunca 1 log düzeyinde bir azalma gözlenirken, *L. acidophilus* şuşlarında azalma düzeyi 4-6 log arasında değişiklik göstermiştir. *Bifidobacterium* şuşlarının bazısında canlı sayımlarında 1 log düzeyinde bir azalma görülürken, bazı şuşlarda 2 log düzeyinde, bazılarında ise 5 log düzeyinde bir azalma gerçekleşmiştir.

Probiyotiklerin bulunduğu gıda içerisindeki oksijen miktarı ve kullanılan ambalajın oksijen geçirgenliği, ürünün depolanması boyunca probiyotiklerin canlılık düzeyilerindeki azalmalara neden olan diğer bir unsurdur. İnsan gastrointestinal sisteminde bulunan mikroorganizmalar anaerobik ya da mikroaerofiliktir, dolayısıyla da katalazlar gibi oksijeni parçalayan hücre mekanizmaları bulunmamaktadır. Bu bakterilerde oksijene maruz kalma hücrede toksijenik metabolitlerin birikmesine ve oksidatif hasar sonucu hücre ölümlerine neden olmaktadır. Bu öldürücü etki “oksijen toksisitesi” olarak isimlendirilmektedir. Probiyotik bakteriler olarak sıklıkla kullanılan *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium* türleri sırayla mikroaerofilik ve anaerobik bakterilerdir. Bu nedenle ürünlerdeki oksijen içeriğinin bu bakterilerin canlılıklarındaki azalmada oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (Talwalkar and Kailasapathy, 2004).

Gıdaların tüketimiyle vücuda giren probiyotik bakteriler, kolona ulaşana kadar ağızda başlayan ve çeşitli stres ortamlarıyla karşılaştıkları yolculukla süren bir evreden geçmektedirler. Probiyotik bakterinin alımından itibaren mideyi terk edene kadar geçen sürenin yaklaşık 90 dakika olduğu belirtilmektedir (Berrada et al., 1991). Ancak, mide sonrasında gerçekleşen ileri sindirim işlemleri düşünüldüğünde bu süre daha da uzamaktadır. Probiyotik bakteri hücrelerinin gıda ile birlikte alındıktan sonra karşılaştıkları en önemli stres ortamı, pH değeri

yaklaşık 1.5 olan midede başlamaktadır (Chou and Weimer, 1999). Bakteri hücreleri, mideden sonra safra salgısı olan bağırsak sisteminin üst bölgesine (oniki parmak bağırsağı) ulaşır. İnsan gastrointestinal sistemindeki safra konsantrasyonunun değişken olduğu ve herhangi bir an için bir tahminde bulunmanın güç olduğu belirtilmektedir. Bu zor koşullardan geçtikten sonra, hücreler bağırsak sisteminin alt bölgesinde (kolon) bulunan epitel hücrelerde kolonize olmaktadır. Mide asitliğine ve safraya direnç göstererek canlı kalabilme özelliği, probiyotikler için yüksek sayıda kolona ulaşabilme, kolonda konaklama ve gelişimini garantilemek için önemli faktörler olarak değerlendirilmektedir.

L. acidophilus ve *Bifidobacterium* spp. suşlarının birçoğunun asit ve safra tuzlarından olumsuz etkilendiği, bağırsaktaki mevcut olumsuz koşullarda canlı kalma düzeylerinin düşük olduğu ve bu suşların fermente gıdalarda diyet katkısı olarak kullanımlarının uygun olmadığı belirtilmektedir (Shah, 2000; Krasaekoopt, 2003). Bu nedenle, asit ve safraya dirençli uygun suşların seçiminin yeterli düzeydeki bakterinin kolona ulaşmasına ve probiyotik yararların oluşmasına yardımcı olacağı ifade edilmektedir.

Vinderola and Reinheimer (2003) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada laktik asit starter bakterileri ile probiyotik bakterilerin probiyotik karakteristikleri ve biyolojik engel dirençleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla test edilen probiyotik bakteriler *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ve çeşitli bifidobakter türleridir. *L. acidophilus*'un mide asitliğine ve safraya en fazla direnç gösteren tür olduğu görülmüştür. *B. bifidum* suşları benzer özellikleri göstermekle birlikte, *L. acidophilus*'dan bu yönde biraz daha düşük değerler elde edilmiştir.

L. acidophilus'un asit dirençliliğinin *Bifidobacterium* türlerinden daha fazla olduğu çeşitli çalışmalarda ifade edilmektedir (Lankaputhra and Shah, 1995). Ortamın pH değeri 2.0 ve altında olduğunda *L. acidophilus* sayısında hızlı bir düşüşler gözlemlendiği, ancak pH 3.0 ve 4.0 değerleri ile üzerindeki pH'larda canlı hücre sayısının önemli ölçüde azalmadığı belirtilmektedir (Lankaputhra and Shah, 1995; Hood and Zottola, 1998).

Dondurma, besin değerinin yüksek olması ve sindiriminin kolaylığı yanında sevilen tat ve aroması ile ferahlatıcı niteliği sayesinde tüketimi oldukça fazla olan ve

toplumun hemen hemen her kesimi tarafından sevilerek tüketilen bir süt ürünüdür. Ülkemizde yaklaşık 18 yıl önce 0.3 litre olan yıllık kişi başi dondurma tüketiminin 8 kat artarak 2007 yılında 2.3 litreye ulaştığı belirtilmekte ve Türkiye'deki dondurma pazarının büyüklüğünün 2007 yılında yaklaşık 900 milyon dolar arasında olduğu tahmin edilmektedir (<http://www.gidabilimi.com/haberler/1-son-haberler/2219-dondurma-timi-art>). Sevilerek tüketilen bir ürün olmasının yanında, dondurmanın yoğurt gibi probiyotik bakterilerin canlılıklarını ve gelişimlerini olumsuz etkileyecek düşük pH'ya sahip olmaması da bu ürünü probiyotik bakterilerin kullanımı için cazip hale getirmektedir. Probiyotik bakterilerin canlılık düzeylerinin dondurmada yüksek oranda korunduğu ve bu nedenle de dondurma gibi soğukta muhafaza edilen ve soğuk tüketilen bir süt ürününün probiyotik bakterilerin vücuda canlı olarak alımı için uygun bir aracı olabileceğine işaret edilmektedir (Hekmat and McMahon, 1992; Turgut ve akmakı, 2003).

Bütün bunlara karşılık literatürde dondurma işleminin canlı bakteri sayısında 0.5 - 1 log arasında kayba neden olduğuna da değinilmektedir (Christiansen et al., 1996; Hagen and Narvhus, 1999; Davidson et al., 2000). Bunun yanı sıra dondurma miksinin karıştırılması esnasında uygulanan mekanik etkinin de bakteri hücrelerinde hasara neden olabileceği düşünülmektedir (Hagen and Narvhus, 1999). Diğer taraftan dondurma prosesinin belirli bir aşamasında dondurma karışımına istenen overrun değerini vermek amacıyla belli miktarda hava uygulanmasının, üründeki oksijen düzeyini arttırması nedeniyle anaerobik ve mikroaerofilik karakterdeki probiyotik bakteriler için toksik etki oluşturacağı da dikkate alınması gereken bir husus olarak değerlendirilmektedir. Bu durum özellikle anaerobik bir bakteri olan bifidobakteriler için önemli ve kritik bir sorun teşkil etmektedir (Hagen and Narvhus, 1999; Shah, 2000).

Hagen ve Narvhus (1999) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada probiyotik bakterilerin dondurma üretiminde kullanımı değerlendirilmiştir. Dondurma işlemi sırasında canlı bakteri sayısının 0.7-0.8 log düzeyinde azaldığı, dondurmadaki canlı bakteri düzeylerinin ortalama 7 log düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Dondurma işlemi basamağındaki azalmanın, hücrelerin donması ve bazı hücrelerin ölmesi sonucu gerçekleştiği belirtilmektedir. Ayrıca, karıştırma işleminin ve dondurma işlemlerinin mekanik streslerinin ve karışıma oksijen aktarımının da

bakteri sayısında ileri azalmalara neden olduğu bildirilmektedir. Canlı sayısının -20 °C'de 1 yıl süren depolama boyunca önemli ölçüde değışmediğı ve tüm örneklerde sayının 6 log üzerinde olduğu belirtilmektedir.

Hekmat ve McMahon (1992) tarafından gerçekleştirilen diğeri bir çalışmada yine dondurma işleminin probiyotik canlılığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Dondurma karışımının öncelikle *L. acidophilus* ve *B. bifidum* kullanılarak fermentasyonu gerçekleştirilmiş, ardından dondurma işlemi uygulanmıştır. Dondurma işleminden sonra canlı sayılarında 1 log'dan daha az düzeyde bir azalma gerçekleştiğı ve bakteri sayılarının 8 log düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Dondurma örnekleri -29 °C'de 17 hafta boyunca depolanmış ve depolama sonunda, *L. acidophilus* sayısının 6 log düzeyine, *B. bifidum* sayısının ise 7 log düzeyine düştüğü görülmüştür.

Probiyotiklerin gıdalardaki canlılığı ve stabilitesindeki azalmayı önlemek ve gıda ile birlikte tüketiminden sonra kolona ulaşana kadar karşılaştıkları stres ortamlarına dirençlerini arttırmak amacıyla çeşitli uygulamalar gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla son yıllarda probiyotik bakterilerin enkapsülasyonu ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır.

Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalarda kullanmak için polimer matriks içerisine tutuklanması ya da immobilize edilmesi geçmiş yıllardan günümüze uygulanan bir yöntemdir. Mikroorganizma hücrelerinin matriks içerisine tutuklanması bunları pH, sıcaklık, organik çözücü ve toksik maddeler gibi olumsuz çevre koşullarından koruyabilmektedir (Park and Chang, 2000).

Mikroenkapsülasyon; içeriğinin belli bir zaman periyodu süresince kontrollü olarak belirli bir hızda serbest kalmasına olanak sağlayan küçük kapsüller içerisine katı, sıvı ya da gaz formundaki materyalleri hapsedme teknolojisi olarak tanımlanmaktadır (Champagne and Fustier, 2007; Anal and Singh, 2007). Mikrokapsül adı verilen bu küçük kapsüllerin boyutları 1 mm'den küçük, mikrometre ölçülerinde farklı büyüklüklerde olabilirler ve hazırlanmalarında kullanılan materyal ve yöntemle bağılı olarak farklı şekillere sahip olabilirler. Kaplama materyali içerisine tutuklanan materyal çoğu zaman "çekirdek" olarak

ifade edilmekte, ancak bu amaçla “dolgu” ya da “iç faz” terimleri de kullanılabilmektedir.

Mikroenkapsülasyon uygulamalarına genel olarak sıvıların katılar gibi davranmasını sağlamak, reaktif materyallerini ayırmak, materyal toksisitesini azaltmak, kapsül içeriğini olumsuz çevre faktörlerinden korumak, materyallerin yüzey özelliklerini değiştirmek, kapsül içeriğinin kontrollü salınımını sağlamak, sıvıların uçuculuğunu ya da yanabilirliğini azaltmak ve acı tada sahip bileşiklerin tadını maskelemek amacıyla değişik alanlarda başvurulmaktadır (Dziezak, 1988; Jackson and Lee, 1991).

Mikroenkapsülasyon teknikleri özellikle eczacılık sektöründe önemli bir alan olmakla birlikte, gıda endüstrisinde de ilgi çekici bir alan niteliğindedir. Mikroenkapsülasyon gıda endüstrisinde çekirdek materyalinin stabilitesinin sağlanması, oksidatif reaksiyonların kontrolü, uzun süreli ya da kontrollü salınımların sağlanması, istenmeyen tat-koku ve renklerin maskelenmesi, raf ömrünün uzatılması, besinsel kayıplara karşı bileşiklerin korunması gibi birçok uygulamalarda kullanılmaktadır.

Mikrokapsüllerin içeriği ısı işlem, çözünme, enzimatik aktiviteler, pH değişiklikleri, difüzyon ya da basınç gibi çeşitli mekanizmalarla serbest kalmaktadır (Gouin, 2004; Anal et al., 2007; Mortazavian et al., 2007). Kaplayıcı materyal mekanik olarak parçalanarak (fiziksel serbest bırakma) veya ısı işleme maruz bırakılarak serbest bırakma gerçekleştirilebilir (ısısal serbest bırakma) ya da çözücüler içinde çözündürme işlemiyle serbest kalma söz konusu olabilir. pH değerindeki değişimler de polimer yapıdaki kaplama materyalinin geçirgenliğini değiştirebilir ve içeriğin serbest kalmasını sağlayabilir. Suda ya da uygun çözücülerde çözünen materyaller çözücü ortamları içinde dağılırlar. Protein, yağ ve polisakkaritler yapısındaki kaplama materyalleri ise sırasıyla proteaz, lipaz ve karbohidraz enzim aktiviteleri ile bozularak içeriğini serbest bırakırlar.

Mikroenkapsülasyon işleminin tasarlanmasında mikroenkapsülasyonun amacı net olmalı, son üründe enkapüle bileşimlerin hangi özellikleri taşıması gerektiği bilinmelidir. Bu amaçla ne tür bir kaplama materyalinin seçilmesi gerektiği belirlenmeli, enkapüle bileşiğin zarar görmeyeceği uygun bir yöntem ve işlem

parametreleri tespit edilmelidir. Mikrokapsülden bileşimin hangi mekanizma ile serbest kalacağı kesinleştirilmelidir. Enkapsüle bileşim için beklenen partikül büyüklüğü, yoğunluğu ve dayanıklılığı belirlenmelidir.

Mikroenkapsülasyonun başlangıç basamağı istenilen hedefe göre uygun kaplama materyalinin seçimidir. Kaplama materyali, enkapsülasyon matriksi (enkapsülasyon materyali) ya da taşıyıcı matriks (taşıyıcı materyal) olarak da nitelendirilmektedir. Kaplama materyali için ayrıca kabuk ya da duvar materyali, enkapsülasyon ajanı, mikroenkapsülasyon ajanı ya da taşıyıcı terimleri de kullanılmaktadır (Champagne et al., 1993; Hyndman et al, 1993; Kim et al. 1996; Jankowski et al., 1997; Charpentier et al., 1998).

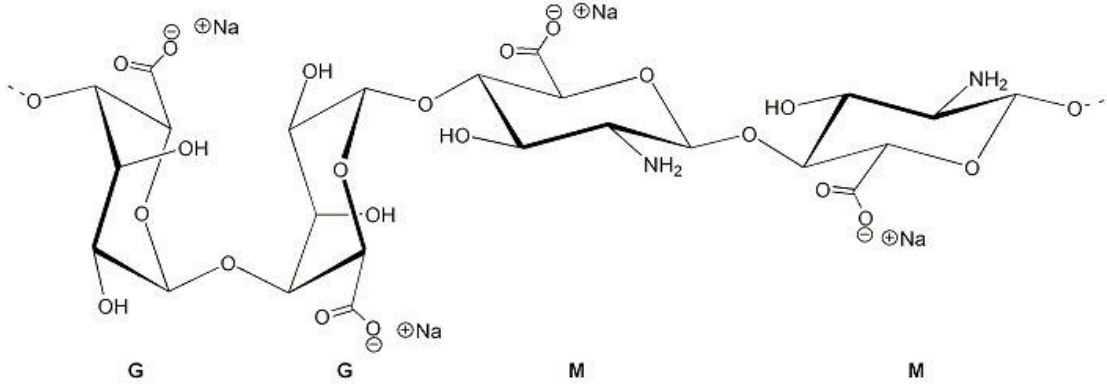
Kaplama materyalinin kompozisyonu mikrokapsülün fonksiyonel özelliklerini belirleyen ana faktördür. Enkapsülasyon uygulamalarında kullanılacak olan kaplama materyallerinin genel olarak reolojik özellikleri iyi olmalı ve enkapsülasyon prosesi sırasında kullanımı kolay olmalıdır. Kaplama materyalleri enkapsüle edilecek materyal ile proses ya da depolama sırasında reaksiyon vermemelidir. Proses ya da depolama boyunca yapısındaki enkapsüle edilen materyali taşımali ve enkapsüle edilen materyali çevresel faktörlere karşı maksimum koruma sağlamalıdır. Ayrıca bu materyaller gıda endüstrisinde kabul edilen çözücülerde çözünme özelliğinde olmalı (su, alkol gibi), ucuz ve kolay temin edilebilmelidir.

Çizelge 2. 3'de gıda bileşenlerinin enkapsülasyonunda kullanılan kaplama materyallerine bazı örnekler gösterilmektedir (Shahidi and Han, 1993).

Çizelge 2. 3. Gıda bileşenlerin enkapsülasyonu için kullanılan bazı kaplama materyalleri (Shahidi and Han, 1993)

Karbonhidratlar	Nişasta, maltodekstrinler, mısır şurubu, dekstran, sukroz, siklodekstrinler
Selülozlar	Karboksi metilselüloz, metilselüloz, etilselüloz, nitroselüloz, asetilselüloz, selüloz asetat-fitalat, selüloz asetat-butilat-fitalat
Gamlar	keçiboynuzu gamı, aljinat, karegenan
Yağlar/Lipidler	Balmumu, parafilm, arı balmumu, tristearik asit, digliserit, monogliserit, sıvı ve katı yağlar
Proteinler	Gluten, kazein, jelatin, albumin, hemoglobin, peptidler

Aljinat, ucuz olması ve toksik olmaması nedeniyle enkapsülasyon uygulamalarında sıklıkla kullanılan doğal bir polimerdir. Aljinat, kahverengi su yosunlarının hücre duvarlarında ve hücreler arası boşluklarında bulunan, β -(1→4) bağlı D-mannuronik asit (M) ve α -(1→4) bağlı L-guluronik asit (G) birimlerinden oluşan bir liner heteropolisakkarittir (Onsøyen, 1997; Anal et al., 2007; Mortazavian et al, 2007). Bitkilere hem esneklik hem de kuvvet sağlarlar. Ticari kullanım için üretilen aljinatlar başlıca *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyberborea*, *Laminaria digitata* ve *Ascorphyllum nodosum* türlerinden alkali ile muamele edilerek ekstrakte edilmektedir. Aljinik asit, aljinatların ticari üretiminde ara üründür ve sınırlı dayanıklılığa sahiptir. Dayanıklı suda çözünür aljinatların hazırlanması için, aljinik asit Na⁻, K⁻, NH₄⁻, Mg ve Ca-aljinat tuzları şeklinde ticari aljinatlara dönüştürülerek üretilmektedir (Onsøyen, 1997). Şekil 2. 2'de aljinatın kimyasal yapısı görülmektedir. Sodyum, potasyum ve amonyum tuzları suda iyi, kalsiyum tuzu ise az çözünür. Aljinatların tamamı jel oluşturmazlar fakat soğuk suda, kalsiyum iyonlarının varlığında ortamda geri dönüşümsüz jel oluşturabilmektedirler.



Şekil 2. 2. Aljinatın kimyasal yapısı

Aljinat jelleri sıcaklığa oldukça dayanıklıdır. Sıcaklık uygulamasıyla dönüşümsüz jel oluşturabilme özelliği nedeniyle aljinattan pasta dolgularında ve süslerin pişirme sırasında erimeye karşı dayanıklılığını arttırmak amacıyla yararlanılmaktadır. Bununla birlikte meyveli turta dolgusu hazırlanmasında pastörizasyon ve pişirme aşamalarında kararlı kalmaktadırlar. Pasta ve keklere yerleştirilen meyve parçalarının fırınlama esnasında yapılarının muhafazası amacıyla veya düşük yağlı kremada köpük stabilizatörü olarak yararlanılabilmektedir. Bunların dışında dondurulmuş balıklarda, donma esnasında oluşan şok yanıklarının engellenmesi amacıyla da aljinatlar kullanılmaktadır. Aljinatlar taze et, balık ve tavukların yenilebilir film ile kaplama işlemlerinde de kullanılabilirler. Aljinat kaplamalar iyi bir oksijen geçiş engelidir, gıdalarda lipid oksidasyonunu geciktirebilirler, aroma, yapı ve hamur yapışmasını iyileştirirler (Krochta and De Mulder-Johnston, 1997). Sodyum aljinat ayrıca C vitamini parçalanmasını ve yağ oksidasyonunun da önlemektedir. Puding gibi ürünlerde jel oluşturma, hazır çorbalarda su bağlama ve dondurmalarda stabilizatör olarak yararlanılmaktadır (Onsøyen, 1997).

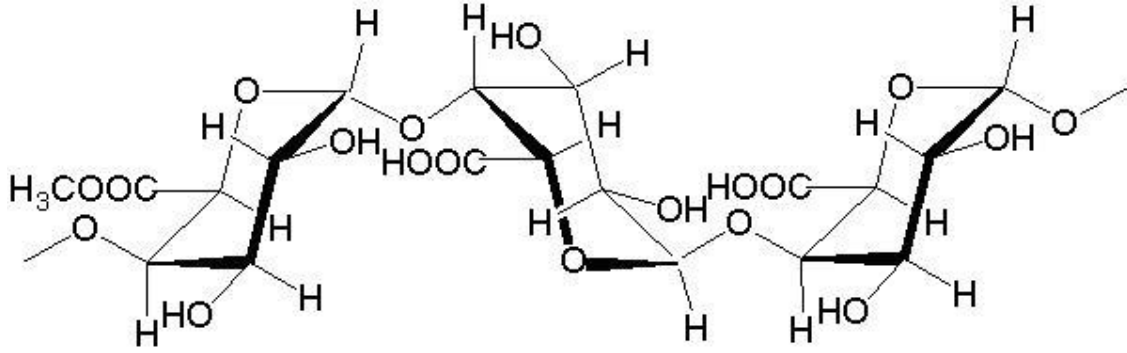
Aljinatlar, mikrobiyal hücrelerin mikroenkapsülasyonunda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Sheu and Marshall, 1993; Shah and Ravula, 2000). Probiyotik bakterilerin aljinat-nişasta ile enkapapsülasyonunun, yogurтта ve yapay gastrointestinal koşullarda canlılık düzeylerini olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir (Khalida et al., 2000). Aljinat ile enkapsüle edilmiş bifidobakterlerin mayonezde yaşam oranlarının daha iyi olduğu bildirilmektedir (Khalil and Mansour, 1998). *Bifidobacterium* türlerinin kalsiyum aljinat küreler içerisine immobilizasyonu

yapay mide sıvısında ve safra tuzu çözeltisinde canlı kalabilme dirençlerini arttırmaktadır (Lee and Heo, 2000).

Kalsiyum aljinat, bakteri hücresi etrafında kolayca jel matriksi oluşturmaları, insan vücudu için toksik olmaması, ucuz olması ve enkapsülasyon işleminin ılımlı proses koşullarında gerçekleştirilmesi, kolayca hazırlanması ve bağısakta çözünerek hücreleri serbest bırakabilmesi nedenleriyle probiyotiklerin enkapsülasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Mortazavian et al., 2007). Ancak bu maddenin kullanımında asidik koşullara duyarlılık ve mekanik dayanımında kayıplar görülmesi gibi bazı dezavantajlardan da söz edilmektedir (Eikmeier and Rehm, 1987; Gombotz and Wee, 1998). Kalsiyum iyonları varlığında aljinat jeli oluştuğu için, kalsiyum iyonlarını absorblayan şelat ajanlar ve monovalent iyonlar (fosfatlar, laktatlar ve sitratlar gibi) varlığında yapısının bütünlüğü bozulur, kapsül boyunca nemin ve diğer sıvıların hızlı bir difüzyonu söz konusudur ve bu durum istenmeyen çevresel faktörlere karşı engel özelliğini azaltır. Sözü edilen bu olumsuzluklar, aljinatın diğer polimerler ile karıştırılarak kullanılması veya diğer bileşiklerle kaplanarak ya da çeşitli katkıları kullanılmak suretiyle aljinatın yapısal modifikasyonu sağlanması ile aşmaya çalışılmaktadır (McKnight et al., 1988; Champagne et al., 1992; Sheu and Marshall, 1993; Larisch et al., 1994; Krasaekoopt et al., 2004).

Pektin ise, bitkilerin hücre duvarında bulunan ve çoğunlukla α -(1→4) glikozidik bağlı D-galakturonik asit birimlerinden oluşan bir heteropolisakkarittir (Wang et al., 2002). Şekil 2. 3'de pektinin kimyasal yapısı görülmektedir. Pektin, tüketilmelerinden sonra kalın bağırsığa gelene kadar sindirilmemekte, insan kalın barsağındaki mikroflora üyelerinin sahip olduğu pektinaz enzimleri ile parçalanabilmekte ve oluşan parçalanma ürünleri yine bu mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilmektedir (Sriamornsak and Nunthanid, 1998; Sriamornsak and Nunthanid, 1999; Vandamme et al., 2002; Wong et al, 2002). Pektik maddeler arasındaki fark, metil ester içerikleri ya da esterifikasyon derecelerinden kaynaklanmaktadır. Esterifikasyon derecesi (ED), esterleşmiş D-galakturonik asit kalıntı miktarının toplam D-galakturonik asit kalıntısına oranının 100 ile çarpımı şeklinde tanımlanmaktadır (Whistler and Daniel, 1990). ED değeri 50'den fazla olan pektinlere "yüksek metoksilli pektin (YM pektin)", ED değeri

50'den az olan pektinlere ise “düşük metoksilli pektin (DM pektin)” denilmektedir. DM pektin, kalsiyum gibi çok değerli iyonlarla bağlanarak jel oluşturabilme özelliğine sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle DM pektinler özellikle kolona spesifik ilaçların enkapsülasyon uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde de bu konuda yapılmış birçok çalışmaya rastlamak mümkündür (Rubinstein et al., 1993; Aydın and Akbuğa, 1996; Wakerly et al., 1996; Sriamornsak and Nunthanid, 1998; Sriamornsak and Nunthanid, 1999; Wong et al., 2002)



Şekil 2. 3. Pektinin kimyasal yapısı

Pektinler, insan beslenmesi ve sağlığı için önemli olan fizyolojik ve besinsel etkiler gösterirler. Pektin, insanlar tarafından üretilen enzimler ile sindirilmediği için diyetel lif olarak değerlendirilmektedir. Gastrointestinal sistemin üst bölgelerinde sindirilememesi ve absorbe edilememesine karşılık, kolonda bulunan mikroflora üyeleri tarafından parçalanabilmekte ve oluşan parçalanma ürünleri CO_2 , CH_4 , H_2 ve kısa zincirli yağ asitlerine (özellikle asetat, propionat ve bütirata) fermente edilebilmektedir. Bu kısa zincirli yağ asitleri ise kalın bağırsağın mukoza hücreleri için iyi bir enerji kaynağı oluşturmaktadır. Pektinin kemirgenler ve insanlarda serum kolesterolünü düşürücü etkisinin olduğu ise 1960'lı yıllarda bildirilmiştir (Wells and Ershof, 1961; Palmer and Dixon, 1966).

Pektinin tek başına gıda bileşenlerinin veya probiyotiklerin enkapsülasyonu amacıyla kullanımı konusunda bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Buna karşılık Mosilhey (2003) mikroenkapsüle *L. acidophilus*'un fizyolojik özellikleri üzerine farklı kapsül materyallerinin etkisini araştırdığı çalışmasında, pektini farklı mikroenkapsülasyon materyalleri ile birlikte kombine olarak kullanmıştır. Pektinin tüketilmesinden sonra kalın bağırsağa gelene kadar sindirilmemesi, insan kalın

barsağındaki mikroflora üyelerinin sahip olduğu pektinaz enzimleri ile parçalanabilmesi ve oluşan parçalanma ürünleri yine bu mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilmesi özellikleri nedeniyle, kolona spesifik ilaçların enkapsülasyon uygulamalarında kullanılmaları gibi, gıda bileşenleri veya probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu amacıyla da pektinden yararlanılabileceğini ve pektin ile mikroenkapsüle edilen probiyotiklerin gıda üretiminde kullanılabileceğini akla getirmektedir.

Mikroenkapsülasyon, daha önce de değinildiği gibi, hücre hasarını ve hücre kaybını azaltmak amacıyla hücrelerin uygun bir materyal içine hapsedilme işleminin gerçekleştirildiği bir prosestir (Krasaekoopt, 2003). Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında hücre kaybını azaltmak ve vücutta karşılaştıkları stres ortamlarına dirençlerini arttırarak yüksek sayıda kolona ulaşmalarını sağlamak amacıyla uygulanmaktadır. Enkapsülasyon yöntemi ile probiyotik bakterilerin hem gıda içerisinde hem de vücuda alındıktan sonra bağırsak bölgesine ulaşana kadar canlılığını büyük oranda koruduğu bildirilmektedir (Adhikari et al., 2000; Sultana et al., 2000; Krasaekoopt et al., 2003; Lian et al., 2003). Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu çoğunlukla yoğurtlarda denenmiş ve bakteriler mikroenkapsüle formda kullanıldığında depolama süresince canlılıklarının önemli ölçüde korunduğu tespit edilmiştir (Adhikari et al., 2000; Sultana et al., 2000).

Probiyotiklerin enkapsülasyonunda genellikle püskürterek kaplama, püskürterek kurutma, ekstrüksiyon (damlatma metodu), emülsiyon (ikili-faz sistemi) ve jel-partikül (püskürterek dondurma) teknolojisi olarak isimlendirilen beş farklı mikroenkapsülasyon yönteminden yararlanılmaktadır.

Biyoaktif ya da enkapsülasyon bileşiklerinin sıvı formda olduğu durumlarda, birçok teknik püskürtme prensibi üzerine dayanmaktadır. Püskürterek dondurmada, düşük erime noktasına sahip (32-42 °C) ve biyoaktif bileşiği içeren sıvı formdaki taşıyıcı matriks uygun bir kap içerisine uygun bir püskürtme başlık boyunca püskürtülür. Bu proses, iyi partikül üretimi yönünden püskürterek kurutmaya benzer, ancak bu yöntemde jel partikülün katılaştırılmasını sağlamak için kap içerisine soğuk hava enjeksiyonu temel alınmaktadır. Püskürterek kurutmada ise, diğerinden farklı olarak partikülleri kurutarak düzgün toz partiküle dönüştüren sıcak

hava söz konusudur. Püskürterek kurutma yöntemi ile jelatin, gum arabik, yağsız süt ve çözünür nişasta gibi çeşitli taşıyıcı materyaller kullanılarak probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Lian et al. 2003).

Püskürtme yöntemlerinin uygulandığı enkapsülasyon teknikleri, diğer teknikler ile karşılaştırıldığında, basit ve sürekli bir prosesle yüksek miktarlarda mikrokapsül üretiminin sağlanması ve ucuz olarak değerlendirilmesine karşılık, laboratuvar ortamlarında daha kolay gerçekleştirildikleri için probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda ekstrüksiyon (damlatma metodu) ve emülsiyon (ikili-faz sistemi) yöntemlerine daha çok başvurulmaktadır. Her iki tekniğin de probiyotik bakterilerin canlılığını % 80-95 düzeylerine kadar arttırdığı belirtilmektedir (Sheu et al., 1993; Krasaekoopt et al., 2003; Sheu and Marshall, 1993; Krasaekoopt et al., 2004).

Ekstrüksiyon yönteminde; hazırlanan hidrokolloid çözeltisi (genellikle aljinat) mikrobiyal hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra, karışım bir enjektör yardımıyla CaCl_2 çözeltisine damlatılmakta ve böylece de hücreler 3 boyutlu kapsül içine hapsedilmektedir. Bu yöntem; kolay uygulanabilir, basit, düşük maliyetli olması ve ılımlı işlem koşulları ile hücre canlılığını yüksek oranda koruması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Krasaekoopt et al., 2003). Ekstrüksiyon yönteminde elde edilen küreler genellikle 2-5 mm boyutlarında olup, emülsiyon yönteminde elde edilen kürelerden daha büyüktür (Mortazavian et al., 2007). Kullanılan destek materyalinin çeşidi, konsantrasyonu, şırınga ve reaktörün birbirine olan uzaklığı, şırınga başlığının çapı oluşan küreleri direkt olarak etkileyen önemli parametrelerdir.

Emülsiyon yönteminde ise, az miktarda hücre-polimer karışımı (kesikli faz), yüksek miktardaki soya yağı, ayçiçek yağı, kanola veya mısır yağı gibi bitkisel yağ (sürekli faz) ile karıştırılır. Öncelikle su-yağ emülsiyonu oluşturmak amacıyla homojenize edilir ve suda çözünen polimerler yağ fazı içerisinde küçük boyutlu jel partikülleri oluşturmak amacıyla çözünmez forma geçer (çapraz bağlanma). Oluşan kapsüller filtrasyon ile toplanır. Bu yöntem kullanılarak koruyucu materyal ile kaplanan mikroorganizmalar, canlılıklarının korunması, bakteriyofaj enfeksiyonunun engellenmesi ve çeşitli proseslere karşı dayanıklılıklarının artması nedeniyle

yoğurt, peynir, dondurulmuş tatlı ve süt ürünleri (dondurma ve buzlu süt gibi) ve biomass üretiminde kullanılmaktadır (Krasaekoopt et al., 2003).

Mikroenkapsülasyon yönteminin etkinliği bakteri türüne, inokülasyon düzeyine, kullanılan yöntem, taşıyıcı materyalin çeşidine ve konsantrasyona bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Genel olarak, aljinat jel konsantrasyonu ve tanecik boyutu arttıkça enkapsüle edilen hücrelerin ölüm hızının azaldığı belirtilmektedir. Bunun dışında, bakteri türüne ve başlangıçtaki hücre sayısına bağlı olarak da mikroenkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılık oranlarının değişiklik gösterdiği, hücre yükünün artışıyla birlikte yapay mide ortamı ve safraya dirençlerinin arttığına işaret edilmektedir (Sheu et al., 1993; Lee and Heo, 2000; Picot and Lacroix, 2004; Chandramouli et al., 2004).

L. acidophilus ATCC 43121'in ekstrüksiyon metodu kullanılarak aljinat içerisine mikroenkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, gastrointestinal ortam ve sıcaklığa direnç özellikleri değerlendirilmiştir (Kim et al., 2008). Bu çalışmada ayrıca kolesterol asimilasyonu ve bağırsak mukozasına tutunma (intestinal adhezyon) özellikleri de incelenmiştir. Mikroenkapsüle hücrelerin intestinal ortam ve sıcaklığa serbest hücrelerden daha fazla direnç gösterdiği görülmüştür. Serbest hücrelerin pH 1.2 ve 1.5 ortamlarında tamamen öldüğü gözlenirken, mikroenkapsüle hücrelerin sayısında 3 log düzeyinde bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Enkapsülasyon işleminin hücrelerin bağırsak epitel yüzeyine (HT-29) tutunma özelliğini önemli ölçüde etkilemediği belirtilmektedir.

Peynir suyu proteini kullanılarak probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada (Reid et al., 2005), ekstrüksiyon yöntemi kullanılmış ve yaklaşık 3 mm boyutlarında küreler elde edilmiştir. Kürelerdeki bakteri düzeyi 8.0×10^8 kob/g olarak belirlenmiş ve kapsülasyon işleminin asidik koşullara ve safraya karşı koruma sağladığı görülmüştür.

Çeşitli destek materyalleri kullanılarak püskürterek kurutma yöntemi ile bifidobakterlerin mikroenkapsüle edildiği başka bir çalışmada, yapay mide ortamı ve safraya direnç özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Mikroenkapsüle edilen hücrelerin, serbest hücrelere göre canlılıkta daha az azalma sergilediği belirlenmiştir. Kullanılan destek materyali çeşidine ve bakteri suşuna göre de

koruyucu etkinin değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir. Gum arabik kullanıldığında canlılıkta en az azalma görülürken, canlı hücre düzeyinde en fazla azalma çözünür nişasta kullanıldığında meydana gelmiştir (Lian et al., 2003).

Liserre, Ré ve Franco (2007), aljinat ve çeşitli aljinat-kitozan modifikasyonları içerisinde *B. animalis* subsp. *lactis*'in enkapsülasyonu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen mikrokapsüllerin pH 1.5 - 7.5 arasındaki yapay gastrointestinal ortamlardaki canlı kalma özellikleri değerlendirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemlerinin tümünün bakteri hücrelerini asit ortama karşı koruduğu, kitozan kullanılarak gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işlemlerindeki koruma düzeyinin daha fazla olduğu belirtilmektedir. Hücrelerin pH 1.5 ortamında canlı kalma özelliklerine bakıldığında, bu ortamda 30 dakikalık inkübasyon sonrasında enkapsüle edilmemiş hücrelerin düzeyinin 2 log ve altına düştüğü buna karşılık mikroenkapsüle edilen hücrelerin 5-6 log düzeyinde canlı kaldığı görülmüştür.

Mikroenkapsülasyonun mide asitliğine olan direnci arttırdığına işaret eden başka bir çalışmada, *B. adolescentis* 15703T hücreleri aljinat ile kaplanmış jelatin mikrokürelerinin içerisinde enkapsüle edilmiştir (Annan, Borza and Hansen, 2008). Jelatinin çapraz bağlanması amacıyla genipin kullanmış, elde edilen küreler daha sonra kalsiyum ile çapraz bağlı aljinat ile kaplanmıştır. Yapay mide ortamı olarak pH 2.0'nin kullanıldığı ortamda 1 saatlik inkübasyonun ardından, yapay bağırsak ortamı olarak pH 7.4 ortamında 4 saat süren inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Serbest bakteri düzeyi ile aljinat ile kaplanmamış jelatin mikroküreler içerisindeki bakteri düzeyi sırasıyla 6.4 ve 6.7 log kob/ml olarak tespit edilmiştir. Jelatin mikrokürelerin aljinat ile kaplanması sonucu canlı bakteri düzeyinin arttığı görülmüş, bu mikrokürelerdeki bakteri düzeyi 7.6 log kob/ml olarak belirlenmiştir.

Ding and Shah (2007), aljinat içerisinde enkapsüle ettiği 8 farklı probiyotik bakteri türünün asit ve safra toleranslarını incelemiştir. Elde edilen sonuçlar mikroenkapsüle bakterilerin asit ortamda (pH 2.0), serbest bakterilerden daha yüksek düzeyde canlı kaldıklarını göstermiştir. MRS broth besiyerinin pH değeri 2.0 olarak ayarlanmış ve serbest ve mikroenkapsüle hücreler bu ortamda 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında serbest bakteri sayıları yaklaşık 3-4 log kob/ml düzeyine düşerken, bu sayı mikroenkapsüle bakterilerde 6.7 log kob/ml olarak belirlenmiştir. Serbest bakteriler safraya maruz bırakıldıklarında 6.51

log kob/ml azalma meydana gelmiş, mikroenkapsüle bakterilerde ise 3.36 log kob/ml düzeyinde kayıp görülmüştür.

Mikroenkapsülasyon işlemlerinde uygulanan işlem parametrelerinin probiyotik canlılığına ve stres ortamlarına dirençlerine etkileri üzerinde durulması gereken bir konudur. Aljinat kullanılarak gerçekleştirilen enkapsülasyon işlemlerinde, aljinat konsantrasyonu arttıkça bakteri canlılığının da arttığı belirtilmektedir. Aljinat içerisine enkapsüle edilen *L. casei* NCDC-298'in, düşük pH değerlerinde (pH 1.5) canlılığını serbest hücrelere göre daha fazla koruduğu, yüksek aljinat konsantrasyonlarında bakteri düzeylerindeki azalmanın daha az olduğu belirtilmektedir (Mandal et al., 2006).

Benzeri bir çalışma Lee and Heo (2000) tarafından gerçekleştirilmiş, yine aljinat jel konsantrasyonun probiyotik canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. *B. longum* hücreleri kalsiyum aljinat küreler içerisine enkapsüle edilmiş ve yapay mide ortamı ile safraya direnç özelliği test edilmiştir. Aljinat jel konsantrasyonu ve küre boyutu arttıkça, küre içerisinde hücre ölümleri hızının düştüğü belirlenmiştir. Küre içerisindeki başlangıç hücre sayısının, bu ortamlara maruz kaldıklarında gerçekleşen azalma miktarını etkilediği tespit edilmiştir.

Mikroenkapsülasyon işlem parametrelerinin etkilerinin değerlendirildiği diğer bir çalışma Chandramouli et al. (2004) tarafından gerçekleştirilmiştir. *L. acidophilus* kalsiyum aljinat kullanılarak mikroenkapsüle edilmiş ve yapay mide ortamındaki canlılığı test edilmiştir. Farklı aljinat konsantrasyonunun ve kalsiyum klorit konsantrasyonunun enkapsüle edilen bakteri canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Mikroenkapsül içerisindeki hücrelerin canlılığı, kapsül boyutu ve jel konsantrasyonu arttıkça artmıştır. Enkapsülasyon sırasında hücre yoğunluğunun artması, yapay mide ortamında 3 saatlik inkübasyon sonrasında canlı bakteri sayısını da arttırmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, mikroenkapsüle edilen hücrelerin asit ve safraya serbest bakteri hücrelerine göre daha dirençli olduklarına işaret etmektedir.

Tsen et al. (2007), mikroenkapsülasyon işleminin *L. reuteri*'nin dondurma işlemine direncini artırmadaki etkisini incelenmişlerdir. *L. reuteri*, dondurma ve donma sıcaklıklarında depolama sırasında düşük canlılık sergileyen bir bakteri türüdür.

Kalsiyun aljinat ve κ -karegenanın mikroenkapsülasyon işlemlerinde taşıyıcı matriks olarak kullanıldığı çalışmada, elde edilen mikroenkapsüle hücreler -20, -40, -60 ve -80 °C olan farklı dondurma sıcaklıklarına maruz bırakılmış ve -40 ile -80 °C'de 12 hafta süreyle depolanmıştır. Sonuçlar mikroenkapsüle hücrelerin hem dondurma işlemlerinde hem de dondurma sıcaklıklarında depolama sırasında daha iyi canlılık gösterdiğine işaret etmektedir.

Mikroenkapsülasyon yönteminin oksijen toksisitesine karşı koruyucu etki sağladığı belirtilmektedir (Talwalkar and Kailasapathy, 2004). Besiyeri ortamında gerçekleştirilen bu çalışmada, mikroenkapsüle ve serbest hücreler aerobik olarak geliştirilmiş ve mikroenkapsüle hücrelerden elde edilen sayıların serbest hücrelerden 1 log daha fazla olduğu görülmüştür. Araştırmacılar bu sonuçların mikroenkapsülasyon işleminin oksijen toksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğuna işaret ettiğini ancak bu konuda daha fazla çalışmanın yapılması gerektiğine değinmektedirler.

Sağlık faydaları bilimsel çalışmalarla kanıtlanan probiyotik mikroorganizmaları içeren gıdalar Fonksiyonel Gıda pazarının önemli bir parçasını oluşturmakta, buna bağlı olarak da bu tür ürünlerin marketlerdeki sayısı ve çeşidi giderek artmaktadır. Probiyotiklerin dinamik bir araştırma konusu olma niteliğini günümüzde olduğu gibi gelecekte de sürdüreceği açık olarak görülmektedir. Probiyotikler üzerine yapılan çalışmalarda son yıllarda özellikle farklı ve dirençli yeni tür ve suş arayışları, farklı ürün formülasyonları ve probiyotiklerin çeşitli ortamlardaki canlılıklarını koruma ve devam ettirmelerini sağlamaya yönelik yeni uygulamalar büyük bir önem kazanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Probiyotik bakteri suşları

Bu çalışmada probiyotik bakteri suşları olarak *Lactobacillus acidophilus* LA-5™, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12™ ve *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696 kullanılmıştır. *L. acidophilus* LA-5™ ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12™ bakteri suşları Chr. Hansen firmasından orijinal paketi içinde liyofilize formda temin edilmiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *B. bifidum* ATCC 15696 bakteri suşları, ATCC (American Type Culture Collection- Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)'nin Avrupa distribütörü olan LGC Promochem (United Kingdom) firmasından cam ampul içerisinde liyofilize formda temin edilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri, dilüsyon sıvıları ve çözeltiler

Çalışmada bakteri suşlarının aktiveleştirilmesinde ve mikrobiyolojik sayımların gerçekleştirilmesinde MRS Agar (*Lactobacillus* Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE; Merck), MRS broth (Merck), Reinforced Clostridal Medium (RCM; Fluka) ve Reinforced Clostridial Agar (RCA; Sigma) besiyerleri kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik analizlerde dilüsyonların hazırlanmasında Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS, Merck) kullanılmıştır.

Prebiyotik maddelerin bakteri gelişimi, asit ve safra direnç özellikleri ve β -galaktosidaz aktiviteleri üzerine etkilerinin belirlendiği analizlerde kullanılan temel besiyerleri, MRS broth ve RCM besiyerlerinin ticari formülasyonlarından hareketle bileşenler ayrı ayrı tartılarak, bileşimlerinde şeker içermeyecek şekilde hazırlanmıştır. Temel besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan besiyeri bileşenlerinin her biri Merck firmasından elde edilmiştir (EK 1).

β -galaktosidaz aktivitesinin belirlenmesi analizlerinde “Z tamponu” kullanılmıştır. Bu tampon maddenin bileşimi ve hazırlanışı EK 1’de verilmiştir.

3.1.3. Prebiyotik maddeler

Çalışmalarda prebiyotik maddeler olarak, fruktooligosakkarit (FOS; Artisan-Orafti, Türkiye), inulin (INU; Artisan-Orafti, Türkiye), galaktooligosakkarit (GOS; Yakult, Japonya), soya oligosakkariti (SOS; Calpis, Japonya), ksilooligosakkarit (KOS; Suntory, Japonya) ve laktuloz (LAK; Sigma) kullanılmıştır.

3.1.4. Diğer kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan safra çözeltileri Oxbile (Merck) kullanılarak hazırlanmıştır.

Çalışmada aljinat mikrokürelerinin hazırlanmasında aljinik asitin sodyum tuzu (Fluka) kullanılmıştır. Pektin mikrokürelerinin hazırlanmasında ise, Esterifikasyon Değeri (ED) 35 olan düşük metoksilli pektin kullanılmıştır (LM 12 CG-Z/200, CP Kelco, Germany).

Çalışmada mikroenkapsülasyon aşamalarında emülsiyon ortamı sağlamak amacıyla bitkisel yağ olarak ticari ayçiçeği yağı kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar glukoz (GLU, Merck), L-cysteine-HCl (Fluka), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën), Tween® 80 (Sigma), 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG, Sigma), o-nitrophenol (ONP, Sigma), kloroform (Sigma), sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma), Na_2CO_3 (Riedel-de Haën), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën), KCl (Merck), MgSO_4 (Merck), β -mercaptoethanol (Sigma), SYTO® 9 (Invitrogen, Molecular Probes) ve pektinaz (Sigma) şeklindedir.

3.2. Metot

3.2.1. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356 gelişimi üzerine etkileri

Çalışmada prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356 gelişimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, FOS, INU, GOS, SOS, KOS ve LAK olmak üzere 6 farklı prebiyotik madde test edilmiştir. Bu amaçla öncelikle, damıtık su kullanılarak prebiyotiklerin % 10 (w/v) konsantrasyonundaki stok çözeltileri hazırlanmış ve 0.45 μm gözenek çapına sahip membran filtreden (Millipore) geçirilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra bu stok çözeltilerden temel besiyerlerine prebiyotik

konsantrasyonu % 0.5, % 1 ve % 2 (w/v) olacak şekilde uygun miktarlarda aktarmalar yapılmıştır. Temel besiyeri olarak glukoz içermeyen MRS broth kullanılmıştır (Temel besiyeri-A) (EK 1). Bu şekilde elde edilen farklı konsantrasyonlarda prebiyotik maddeleri içeren besiyerlerinin her birine MRS broth besiyerinde aktifleştirilmiş *L. acidophilus* ATCC 4356 kültürü % 1 (v/v) oranında inoküle edilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla % 2 (w/v) oranında GLU içeren temel besiyerine yine aynı oranda inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Kontrol amacıyla ise, aynı oranda aşılama yapılmış temel besiyeri kullanılmıştır. Örneklerin hepsi 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında örneklerin TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan MRS Agar besiyeri kullanılarak çift katlı dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Besiyerlerindeki asitlik gelişimleri inkübasyon sonrasında pH ölçümleri ile belirlenmiştir. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356 gelişimi üzerine etkileri, inkübasyon öncesi ve sonrası canlı bakteri düzeyleri arasındaki farklar üzerinden değerlendirilmiştir.

3.2.2. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5 gelişimi üzerine etkileri

Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5 gelişimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.2.1'de belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.3. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696 gelişimi üzerine etkileri

Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696 gelişimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, FOS, INU, GOS, SOS, KOS ve LAK olmak üzere 6 farklı prebiyotik madde test edilmiştir. Bu amaçla öncelikle, damıtık su kullanılarak prebiyotiklerin % 10 (w/v) konsantrasyonundaki stok çözeltileri hazırlanmış ve 0.45 µm gözenek çapına sahip membran filtreden (Millipore) geçirilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra bu stok çözeltilerden temel besiyerlerine prebiyotik konsantrasyonu % 0.5, % 1 ve % 2 (w/v) olacak şekilde uygun miktarlarda aktarmalar yapılmıştır. Temel besiyeri olarak içerisinde glukoz içermeyen RCM kullanılmıştır (Temel besiyeri-B, EK 2). *B. bifidum* ATCC 15696 suşu, RCM besiyerinde anaerobik ortam kitleri (GENbox anaer, Biomérieux) kullanılarak anaerobik inkübasyon koşulları altında aktive edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik maddeleri içeren besiyerlerinin her birine aktifleştirilmiş *B. bifidum* ATCC 15696 kültürü % 1 (v/v)

oranında inoküle edilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla % 2 (w/v) oranında GLU içeren temel besiyerine yine aynı oranda inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Kontrol amacıyla ise, aynı oranda aşılama yapılmış temel besiyeri kullanılmıştır. Örneklerin hepsi 37 °C'de 24 saat anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında örneklerin % 0.05 (w/v) oranında L-cysteine-HCl eklenmiş TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan RCA besiyeri kullanılarak anaerobik koşullarda dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Besiyerlerindeki asitlik gelişimleri inkübasyon sonrasında pH ölçümleri ile belirlenmiştir. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696 gelişimi üzerine etkileri, inkübasyon öncesi ve sonrası canlı bakteri düzeyleri arasındaki farklar üzerinden değerlendirilmiştir.

3.2.4. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 gelişimi üzerine etkileri

Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 gelişimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, Bölüm 3.2.3'de belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.5. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın aside direnç özelliği üzerine etkisi

Bölüm 3.2.1'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen analizler sonucunda *L. acidophilus* ATCC 4356'nin gelişimini en iyi düzeyde FOS ve INU prebiyotiklerinin teşvik ettiği belirlenmiştir (Bölüm 4.1.1). Bu nedenle prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın aside direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca bu iki prebiyotik denemeye alınmıştır.

Bu amaçla, FOS ve INU steril stok çözeltilerinden Temel besiyeri-A'ya son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı ilave edilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri-A'ya aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 1 (v/v) oranında aktifleştirilmiş *L. acidophilus* ATCC 4356 kültürü inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında kültürle 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve çökelti kısmı 4 ml steril saf su içerisinde süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonlarından, pH değerleri 1, 2 ve 3 olan % 0.5'lik (w/v) NaCl çözeltilerine % 2 (v/v) düzeyinde inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerinin pH değerleri 1 M HCl kullanılarak 1, 2 ve 3 değerlerine ayarlanmıştır. Aynı

miktardaki hücre süspansiyonu kontrol amacıyla direkt olarak % 0.5 (w/v) NaCl çözeltisine (pH 5.35 olarak ölçülmüştür) aktarılmıştır. İnokülasyon yapılan bu çözeltiler 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0, 1/2, 1, 2 ve 3. saatlerinde 1 ml örnek alınarak TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan MRS Agar besiyeri kullanılarak çift katlı dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nin aside direnç özelliği üzerine etkileri, canlı bakteri düzeylerinde meydana gelen değişimler üzerinden değerlendirilmiştir.

3.2.6. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in aside direnç özelliğine etkisi

Bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen analizler sonucunda *L. acidophilus* LA-5'in gelişimini en iyi düzeyde FOS ve INU prebiyotiklerinin teşvik ettiği belirlenmiştir (Bölüm 4.1.2). Bu nedenle prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in aside direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca bu iki prebiyotik denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.5'de belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.7. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine etkisi

Bölüm 3.2.3'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen analizler sonucunda *B. bifidum* ATCC 15696'nın gelişimini en iyi düzeyde GOS ve SOS prebiyotiklerinin teşvik ettiği belirlenmiştir (Bölüm 4.1.3). Bu nedenle prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca bu iki prebiyotik denemeye alınmıştır.

Bu amaçla, GOS ve SOS steril stok çözeltilerinden Temel besiyeri-A'ya son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı ilave edilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri-B'ye aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 1 (v/v) oranında aktifleştirilmiş *B. bifidum* ATCC 15696 kültürü inoküle edilmiş ve anaerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında kültürler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve çökelti kısmı 4 ml steril saf su içerisinde süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonlarından, pH değerleri 1, 2 ve 3 olan % 0.5'lik (w/v) NaCl çözeltilerine % 2 (v/v) düzeyinde inokülasyonlar

gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerinin pH değerleri 1 M HCl kullanılarak 1, 2 ve 3 değerlerine ayarlanmıştır. Aynı miktardaki hücre süspansiyonu kontrol amacıyla direkt olarak % 0.5 (w/v) NaCl çözeltisine (pH 5.35 olarak ölçülmüştür) aktarılmıştır. İnokülasyon yapılan bu çözeltiler anaerobik koşullarda ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0, 1/2, 1, 2 ve 3. saatlerinde 1 ml örnek alınarak TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan RCA besiyeri kullanılarak anaerobik koşullarda dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine etkileri, canlı bakteri düzeylerinde meydana gelen değişimler üzerinden değerlendirilmiştir.

3.2.8. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin aside direnç özelliğine etkisi

Bölüm 3.2.4'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen analizler sonucunda *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in gelişimini en iyi düzeyde KOS ve SOS prebiyotiklerinin teşvik ettiği belirlenmiştir (Bölüm 4.1.4). Bu nedenle prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in aside direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca bu iki prebiyotik denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.7'de belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.9. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın safraya direnç özelliği üzerine etkisi

Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın safraya direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca FOS ve INU denemeye alınmış ve denemeler % 0.5'lik (w/v) safra içeren ortamda gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla öncelikle, FOS ve INU steril stok çözeltilerinden son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde Temel besiyeri-A'ya ayrı ayrı aktarılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri-A'ya aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 1 (v/v) oranında aktifleştirilmiş *L. acidophilus* ATCC 4356 kültürü inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında kültürler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve çökelti kısmı 4 ml steril saf su içerisinde süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonlarından, saf su kullanılarak hazırlanan ve 121 °C'de 15

dakika sterilize edilen 25 ml'lik % 0.5'lik (w/v) safra çözeltisine % 2 (v/v) düzeyinde inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Aynı miktardaki hücre süspansiyonu kontrol amacıyla direkt olarak 25 ml steril saf su içerisine aktarılmıştır. İnokülasyon yapılan bu çözeltiler 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0, 3, 6 ve 24. saatlerinde 1 ml örnek alınarak TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan MRS Agar besiyeri kullanılarak çift katlı dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in safraya direnç özelliğine etkisi

Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in safraya direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca FOS ve INU denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.9'da belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.11. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın safraya direnç özelliği üzerine etkisi

Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun safraya direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca GOS ve SOS denemeye alınmış ve denemeler % 0.5'lik (w/v) safra içeren ortamda gerçekleştirilmiştir.

GOS ve SOS, steril stok çözeltilerinden Temel besiyeri-B'ye son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı ilave edilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri- B'ye aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 1 (v/v) oranında aktifleştirilmiş *B. bifidum* ATCC 15696 kültürü inoküle edilmiş ve anaerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında kültürler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve çökelti kısmı 4 ml steril saf su içerisinde süspanse edilmiştir.

Elde edilen hücre süspansiyonlarından, saf su kullanılarak hazırlanan ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilen 25 ml'lik % 0.5'lik (w/v) safra çözeltisine % 2 (v/v) düzeyinde inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Aynı miktardaki hücre süspansiyonu kontrol amacıyla direkt olarak 25 ml steril saf su içerisine aktarılmıştır. İnokülasyon yapılan bu çözeltiler anaerobik koşullarda ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0, 1/2, 1, 2 ve 3. saatlerinde 1 ml örnek alınarak TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan RCA besiyeri kullanılarak

anaerobik koşullarda dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in safraya direnç özelliğine etkisi

Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in safraya direnç özelliğı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca KOS ve SOS denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.11'de belirtildiğı şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.13. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğı üzerine etkisi

Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca FOS ve INU denemeye alınmıştır.

Bu amaçla, FOS ve INU steril stok çözeltilerinden Temel besiyeri-A'ya son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı ilave edilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri-A'ya aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 10 (v/v) oranında aktifleştirilmiş *L. acidophilus* ATCC 4356 kültürü inoküle edilmiş ve 4 ± 1 °C (buzdolabı sıcaklığı) ile -25 ± 1 °C'de (derin dondurucu sıcaklığı) ayrı ayrı depolamaya alınmıştır. Kontrol amacıyla ise, aynı oranda aşılama yapılmış temel besiyeri kullanılmıştır. Depolamanın 0, 7, 21 ve 28. günlerinde 1 ml örnek alınarak TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan MRS Agar besiyeri kullanılarak çift katlı dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir.

3.2.14. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğı üzerine etkisi

Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca FOS ve INU denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.13'de belirtildiğı şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.15. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine etkisi

Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca GOS ve SOS denemeye alınmıştır.

GOS ve SOS, steril stok çözeltilerinden Temel besiyeri-B'ye son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı aktarılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri-B'ye aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 10 (v/v) oranında aktiveleştirilmiş *B. bifidum* ATCC 15696 kültürü inoküle edilmiş ve 4 ± 1 °C (buzdolabı sıcaklığı) ile -25 ± 1 °C'de (derin dondurucu sıcaklığı) ayrı ayrı depolamaya alınmıştır. Kontrol amacıyla ise, aynı oranda aşılama yapılmış temel besiyeri kullanılmıştır. Depolamanın 0, 7, 21 ve 28. günlerinde 1 ml örnek alınarak TPS içinde uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilusyondan RCA besiyeri kullanılarak anaerobik koşullarda dökme plak yöntemiyle canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir.

3.2.16. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi

Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca KOS ve SOS denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.15'de belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.17. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri

Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca FOS ve INU denemeye alınmıştır.

FOS ve INU, steril stok çözeltilerinden Temel besiyeri-A'ya son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı ilave edilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri-A'ya aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 1 (v/v) oranında aktiveleştirilmiş *L. acidophilus* ATCC 4356 kültürü

inoküle edilmiş ve 37 °C'de bir gece süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültürler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve çökelti kısmı 2 ml Z tamponunda (EK 1) süspanse edilmiştir. Daha sonra, her bir hücre süspanسیونundan 0.5 ml alınarak içerisinde 2.5 ml Z tamponu, 200 µl kloroform ve 100 µl % 0.1'lik sodyum dodesil sülfat çözeltisi bulunan tüplere aktarılmıştır. Tüpler yaklaşık 30 saniye boyunca vortex yardımıyla karıştırılmış ve sonrasında 37 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Tüplere, 0.1 M fosfat tamponunda 4 mg/ml konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlanan 2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) 1 ml miktarda aktarılmıştır. Tüpler daha sonra 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmişlerdir. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla tüplere 1 ml 1 M Na₂CO₃ çözeltisinden eklenmiş ve örneklerin 420 nm'deki absorbanları ölçülerek OD₄₂₀ değerleri kaydedilmiştir. Ortamdaki β-galaktosidaz aktivitesi sonucu ONPG'nin parçalanması ile oluşan ONP miktarları, daha önce hazırlanan standart ONP grafiğinden (EK 2) yararlanılarak belirlenmiş ve β-galaktosidaz aktivite değerleri "ONP µmol/ml" olarak değerlendirilmiştir.

ONP standart grafiğinin eldesi: Bu amaçla fosfat tamponunda (pH 7) 1.25 – 0.02 µmol/ml arasında değişen farklı konsantrasyonlarda ONP çözeltileri hazırlanmıştır. ONP'nin erime sıcaklığının 44 – 45 °C arasında olması nedeniyle, çözeltileri hazırlama işlemleri 45 °C'deki su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spesifik sarı renk veren her bir dilüsyonun 420 nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. ONP'nin bilinen her bir konsantrasyonuna karşılık ölçülen absorban değerleri grafiğe geçirilerek standart ONP grafiği elde edilmiştir (EK 2).

3.2.18. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in β-galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri

Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in β-galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca FOS ve INU denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.17'de belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.19. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri

Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca GOS ve SOS denemeye alınmıştır.

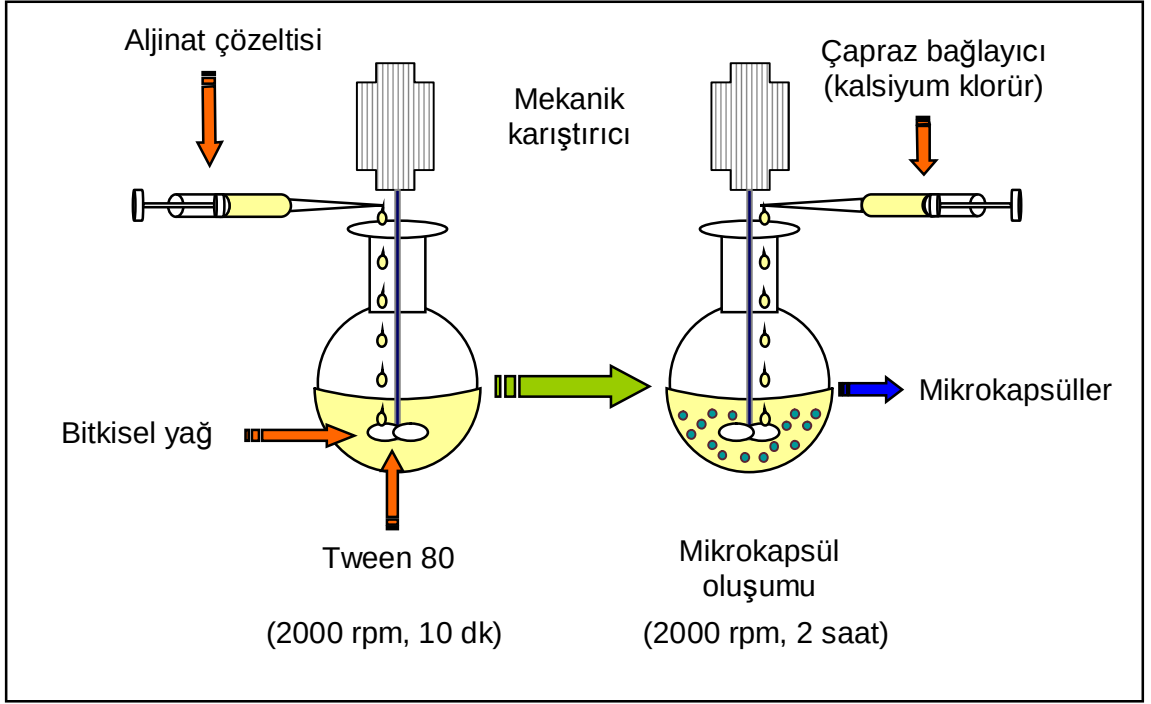
GOS ve SOS, steril stok çözeltilerinden Temel besiyeri-B'ye son konsantrasyonları % 2 (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı aktarılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı oranda GLU yine Temel besiyeri- B'ye aktarılmıştır. Daha sonra besiyerlerinin her birine % 1(v/v) oranında aktifleştirilmiş *B. bifidum* ATCC 15696 kültürü inoküle edilmiş ve anaerobik koşullarda 37 °C'de bir gece süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında Bölüm 3.2.17'de belirtilen yol aynen izlenmiştir.

3.2.20. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkileri

Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'in β -galaktosidaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yalnızca KOS ve SOS denemeye alınmış ve denemelerde Bölüm 3.2.15'de belirtildiği şekilde bir yol izlenmiştir.

3.2.21. Aljinat mikrokapsüllerin hazırlanması ve karakterizasyonu

Aljinat mikrokapsüllerin hazırlanmasında emülsiyon yöntemi kullanılmıştır (Krasaekoopt, Bhandari and Deeth, 2003; Mortazavian et al., 2007). Emülsiyon ortamı bitkisel yağ olarak ticari ayçiçeği yağı kullanılarak sağlanmıştır. Reaktör kabında karıştırılmakta olan ve % 0.5 (v/v) Tween 80 içeren 50 ml bitkisel yağ içerisine belli konsantrasyondaki aljinat jeli programlanılabilir şırınga yardımıyla (Razel Scientif Syringe Pump, Model R99 EJM, Germany) damla damla aktarılmıştır. Aktarma tamamlandıktan sonra mekanik karıştırıcı (Heidolp RZR 2021, Germany) kullanılarak 10 dakika süreyle karıştırma işlemi uygulanmış ve böylece de emülsiyon elde edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak belli konsantrasyondaki kalsiyum klorür çözeltisi yine şırınga yardımıyla damlatılmak suretiyle aktarılmış ve 2 saat süreyle karıştırma işlemine devam edilmiştir (Şekil 3.1, EK 3).



Şekil 3.1. Mikroenkapsülasyon düzeneğinin şematik gösterimi

Bu şekilde elde edilen aljinat mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla, aljinat jeli konsantrasyonu, kalsiyum klorür konsantrasyonu ve karıştırma hızı değiştirilerek işlemler tekrarlanmış ve bu parametrelerin aljinat mikrokapsüllerin boyutlarına etkisi değerlendirilmiştir. Aljinat mikrokapsüllerinin karakterizasyonu amacıyla işlem parametrelerinde yapılan değişiklikler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin boyutları basit ışık mikroskobundan yararlanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan aljinat mikrokapsüllerden alınan bir miktar örnek temiz bir lam üzerine aktarılarak mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Aljinat mikrokapsüllerin hazırlanmasında kullanılan formülasyonlar

Aljinat (%)	CaCl ₂ (%)	Bitkisel yağ (ml)	Tween 80 (%)	Karıştırma hızı (rpm)	Karıştırma süresi (saat)
Aljinat konsantrasyonunun etkisi					
0.5	2	50	0.5	2000	2
1	2	50	0.5	2000	2
2	2	50	0.5	2000	2
4	2	50	0.5	2000	2
CaCl₂ konsantrasyonunun etkisi					
1	0.5	50	0.5	2000	2
1	1	50	0.5	2000	2
1	2	50	0.5	2000	2
1	4	50	0.5	2000	2
Karıştırma hızının etkisi					
1	2	50	0.5	500	2
1	2	50	0.5	1000	2
1	2	50	0.5	1500	2
1	2	50	0.5	2000	2

3.2.22. Pektin mikrokapsüllerin hazırlanması ve karakterizasyonu

Pektin mikrokapsüllerin hazırlanmasında yine emülsiyon yöntemi kullanılmıştır. Emülsiyon ortamı bitkisel yağ olarak ticari ayçiçeği yağı kullanılarak sağlanmıştır. Reaktör kabında karıştırılmakta olan ve % 0.5 (v/v) Tween 80 içeren 50 ml bitkisel yağ içerisine belli konsantrasyondaki pektin jeli şırınga yardımıyla damla damla aktarılmıştır. Aktarma tamamlandıktan sonra 10 dakika karıştırma işlemi uygulanmış ve böylece de emülsiyon elde edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak kalsiyum klorür çözeltisi yine şırınga yardımıyla damlatılmak suretiyle aktarılmış ve 2 saat süreyle karıştırma işlemine devam edilmiştir. Bu şekilde elde edilen pektin mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla, pektin jeli konsantrasyonu, kalsiyum klorür konsantrasyonu ve karıştırma hızı değiştirilerek işlemler tekrarlanmış ve bu parametrelerin pektin mikrokapsüllerin boyutlarına etkisi değerlendirilmiştir. Pektin mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla işlem parametrelerinde yapılan değişiklikler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin boyutları basit

ışık mikroskopundan yararlanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan pektin mikrokapsüllerden alınan bir miktar örnek temiz bir lam üzerine aktararak mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Pektin mikrokapsüllerin hazırlanmasında kullanılan formülasyonlar

Pektin (%)	CaCl ₂ (%)	Bitkisel yağ (ml)	Tween 80 (%)	Karıştırma hızı (rpm)	Karıştırma süresi (saat)
Pektin konsantrasyonunun etkisi					
0.5	6	50	0.5	2000	2
1	6	50	0.5	2000	2
2	6	50	0.5	2000	2
3	6	50	0.5	2000	2
4	6	50	0.5	2000	2
CaCl₂ konsantrasyonunun etkisi					
2	0.5	50	0.5	2000	2
2	1	50	0.5	2000	2
2	2	50	0.5	2000	2
2	4	50	0.5	2000	2
2	6	50	0.5	2000	2
2	8	50	0.5	2000	2
Karıştırma hızının etkisi					
2	6	50	0.5	500	2
2	6	50	0.5	1000	2
2	6	50	0.5	1500	2
2	6	50	0.5	2000	2

3.2.23. Probiyotik bakterilerin aljinat mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyonu

Probiyotik bakterilerin aljinat mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyon işlemleri Bölüm 3.2.21’de sözü edilen aljinat mikrokapsüllerin karakterizasyonu sonucu elde edilen optimum parametreler (% 1 (w/v) aljinat, % 2 (w/v) kalsiyum klorür ve 2000 rpm karıştırma hızı; Bölüm 4.9) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemlerinde probiyotik bakteriler olarak *L. acidophilus* LA-5

ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 kullanılmıştır. Bu bakteri suşları, gerçekleştirilen asit ve safraya direnç analizlerinde diğer bakteri suşlarından daha iyi sonuçlar vermeleri nedeniyle tercih edilmişlerdir. *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin mikroenkapsülasyonu amacıyla öncelikle bu bakteri suşları sırasıyla MRS broth ve RCM besiyerlerinde aktifleştirilmiştir. Bakteri kültürlerine 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemleri uygulanmış ve pelet üzerine 2 ml steril saf su eklenerek hücre süspansiyonları elde edilmiştir. Hazırlanan aljinat jeli içerisine 5:1 (aljinat jeli:hücre süspansiyonu) oranında hücre süspansiyonları ayrı ayrı eklenmiştir. Daha sonra optimum işlem koşullarında Bölüm 3.2.21'de anlatıldığı şekilde mikroenkapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.24. Probiyotik bakterilerin pektin mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyonu

Bölüm 3.2.23'de sözü edilen işlemler aljinat jel yerine pektin jeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Probiyotik bakterilerin pektin mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyonunda, pektin mikrokapsüllerin karakterizasyonu işlemleri sonucu elde edilen optimum parametreler (% 2 (w/v) pektin, % 6 (w/v) kalsiyum klorür ve 2000 rpm karıştırma hızı; Bölüm 4.10) kullanılmıştır.

3.2.25. Mikroenkapsüle edilen probiyotik bakterilerin floresan mikroskobunda gözlemlenmesi

Aljinat ve pektin içerisine mikroenkapsüle edilen *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 hücrelerini gözlemleyebilmek amacıyla floresan mikroskobundan yararlanılmıştır. Bu amaçla SYTO® 9 yeşil floresan nükleik asit boyası kullanılmıştır. Sözü edilen bu boya, bakteri hücrelerinin hem DNA hem de RNA'sını boyamakta ve bakteri hücreleri floresan mikroskobunda yeşil ışıma şeklinde gözlemlenmektedir (Pereira, Millar and Chuck, 2005). Bu amaçla, steril saf su kullanılarak 0.5 µl/ml konsantrasyonunda SYTO® 9 boya çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan 10 ml hacmindeki aljinat ya da pektin mikrokapsülleri içerisine 1 ml SYTO® 9 boya çözeltisi ilave edilmiş ve 20 dakika süresince karanlıkta bekletilmiştir. Steril saf su ile yıkanan mikrokapsüller floresan mikroskobunda 20x büyütme objektif kullanılarak gözlemlenmiştir.

3.2.26. Mikrokapsül içerisindeki probiyotik bakteri düzeyinin belirlenmesi

Bölüm 3.2.23 ve Bölüm 3.2.24'de anlatıldığı şekilde aljinat ve pektin içerisine probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikrokapsüller uygun bir cam kap içerisinde -70 °C'de 24 saat boyunca dondurulmuş ve donmuş haldeki bu mikroküreler liyofilizatörde (Christ, Alpha 1-4 LD plus, Germany) 0.04 mbar basınç altında 24 saat boyunca dondurularak kurutulmuştur.

Kuru formdaki aljinat mikrokapsüller içerisindeki bakteri düzeyini belirlemek amacıyla, 0.1 gr mikrokapsül 9 ml 1 M fosfat tamponu (pH 7.0) içerisine aktarılmış ve 30 dakika süresince belirli aralıklarla vortex işlemi uygulanmıştır. Böylece aljinat mikrokapsüller içerisindeki bakteri hücrelerinin tampon ortamında serbest hale geçmesi sağlanmıştır (Chandramouli et al., 2004). Bunu takiben TPS içerisinde uygun dilüsyonları hazırlanmış ve *L. acidophilus* LA-5 için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise RCA besiyeri kullanılarak dökme plak yöntemi ile canlı hücre sayımları belirlenmiştir.

Pektin mikrokapsüller içerisindeki bakteri düzeyini belirlemek amacıyla, 0.1 gr mikrokapsül 9 ml sitrat tamponuna (pH 4.5) aktarılmış ve 40 °C'lik su banyosunda çözelti sıcaklığı bu sıcaklığa erişene kadar bekletilmiştir. Daha sonra ortama %2 (v/v) oranında pektinaz enzimi çözeltisi eklenmiş ve enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 40 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Böylece, pektin mikrokapsüllerin parçalanması sağlanarak bakteri hücrelerinin tampon ortamına serbest hale geçmesi gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben TPS içerisinde uygun dilüsyonları hazırlanmış ve *L. acidophilus* LA-5 için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise RCA besiyeri kullanılarak dökme plak yöntemi ile canlı hücre sayımları belirlenmiştir.

3.2.27. Mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin aside direnç özelliği

Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşlarının aside direnç özelliğini belirlemek amacıyla öncelikle sözü edilen bakteri suşlarını içeren kuru formdaki aljinat ve pektin mikrokapsüller hazırlanmış ve bu mikrokapsüller Bölüm 3.2.26'da belirtildiği şekilde dondurularak kurutulmuştur.

Aljinat içerisine mikroenkapsüle edilen probiyotik bakteri hücrelerinin aside direnç özelliğini belirlemek amacıyla, kuru formdaki 0.1 gr mikrokapsül pH değerleri 1, 2 ve 3 olan 10 ml % 0.5'lik NaCl zltilerine ayrı ayrı aktarılmıştır. zltilerinin pH değerleri 1 M HCl kullanılarak 1, 2 ve 3 değerlerine ayarlanmıştır. Aynı miktardaki mikrokapsül kontrol amacıyla direkt olarak % 0.5 (w/v) NaCl zltisine (pH 5.40) aktarılmıştır. Örnekler 37  C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0, 1/2, 1, 2 ve 3. saatlerinde 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işleminin ardından saf su kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Mikrokapsüller zerine 10 ml fosfat tamponu (pH 7.0) aktarılmış ve belirli aralıklarla vortex işlemi uygulanarak 30 dakika bekletilmiş ve böylece de mikrokapsül içeriğinin ortamda serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Bunu takiben TPS içerisinde uygun dilüsyonları hazırlanmış ve *L. acidophilus* LA-5 için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise RCA besiyeri kullanılarak dökme plak yöntemi ile canlı hücre sayımları belirlenmiştir.

Pektin içerisine mikroenkapsüle edilen probiyotik bakteri hücrelerinin aside direnç özelliğini belirlemek amacıyla yine yukarıda anlatıldığı şeklide bir yol izlenmiştir. Ancak, mikrokapsül içeriğinin serbest hale geçmesini sağlamak için mikrokapsüllerin üzerine 10 ml sitrat tamponu (pH 4.5) ilave edilmiş ve sıcaklık 40  C'ye ulaşana kadar su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra % 2 (v/v) oranında pektinaz enzimi ilave edilmiş ve 30 dakika boyunca bu sıcaklıkta inkübasyona bırakılmış ve böylece de pektinaz aktivitesi ile pektin mikrokapsüllerinin parçalanması ve mikrokapsül içeriğinin ortamda serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Bunu takiben TPS içerisinde uygun dilüsyonları hazırlanmış ve *L. acidophilus* LA-5 için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise RCA besiyeri kullanılarak dökme plak yöntemi ile canlı hücre sayımları belirlenmiştir.

3.2.28. Mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin safraya direnç özelliği

Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşlarının safraya direnç özelliğini belirlemek amacıyla öncelikle sözü edilen bakteri suşlarını içeren kuru formdaki aljinat ve pektin mikrokapsüller hazırlanmış ve bu mikrokapsüller Bölüm 3.2.26'da belirtildiği şekilde dondurularak kurutulmuştur.

Aljinat içerisine mikroenkapsüle edilen probiyotik bakteri hücrelerinin safraya direnç özelliğini belirlemek amacıyla, kuru formdaki 0.1 gr mikrokapsül 10 ml % 0.5'lik safra çözeltisine ayrı ayrı aktarılmıştır. Örnekler 37 C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 0, 3, 6 ve 24. saatlerinde 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işleminin ardından saf su kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Mikrokapsüller zerine 10 ml fosfat tamponu (pH 7.0) aktarılmış ve belirli aralıklarla vortex işlemi uygulanarak 30 dakika bekletilmiş ve böylece de mikrokapsül içeriğinin ortamda serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Bunu takiben TPS içerisinde uygun dilüsyonları hazırlanmış ve *L. acidophilus* LA-5 için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise RCA besiyeri kullanarak dökme plak yöntemi ile canlı hücre sayımları belirlenmiştir.

Pektin içerisine mikroenkapsüle edilen probiyotik bakteri hücrelerinin safraya direnç özelliğini belirlemek amacıyla yine yukarıda anlatıldığı şeklide bir yol izlenmiştir. Ancak, mikrokapsül içeriğinin serbest hale geçmesini sağlamak için mikrokapsüllerin üzerine 10 ml sitrat tamponu (pH 4.5) ilave edilmiş ve sıcaklık 40 C'ye ulaşana kadar su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra % 2 (v/v) oranında pektinaz enzimi ilave edilmiş ve 30 dakika boyunca bu sıcaklıkta inkübasyona bırakılmış ve böylece de pektinaz aktivitesi ile pektin mikrokapsüllerinin parçalanması ve mikrokapsül içeriğinin ortamda serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Bunu takiben TPS içerisinde uygun dilüsyonları hazırlanmış ve *L. acidophilus* LA-5 için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise RCA besiyeri kullanarak dökme plak yöntemi ile canlı hücre sayımları belirlenmiştir.

3.2.29. Dondurma retimi

Serbest ve mikroenkapsüle edilmiş probiyotik bakteri suşları (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) ile prebiyotikleri (INU ve KOS) içeren dondurma üretimleri Algida-Unilever San ve Tic. Türk A. ř, orlu fabrikasındaki pilot düzeyde üretim yapılan ARGE biriminde 12-15 Ağustos 2008 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Dondurma üretimlerinde Algida'nın "sade dondurma (klasik sade kaymaklı dondurma)" çeşidi temel alınarak aşağıda sıralanan 11 farklı dondurma örneği üretilmiştir;

1. Sade dondurma (Kontrol)
2. % 2 oranında inulin içeren sade dondurma
3. *L. acidophilus* LA-5 içeren sade dondurma
4. *L. acidophilus* LA-5 ve % 2 oranında inulin içeren sade dondurma
5. Mikroenkapsüle *L. acidophilus* LA-5 içeren sade dondurma
6. Mikroenkapsüle *L. acidophilus* LA-5 ve % 2 oranında inulin içeren sade dondurma
7. % 2 oranında ksilooligosakkarit içeren sade dondurma
8. *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 içeren sade dondurma
9. *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 ve % 2 oranında ksilooligosakkarit içeren sade dondurma
10. Mikroenkapsüle *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 içeren sade dondurma
11. Mikroenkapsüle *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 ve % 2 oranında ksilooligosakkarit içeren sade dondurma

"Sade dondurma"nın temel bileşimi EK 4 'de verilmiştir. EK 4 'den de görülebileceği gibi "sade dondurma"nın bileşimine renk-koku ve yapısal özellikte oluşabilecek herhangi bir değişikliği baskılamaması için aroma maddesi ilave edilmemiştir.

Dondurma üretimindeki temel aşamalar; bileşenlerin karıştırılması, pastörizasyon, homojenizasyon, dinlendirme, dondurma ve paketlenme şeklinde gerçekleştirilmiştir (EK 5).

Mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin asit ve safraya direnç özelliklerini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda, probiyotik bakterilerin mikroenkapsüle edilmesinde destek materyali olarak pektinin kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde probiyotiklerin aljinat ile enkapsülasyonuna ve bunun dondurmalarda kullanımına yönelik pek çok çalışmaya rastlamak mümkündür. Ayrıca, yine bazı çalışmalarda aljinatın mikroenkapsülasyon uygulamalarında kullanımıyla ilgili olarak aljinatın asidik koşullara duyarlılık ve mekanik dayanımında kayıplar görülmesi gibi bazı dezavantajlardan da söz edilmektedir

(Gombotz and Wee, 1998). Bu nedenle, aljınata da alternatif olması amacıyla probiyotik bakterilerin mikroenkapsüle edilmesinde destek materyali olarak pektinin kullanılmasına karar verilmiştir. *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşlarının mikroenkapsüle edilmesinde destek materyali olarak yalnızca pektin denemeye alınmış ve mikroenkapsüle probiyotik bakterileri içeren dondurma örneklerinin (5, 6, 10 ve 11 nolu dondurma örnekleri) üretiminde de yalnızca pektin ile mikroenkapsüle edilen probiyotik bakteriler kullanılmıştır.

3.2.30. Dondurma örneklerine uygulanan kalite kontrol testleri

3.2.30.1. Viskozite ölçümleri

Üretimleri gerçekleştirilen dondurma örneklerinin viskozite değerleri, üretimin yapıldığı fabrikada üretimin hemen sonrasında belirlenmiştir. Viskozite ölçümleri Brookfield viskozimetresi ile 3 nolu spindle kullanılarak 60 rpm'de 4 °C'de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar cp (centi point) olarak belirtilmiştir.

3.2.30.2. Kuru madde analizi

Kuru madde değerleri üretimin yapıldığı fabrikada üretimin hemen sonrasında Ohaus MB200 marka kuru madde ölçüm cihazı kullanılarak (%) kuru madde olarak belirlenmiştir.

3.2.30.3. Erime hızı testi

Erime hızı testleri, -22 °C'de depolanan dondurma örneklerinden depolamanın beşinci gününde üretimin yapıldığı fabrikada gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 70 gr dondurma örneği, ölçü silindiri üzerine yerleştirilmiş olan belli bir gözenek çapına sahip paslanmaz çelik levha üzerine aktarılmış ve 26 °C'de (oda sıcaklığı) bekletilmiştir. Eriyen ve ölçü silindiri içerisine düşen dondurma miktarı 15 dakikalık aralıklarla ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra ölçülen miktarlar zamana karşı grafiğe geçirilerek dondurma örneklerinin erime hızları ml/dk olarak hesaplanmıştır.

3.2.31. Dondurma örneklerinin mikrobiyolojik analizleri

Daha önce de belirtildiği üzere; 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ve 11 nolu dondurma örnekleri serbest ya da mikroenkapsüle probiyotik bakterileri içermektedir. Dondurma üretimi sırasında uygulanan dondurma işleminin canlı bakteri düzeyine etkisini ortaya koyabilmek amacıyla dondurma örneklerinin dondurma öncesi ve sonrası aşamalarında örnekler alınmış ve bu örneklerdeki canlı bakteri düzeyleri daha önce sözü edilen uygun besiyerleri kullanılarak ve dökme plak yöntemiyle belirlenmiştir.

Depolama boyunca örneklerdeki canlı bakteri düzeylerinde meydana gelebilecek değişimleri belirlemek amacıyla mikrobiyolojik sayımlar 15 günlük dönemlerle tekrarlanmıştır. Sayım amacıyla, serbest formdaki probiyotik bakterileri içeren örnekler (3, 4, 8 ve 9) 40 °C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilerek tamamen erimeleri sağlanmış ve tamponlu pepton su kullanılarak uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır. *L. acidophilus* LA-5 içeren örneklerdeki (3 ve 4) canlı bakteri sayımları için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 içeren örneklerdeki (8 ve 9) canlı bakteri sayımları için ise RCA besiyeri kullanılarak dökme plak yöntemiyle ekimler yapılmıştır.

Mikroenkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 (5 ve 6 nolu örnekler) ile *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (10 ve 11 nolu örnekler) içeren örneklerdeki canlı bakteri düzeylerini belirlemek amacıyla ise, örnekler ilk aşamada yine 40 °C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilerek tamamen erimeleri sağlanmıştır. Daha sonra sitrat tamponu kullanılarak bu örneklerin 10⁻¹'lik ilk dilüsyonları hazırlanmış ve sıcaklık 40 °C değerine ulaşana kadar su banyosunda bekletilmiştir. Sıcaklık bu değere ulaştınca % 2 (v/v) düzeyinde pektinaz enzimi ilave edilmiş ve 30 dakika boyunca aynı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından ileri dilüsyonlar hazırlanarak, canlı bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. *L. acidophilus* LA-5 içeren örneklerdeki (5 ve 6) canlı bakteri sayımları için MRS agar besiyeri, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 içeren örneklerdeki (10 ve 11) canlı bakteri sayımları için ise RCA besiyeri kullanılarak dökme plak yöntemiyle ekimler yapılmıştır.

3.2.32. Dondurma örneklerinde duyusal muayene

Dondurma örneklerinin 15 günlük dönemlerde duyusal muayeneleri Türk Standartları Enstitüsü “TS 4265 Süt Esaslı Dondurma” standardı esas alınarak hazırlanan duyusal değerlendirme puan cetveli (EK 6) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Duyusal muayeneler 5 farklı panelist tarafından gerçekleştirilmiş olup, panelistler EK 6’da verilen “Dondurma örnekleri için duyusal muayene değerlendirme puanları” çizelgesinde bulunan kriterler ve puanlar dahilinde değerlendirme yapmışlardır. Değerlendirmede görünüş, renk, kıvam, yapı, koku ve tat kriterleri dikkate alınmıştır.

3.2.33. İstatistiksel Analizler

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde SPSS 15.0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Varyanslar arasındaki farklılığın önem kontrolü ANOVA testi kullanılarak saptanmış ve sonuçlar $p < 0.05$ önemlilik düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması genel anlamda iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında aljinat ve pektin mikrokapsülleri karakterize edilerek optimum mikrokapsülasyon koşulları belirlenmiş, optimum mikrokapsülasyon koşullarında iki farklı probiyotik bakteri türünün enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve mikrokapsüle probiyotik bakterilerin asit ve safraya dirençleri serbest probiyotik bakterilerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise serbest ve mikrokapsüle probiyotik bakteriler kullanılarak dondurma üretimleri gerçekleştirilmiş ve mikrokapsülasyonun dondurmanın duyu ve mikrobiyolojik özelliklerine etkileri belirlenerek mikrokapsüle probiyotiklerin dondurma üretiminde kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında öncelikli olarak belirli bazı prebiyotik maddelerin çalışmada kullanılan probiyotik bakterilerin (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *L. acidophilus* ATCC 4356, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ve *B. bifidum* ATCC 15696) gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan bu bakterilerin her birinin gelişimlerini en iyi düzeyde teşvik eden iki farklı prebiyotik madde belirlenmiş ve bu maddelerin kullanılan probiyotik bakterilerin asit ve safra dirençlilik özellikleri, β -galaktosidaz aktiviteleri ve soğuk depolama koşullarına direnç özellikleri üzerine etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Bu aşamada elde edilen sonuçlar değerlendirilerek asit, safra ve soğuk depolama koşullarına en fazla direnç gösteren *L. acidophilus* suşu ve *Bifidobacterium* türü ile bu bakterilerin her biri için gelişimlerini en iyi düzeyde teşvik eden prebiyotik madde belirlenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında daha sonra mikrokapsülasyon amacıyla destek materyali olarak aljinat ve pektin test edilmiştir. Aljinat ve pektin kullanılarak elde edilen mikrokapsüllerin karakterize edilmesini takiben, *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşlarının her iki destek materyali içerisine enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikrokapsüle edilen bakteri hücrelerinin asit ve safraya dirençleri test edildikten sonra, dondurma üretiminde kullanılacak olan mikrokapsüle probiyotik bakteri seçimine gidilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise serbest ve mikroenkapsüle probiyotik bakteri içeren dondurma üretimleri gerçekleştirilmiştir. Dondurma üretimleri Algida-Unilever San. ve Tic. Türk A. Ş, Çorlu fabrikasındaki pilot düzeyde üretim yapılan ARGE biriminde yapılmıştır. Üretilen 11 farklı dondurma örneği üzerinde kuru madde analizleri, viskozite analizleri, erime hızı testleri ve dondurma işleminin canlı probiyotik bakteri düzeyine etkisini belirlemeye yönelik mikrobiyolojik sayımlar gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.29 ve Bölüm 3.2.30). Ayrıca, 4 aylık depolama süresi boyunca dondurma örneklerindeki canlı probiyotik bakteri düzeyindeki değişimleri belirlemeye yönelik mikrobiyolojik sayımlar ve duyuusal değerlendirmeler de yapılmıştır (Bölüm 3.2.30 ve Bölüm 3.2.31).

4.1. Prebiyotiklerin Probiyotik Bakteri Gelişimi Üzerine Etkileri

Bu amaçla *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* LA-5, *B. bifidum* ATCC 15969 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 probiyotik test bakteri suşları olarak seçilmiştir. Tez çalışmasının bu aşamasında test edilecek olan prebiyotik maddelerin belirlenmesi amacıyla bir literatür araştırması yapılmış ve prebiyotik etkinliğinden sıklıkla söz edilen altı farklı prebiyotik maddenin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu maddeler fruktooligosakkarit (FOS), inulin (INU), galaktooligosakkarit (GOS), soyaoligosakkariti (SOS), ksilooligosakkarit (KOS) ve laktuloz (LAK) şeklinde olup, ayrıca karşılaştırma yapmak amacıyla glukoz (GLU) da analizlere dahil edilmiştir. Bakteri kültürlerinin her birinin farklı konsantrasyonlarda (% 0.5, % 1 ve % 2) prebiyotik maddeleri içeren ortamlardaki gelişim düzeylerindeki artışlar belirlenerek, prebiyotiklerin probiyotik bakteri gelişimi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

4.1.1. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356 gelişimi üzerine etkileri

Farklı konsantrasyonlarda denenene 6 farklı prebiyotik maddenin *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun gelişimi üzerine etkileri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

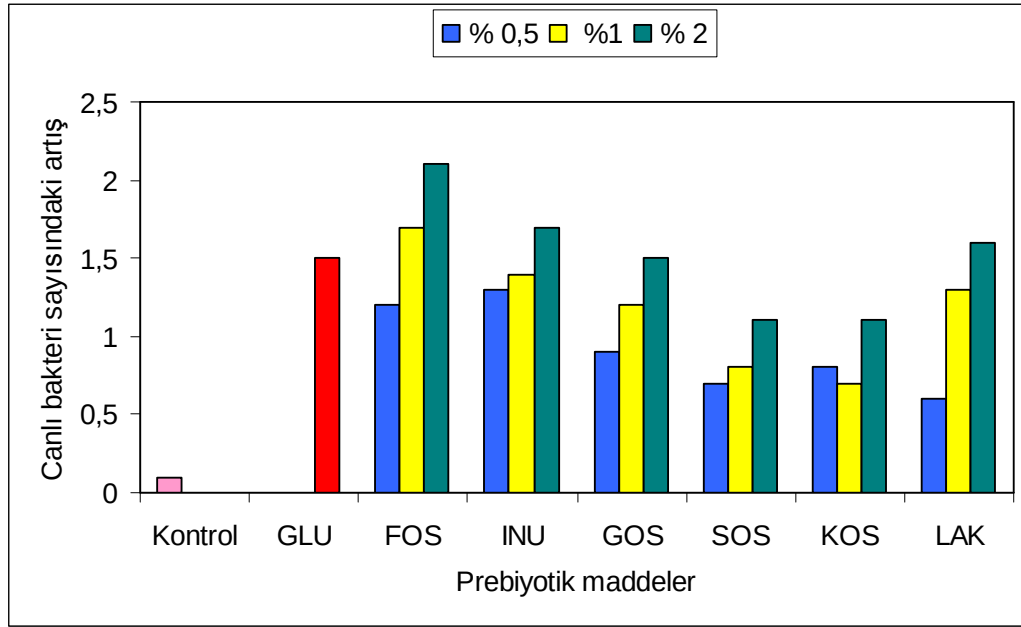
L. acidophilus ATCC 4356 suşunun gelişimi üzerine prebiyotiklerin etki düzeylerini karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilen analizler sonucunda, tüm prebiyotiklerin denenene *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun gelişimini belirli düzeylerde teşvik ettiği belirlenmiştir. Kontrol ortamında (karbonhidrat içermeyen besiyeri) 24 saat inkübasyonun ardından canlı bakteri düzeyinde önemli bir artış gözlenmezken,

ortama belirli oranlarda prebiyotik madde eklendiğinde canlı bakteri düzeyinde 0.5-2.1 log arasında değişen miktarlarda artışlar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1.).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, bakteri gelişimi üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların önemli olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). Prebiyotik maddelerin konsantrasyon farklarının bakteri gelişimi üzerindeki etkisi de istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.1. Denenen prebiyotik maddelerin *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri

Gelişme ortamı		Başlangıç canlı bakteri sayısı	İnkübasyon sonrası canlı bakteri sayısı	Canlı bakteri sayısındaki artış	İnkübasyon sonrası pH
Kontrol		6.6±0.2	6.7±0.1	0.1±0.1	5.6±0.2
% 2 Glukoz		6.4±0.2	7.9±0.2	1.5±0.3	3.9±0.1
FOS	% 0.5	6.7±0.1	7.9±0.3	1.2±0.3	4.3±0.2
	% 1	6.5±0.3	8.2±0.2	1.7±0.2	4.3±0.3
	% 2	6.5±0.2	8.6±0.2	2.1±0.3	4.1±0.1
INU	% 0.5	6.5±0.1	7.8±0.1	1.3±0.3	4.6±0.3
	% 1	6.6±0.1	8.0±0.2	1.4±0.2	4.2±0.2
	% 2	6.6±0.2	8.3±0.3	1.7±0.5	4.1±0.2
GOS	% 0.5	6.5±0.1	7.4±0.2	0.9±0.3	4.7±0.2
	% 1	6.6±0.2	7.8±0.1	1.2±0.2	4.5±0.1
	% 2	6.5±0.2	8.0±0.1	1.5±0.2	4.2±0.2
SOS	% 0.5	6.4±0.3	7.1±0.1	0.7±0.1	4.9±0.2
	% 1	6.7±0.1	7.5±0.4	0.8±0.2	4.4±0.3
	% 2	6.6±0.1	7.7±0.2	1.1±0.1	4.2±0.2
KOS	% 0.5	6.3±0.1	7.1±0.1	0.8±0.1	5.5±0.1
	% 1	6.6±0.1	7.3±0.3	0.7±0.1	5.4±0.2
	% 2	6.6±0.2	7.7±0.3	1.1±0.1	5.1±0.2
LAK	% 0.5	6.7±0.1	7.3±0.1	0.6±0.3	5.1±0.3
	% 1	6.4±0.3	7.7±0.1	1.3±0.2	4.5±0.2
	% 2	6.5±0.2	8.1±0.2	1.6±0.3	4.5±0.1



Şekil 4.1. Prebiyotik maddelerin *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri

Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'den de takip edilebileceği gibi, *L. acidophilus* ATCC 4356 kültürünün gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden prebiyotik maddenin % 2 konsantrasyonunda denenen FOS olduğu görülmektedir. Gelişme ortamına %2 oranında FOS eklendiğinde bakteri düzeyinde 2.1 log (kob/ml) artış elde edilmiştir. Bu prebiyotik maddeyi etki düzeyi açısından INU ve LAK izlemektedir. FOS, INU ve LAK, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun gelişimini teşvik etmeleri açısından diğer prebiyotiklere göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Bazı prebiyotik maddelerin (SOS ve KOS), denendikleri tüm konsantrasyonlarda bakteri düzeyinde meydana getirdikleri artışların, ortama % 2 oranında GLU eklendiğinde elde edilen artıştan daha az olduğu gözlenmiştir.

Gelişme ortamlarında GLU ve prebiyotik maddeler bulunan ortamlarda, inkübasyon sonrasında ortamdaki asitliğin belli düzeylerde değiştiği görülmektedir. Genel olarak, ortamdaki prebiyotik madde konsantrasyonu arttıkça, inkübasyon sonrası ölçülen pH değerlerinde azalmalar, dolayısıyla da asitlik gelişiminde artışların olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar FOS ve INU'nın diğer prebiyotiklere

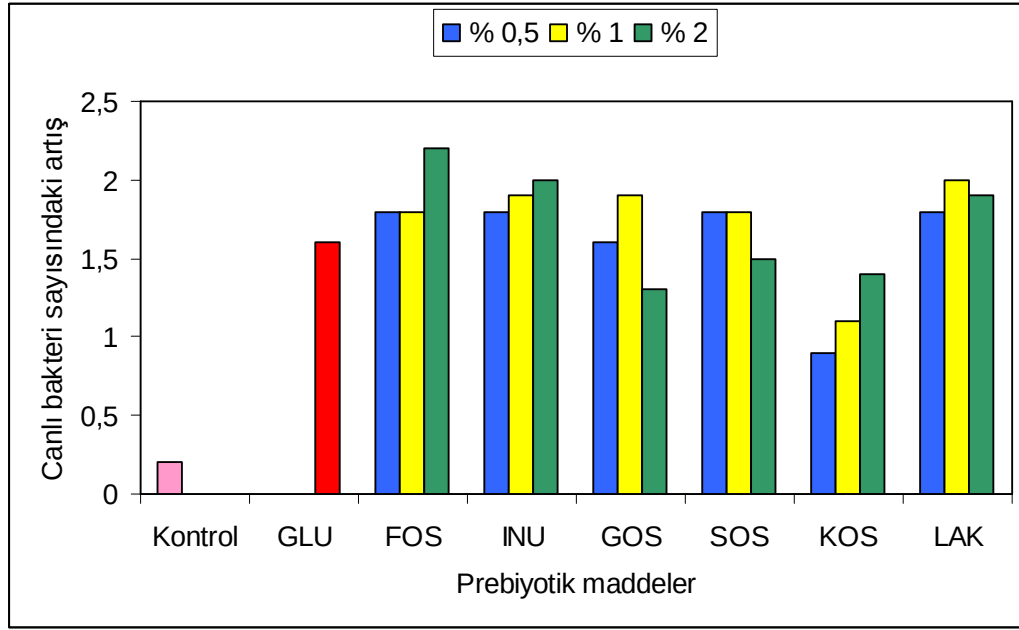
göre, bu bakterinin gelişiminin yanı sıra asitlik gelişimini de daha yüksek düzeylerde teşvik ettiğini göstermektedir.

4.1.2. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5 gelişimi üzerine etkileri

Farklı konsantrasyonlarda denenen 6 farklı prebiyotik maddenin *L. acidophilus* LA-5 suşunun gelişimi üzerine etkileri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Denenen prebiyotik maddelerin *L. acidophilus* LA-5 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri

Gelişme ortamı		Başlangıç canlı bakteri sayısı	İnkübasyon sonrası canlı bakteri sayısı	Canlı bakteri sayısındaki artış	İnkübasyon sonrası pH
Kontrol		6.5±0.2	6.7±0.3	0.2±0.3	5.9±0.1
%2 Glukoz		6.5±0.2	7.6±0.2	1.6±0.2	4.1±0.3
FOS	% 0.5	6.5±0.3	8.3±0.1	1.8±0.2	4.6±0.1
	% 1	6.5±0.2	8.3±0.3	1.8±0.4	4.2±0.2
	% 2	6.4±0.1	8.6±0.2	2.2±0.3	4.2±0.1
INU	% 0.5	6.7±0.3	8.4±0.2	1.8±0.1	5.1±0.3
	% 1	6.5±0.1	8.3±0.1	1.9±0.2	4.7±0.1
	% 2	6.4±0.1	8.4±0.3	2.0±0.1	4.3±0.1
GOS	% 0.5	6.5±0.3	8.0±0.1	1.6±0.3	4.8±0.2
	% 1	6.4±0.1	8.3±0.2	1.9±0.2	4.4±0.2
	% 2	6.5±0.4	7.8±0.2	1.3±0.5	4.2±0.1
SOS	% 0.5	6.5±0.2	8.3±0.2	1.8±0.1	4.9±0.1
	% 1	6.5±0.1	8.3±0.1	1.8±0.2	4.6±0.1
	% 2	6.6±0.3	8.1±0.1	1.5±0.1	4.3±0.3
KOS	% 0.5	6.5±0.2	7.5±0.2	0.9±0.1	5.7±0.1
	% 1	6.6±0.2	7.7±0.3	1.1±0.3	5.6±0.2
	% 2	6.5±0.3	7.9±0.3	1.4±0.5	5.3±0.4
LAK	% 0.5	6.5±0.3	8.4±0.2	1.8±0.4	4.5±0.2
	% 1	6.5±0.2	8.5±0.1	2.0±0.3	4.3±0.1
	% 2	6.5±0.1	8.4±0.3	1.9±0.4	4.1±0.1



Şekil 4.2. Prebiyotik maddelerin *L. acidophilus* LA-5 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri

L. acidophilus LA-5 suşunun gelişimine prebiyotiklerin etki düzeylerini karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilen analizler sonucunda, tüm prebiyotiklerin denenen *L. acidophilus* LA-5 suşunun gelişimini belirli düzeylerde teşvik ettiği belirlenmiştir. Kontrol ortamında 24 saat inkübasyonun ardından canlı bakteri düzeyinde önemli bir artış gözlenmemiştir. Gelişme ortamına prebiyotik madde eklendiğinde canlı bakteri düzeyinde yaklaşık 1-2.2 log arasında değişen miktarlarda artışlar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

İstatistiksel analizler, bakteri gelişimi üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). Prebiyotik maddelerin konsantrasyon farklarının bakteri gelişimi üzerindeki etkisi de istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'den de takip edilebileceği gibi, *L. acidophilus* LA-5 kültürünün gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden prebiyotik maddenin % 2 konsantrasyonunda denenen FOS olduğu görülmektedir. Bu prebiyotik maddeyi etki düzeyi açısından INU ve LAK izlemektedir. Bütün bunlara göre de FOS, INU ve LAK *L. acidophilus* LA-5 suşunun gelişimini teşvik etmeleri açısından diğer prebiyotiklere göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Denenen prebiyotik maddeler

arasında yalnızca KOS gelişme ortamına % 0.5 oranında eklendiğinde bakteri düzeyinde meydana getirdiği artış, ortama GLU ilave edildiğinde elde edilen artıştan daha düşük çıkmıştır.

L. acidophilus LA-5 suşu ile elde edilen sonuçların, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu ile gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlar (Bölüm 4.1.1) ile genelde uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre de suş farklılığının bu yönde önemli bir fark yaratmadığı sonucuna varılabilir.

Gelişme ortamlarında GLU ve prebiyotik maddeler bulunan ortamlarda, inkübasyon sonrasında ortamdaki asitliğin belli düzeylerde değiştiği görülmektedir. Genel olarak, ortamdaki prebiyotik madde konsantrasyonu arttıkça, inkübasyon sonrası ölçülen pH değerlerinde azalmalar, dolayısıyla da asitlik gelişiminde artışların olduğu ortaya çıkmıştır. Farklı prebiyotik maddelerin eklendiği gelişme ortamlarında inkübasyon sonrası ölçülen pH değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Yalnızca KOS bulunan ortamlarda inkübasyon sonrası ölçülen pH değerleri diğerlerinden daha yüksek çıkmıştır. KOS eklenen gelişme ortamlarındaki bakteri düzeyindeki artışlar da, diğer ortamlarda tespit edilen düzeylerden daha az olduğu dikkati çekmektedir. Dolayısıyla KOS bulunan ortamlarda daha yüksek pH değerlerinin ölçülmesi normal bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

4.1.3. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696 gelişimi üzerine etkileri

B. bifidum ATCC 15696 suşunun gelişimi üzerine prebiyotiklerin etki düzeylerini karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilen analizler sonucunda, tüm prebiyotiklerin denenen *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun gelişimini belirli düzeylerde teşvik ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3).

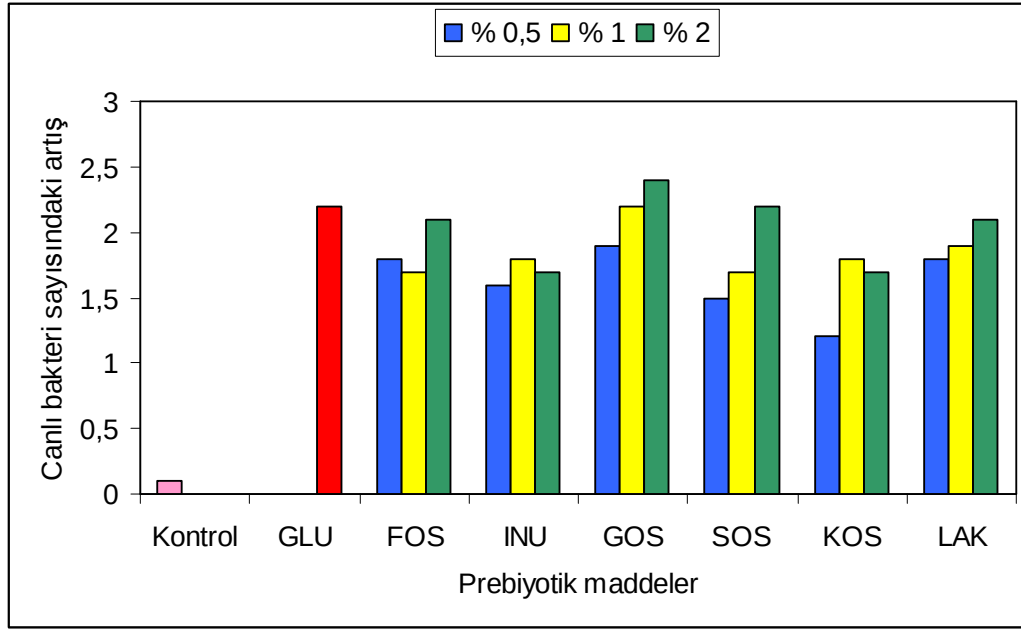
Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, bakteri gelişimi üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların önemli olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). Prebiyotik maddelerin konsantrasyon farklarının bakteri gelişimi üzerindeki etkisi de istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3'den de izlenebileceği gibi, *B. bifidum* ATCC 15696 kültürünün gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden prebiyotik maddenin % 2

konsantrasyonunda denenen GOS olduğu görülmektedir. Bu prebiyotik maddeyi etki düzeyi açısından LAK ve SOS izlemektedir. Bütün bunlara göre de GOS, LAK ve SOS *B. bifidum* ATCC 15969 suşunun gelişimini teşvik etmeleri açısından diğer prebiyotiklere göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Çalışmada kullanılan prebiyotik maddeler % 0.5 ve % 1 oranlarında ortama eklendiklerinde bakteri düzeyindeki artışların, ortamda % 2 GLU bulunduğu elde edilen artıştan daha az olduğu dikkati çekmiştir. Yalnızca % 2 oranında GOS kullanıldığında bakteri düzeyindeki artış GLU'daki artıştan daha fazla olmuştur.

Çizelge 4.3. Denenen prebiyotik maddelerin *B. bifidum* ATCC 15969 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri

Gelişme ortamı		Başlangıç canlı bakteri sayısı	İnkübasyon sonrası canlı bakteri sayısı	Canlı bakteri sayısındaki artış	İnkübasyon sonrası pH
Kontrol		6.5±0.1	6.6±0.3	0.1±0.2	5.7±0.1
%2 Glukoz		6.3±0.4	8.5±0.6	2.2±0.3	4.3±0.2
FOS	% 0.5	6.3±0.2	8.1±0.2	1.8±0.1	5.3±0.1
	% 1	6.4±0.5	8.2±0.1	1.7±0.3	5.0±0.1
	% 2	6.3±0.1	8.4±0.3	2.1±0.1	4.7±0.2
INU	% 0.5	6.4±0.3	7.9±0.3	1.6±0.1	5.5±0.1
	% 1	6.4±0.1	8.2±0.3	1.8±0.4	5.4±0.2
	% 2	6.5±0.2	8.2±0.1	1.7±0.3	5.2±0.2
GOS	% 0.5	6.2±0.1	8.1±0.1	1.9±0.2	4.3±0.1
	% 1	6.3±0.1	8.5±0.3	2.2±0.4	4.2±0.2
	% 2	6.3±0.2	8.7±0.1	2.4±0.1	4.3±0.2
SOS	% 0.5	6.4±0.4	7.9±0.1	1.5±0.2	4.7±0.1
	% 1	6.4±0.3	8.1±0.3	1.7±0.2	4.5±0.2
	% 2	6.3±0.1	8.5±0.2	2.2±0.3	4.2±0.2
KOS	% 0.5	6.5±0.2	7.7±0.1	1.2±0.2	5.6±0.1
	% 1	6.3±0.2	8.1±0.4	1.8±0.5	5.5±0.3
	% 2	6.5±0.1	8.2±0.1	1.7±0.3	5.4±0.2
LAK	% 0.5	6.2±0.1	8.1±0.2	1.8±0.1	4.6±0.3
	% 1	6.3±0.3	8.2±0.1	1.9±0.1	4.5±0.1
	% 2	6.3±0.1	8.4±0.3	2.1±0.3	4.6±0.2



Şekil 4.3. Prebiyotik maddelerin *B. bifidum* ATCC 15969 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri

İnkübasyon sonrası tespit edilen pH değerlerine bakıldığında, genel olarak bakteri gelişiminde meydana gelen artışla birlikte pH değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. İnkübasyon sonrası asitlik gelişiminin en az olduğu ortamlar, gelişme ortamına INU ve KOS'un eklendiği ortamlar olmuştur. Bu ortamlardaki bakteri gelişimlerinin diğer ortamlara göre daha az olduğu dikkati çekmektedir.

4.1.4. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 gelişimi üzerine etkileri

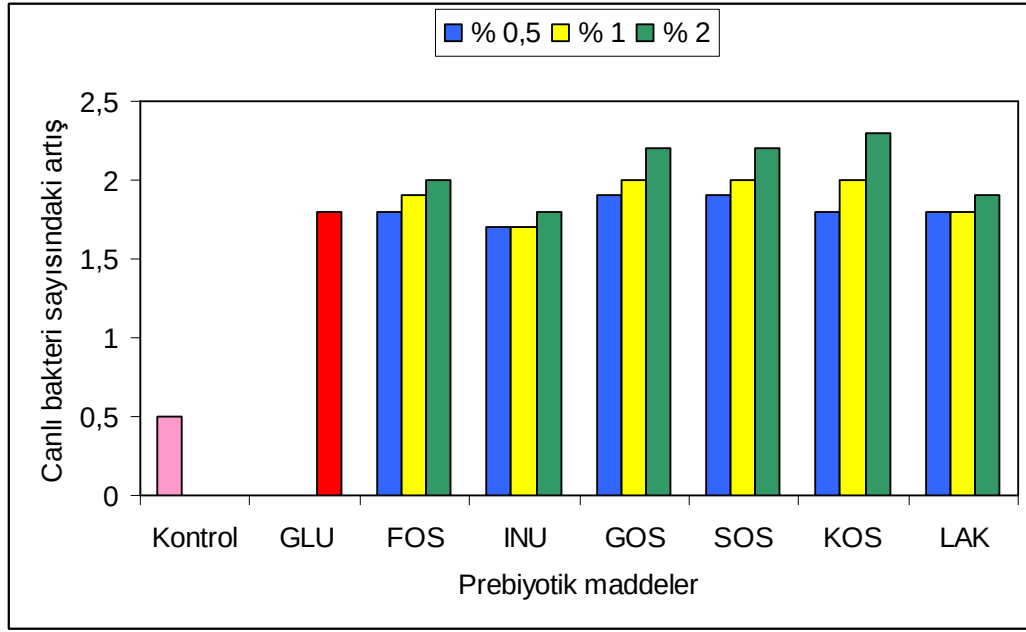
Farklı konsantrasyonlarda denenen 6 farklı prebiyotik maddenin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun gelişimi üzerine etkileri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Gerçekleştirilen analizler sonucunda tüm prebiyotiklerin denenen *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun gelişimini belirli düzeylerde teşvik ettiği belirlenmiştir.

Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, bakteri gelişimi üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların önemli olduğu ortaya çıkmıştır ($p < 0.05$). Prebiyotik maddelerin konsantrasyon farklarının bakteri gelişimi üzerindeki etkisi de istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çizelge 4.4. Denenen prebiyotik maddelerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun üremesi (log (kob/ml)) ve asitlik geliştirmesi (pH) üzerine etkileri

Gelişme ortamı		Başlangıç canlı bakteri sayısı	İnkübasyon sonrası canlı bakteri sayısı	Canlı bakteri sayısındaki artış	İnkübasyon sonrası pH
Kontrol		6.3±0.3	6.9±0.2	0.5±0.4	5.6±0.2
%2 Glukoz		6.3±0.2	8.1±0.3	1.8±0.3	4.1±0.2
FOS	% 0.5	6.3±0.1	8.1±0.3	1.8±0.1	4.7±0.2
	% 1	6.4±0.3	8.3±0.1	1.9±0.2	4.6±0.1
	% 2	6.3±0.1	8.3±0.4	2.0±0.5	4.4±0.3
INU	% 0.5	6.3±0.2	8.0±0.3	1.7±0.3	5.0±0.2
	% 1	6.3±0.3	8.0±0.3	1.7±0.4	4.8±0.1
	% 2	6.2±0.1	8.1±0.2	1.8±0.2	4.4±0.3
GOS	% 0.5	6.2±0.2	8.1±0.4	1.9±0.3	4.4±0.4
	% 1	6.3±0.1	8.3±0.3	2.0±0.2	4.2±0.2
	% 2	6.2±0.1	8.4±0.2	2.2±0.2	4.1±0.1
SOS	% 0.5	6.1±0.3	8.1±0.1	1.9±0.2	4.3±0.2
	% 1	6.3±0.2	8.2±0.3	2.0±0.4	4.2±0.2
	% 2	6.2±0.1	8.5±0.1	2.2±0.2	4.0±0.1
KOS	% 0.5	6.3±0.3	8.1±0.4	1.8±0.6	4.4±0.3
	% 1	6.3±0.2	8.2±0.3	2.0±0.5	4.2±0.1
	% 2	6.3±0.2	8.6±0.2	2.3±0.3	4.1±0.4
LAK	% 0.5	6.3±0.1	8.0±0.3	1.8±0.2	5.1±0.2
	% 1	6.3±0.4	8.1±0.2	1.8±0.5	5.0±0.1
	% 2	6.3±0.2	8.2±0.2	1.9±0.1	4.6±0.3



Şekil 4. 4. Prebiyotik maddelerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun gelişimi (log (kob/ml)) üzerine etkileri

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'den de izlenebileceği gibi, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 kültürünün gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden prebiyotik maddenin % 2 konsantrasyonunda denenen KOS olduğu görülmektedir. Bu prebiyotik maddeyi etki düzeyi açısından SOS ve GOS izlemektedir. KOS, SOS ve GOS, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun gelişimini teşvik etmeleri açısından birbirlerine yakın ve diğer prebiyotiklere göre daha iyi sonuçlar vermiştir. LAK ve INU dışında denenen diğer prebiyotik maddeler % 2 konsantrasyonunda kullanıldıklarında bakteri düzeylerindeki artışlar, % 2 GLU kullanıldığında elde edilen artıştan daha fazla olmuştur.

B. animalis subsp. *lactis* BB-12 suşu ile elde edilen sonuçların, *B. bifidum* ATCC 15969 suşu ile gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlar (Bölüm 4.1.3) ile uyum içerisinde olmadığı görülmektedir. Ortaya çıkan bu uyumsuzluğun tür farklılığından kaynaklandığı sonucuna varılabilir.

Gelişme ortamlarına ilave edilen prebiyotik konsantrasyonu arttıkça, bu ortamlardaki inkübasyon sonrası ölçülen pH değerlerinin azaldığı, dolayısıyla asitlik gelişiminin arttığı gözlenmiştir. Bu durumun, prebiyotik konsantrasyonu artışıyla birlikte artan bakteri gelişimiyle orantılı olduğu görülmektedir.

Bölüm 4.1.1, Bölüm 4.1.2, Bölüm 4.1.3 ve Bölüm 4.1.4’de sözü edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; bu sonuçların prebiyotiklerin mide ve ince bağırsakta sindirilmeden kalın bağırsağa geçen ve burada yerleşen *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. gibi probiyotik bakterilerin gelişimlerini ve aktivitelerini desteklediğini belirten literatür bilgilerini (Ziemer and Gibson, 1998; Can ve Özçelik, 2003; Yıldırım ve ark., 2003) doğrular nitelikte olduğu görülmektedir.

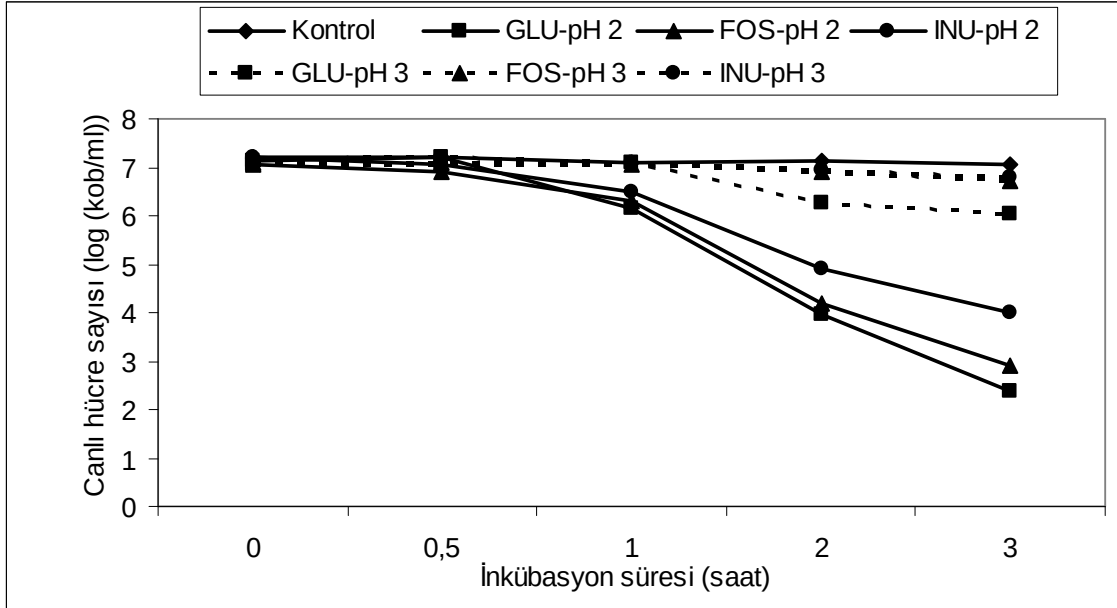
4.2. Probiyotik Bakterilerin Aside Direnç Özellikleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi

Çalışmada kullanılan probiyotik bakterilerin aside direnç özellikleri üzerine prebiyotiklerin etkilerinin araştırıldığı analizler için, her bir probiyotik bakterinin gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen iki farklı prebiyotik madde seçilmiştir. Bu amaçla probiyotik bakterilerin aside direnç özellikleri ile ilgili deneylerde *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. acidophilus* LA-5 için FOS ve INU, *B. bifidum* ATCC 15696 için GOS ve SOS, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise SOS ve KOS denemeye alınmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla ayrıca glukoz (GLU) da analizlere dahil edilmiştir. Probiyotik bakterilerin aside direnç özellikleri pH 1, pH 2 ve pH 3 olan çözelti ortamlarında test edilmiştir. Bu ortamlar; % 0.5 NaCl çözeltisinin 1 M HCl kullanılarak pH değerlerinin ayarlanmasıyla elde edilmiştir. Kontrol amacıyla pH değeri 5.35 olarak belirlenen % 0.5’lik NaCl çözeltisi kullanılmıştır.

4.2.1. *L. acidophilus* ATCC 4356’nın aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi

L. acidophilus ATCC 4356 suşunun aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla *L. acidophilus* ATCC 4356 gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen FOS ve INU prebiyotikleri (Bölüm 4.1.1) test edilmiştir. FOS ve INU’nın ayrı ayrı % 2 oranında ilave edildiği gelişme ortamlarında *L. acidophilus* ATCC 4356’nın gelişimi sağlanmış ve elde edilen kültürlerin asit ortamlara gösterdikleri direnç belirlenmiştir. Kültürlerin bu ortamlardaki canlı bakteri düzeylerinin belli bir inkübasyon süresi boyunca değişimleri Şekil 4.5’de gösterilmiştir.

pH 1 olan ortamda 30 dakika sonunda canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. Bu nedenle FOS ve INU'nun *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun aside direnç özelliğine etkileri pH 2 ve pH 3 ortamlarında elde edilen sonuçlara göre değerlendirilmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.5. *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun aside direnç özelliği üzerine FOS ve INU'nun etkileri

Gelişme ortamında INU bulunduğunda *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun aside direnç özelliğinin daha fazla olduğu görülmektedir. GLU ile karşılaştırıldığında FOS'in de bu bakteri suşunun aside direnç özelliğini arttırdığı gözlemlenmiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun gelişimi üzerine en fazla olumlu etkiyi FOS'un göstermesine karşılık, INU'nun bu bakteri suşunun aside dirençliliğini daha fazla arttırdığı dikkat çekmektedir.

Yapılan istatistiksel analizlerde, *L. acidophilus* ATCC 4356'nın aside direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

Şekil 4.5'den de görülebileceği gibi pH 2 ortamında inkübasyonun birinci saatinden sonra canlı bakteri düzeyinde önemli azalmalar olmuştur. Başlangıçta yaklaşık 7 log (kob/ml) olan bakteri düzeyi, pH 2 ortamındaki 3 saatlik inkübasyonun ardından INU'da 4 log, FOS'da 2.9 log ve GLU'da 2.4 log düzeylerine düşmüştür.

Bütün bunlara karşılık pH 3 ortamındaki canlı bakteri düzeyindeki azalmalar, pH 2 ortamına göre çok daha azdır. INU ve FOS bulunan ortamlarda geliştirilen *L. acidophilus* ATCC 4356 suşu bakteri kültürlerinin pH 3 ortamındaki bakteri düzeylerinde inkübasyon süresince meydana gelen değişimler istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) bulunmasına karşılık, bu ortamlardaki bakteri düzeylerindeki değişimler nerdeyse kontrol ortamına yakın, oldukça düşük düzeyde azalma gösteren bir durum sergilemiştir.

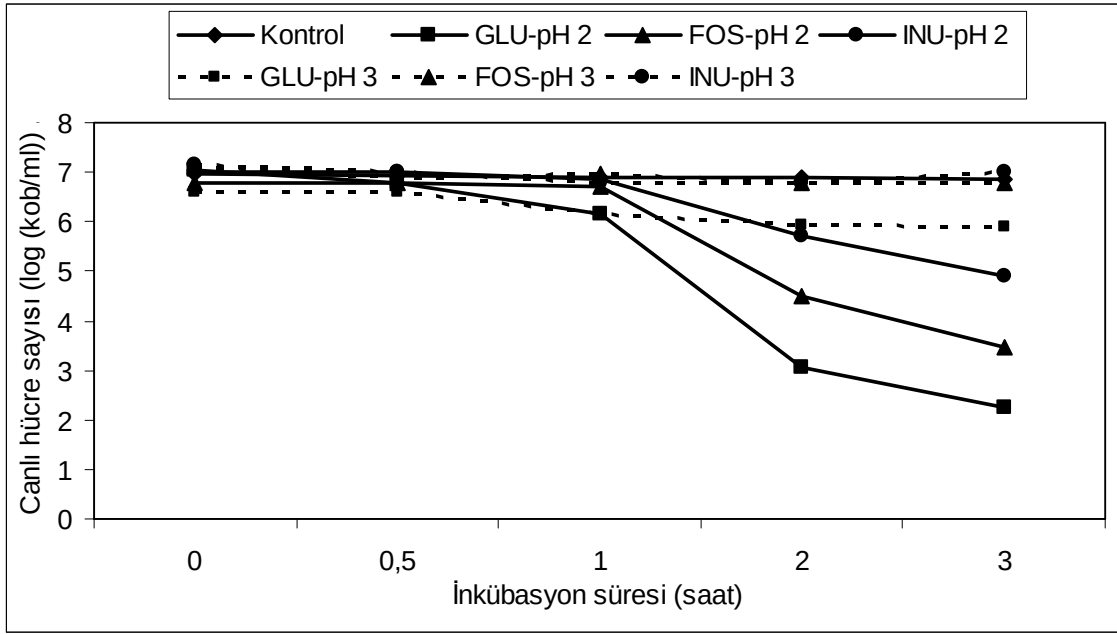
4.2.2. *L. acidophilus* LA-5'in aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi

L. acidophilus LA-5 suşunun aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkileri değerlendirilmesi çalışmalarında, bu suşun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen FOS ve INU'nun (Bölüm 4.1.2) etkileri test edilmiştir. FOS ve INU'nun ayrı ayrı ilave edildiği gelişme ortamlarında *L. acidophilus* LA-5'in gelişimi sağlanmış ve elde edilen kültürlerin asit ortamlara gösterdikleri direnç belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

pH 1 olan ortamda 30 dakika sonunda canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. pH 3 ortamında elde edilen sonuçların birbirine çok yakın olması nedeniyle, FOS ve INU'nun *L. acidophilus* LA-5 suşunun aside direnç özelliği üzerine etkileri özellikle pH 2 ortamlarından elde edilen sonuçlara göre değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Yapılan istatistiksel analizlerde, *L. acidophilus* LA-5'in asite direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Gelişme ortamında INU bulunduğunda *L. acidophilus* LA-5 suşunun aside direnç özelliğinin daha fazla olduğu görülmektedir. pH 2 ortamında canlı bakteri düzeylerinin, özellikle inkübasyonun birinci saatinden sonra, zamanla azaldığı görülmüştür. Inkübasyonun üçüncü saatinin sonunda canlı bakteri düzeyleri INU, FOS ve GLU için sırasıyla 4.9 log, 3.5 log ve 2.3 log şeklinde belirlenmiştir. pH 3 ortamında ise INU ve FOS için birbirine çok yakın değerler elde edilmiş, aralarındaki fark istatistiksel açıdan da önemsiz bulunmuştur.



Şekil 4.6. *L. acidophilus* LA-5 suşunun aside direnç özelliği üzerine FOS ve INU'nun etkileri

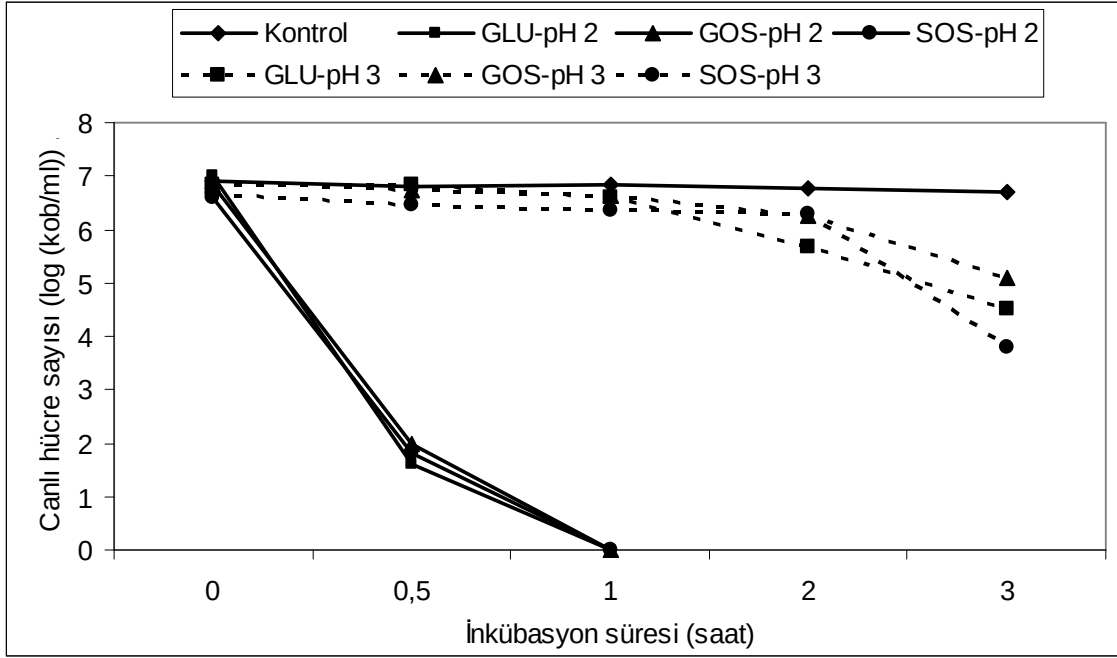
Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; *L. acidophilus* LA-5 suşunun aside direnç özelliğinin, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun aside direnç özelliğinden daha fazla olduğunu söylemek mümkündür.

4.2.3. *B. bifidum* ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi

B. bifidum ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisini incelemek amacıyla bu suşun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen GOS ve SOS (Bölüm 4.1.3) test edilmiştir. *B. bifidum* ATCC 15696 bakteri suşu GOS ve SOS içeren ortamlarda ayrı ayrı geliştirilmiş ve elde edilen kültürlerin pH 1, pH 2 ve pH 3 ortamlarında üç saatlik inkübasyon süresince canlı bakteri düzeyleri belirlenmiştir (Şekil 4.7).

pH 1 olan ortamda 30 dakikalık inkübasyon sonunda canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. pH 2 ortamından elde edilen sonuçlar ise birbirine çok yakındır ve aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir. Ayrıca, pH 2 ortamında inkübasyonun birinci saatinden sonra yapılan sayımlarda canlı bakteri belirlenememiştir. Bu nedenle GOS ve SOS'un *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun

aside direnç özellikleri üzerine etkileri pH 3 ortamından elde edilen sonuçlara göre karşılaştırılmaya çalışılmıştır.



Şekil 4.7. *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun aside direnç özelliği üzerine GOS ve SOS'un etkileri

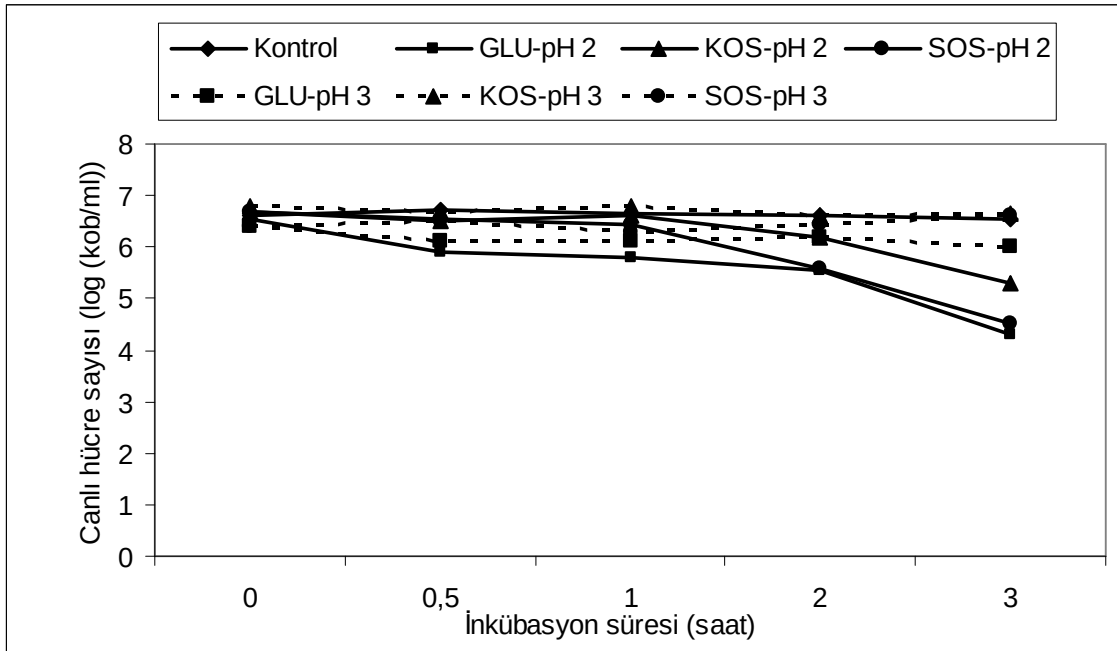
Yapılan istatistiksel analizlerde, pH 3 ortamında *B. bifidum* ATCC 15696'nın aside direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

Gelişme ortamında GOS bulunduğunda *B. bifidum* ATCC 15696'nın bu pH'daki asit direncinin daha fazla olduğu görülmektedir. Başlangıç bakteri düzeyleri yaklaşık 7 log (kob/ml) olan kültürlerin, pH 3 ortamında uygulanan üç saatlik inkübasyonun sonunda belirlenen bakteri düzeyleri gelişme ortamlarında GOS, SOS ve GLU bulunan durumlar için sırasıyla 5.1, 3.8 ve 4.5 log (kob/ml) şeklinde olmuştur.

pH 1 ortamında 30 dakikalık inkübasyon sonunda canlı bakteri sayısı tespit edilememesi, pH 2 ortamında ise inkübasyonun birinci saatinden sonra yapılan sayımlarda hiçbir örnekte canlı bakteri belirlenememesi, *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun aside oldukça duyarlı olduğunu ve denemelerde kullanılan prebiyotiklerin bu suşun pH 1-2 değerlerindeki aside direnç özelliği üzerinde etkili olmadığını ortaya koyması bakımından önemli bulunmuştur.

4.2.4. *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi

B. animalis subsp. *lactis* BB-12'nin aside direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisinin incelendiği denemelerde, bu suşun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen KOS ve SOS (Bölüm 4.1.4) test edilmiştir. *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 bakteri suşu KOS ve SOS içeren ortamlarda ayrı ayrı geliştirilmiş ve elde edilen kültürlerin pH 1, pH 2 ve pH 3 ortamlarında üç saatlik inkübasyon süresince canlı bakteri düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.8. *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun aside direnç özelliği üzerine KOS ve SOS'un etkileri

Çalışmalarda kullanılan diğer probiyotik bakteri suşlarında olduğu gibi, bu bakteri suşunda da pH 1 olan ortamda 30 dakikalık inkübasyon sonunda canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. pH 3 ortamından ise KOS ve SOS ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar birbirine oldukça yakın olup, istatistiksel analizler ile de prebiyotikler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. pH 2 ortamından elde edilen sonuçlardan KOS ve SOS'un *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun aside direnç özelliklerine etkileri daha açık olarak görülmektedir.

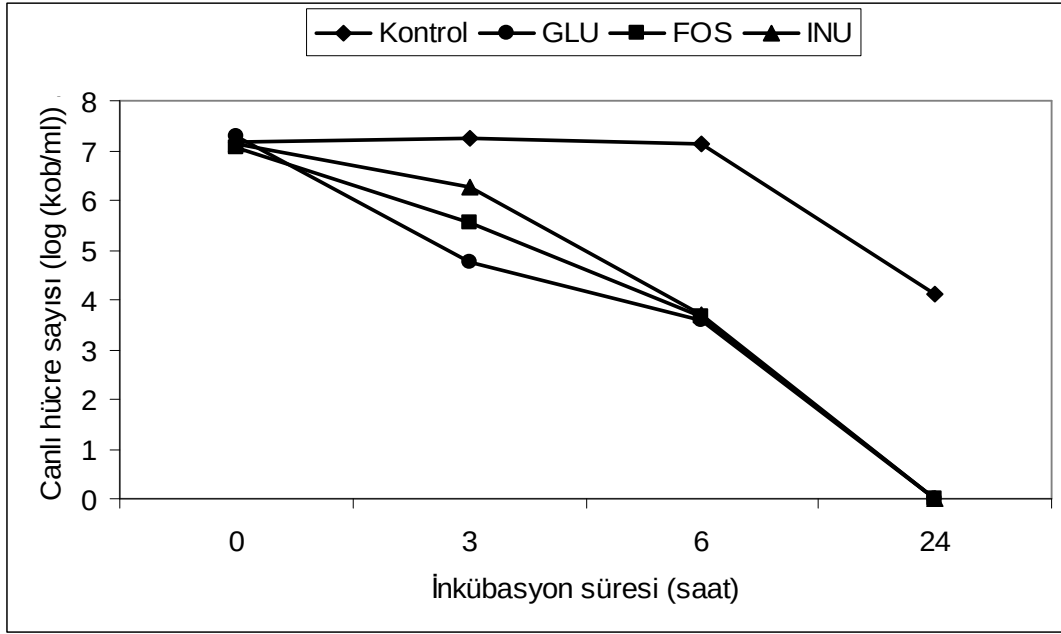
Yapılan istatistiksel analizlerde, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin asite direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Buna göre de, gelişme ortamında KOS bulunduğunda *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin asit direncinin daha fazla olduğunu söylemek mümkündür. Başlangıç bakteri düzeyleri yaklaşık 7 log (kob/ml) olan kültürlerin, pH 2 ortamında uygulanan üç saatlik inkübasyonun sonunda belirlenen bakteri düzeyleri gelişme ortamlarında KOS, SOS ve GLU bulunduğu durumlar için sırasıyla 5.3, 4.5 ve 4.3 log (kob/ml) şeklinde belirlenmiştir.

4.3. Probiyotik Bakterilerin Safraya Direnç Özellikleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi

Çalışmada kullanılan probiyotik bakterilerin safraya direnç özellikleri üzerine prebiyotiklerin etkilerinin araştırıldığı analizlerde, her bir probiyotik bakterinin gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden iki farklı prebiyotik madde test edilmiştir. Bu amaçla *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. acidophilus* LA-5 için FOS ve INU, *B. bifidum* ATCC 15696 için GOS ve SOS, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 için ise SOS ve KOS denemeye alınmıştır. Probiyotik bakterilerin safraya direnç özellikleri % 0.5 safra çözeltisinde test edilmiş ve kontrol amacıyla steril saf su kullanılmıştır.

4.3.1. *L. acidophilus* ATCC 4356'nın safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi

L. acidophilus ATCC 4356 bakteri suşunun safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi, bu suşun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen FOS ve INU (Bölüm 4.1.1) prebiyotikleri üzerinden test edilmiştir. Bu amaçla, bakteri suşunun FOS ve INU bulunan gelişme ortamlarında gelişimi sağlanmış ve geliştirilen kültürlerin % 0.5'lik safra çözeltilerindeki 24 saatlik inkübasyon süresince canlı bakteri düzeylerindeki azalmaları belirlenmiştir (Şekil 4.9).



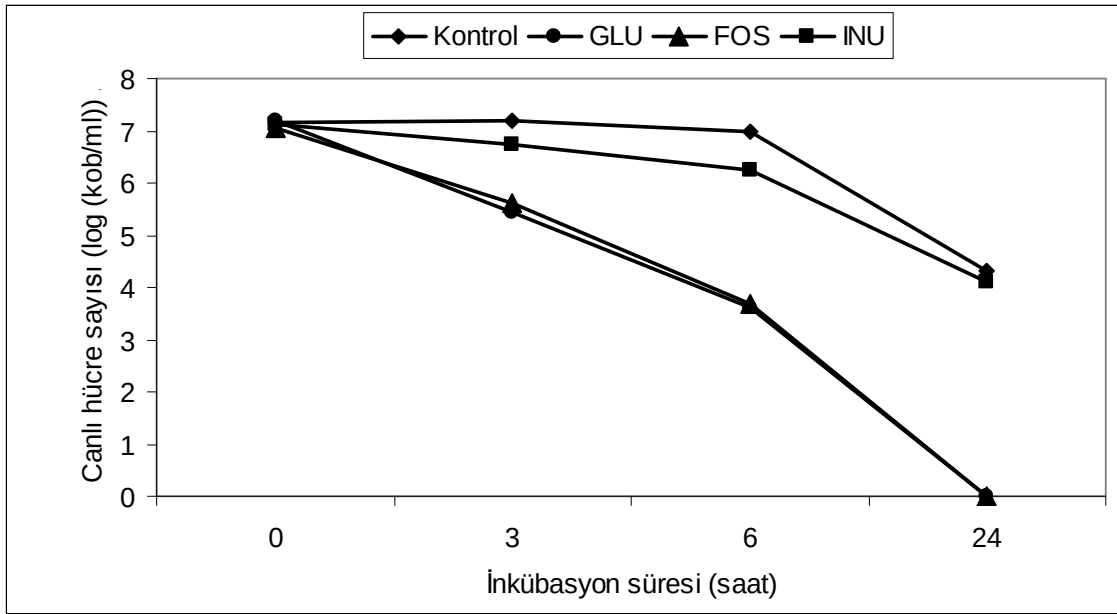
Şekil 4.9. *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun safraya direnç özelliği üzerine INU ve FOS'un etkileri

Örneklerin tümünün başlangıç canlı bakteri düzeyleri yaklaşık 7 log (kob/ml) şeklindedir. İnkübasyonun üçüncü saatinde tespit edilen canlı bakteri sayıları ise INU, FOS ve GLU içeren ortamlarda geliştirilen kültürler için sırasıyla 6.3, 5.5 ve 4.7 log (kob/ml) düzeyindedir. Yapılan istatistiksel analizlerde, *L. acidophilus* ATCC 4356'nın safraya direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuçlara göre de, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun gelişme ortamında INU bulunduğunda safraya direnç özelliğinin daha fazla olduğunu söylemek mümkündür.

İnkübasyonun altıncı saatinde bakteri düzeyleri birbirine çok yakın değerlerde bulunmuş, 24 saatlik inkübasyon sonunda ise prebiyotik eklenerek geliştirilen örneklerin hiç birinde canlı bakteri sayısı belirlenememiştir. Kontrol örneğinde de inkübasyonun altıncı saatinden 24 saatlik inkübasyona geçişte canlı bakteri sayısında büyük bir düşüş gözlenmektedir.

4.3.2. *L. acidophilus* LA-5'in safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi

L. acidophilus LA-5 bakteri suşunun safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisinin araştırıldığı analizlerde, bu suşun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen FOS ve INU prebiyotikleri (Bölüm 4.1.2) test edilmiştir. FOS ve INU içeren ortamlarda ayrı ayrı geliştirilen kültürlerin % 0.5'lik safra çözeltilerindeki 24 saatlik inkübasyon süresince canlı bakteri düzeylerindeki azalmalarını gösteren sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekli 4.10. *L. acidophilus* LA-5 suşunun safraya direnç özelliği üzerine INU ve FOS'un etkileri

L. acidophilus LA-5 suşunun gelişme ortamında INU bulunduğunda safraya direnç özelliğinin daha fazla olduğu ve gelişme ortamına INU eklenerek geliştirilen kültürün % 0.5 safra bulunan ortamda kontrole yakın bir değişim sergilediği gözlemlenmektedir. Yapılan istatistiksel analizlerde, *L. acidophilus* LA-5'in safraya direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

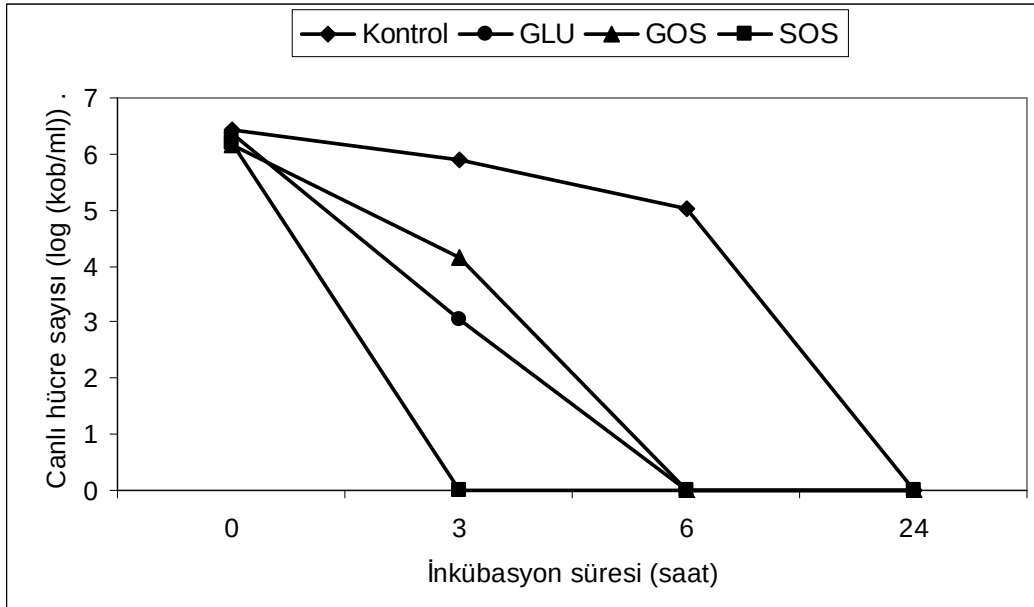
Bu bakteri suşunun FOS ve GLU içeren ortamlarda geliştirilmesi ile elde edilen kültürlerin % 0.5 safra bulunan ortamdaki canlı bakteri düzeylerinde INU'ya göre zamanla daha fazla bir azalma görülmüş ve 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda bu örneklerde canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. INU içeren

ortamda 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda canlı bakteri düzeyi 4.1 log (kob/ml) olarak belirlenmiştir.

Sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; *L. acidophilus* LA-5 suşunun safraya direnç özelliğinin, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun safraya direnç özelliğinden çok daha fazla olduğunu söylemek mümkündür. INU prebiyotiği *L. acidophilus* LA-5 suşunun safraya direnç özelliği üzerinde *L. acidophilus* ATCC 4356 suşuna göre inkübasyon süresi boyunca çok daha belirgin olumlu bir etki yaratmıştır.

4.3.3. *B. bifidum* ATCC 15696'nın safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi

B. bifidum ATCC 15696 bakteri suşunun safraya direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin etkisi, bu bakteri suşunun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen GOS ve SOS (Bölüm 4.1.3) üzerinden test edilmiştir. Bu ortamlarda geliştirilen kültürlerin % 0.5'lik safra çözeltilerindeki 24 saatlik inkübasyon süresince canlı bakteri düzeylerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



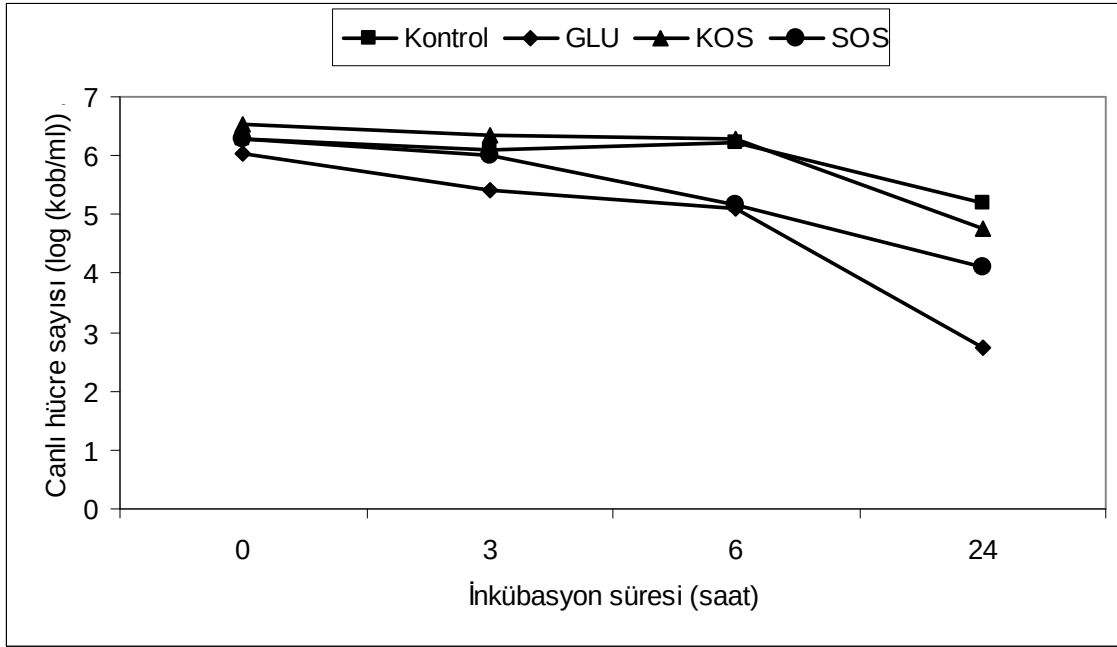
Şekil 4.11. *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun safraya direnç özelliği üzerine GOS ve SOS'un etkileri

B. bifidum ATCC 15696 suşu safraya direnç özelliğini en yüksek düzeyde gelişme ortamında GOS bulunduğunda sergilemiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, *B. bifidum* ATCC 15696'nın safraya direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). SOS içeren ortamda geliştirilen bakteri kültürünün % 0.5'lik safra çözeltilisinde inkübasyonunun üçüncü saatinde, GOS ve GLU içeren ortamlarda ise inkübasyonunun altıncı saatinde canlı bakteri varlığına rastlanmamıştır. GOS içeren ortamda geliştirilen bakteri kültürünün inkübasyonunun üçüncü saatinde % 0.5'lik safra çözeltilisindeki canlı bakteri düzeyi 4.2 log (kob/ml) iken, GLU içeren ortamda geliştirilen kültür için bu değer 3.1 log (kob/ml) şeklinde elde edilmiştir. Kontrol örneği de dahil olmak üzere örneklerin hiç birinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir.

4.3.4. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin safraya direnç özelliğine etkisi

Bu amaçla, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik ettiği belirlenen KOS ve SOS (Bölüm 4.1.4) test edilmiştir. KOS ve SOS içeren ortamlarda ayrı ayrı geliştirilen *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 kültürünün % 0.5'lik safra çözeltilerinde 24 saatlik inkübasyonu süresince canlı bakteri düzeylerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.12'de gösterilmektedir.

KOS bulunan besiyeri ortamında geliştirilen *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun safraya direnç özelliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin safraya direnç özelliği üzerine etkileri açısından prebiyotik maddeler arasındaki farkların ve inkübasyon süresinin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.12. *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun safraya direnç özelliği üzerine KOS ve SOS'un etkileri

KOS, SOS ve GLU içeren ortamlarda gelişimleri sağlanan *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 kültürlerinin safra çözeltilerinde 24 saatlik inkübasyonun ardından canlı bakteri düzeyleri sırasıyla 4.8, 4.1 ve 2.8 log (kob/ml) olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun safraya direncinin *B. bifidum* ATCC 15696 suşundan çok daha fazla düzeyde olduğunu söylemek mümkündür. KOS prebiyotiği *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun safraya direnç özelliğini inkübasyon süresi boyunca önemli ölçüde artırırken, GOS prebiyotiği *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun safraya direnç özelliğini ancak inkübasyonun üçüncü saatine kadar belli düzeylerde artırabilmiştir.

4.4. Probiyotik Bakterilerin Soğuk Depolama Sıcaklıklarına Direnç Özellikleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi

Çalışmada kullanılan probiyotik bakterilerin soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özellikleri üzerine prebiyotiklerin etkilerinin araştırıldığı denemelerde, her bir probiyotik bakterinin gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden iki farklı prebiyotik madde test edilmiştir. Bu amaçla *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. acidophilus* LA-5 için FOS ve INU, *B. bifidum* ATCC 15696 için GOS ve SOS, *B. animalis* subsp.

Lactis BB-12 için ise SOS ve KOS kullanılmıştır. Probiyotik bakterilerin soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özellikleri $4\pm1^{\circ}\text{C}$ (buzdolabı sıcaklığı) ile $-25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de (derin dondurucu sıcaklığı) ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan probiyotik bakteri kültürlerinin, test edilen prebiyotik maddeleri içeren farklı besiyeri ortamlarında $4\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $-25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmalarının 0, 7, 21 ve 28. günlerinde canlı bakteri düzeyleri belirlenmiştir.

Çalışılan probiyotik bakteri suşlarının soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özellikleri ve bu özelliklere prebiyotiklerin etkileri Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8'de her bir bakteri suşu için ayrı ayrı gösterilmiştir.

L. acidophilus ATCC 4356'nın soğuk depolama sıcaklıklarında canlı hücre sayıları genelde azalma eğiliminde olmuş ancak bu azalma hiçbir örnekte 1 log düzeyine bile ulaşamamıştır (Çizelge 4.5). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda da *L. acidophilus* ATCC 4356'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin ve depolama sürelerinin etkileri önemsiz bulunmuştur. Bu sonuçlara göre de test edilen prebiyotiklerin bu bakteri suşunun soğuk depolama direnç özellikleri üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı sonucuna varılabilir.

L. acidophilus LA-5'in soğuk depolama sıcaklıklarında canlı hücre sayıları genelde azalma eğiliminde olmuştur (Çizelge 4.6). Bu suşun buzdolabı sıcaklığında depolama anındaki canlı hücre sayılarındaki azalma kontrol ve GLU örnekleri de dahil olmak üzere ancak depolamanın 28. gününde yaklaşık 1 log düzeyinde olmuştur. Bu suşun derin dondurucu sıcaklığında depolamada canlı hücre sayılarındaki azalma kontrol ve GLU örneklerinde depolamanın 14. gününden itibaren yaklaşık 1 log düzeyinde iken FOS ve INU örneklerinde bu düzeydeki azalma depolamanın ancak 21. gününden sonra görülmüştür. Depolamanın 28. gününde ise örneklerin tümünde de canlı bakteri sayıları, aralarında önemli fark gözlenmeyen düzeylerde kalmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *L. acidophilus* LA-5'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine depolama sürelerinin etkilerinin önemli olduğu ($p<0.05$), ancak prebiyotiklerin etkilerinin önemsiz olduğu bulunmuştur. Bütün bu sonuçlar, FOS ve INU'nun bu bakteri suşunun buzdolabı sıcaklığına direnci üzerinde olumlu bir etkisi olmadığına, derin dondurucu sıcaklığına direnci üzerinde ise önemsenecek düzeyde olumlu bir etki yaratmadığına işaret etmektedir.

Çizelge 4.5. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* ATCC 4356'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi

Prebiyotik	4 °C'de depolama (log kob/ml,gün)					-25 °C'de depolama (log kob/ml,gün)				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Kontrol	7.5±0.1	7.5±0.1	7.2±0.2	7.3±0.3	7.4±0.1	7.5±0.2	7.4±0.2	7.3±0.1	7.3±0.3	7.3±0.1
GLU	7.4±0.1	7.1±0.2	7.4±0.1	7.1±0.2	7.2±0.2	7.4±0.3	7.2±0.1	7.3±0.1	7.2±0.2	7.3±0.1
FOS	7.4±0.2	7.4±0.1	7.4±0.1	7.3±0.1	7.3±0.3	7.4±0.1	7.4±0.3	7.3±0.2	7.4±0.1	7.4±0.2
INU	7.3±0.1	7.2±0.1	7.3±0.2	7.3±0.1	7.2±0.2	7.3±0.2	7.3±0.1	7.1±0.1	7.3±0.2	7.3±0.3

Çizelge 4.6. Prebiyotiklerin *L. acidophilus* LA-5'in soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi

Prebiyotik	4 °C'de depolama (log kob/ml,gün)					-25 °C'de depolama (log kob/ml,gün)				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Kontrol	8.0±0.2	7.7±0.3	7.6±0.1	7.2±0.3	7.0±0.1	8.0±0.2	7.1±0.1	6.9±0.1	6.3±0.2	6.2±0.1
GLU	7.8±0.3	7.6±0.1	7.1±0.3	7.1±0.2	6.8±0.1	7.8±0.2	7.4±0.2	7.0±0.1	6.9±0.3	7.0±0.2
FOS	7.8±0.1	7.6±0.2	7.1±0.2	7.1±0.1	6.7±0.1	7.8±0.1	7.8±0.2	7.4±0.2	6.7±0.1	6.5±0.1
INU	7.8±0.2	7.7±0.2	7.3±0.1	7.1±0.1	7.0±0.2	7.8±0.1	7.3±0.3	7.1±0.1	6.7±0.2	6.5±0.1

Çizelge 4.7. Prebiyotiklerin *B. bifidum* ATCC 15696'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi

Prebiyotik	4 °C'de depolama (log kob/ml,gün)					-25 °C'de depolama (log kob/ml,gün)				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Kontrol	6.7±0.3	5.4±0.2	4.3±0.1	3.7±0.4	2.9±0.3	6.7±0.1	6.5±0.3	6.6±0.4	6.5±0.2	6.5±0.1
GLU	6.5±0.2	5.8±0.1	4.9±0.3	4.6±0.2	2.7±0.2	6.5±0.3	6.5±0.1	6.7±0.1	6.5±0.2	6.6±0.2
GOS	6.6±0.4	5.7±0.1	4.4±0.1	3.6±0.1	2.7±0.1	6.6±0.3	6.3±0.2	6.6±0.1	6.6±0.1	6.7±0.2
SOS	6.7±0.1	5.5±0.3	4.7±0.2	4.2±0.3	2.5±0.2	6.7±0.2	6.5±0.1	6.6±0.3	6.6±0.2	6.8±0.1

Çizelge 4.8. Prebiyotiklerin *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliğine etkisi

Prebiyotik	4 °C'de depolama (log kob/ml,gün)					-25 °C'de depolama (log kob/ml,gün)				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
Kontrol	7.8±0.1	7.9±0.2	8.0±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.8±0.1	8.0±0.1	7.8±0.2	7.7±0.1	7.6±0.2
GLU	7.9±0.1	7.8±0.3	7.9±0.1	7.9±0.2	7.8±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.8±0.1	7.6±0.2	7.6±0.1
KOS	7.9±0.2	8.0±0.1	7.8±0.2	7.8±0.2	7.8±0.1	7.9±0.1	8.0±0.2	7.8±0.1	7.7±0.1	7.6±0.2
SOS	7.8±0.2	8.0±0.1	8.0±0.1	7.9±0.1	7.8±0.2	7.8±0.2	7.9±0.2	8.0±0.1	7.6±0.1	7.6±0.3

B. bifidum ATCC 15696 suşu, buzdolabı sıcaklığında depolamaya direnç özelliği ile derin dondurucu sıcaklığında depolamaya direnç özelliği hususunda farklı bir davranış sergilemiştir (Çizelge 4.7). Bu suşun buzdolabı sıcaklığında depolama anındaki canlı hücre sayılarındaki azalma kontrol ve GLU örnekleri de dahil olmak üzere depolamanın 7. gününden itibaren başlamış ve depolamanın 28. gününde örneklerin tümünde de canlı bakteri sayıları aralarında önemli fark gözlenmeyen 2 log dolayında oldukça düşük düzeylere düşmüştür. Bu sonuçlar *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun buzdolabı sıcaklığında depolamaya duyarlı olduğunu, denemeye alınan prebiyotiklerin ise bu suşun buzdolabı sıcaklığına direnci üzerinde olumlu bir etkisi olmadığına işaret etmektedir. Buna karşılık, bu suşun derin dondurucu sıcaklığında depolamada canlı hücre sayıları depolama boyunca başlangıç sayılarına çok benzer değerlerde değişmeden kalmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *B. bifidum* ATCC 15696'nın soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine depolama sürelerinin etkileri önemli bulunurken ($p<0.05$), prebiyotiklerin etkisi önemsiz bulunmuştur. Bu sonuçlar, *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun derin dondurucu sıcaklığında depolamaya dirençli olduğunu, denemeye alınan prebiyotiklerin ise bu suşun derin dondurucu sıcaklığına direnci üzerinde olumlu bir etkisi olmadığına işaret etmektedir.

B. animalis subsp. *lactis* BB-12'nin soğuk depolama sıcaklıklarında canlı hücre sayıları depolama boyunca başlangıç sayılarına çok benzer değerlerde değişmeden kalmıştır (Çizelge 4.8). Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin suşunun soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özelliği üzerine prebiyotiklerin ve depolama süresinin etkilerinin önemsiz olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin suşunun soğuk depolama sıcaklıklarına dirençli olduğunu, denemeye alınan prebiyotiklerin ise bu suşun soğuk depolama sıcaklıklarına direnci üzerinde olumlu bir etkisi olmadığına işaret etmektedir.

4.5. Probiyotik Bakterilerin β -galaktosidaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Prebiyotiklerin Etkisi

L. acidophilus LA-5, *L. acidophilus* 4356, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ve *B. bifidum* ATCC 15696 bakteri suşlarının β -galaktosidaz aktiviteleri üzerine

prebiyotik maddelerin etkisini belirlemek amacıyla substrat olarak ONPG kullanılmış ve enzimin bu substratı parçalaması sonucu ortamda oluşan ONP miktarı belirlenerek enzim aktiviteleri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, öncelikle ONP'nin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve 420 nm'de absorbans değerleri belirlenmiştir. ONP konsantrasyonlarına karşılık okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek "ONP standart eğrisi" elde edilmiştir (EK 2). Bu standart eğriden yararlanılarak test edilen her bir bakteri suşunun farklı gelişme ortamlarındaki β -galaktosidaz aktiviteleri, ortamda oluşan ONP miktarları cinsinden belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da topluca gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Çalışmada kullanılan probiyotik bakteri suşlarının β -galaktosidaz aktiviteleri üzerine prebiyotiklerin etkisi

Probiyotik bakteri	Gelişme ortamı	β -galaktosidaz aktivitesi (ONP μ mol/ml)
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Kontrol	0.2 $\pm$ 0.1
	GLU	0.5 $\pm$ 0.2
	FOS	0.6 $\pm$ 0.2
	INU	1.0 $\pm$ 0.3
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Kontrol	0.2 $\pm$ 0.1
	GLU	0.4 $\pm$ 0.1
	FOS	0.5 $\pm$ 0.3
	INU	0.7 $\pm$ 0.2
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Kontrol	0.2 $\pm$ 0.2
	GLU	1.0 $\pm$ 0.4
	KOS	2.3 $\pm$ 0.6
	GOS	6.5 $\pm$ 1.7
<i>B. bifidum</i> ATCC 15696	Kontrol	0.4 $\pm$ 0.1
	GLU	5.5 $\pm$ 0.9
	GOS	3.8 $\pm$ 1.3
	SOS	2.2 $\pm$ 0.7

Çizelge 4.9'dan da izlenebileceği gibi *L. acidophilus* suşlarının β -galaktosidaz aktivitesinin gelişme ortamında INU bulunduğunda daha yüksek olduğu görülmektedir. *B. animalis* subsp *lactis* BB-12 ve *B. bifidum* ATCC 15696 bakteri suşları için ise gelişme ortamlarında prebiyotik madde olarak GOS olduğunda enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, çalışmada kullanılan prebiyotik bakteri suşlarının β -galaktosidaz aktiviteleri üzerine etkileri açısından prebiyotikler arasındaki farklar önemli bulunmuştur ($p<0.05$). GLU yalnızca *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun enzim aktivitesinde denenen iki prebiyotiğe göre daha fazla bir artış sağlamıştır.

4.6. Mikroenkapsülasyon İşlemleri İçin Probiyotik Bakteri Seçimi ve Seçilen Bakteriler İçin Uygun Prebiyotik Maddenin Belirlenmesi

Mikroenkapsülasyon işlemlerinde; çalışmanın bu aşamasına kadar denemelere alınmış olan *Lactobacillus acidophilus* suşlarından bir tanesi ve *Bifidobacterium* türlerinden bir tanesi olmak üzere toplam iki farklı probiyotik bakteri kullanılmıştır. Mikroenkapsülasyon işlemlerinde kullanılacak olan probiyotik bakterilerin seçimi, test edilen probiyotik bakterilerin aside, safraya ve soğuk depolama sıcaklıklarına dirençlilik özellikleri ile β -galaktosidaz aktivite değerleri değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. Ancak, asit ve safraya direnç özelliklerinin probiyotiklerin seçiminde önemli birer kriter olması nedeniyle, bakterilerin seçiminde temelde aside ve safraya direnç özellikleri dikkate alınmıştır.

Bu çalışmada test edilen probiyotik bakteriler *L. acidophilus* LA-5, *L. acidophilus* ATCC 4356, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ve *B. bifidum* ATCC 15696 şeklindedir. Gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilen sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, özellikle asit ve safra dirençlilik özellikleri dikkate alınarak, mikroenkapsülasyon işlemlerinde ve dondurma üretiminde kullanılmak üzere Chr. Hansen's firmasından sağlanan *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 bakteri suşlarının seçilmesine karar verilmiştir. Bu bakterilerin asit ve safraya dirençlilik özellikleri, test edilen diğer iki probiyotik bakteriden daha yüksek olarak belirlenmiştir.

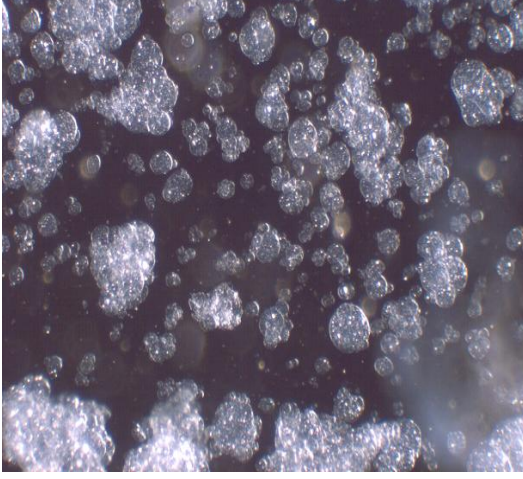
Söz konusu bu bakteriler ile birlikte kullanılacak olan prebiyotik maddenin belirlenmesinde ise; bu bakterilerin gelişimini yüksek düzeyde teşvik eden ve aynı

zamanda da asit, safra ve soğuk depolama sıcaklıklarına direnç ile β -galaktosidaz aktivitelerini daha fazla artıran prebiyotik maddenin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Daha önceki bulguların değerlendirilmesi sonucunda; *L. acidophilus* LA-5 suşu için INU, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşu için ise KOS'un prebiyotik madde olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

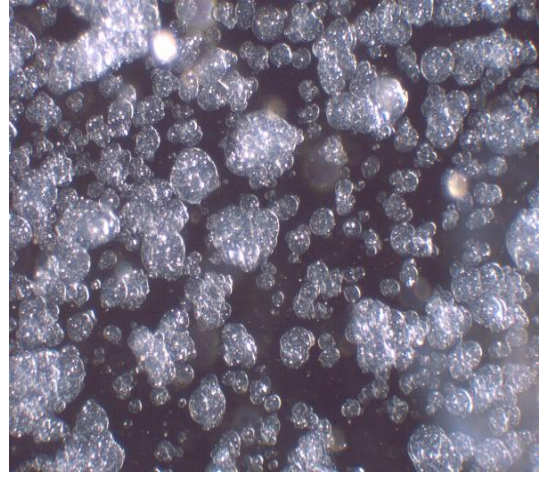
4.7. Aljinat Mikrokapsüllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Aljinat mikrokapsüllerin hazırlanması “emülsiyon yöntemi” kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.21). Hazırlanan aljinat mikrokapsüllerden alınan bir miktar örnek temiz bir lam üzerine aktararak mikroskobik inceleme gerçekleştirilmiştir. Aljinat mikrokapsüllerin basit ışık mikroskobunda 4x objektifi kullanılarak elde edilen farklı görüş sahalarındaki görüntüleri Şekil 4.13'de topluca verilmiştir. Mikroskobik incelemede elde edilen aljinat mikrokapsüllerin topaklaşma sergilediği gözlemlenmiştir.

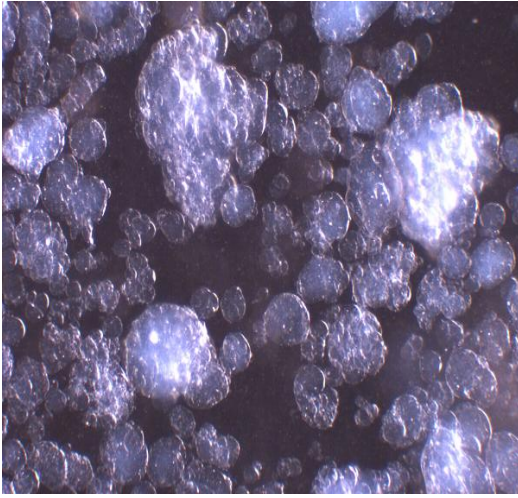
Bundan sonraki aşamada aljinat mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla aljinat konsantrasyonu, CaCl_2 konsantrasyonu ve karıştırma hızı değiştirilerek, bu parametrelerin mikrokapsül boyutuna etkisi ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır. Elde edilen kapsüller, basit ışık mikroskobunda incelenmiş ve boyutları belirlenmiştir.



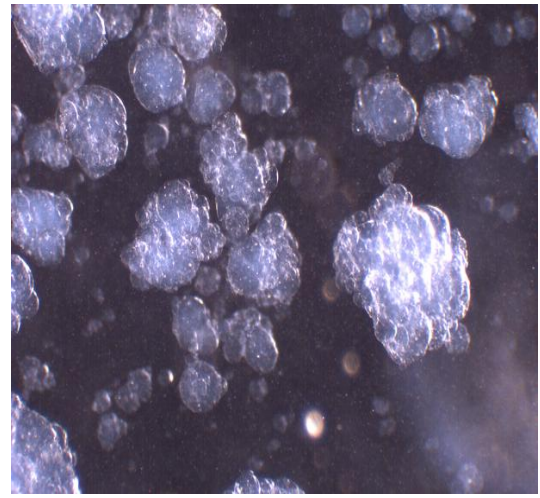
a



b



c

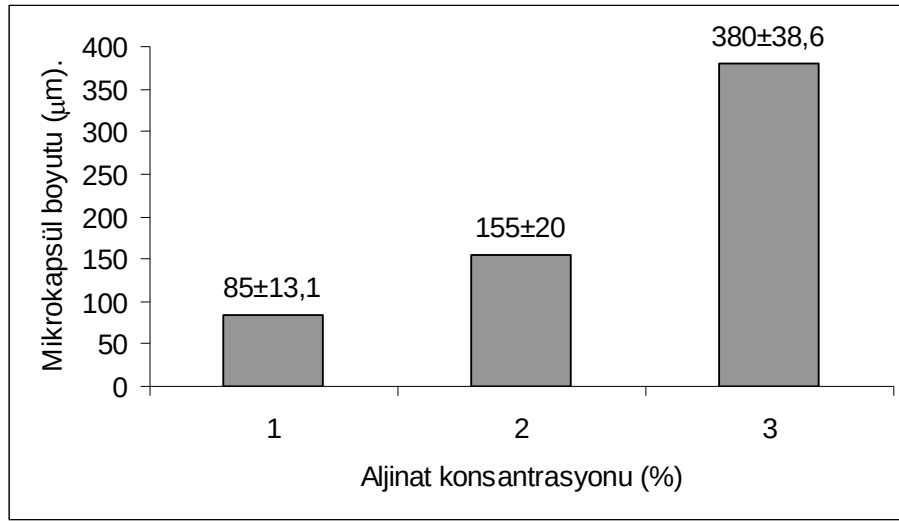


d

Şekil 4.13. Aljinat mikrokapsüllerinin basit ışık mikroskopunda 4x objektifi kullanılarak elde edilen farklı görüş sahaslarındaki (a,b,c,d) görüntüleri

4.7.1. Aljinat konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi

Aljinat konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisini değerlendirmek amacıyla aljinat konsantrasyonu % 0.5 ile % 4 arasında değiştirilerek mikrokapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir, aljinat konsantrasyonu dışındaki diğer tüm parametreler (% 2 CaCl_2 , 50 ml bitkisel yağ, % 0.5 Tween 80, 2000 rpm karıştırma hızı ve 2 saat karıştırma işlemi) sabit tutulmuştur. Aljinat konsantrasyonu arttıkça mikrokapsül boyutlarının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



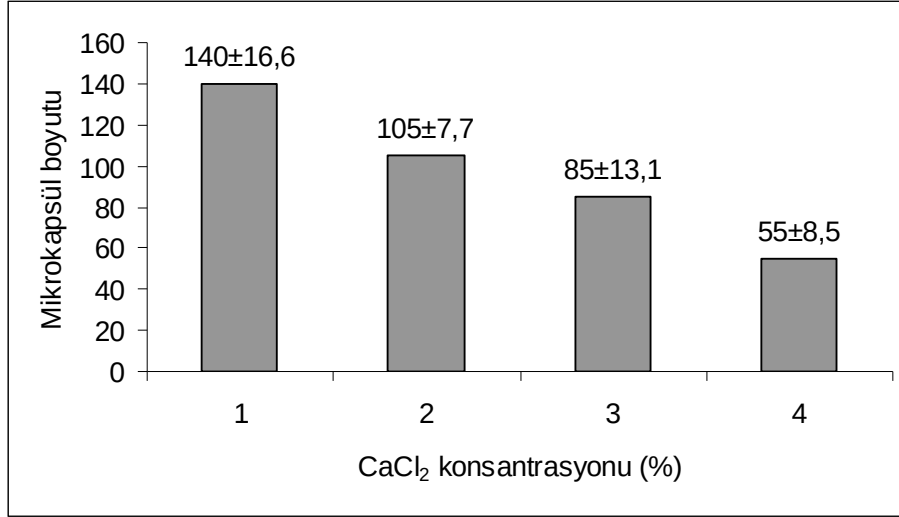
Şekil 4.14. Aljinat konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi

Aljinat konsantrasyonunun artmasıyla, polimer jelinin viskozitesi artmakta ve buna bağlı olarak jelin damlalar halinde ortama düşmesi zorlaştığı için daha büyük kapsüller oluşmaktadır. Çalışılan en düşük aljinat konsantrasyonunda (% 0.5) ise mikrokapsül oluşumu sağlanamamıştır. Bu konsantrasyonda aljinat kullanıldığında, şekilsiz ve stabil olmayan polimer agregatları gözlemlenmiştir. Aljinatın çalışılan diğer konsantrasyonlarında ise mikrokapsül oluşumu sağlanırken, oluşan mikrokapsüllerin bir araya gelerek topaklanma eğilimi gösterdiği ortaya çıkmıştır.

4.7.2. CaCl_2 konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi

CaCl_2 konsantrasyonunun aljinat mikrokapsüllerinin boyutuna etkisinin belirlemek amacıyla, CaCl_2 konsantrasyonu % 0.5 ile % 4 arasında değiştirilerek mikrokapsülasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Diğer tüm parametreler (% 1

aljinat, 50 ml bitkisel yağ, % 0.5 Tween 80, 2000 rpm karıştırma hızı, 2 saat karıştırma işlemi) sabit tutulmuştur. CaCl_2 konsantrasyonu arttıkça, mikrokapsüllerin boyutlarının küçüldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).

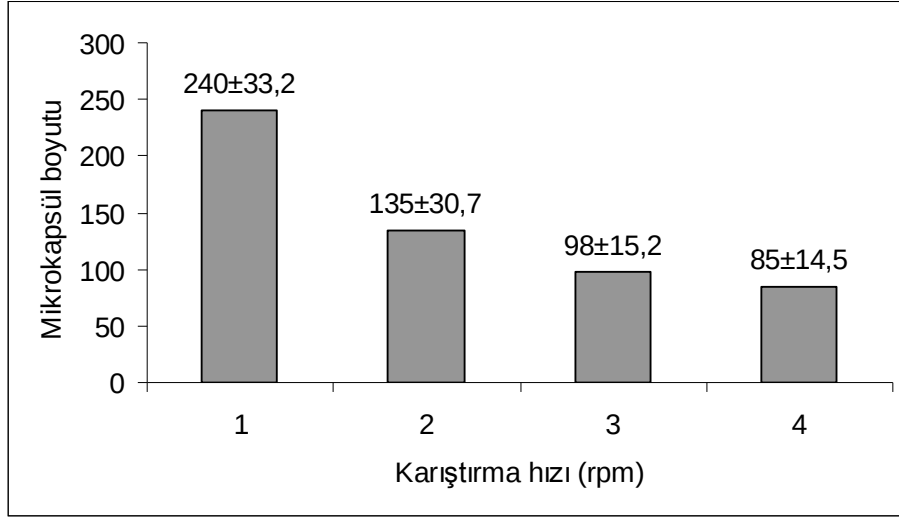


Şekil 4.15. CaCl_2 konsantrasyonunun aljinat mikrokapsül boyutuna etkisi

Yüksek CaCl_2 konsantrasyonlarında mikrokapsüllerin daha küçük boyutta olmalarına rağmen, her bir mikrokapsülün birbirine oldukça sıkı bağlı aljinat polimerinden oluşması nedeniyle bağırsak ortamında beklenen polimer parçalanmasının gerçekleşemeyeceği ve kapsül içerisindeki bakteri hücrelerinin ortama salınamayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda kapsül boyutunun artmasıyla birlikte mikroenkapsüle edilen hücre sayısının da arttığı da belirtilmektedir (Sheu et al., 1993; Lee and Heo, 2000; Picot and Lacroix, 2004; Chandramouli et al., 2004). Ürüne uygulanacak olan mikrokapsüllerin, ürünün duyusal ve yapısal kalitesini olumsuz etkilemeyecek ve tüketicide bir memnuniyetsizlik yaratmayacak ölçüde büyük olması yeterli olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, CaCl_2 derişimi % 2 konsantrasyonunda kullanıldığında elde edilen kapsül boyutlarının (85 μm) kabul edilebilir değerler arasında olduğu düşünülmektedir.

4.7.3. Karıştırma hızının mikrokapsül boyutuna etkisi

Karıştırma hızının aljinat mikrokapsüllerinin boyutuna etkisini belirlemek amacıyla, reaktör ortamının karıştırma hızı 500-2000 rpm arasında değiştirilmiştir. Karıştırma hızı dışındaki tüm parametreler (% 1 aljinat, % 2 CaCl₂, 50 ml bitkisel yağ, % 0.5 Tween 80 ve 2 saat karıştırma işlemi) sabit tutulmuştur. Karıştırma hızı arttıkça, mikrokapsül boyutunun azaldığı görülmüştür (Şekil 4.16).

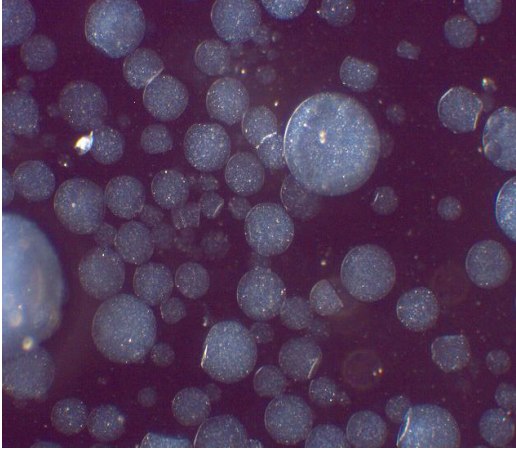


Şekil 4.16. Karıştırma hızının aljinat mikrokapsül boyutuna etkisi

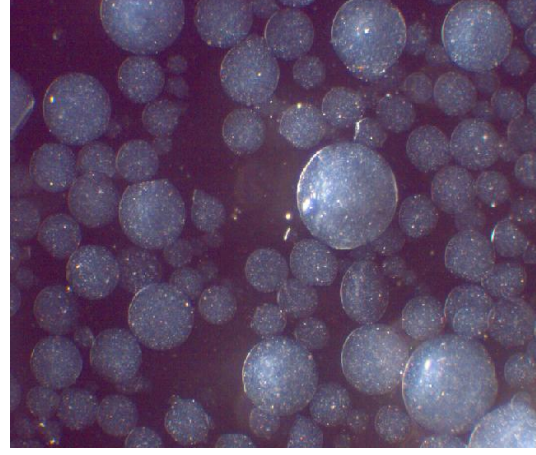
Karıştırma hızının artmasıyla birlikte, ortama aktarılan enerji transferi artmakta ve polimer jeli daha küçük damlacıklar halinde ortama dağılmakta ve mikrokapsüllerin boyutları azalmaktadır (Denkbaş ve Odabaşı, 2000). Karıştırma hızı düştükçe aljinat mikrokapsüllerinin daha fazla agregat oluşturma eğiliminde olduğu da gözlemlenmiştir.

4.8. Pektin Mikrokapsüllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

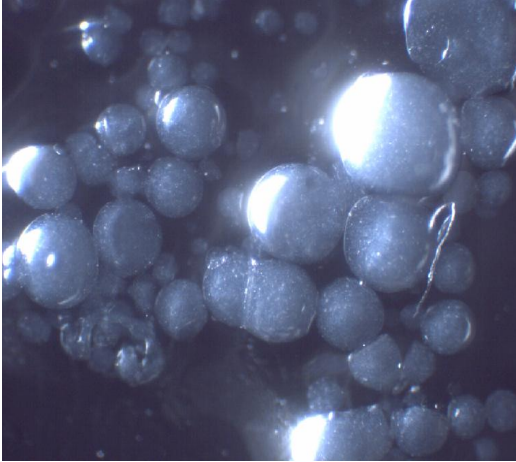
Pektin mikrokapsüllerinin hazırlanmasında, aljinat mikrokapsüllerinin elde edilmesinde olduğu gibi, “emülsiyon yöntemi” kullanılmıştır (Bölüm 3.2.22). Hazırlanan pektin mikrokapsüllerden alınan bir miktar örnek temiz bir lam üzerine aktarılarak mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir. Pektin mikrokapsüllerin basit ışık mikroskopunda 4x objektifi kullanılarak elde edilen farklı görüş sahalarındaki görüntüleri Şekil 4.17’de topluca verilmiştir.



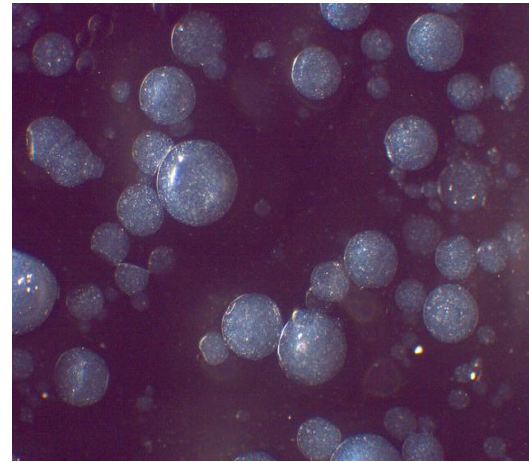
a



b



c



d

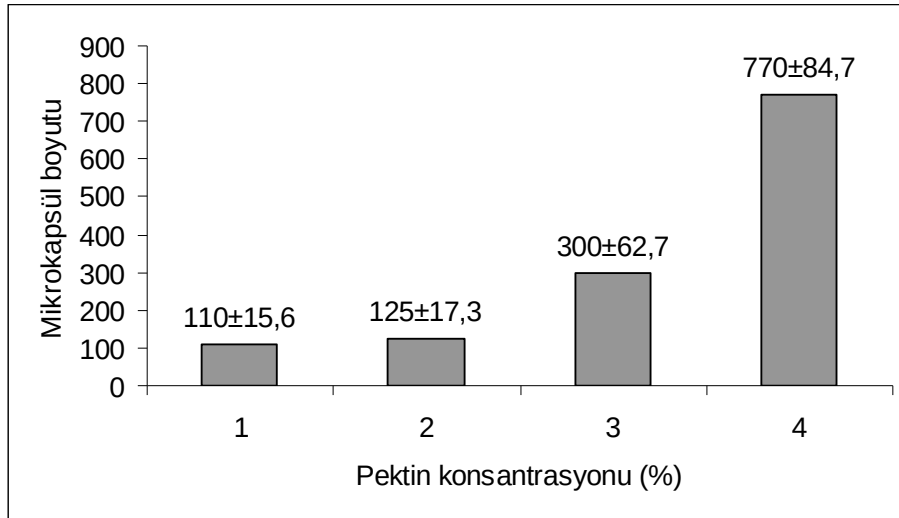
Şekil 4.17. Pektin mikrokapsüllerinin basit ışık mikroskopunda 4x objektifi kullanılarak elde edilen farklı görüş sahalarındaki (a,b,c,d) görüntüleri

Mikroskopik incelemede oldukça düzgün pektin mikrokapsüllerinin elde edildiği gözlemlenmektedir (Şekil 4.17).

Bundan sonraki aşamada pektin mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla pektin jeli konsantrasyonu, CaCl_2 konsantrasyonu ve karıştırma hızı değiştirilerek, bu parametrelerin mikrokapsül boyutuna etkisi ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır. Elde edilen kapsüller, basit ışık mikroskopunda incelenmiş ve boyutları belirlenmiştir.

4.8.1. Pektin konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi

Pektin konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi, mikrokapsülasyon işlemlerinde pektin konsantrasyonu % 0.5 ile % 4 arasında değiştirilerek değerlendirilmiştir. Pektin konsantrasyonu dışındaki diğer tüm parametreler (% 6 CaCl_2 , 50 ml bitkisel yağ, % 0.5 Tween 80, 2000 rpm karıştırma hızı ve 2 saat karıştırma işlemi) sabit tutulmuştur. Pektin konsantrasyonu arttıkça mikrokapsül boyutlarının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

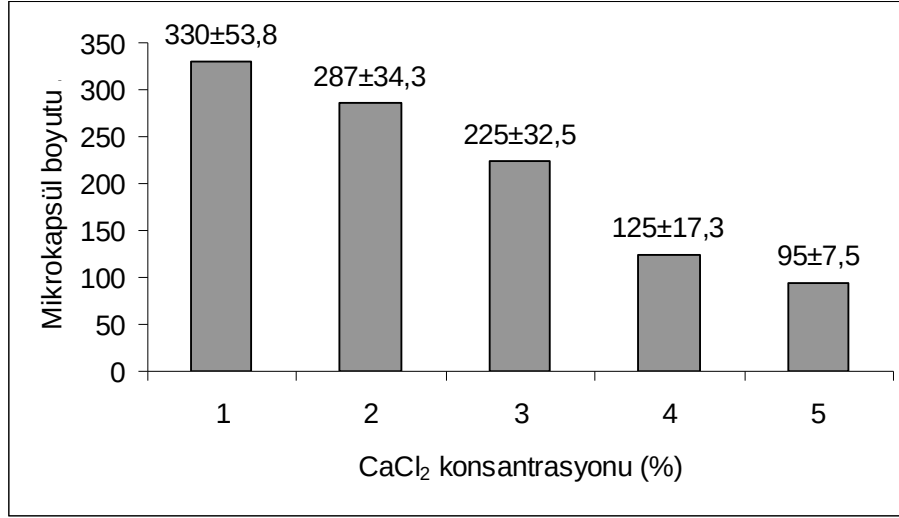


Şekil 4.18. Pektin konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi

Çalışılan en düşük pektin konsantrasyonunda (% 0.5) ise mikrokapsül oluşumu sağlanamamıştır. Bu konsantrasyonda pektin kullanıldığında, stabil olmayan polimer parçacıkları gözlemlenmiştir.

4.8.2. CaCl₂ konsantrasyonunun mikrokapsül boyutuna etkisi

CaCl₂ konsantrasyonunun pektin mikrokapsüllerinin boyutuna etkisini belirlemek amacıyla, CaCl₂ konsantrasyonu % 0.5 ile % 8 arasında değiştirilmiştir. Diğer tüm parametreler (% 2 pektin, 50 ml bitkisel yağ, % 0.5 Tween 80, 2000 rpm karıştırma hızı, 2 saat karıştırma işlemi) sabit tutulmuştur. CaCl₂ konsantrasyonu arttıkça, mikrokapsüllerin boyutlarının küçüldüğü görülmüştür (Şekil 4.19).

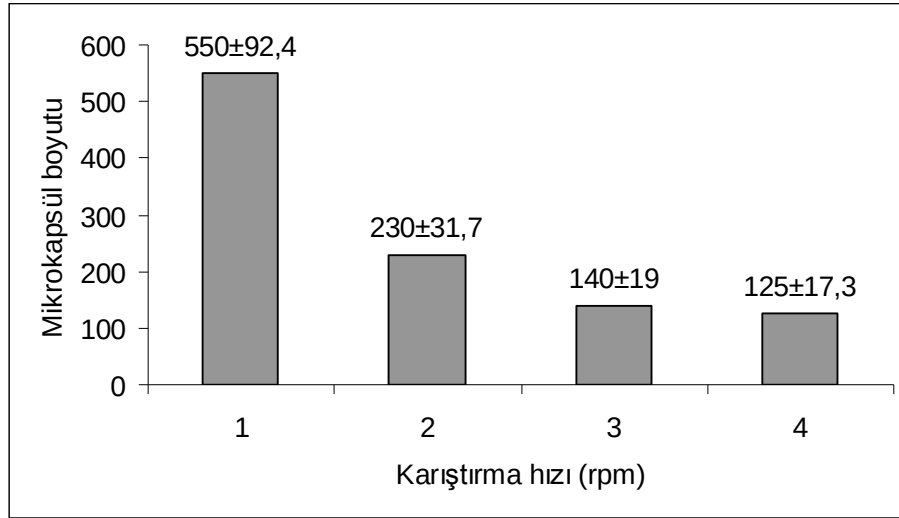


Şekil 4.19. CaCl₂ konsantrasyonunun pektin mikrokapsül boyutuna etkisi

CaCl₂ % 0.5 konsantrasyonunda kullanıldığında stabil olmayan kapsüllerin oluştuğu görülmüştür. Bu nedenle bu konsantrasyon değerlendirilmeye dahil edilmemiştir.

4.8.3. Karıştırma hızının mikrokapsül boyutuna etkisi

Karıştırma hızının pektin mikrokapsüllerinin boyutuna etkisini belirlemek amacıyla, reaktör ortamının karıştırma hızı 500-2000 rpm arasında değiştirilmiştir. Karıştırma hızı dışındaki tüm parametreler (% 2 pektin, %2 CaCl₂, 50 ml bitkisel yağ, % 0.5 Tween 80 ve 2 saat karıştırma işlemi) sabit tutulmuştur.



Şekil 4.20. Karıştırma hızının pektin mikrokapsül boyutuna etkisi

Karıştırma hızı düşürüldükçe pektin mikrokapsül boyutlarının arttığı görülmüştür (Şekil 4.20).

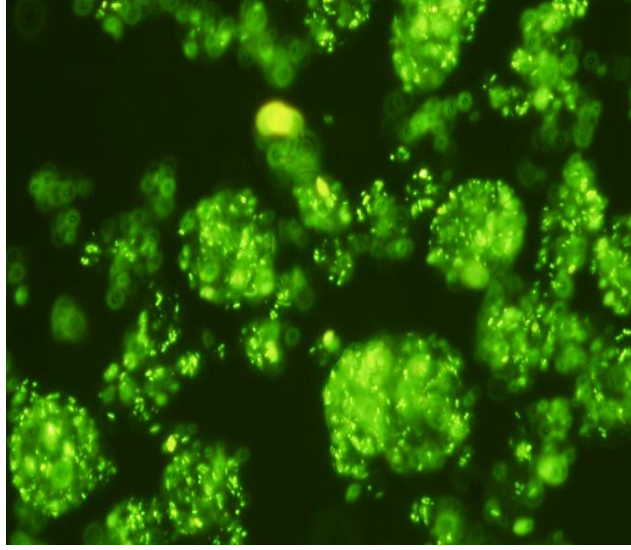
4.9. Probiyotik Bakterilerin Aljinat Mikrokapsüller İçerisine Mikroenkapsülasyonu

Probiyotik bakterilerin aljinat mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyon işlemleri, Bölüm 4.7’de sözü edilen aljinat mikrokapsüllerin karakterizasyonu sonucu elde edilen optimum parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aljinat mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, optimum mikroenkapsülasyon koşulları olarak % 1 aljinat, % 2 CaCl_2 ve 2000 rpm karıştırma hızının kullanılmasına karar verilmiştir.

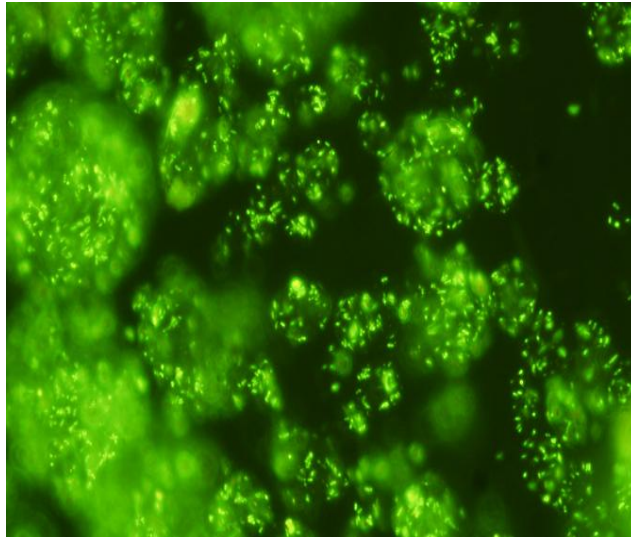
Mikroenkapsülasyon işlemlerinde kullanılan probiyotik bakteriler ise *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 bakteri suşlarıdır. Bu bakteri suşları, gerçekleştirilen asit ve safraya direnç analizlerinde diğer bakteri suşlarından daha iyi sonuçlar vermeleri nedeniyle tercih edilmişlerdir.

Probiyotik bakterilerin aljinat mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyon işlemleri Bölüm 3.2.23’de belirtildiği şekilde ve yukarıda sözü edilen optimum mikroenkapsülasyon koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen mikrokapsüller içerisindeki bakteri hücreleri, mikrokapsüllerin SYTO®9 boyası ile boyanmalarının ardından floresan mikroskobunda yeşil ışıma şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).



a



b

Şekil 4.21. Aljinat mikrokapsüllerin floresans mikroskobunda 20x objektifi kullanılarak elde edilen görüntüleri; (a) Mikroenkapsüle *L. acidophilus* LA-5 hücreleri (b) Mikroenkapsüle *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 hücreleri

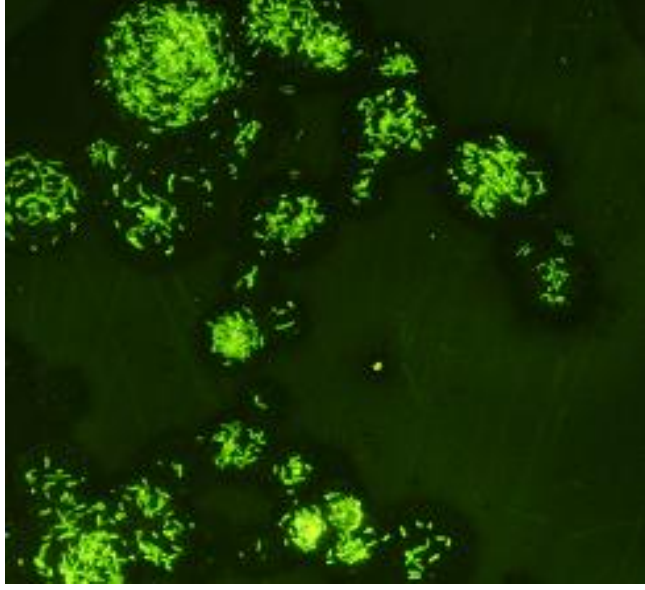
4.10. Probiyotik Bakterilerin Pektin Mikroküreler İçerisine Mikroenkapsülasyonu

Probiyotik bakterilerin pektin mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyon işlemleri, Bölüm 4.8’de sözü edilen pektin mikrokapsüllerin karakterizasyonu sonucu elde edilen optimum parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pektin mikrokapsüllerin karakterizasyonu amacıyla yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar değerlendirilerek optimum mikroenkapsülasyon koşulları olarak % 2 pektin, % 6 CaCl₂ ve 2000 rpm karıştırma hızının kullanılmasına karar verilmiştir.

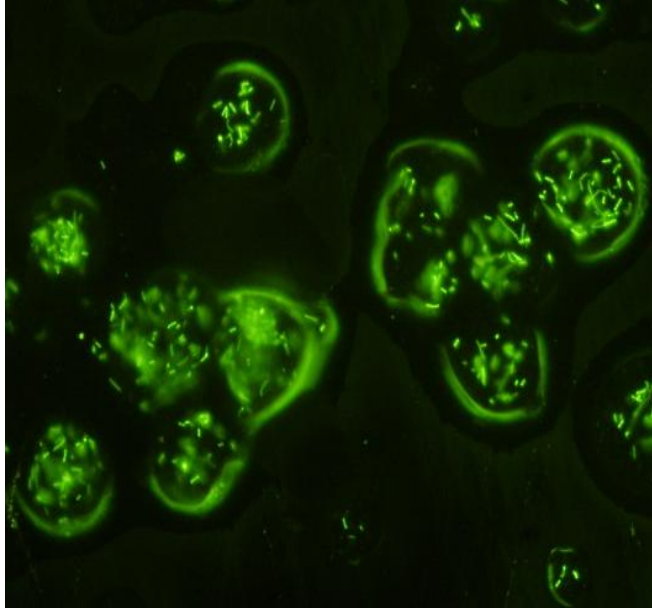
Mikroenkapsülasyon işlemlerinde kullanılan probiyotik bakteriler *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 bakteri suşlarıdır. Bu bakteri suşları, gerçekleştirilen asit ve safraya direnç analizlerinde diğer bakteri suşlarından daha iyi sonuçlar vermeleri nedeniyle tercih edilmişlerdir.

Probiyotik bakterilerin pektin mikrokapsüller içerisine mikroenkapsülasyon işlemleri Bölüm 3.2.24’de belirtildiği şekilde ve yukarıda sözü edilen optimum mikroenkapsülasyon koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen mikrokapsüller içerisindeki bakteri hücreleri, mikrokapsüllerin SYTO®9 boyası ile boyanmalarının ardından floresan mikroskopunda yeşil ışıma şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).



a



b

Şekil 4.22. Pektin mikrokapsüllerin floresans mikroskopunda 20x objektifi kullanılarak elde edilen görüntüleri. (a) Mikrokapsüle *L. acidophilus* LA-5 hücreleri (b) Mikrokapsüle *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 hücreleri

4.11. Mikro kapsül İçerisindeki Probiyotik Bakteri Düzeyinin Belirlenmesi

Belirlenen optimum mikroenkapsülasyon koşullarında probiyotik bakterilerin aljinat ve pektin içerisine mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra da mikrokapsüller Bölüm 3.2.26'da anlatıldığı şekilde liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur.

Kuru formdaki aljinat ve pektin mikrokapsüller içerisindeki bakteri düzeylerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.2.2.6'da anlatılan işlemler gerçekleştirilmiş ve canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.10'da topluca verilmiştir.

Çizelge 4.10. Kuru formdaki aljinat ve pektin mikrokapsüller içerisindeki probiyotik bakteri düzeyleri

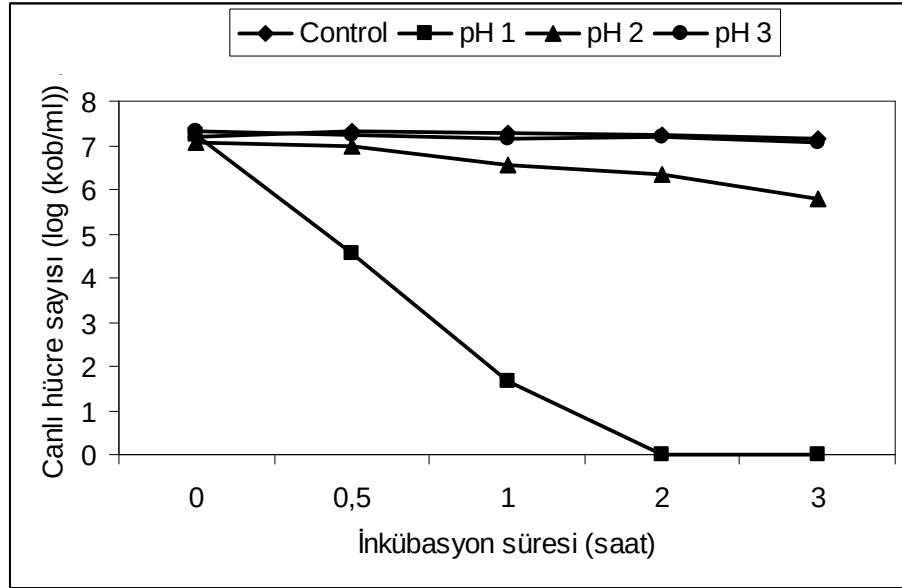
Probiyotik bakteri	Canlı bakteri sayısı (log(kob/gr))
<i>L. acidophilus</i> LA-5	
Aljinat mikrokapsüller	9.2±0.5
Pektin mikrokapsüller	9.4±0.2
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	
Aljinat mikrokapsüller	9.3±0.3
Pektin mikrokapsüller	9.2±0.6

4.12. Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Aside Direnç Özelliği

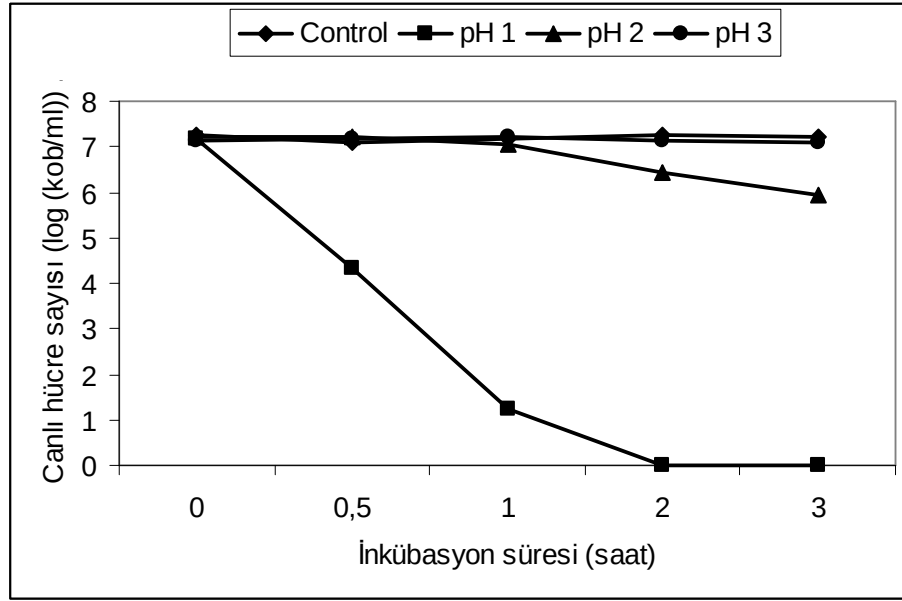
Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşlarının aside direnç özelliğini belirlemek amacıyla öncelikle bu bakteri suşlarını içeren kuru toz formdaki aljinat ve pektin mikrokapsüller hazırlanmıştır. Kuru formdaki mikrokapsüller pH değerleri 1, 2 ve 3 olan ortamlara aktararak 3 saatlik inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon süresince belirli aralıklarla örnek alınarak Bölüm 3.2.27'da belirtildiği şekilde aljinat ve pektin mikroküreler parçalanmış ve sonrasında da her bir örnekteki canlı bakteri sayıları belirlenerek başlangıç canlı bakteri düzeylerindeki azalma miktarlarına göre

mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin asit ortamlara direnç özellikleri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.23, 4.24, 4.25 ve 4.26'da ayrı ayrı gösterilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, probiyotik bakterilerin aside direnç özellikleri aynı zamanda serbest formdaki (mikroenkapsüle edilmemiş formdaki) probiyotik bakteri suşları kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin pH 1 ortamına direnç göstermediği belirlenmiş, inkübasyonun 30. dakikası sonunda dahi canlı bakteri varlığına rastlanmamıştır (Bölüm 4.2.2 ve Bölüm 4.2.4). pH 1 ortamında 30 dakikalık inkübasyon sonrasında serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 hücreleri için canlı bakteri sayısı belirlenemezken (Bölüm 4.2.2), bu bakteri suşu aljinat ve pektin ile mikroenkapsüle edildiğinde inkübasyonun 2. saatine kadar canlılığını belli düzeylerde koruduğu görülmektedir (Şekil 4.23 ve Şekli 4.24).



4.23. Aljinat içerisine enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 hücrelerinin aside direnç özellikleri



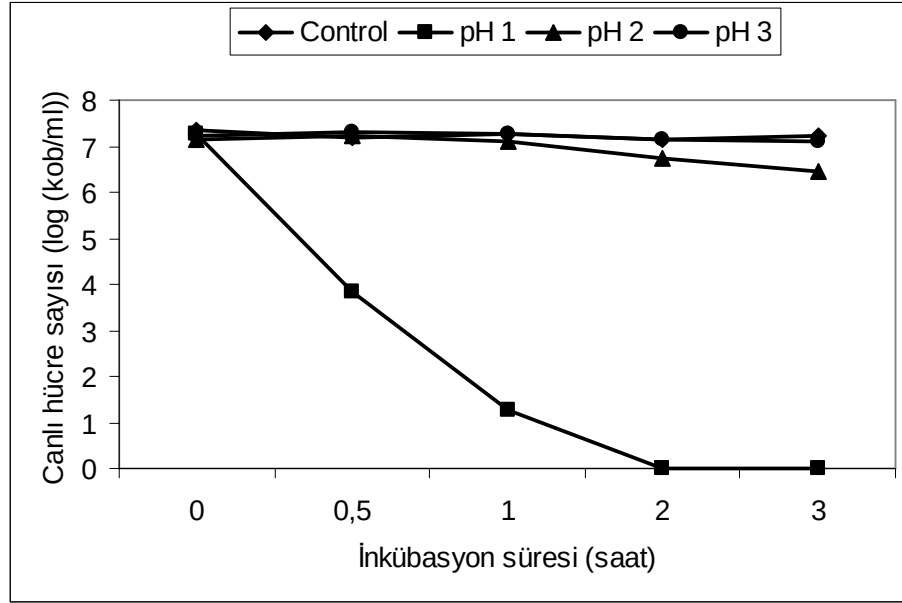
4.24. Pektin içerisine enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 hücrelerinin aside direnç özellikleri

Mikroenkapsüle hücrelerin canlı bakteri sayılarında pH 1 ortamında zamanla bir azalma gözlenmiş ve inkübasyonun 2. saatinden sonra canlı bakteri sayısı belirlenememiştir. Mikroenkapsüle edilen *L. acidophilus* LA-5 hücrelerinin pH 1 ortamında 30 dakikalık inkübasyonun sonrasında belirlenen bakteri sayıları aljinat ve pektin mikrokapsüller için sırasıyla 4.57 ve 4.35 log (kob/ml), yine bu ortamdaki 1 saatlik inkübasyonun sonunda ise sırasıyla 1.65 ve 1.23 log (kob/ml) şeklindedir.

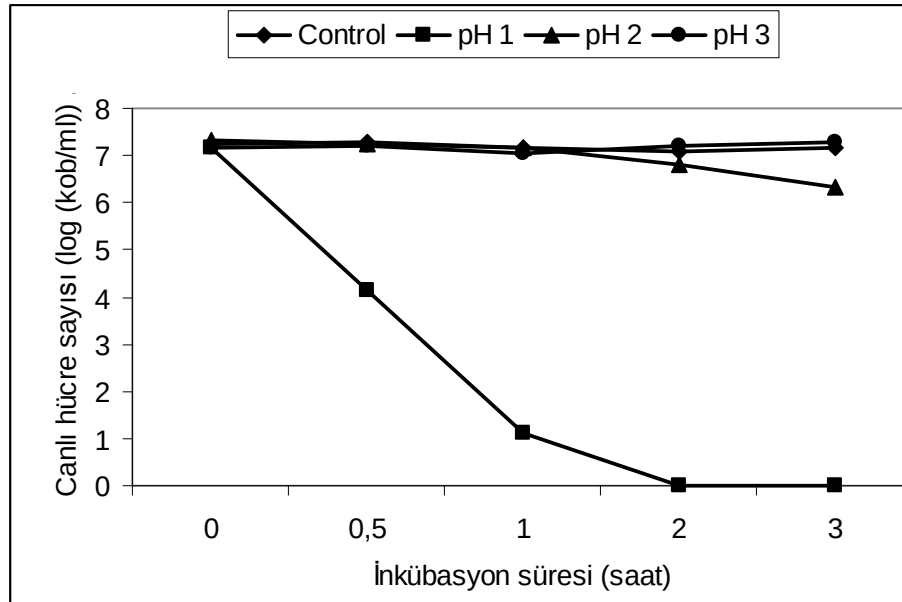
Aljinat ve pektin içerisine mikroenkapsüle edilen *L. acidophilus* LA-5 hücrelerinin pH 2 ortamındaki canlı bakteri düzeylerindeki azalma miktarı serbest formdaki hücrelerine göre oldukça düşük düzeyde olup, 3 saatlik inkübasyon sonrasında canlı bakteri sayıları aljinat ve pektin mikrokapsüller için sırasıyla 5.80 ve 5.92 log (kob/ml) olarak belirlenmiştir. pH 3 ortamında ise mikroenkapsüle *L. acidophilus* LA-5 için kontrole oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Mikroenkapsüle *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin aside direnç özelliklerinin belirlendiği analizlerde de mikroenkapsüle *L. acidophilus* LA-5 için elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar gözlenmiştir. pH 1 ortamında 30 dakikalık inkübasyon sonrasında serbest formdaki *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücreleri için canlı bakteri sayısı belirlenemezken (Bölüm 4.2.4), bu bakteri suşu aljinat ve

pektin ile mikroenkapsüle edildiğinde inkübasyonun 2. saatine kadar canlılığını koruduğu görülmektedir (Şekil 4.25 ve Şekli 4.26).



4.25. Aljinat içerisine enkapsüle edilmiş *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin aside direnç özellikleri



4.26. Pektin içerisine enkapsüle edilmiş *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin aside direnç özellikleri

Mikroenkapsüle hücrelerin canlı bakteri sayılarında pH 1 ortamında zamanla bir azalma gözlenmiş ve inkübasyonun 2. saatinden sonra canlı bakteri sayısı belirlenememiştir. Mikroenkapsüle edilen *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin pH 1 ortamında 30 dakikalık inkübasyonun sonrasında belirlenen bakteri sayıları aljinat ve pektin mikrokapsüller için sırasıyla 3.84 ve 4.12 log (kob/ml), yine bu ortamdaki 1 saatlik inkübasyonun sonunda ise sırasıyla 1.25 ve 1.13 log (kob/ml) şeklindedir.

Aljinat ve pektin içerisine mikroenkapsüle edilen *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin pH 2 ortamındaki canlı bakteri düzeylerindeki azalma miktarı serbest formdaki hücrelerine (Bölüm 4.2.4) göre oldukça düşük düzeyde olup, 3 saatlik inkübasyon sonrasında canlı bakteri sayıları aljinat ve pektin mikrokapsüller için sırasıyla 6.45 ve 6.33 log (kob/ml) olarak belirlenmiştir. pH 3 ortamında ise mikroenkapsüle *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 için kontrole oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde aljinat ya da pektin kullanılarak *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12'nin mikroenkapsülasyonunun bakteri hücrelerini asit ortama karşı koruduğu ve buna bağlı olarak da asit ortamlara olan dirençlerini dolaylı olarak arttırdığı görülmektedir.

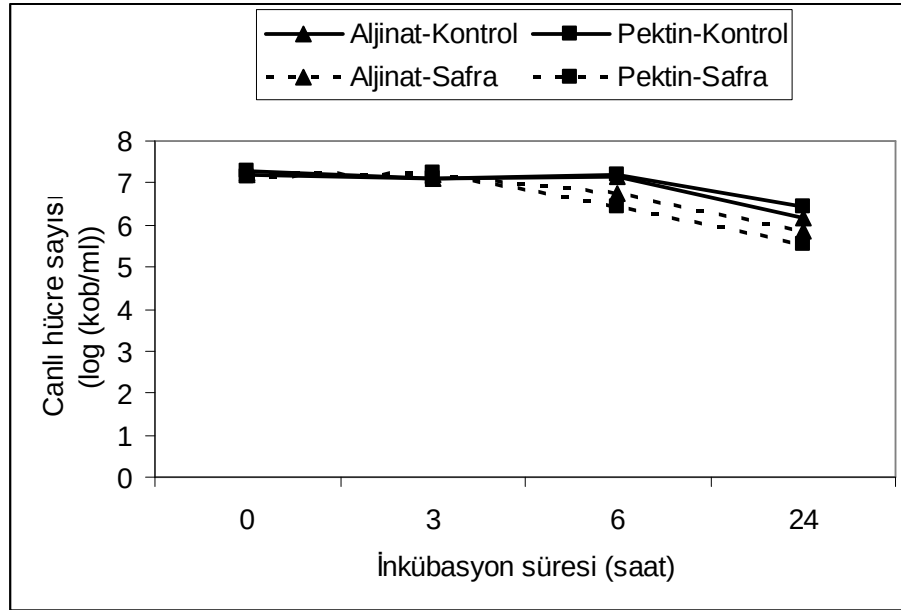
Aside dirençlilik açısından, aljinat ve pektin kullanılarak elde edilen mikrokapsüller arasında önemli bir fark görülmemektedir. Yapılan istatistiksel analizler ile de aside dirençlilik açısından aljinat ve pektin arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Mikroenkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 için inkübasyon süreleri sonunda belirlenen canlı bakteri düzeyleri, serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 için elde edilen sonuçlardan daha yüksek değerlerde bulunmuştur.

Probiyotik bakterilerin asit dirençleri üzerine mikroenkapsülasyon işlemlerinin etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışmada, mikroenkapsülasyon uygulamalarının probiyotiklerin asit dirençlerini arttırdıkları, asit ortama maruz bırakılan mikroenkapsüle probiyotiklerin serbest formlarına kıyasla daha yüksek düzeyde canlı kalabildikleri belirtilmektedir (Lian et al., 2003; Chandramouli et al., 2004;

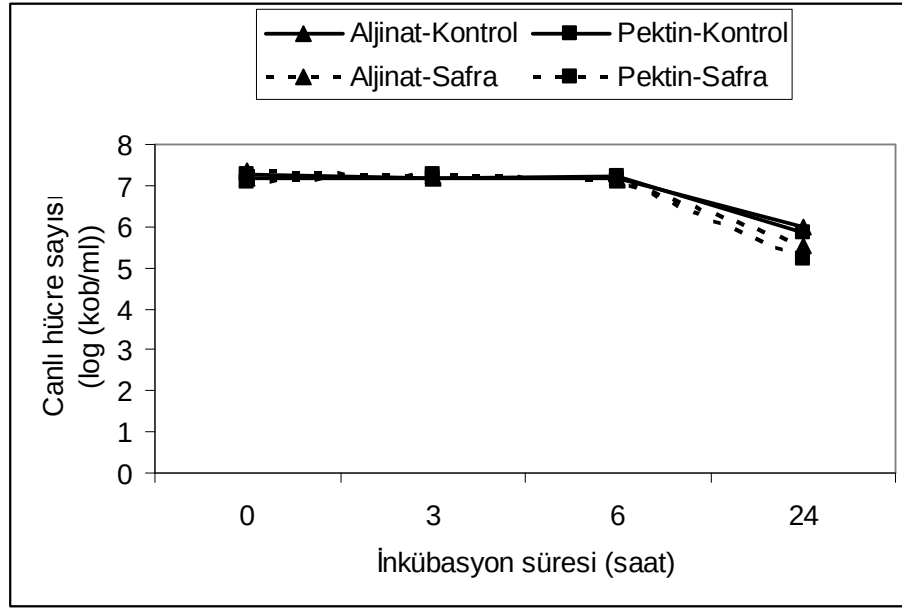
Reid et al., 2005; Mandal et al., 2006; Ding and Shah, 2007; Liserre et al., 2007; Annan et al., 2008; Kim et al., 2008).

4.13. Mikroenkapsüle Probiyotik Bakterilerin Safraya Direnç Özelliği

Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşlarının safraya direnç özelliklerinin belirlendiği analizlerde bu bakteri suşlarını içeren kuru toz formda hazırlanmış aljinat ve pektin mikroenkapsüller % 0.5'lik safra çözeltisinde ayrı ayrı inkübasyona bırakılmıştır (Bölüm 3.2.28). İnkübasyon süresince belirli aralıklarla örnek alınarak Bölüm 3.2.27'de belirtildiği şekilde aljinat ve pektin mikroküreler parçalanmış ve sonrasında da her bir örnekteki canlı bakteri sayıları belirlenerek başlangıç canlı bakteri düzeylerindeki azalma miktarlarına göre mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin safraya direnç özellikleri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de ayrı ayrı verilmiştir.



Şekil 4.27. Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5'in safraya direnç özelliği



Şekil 4.28. Aljinat ve pektin içerisine enkapsüle edilmiş *B. animalis* subs. *lactis* BB-12'nin safraya direnç özelliği

Mikroenkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 için inkübasyon süreleri boyunca safra bulunan ortamda belirlenen canlı bakteri düzeyleri, serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 için elde edilen sonuçlardan (Bölüm 4.3.2 ve Bölüm 4.3.4) daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 için, gelişme ortamında INU bulunduğunda ve % 0.5'lik safra çözeltisinde 24 saatlik inkübasyonunun ardından belirlenen canlı bakteri düzeyi 4.1 log (kob/ml) olarak belirlenirken, bu değer bakteri aljinat ve pektin içerisine mikroenkapsüle edildiğinde sırasıyla 5.9 ve 5.6 log (kob/ml) olarak belirlenmiştir. Başlangıç bakteri düzeylerine göre serbest formdaki bakteri hücrelerinde yaklaşık 2 log düzeyinde bir azalma olurken, mikroenkapsüle edilen hücrelerdeki azalma düzeyi 1 log dan daha az olmuştur.

B. animalis subs. *lactis* BB-12'nin KOS bulunan ortamda geliştirilen serbest formu % 0.5'lik safra çözeltisinde 24 saat inkübe edildiğinde belirlenen canlı bakteri düzeyi 4.8 log (kob/ml) iken, bu bakterinin aljinat ve pektin içerisine mikroenkapsüle edilen formları için tespit edilen değerler sırasıyla 5.6 ve 5.2 log (kob/ml) şeklindedir. Başlangıç bakteri düzeylerine göre serbest formdaki bakteri hücrelerinde yaklaşık 2 log düzeyinde bir azalma olurken, mikroenkapsüle edilen hücrelerdeki azalma düzeyi 1 log dan daha az olmuştur.

Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde aljinat ya da pektin kullanılarak *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12'nin mikroenkapsülasyonunun bakteri hücrelerini safraya karşı koruduğu ve buna bağlı olarak da safraya olan dirençlerini dolaylı olarak arttırdığı görülmektedir.

Safraya dirençlilik açısından, aljinat ve pektin kullanılarak elde edilen mikrokapsüller arasında önemli bir fark görülmemektedir. Yapılan istatistiksel analizler de bu farkın önemsiz olduğunu göstermektedir.

Literatürde de mikroenkapsülasyon işlemlerinin probiyotik bakterilerin safra dirençlerini arttırdıklarının gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Lian et al., 2003; Reid et al., 2005; Ding and Shah, 2007; Kim et al., 2008).

4.14. Serbest ve Mikroenkapsüle Probiyotik Bakteri Kullanılarak Dondurma Üretimi ve Dondurma Örneklerine Uygulanan Analizler

Serbest ve mikroenkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 probiyotik bakteri suşları kullanılarak yapılan dondurma üretimleri Algida-Unilever San ve Tic. Türk A. Ş, Çorlu fabrikasındaki pilot düzeyde üretim yapılan ARGE biriminde gerçekleştirilmiştir. Prebiyotiklerin dondurma üretiminde kullanılabilirliği ve etkilerini değerlendirmek amacıyla, üretilen dondurma örneklerinin bir bölümünde prebiyotik maddeler de kullanılmıştır. Bu amaçla *L. acidophilus* LA-5 içeren bazı dondurma örneklerinde INU, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 içeren bazı dondurma örneklerinde ise KOS'dan yararlanılmıştır.

Dondurma üretimlerinde Algida'nın "sade dondurma (klasik sade kaymaklı dondurma)" çeşidi temel alınarak Bölüm 3.2.29'da belirtilen 11 farklı dondurma örneği üretilmiştir. İçerisinde % 2 oranında INU bulunan dondurma örnekleri 2, 4 ve 6 nolu örnekler, içerisinde % 2 oranında KOS bulunan dondurma örnekleri ise 7, 9 ve 11 nolu örneklerdir. Serbest formda probiyotik bakterilerin kullanıldığı dondurma örnekleri 3, 4, 8 ve 9 nolu, mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin kullanıldığı örnekler ise 5, 6, 10 ve 11 nolu dondurma örnekleridir.

Dondurma üretimlerinde kullanılan mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin enkapsülasyon işlemlerinde destek materyali olarak pektinin kullanılması tercih edilmiştir. Literatürde probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda destek materyali

olarak aljinatın kullanıldığı ve aljinatla mikroenkapsüle edilen probiyotiklerin dondurma üretiminde kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Godward and Kailasapathy, 2003). Diğer taraftan, aljinatın asidik koşullara duyarlı olduğu belirtilmektedir (Gombotz and Wee, 1998). Bu durumlar dikkate alınarak, çalışmanın dondurma üretimi aşamasında destek materyali olarak pektinden yararlanılarak mikroenkapsüle edilen probiyotiklerin kullanımına karar verilmiştir. Mikroenkapsüle probiyotik bakterileri içeren dondurma örneklerinin (5, 6, 10 ve 11 nolu dondurma örnekleri) üretiminde de yalnızca pektin ile mikroenkapsüle edilen probiyotik bakteriler kullanılmıştır.

4.14.1. Dondurma örneklerine uygulanan kalite kontrol testleri

Dondurma örneklerinin viskozite ölçümleri, kuru madde analizleri ve erime hızı testleri Bölüm 3.2.30'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Dondurma örneklerinin kuru madde ve viskozite değerleri

Örnek No	Kuru madde değeri (%)	Viskozite değeri (cp)
1	34.7	520
2	38.2	830
3	34.7	520
4	38.2	830
5	35.6	670
6	37.6	765
7	37.0	680
8	36.0	620
9	37.0	680
10	36.0	620
11	37.5	700

İçerisinde % 2 oranında prebiyotik madde bulunan dondurma örneklerinde (2, 4, 6, 7, 9 ve 11 nolu örnekler) kuru madde ve viskozite değerleri daha yüksek bulunmuştur. Örneklerdeki kuru madde miktarı arttıkça viskozite değerlerinde de artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12. Dondurma örneklerinin erime hızları

Örnek No	İlk damla zamanı (dk)	10 ml geliş zamanı (dk)	Erime hızları (ml/dk)
1	21	44	1.0
2	17	69	0.4
3	16	53	0.7
4	18	55	0.6
5	18	45	0.8
6	19	58	0.6
7	14	59	0.5
8	14	45	0.8
9	14	52	0.6
10	14	41	0.8
11	16	34	0.7

İçeriğinde % 2 oranında prebiyotik madde bulunan dondurma örneklerinin (2, 4, 6, 7, 9 ve 11 nolu örnekler) erime hızlarının daha düşük olduğu da gözlenmiştir (Çizelge 4.12).

4.14.2. Dondurma örneklerinin mikrobiyolojik analizleri

Dondurma örneklerine uygulanan mikrobiyolojik analizlerden bir tanesi dondurma üretiminin hemen ardından ürüne uygulanan dondurma işleminin canlı bakteri düzeylerine etkisini belirlemek amacıyla uygulanan analizdir. Bu amaçla, dondurma işlemi öncesi ve sonrası örnekler alınmış ve bu örneklerde mikrobiyolojik sayımlar (*L. acidophilus* LA-5 veya *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 probiyotik bakteri suşlarına ait canlı hücre sayımları) gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.31). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13’de topluca gösterilmiştir.

Örneklerin genelinde dondurma işlemi sonrası canlı bakteri düzeylerinde belirli düzeylerde azalmalar gözlenmiştir. Dondurma işlemi sonrasında örneklerdeki canlı bakteri düzeylerinde görülen en yüksek azalmalar 4, 6, 8 ve 9 nolu örneklerde ve 0.3-0.4 log düzeylerinde olmuştur. Mikrobiyolojik sayımlarda paralel çalışmalar arası sonuçlarda bile bu düzeylerde farklılıklar olabileceği dikkate alınarak sayıdaki bu azalmaların önemli olmadığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.13. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeyleri (log kob/ml)

Örnek No*	Dondurma işlemi öncesi canlı bakteri sayısı (log kob/ml)	Dondurma işlemi sonrası canlı bakteri sayısı (log kob/ml)
3	7.2±0.2	7,4±0.3
4	7,4±0.4	7,0±0.1
5	7,5±0.3	7,3±0.2
6	7,6±0.3	7,3±0.2
8	7,7±0.2	7,3±0.1
9	7,7±0.3	7,4±0.3
10	7,6±0.1	7,4±0.2
11	7,5±0.1	7,5±0.2

* 3 ve 4 nolu örnekler serbest formdaki *L.acidophilus* LA-5; 5 ve 6 nolu örnekler mikroenkapsüle *L.acidophilus* LA-5; 8 ve 9 nolu örnekler serbest formdaki *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12; 10 ve 11 nolu örnekler mikroenkapsüle *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 içermektedir.

Dondurma örneklerine uygulanan mikrobiyolojik analizlerden diğeri ise dondurma işlemini takiben gerçekleştirilen depolamanın dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeylerine etkisini değerlendirmek amacıyla uygulanan analizdir. Soğuk dolaplarda (-22 °C'de) depolanan dondurma örneklerindeki canlı bakteri sayıları 4 aylık depolama süresince belirli periyotlarda tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

Sonuçların genel bir değerlendirmesi yapıldığında; soğuk depolamanın dondurma örneklerindeki canlı bakteri sayılarında azalmaya neden olmadığı ve 4 aylık soğuk depolama boyunca mikroenkapsüle ve serbest formdaki bakteriler kullanılarak üretilen dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeylerinde önemli bir değişiklik olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.14. Depolamanın dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeylerine etkisi

Örnek No*	Depolama boyunca örneklerdeki canlı bakteri sayıları (log (kob/ml))						
	0.gün	15. gün	30.gün	45.gün	60.gün	90.gün	120.gün
3	7,4±0.2	7,1±0.1	7,4±0.1	7,3±0.2	7,4±0.2	7,3±0.1	7,1±0.3
4	7,0±0.1	7,5±0.2	7,2±0.2	7,4±0.3	7,1±0.1	7,0±0.2	7,1±0.1
5	7,3±0.1	7,4±0.1	7,4±0.2	7,4±0.3	7,3±0.1	7,1±0.2	7,2±0.1
6	7,3±0.1	7,4±0.2	7,4±0.4	7,3±0.1	7,5±0.2	7,2±0.3	7,3±0.2
8	7,3±0.2	7,3±0.3	7,4±0.2	7,8±0.2	7,7±0.1	7,5±0.2	7,7±0.2
9	7,4±0.3	7,2±0.2	7,3±0.1	7,5±0.2	7,6±0.1	7,3±0.3	7,5±0.2
10	7,4±0.2	7,5±0.1	7,4±0.1	7,5±0.3	7,3±0.2	7,3±0.1	7,3±0.1
11	7,5±0.2	7,4±0.1	7,5±0.3	7,5±0.2	7,3±0.1	7,3±0.2	7,4±0.2

* 3 ve 4 nolu örnekler serbest formdaki *L.acidophilus* LA-5; 5 ve 6 nolu örnekler mikroenkapsüle *L.acidophilus* LA-5; 8 ve 9 nolu örnekler serbest formdaki *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12; 10 ve 11 nolu örnekler mikroenkapsüle *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 içermektedir.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda da, 4 aylık soğuk depolama boyunca örneklerdeki canlı bakteri düzeylerinde meydana gelen değişimlerin önemli olmadığı bulunmuştur. Aynı şekilde, istatistiksel açıdan örnekler arasındaki fark da önemsiz çıkmıştır. Buna karşılık, soğuk depolamanın canlı bakteri düzeyinde azalmalara neden olduğu, mikroenkapsülasyon uygulamalarının probiyotik bakterilerin soğuk depolamaya dirençlerini arttırdığı ve soğuk depolamada mikroenkapsüle edilen probiyotik bakterilerle alınan canlı hücre sayım sonuçlarının serbest formdaki probiyotik bakterilerle alınanlara göre yaklaşık 1 log düzeyinde daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Hansen et al., 2002; Krasaekoopt, Bhandari and Deeth, 2006; Tsen et al., 2007). Ancak söz konusu bu çalışmalarda destek materyali olarak aljinat kullanılmış ve bizim çalışmamızda kullanılan probiyotik bakterilerden farklı bakteri türleri ile çalışılmıştır.

4.14.3. Dondurma örneklerinde duyuusal değerlendirme

Dondurma örneklerinin 4 aylık depolama boyunca belirli dönemlerdeki duyuusal muayeneleri Türk Standartları Enstitüsü “TS 4265 Süt Esaslı Dondurma” standardı temel alınarak 5 farklı panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Dondurma örneklerine ait renk ve görünüş, yapı ve kıvam, tat ve koku ile toplam kabul

edilebilirlik düzeylerine ait duysal değerlendirme sonuçları Çizelge 4.15, Çizelge 4.16, Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18'de verilmiştir. Çizelgelerde belirtilen puanlar, 5 farklı panelistin verdiği puanların ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.15. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama renk ve görünüş puanları

Örnek No	15. gün	30.gün	45.gün	60.gün	90.gün	120.gün
1	4.9±0.2	4.6±0.2	4.5±0.3	4.5±0.7	5.0±0.0	4.8±0.5
2	4.9±0.2	4.6±0.4	4.8±0.3	4.6±0.2	5.0±0.0	4.5±0.6
3	5.0±0.0	4.8±0.3	4.5±0.6	4.5±0.4	4.8±0.4	4.5±0.4
4	4.9±0.2	4.8±0.5	4.5±0.4	4.9±0.2	4.8±0.3	4.6±0.2
5	4.9±0.2	4.6±0.5	4.8±0.4	4.9±0.2	4.8±0.3	4.7±0.5
6	5.0±0.0	4.6±0.2	4.3±0.5	4.5±0.6	4.8±0.5	4.3±0.3
7	4.8±0.3	4.8±0.3	4.8±0.3	4.6±0.4	4.4±0.2	4.5±0.3
8	4.9±0.2	4.8±0.5	4.5±0.3	4.5±0.3	4.8±0.4	4.0±0.4
9	4.9±0.2	5.0±0.0	4.5±0.4	4.8±0.4	4.6±0.5	4.3±0.5
10	4.9±0.2	4.8±0.3	4.8±0.5	4.8±0.5	4.4±0.4	4.6±0.4
11	5.0±0.0	4.8±0.3	4.3±0.3	4.6±0.5	3.5±0.6	4.0±0.4

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda dondurma örneklerinin renk ve görünüş özellikleri üzerinde örnekler arasındaki farkın, depolama süresinin ve örnek x gün etkileşiminin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak buna karşılık 11 nolu örnek dışındaki bütün dondurma örneklerinde renk ve görünüş puanları depolama boyunca, “iyi” olarak değerlendirilen 4.0 ve üzerinde olmuştur (Çizelge 4.15). Söz konusu 11 nolu örnekte renk ve görünüş puanı yalnızca depolamanın 90. gününde 4.0’ün altına düşmüş (3.5 ± 0.6), depolamanın 120. gününde ise puan yine 4.0 olmuştur (4.0 ± 0.4).

Çizelge 4.16. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama yapı ve kıvam puanları

Örnek No	15. gün	30.gün	45.gün	60.gün	90.gün	120.gün
1	4.8±0.3	4.6±0.2	4.5±0.4	4.5±0.3	4.4±0.2	4.3±0.6
2	4.7±0.4	4.4±0.2	4.8±0.5	4.3±0.6	4.4±0.4	4.5±0.7
3	4.8±0.3	4.4±0.2	4.5±0.3	4.2±0.3	4.8±0.5	4.0±0.4
4	5.0±0.0	4.4±0.4	4.3±0.4	4.6±0.5	4.4±0.4	4.0±0.4
5	4.8±0.4	4.6±0.2	4.8±0.3	4.5±0.7	4.4±0.4	4.2±0.5
6	4.8±0.3	4.4±0.4	4.0±0.4	4.2±0.4	4.4±0.3	4.3±0.5
7	4.8±0.3	4.4±0.2	4.5±0.4	4.5±0.4	4.2±0.5	4.0±0.5
8	4.8±0.5	4.4±0.3	4.5±0.6	4.6±0.2	4.0±0.5	4.3±0.4
9	4.8±0.3	4.6±0.4	4.3±0.3	4.5±0.3	4.2±0.5	4.0±0.3
10	4.6±0.2	4.8±0.3	4.0±0.5	4.2±0.6	3.5±0.6	4.0±0.5
11	4.7±0.5	4.6±0.3	4.0±0.5	4.3±0.5	3.3±0.4	3.5±0.6

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda dondurma örneklerinin yapı ve kıvam özellikleri üzerinde örnekler arasındaki farkın, depolama süresinin ve örnek x gün etkileşiminin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak buna karşılık 10 ve 11 nolu örnek dışındaki bütün dondurma örneklerinde yapı ve kıvam puanları depolama boyunca, “iyi” olarak değerlendirilen 4.0 ve üzerinde olmuştur (Çizelge 4.16). Söz konusu 10 nolu örnekte yapı ve kıvam puanı yalnızca depolamanın 90. gününde 4.0’ün altına düşmüş (3.5 ± 0.6), depolamanın 120. gününde puan yine 4.0 olmuştur (4.0 ± 0.5), 11 nolu örnekte ise yapı ve kıvam puanları depolamanın 90. ve 120. gününde 4.0’ün altına düşmüştür (sırasıyla 3.3 ± 0.4 ve 3.5 ± 0.6). Diğer taraftan kimi panelistler tarafından içerisinde prebiyotik içeren örneklerin daha kıvamlı olduğu özel not olarak düşülmüştür.

Çizelge 4.17. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama tat ve koku puanları

Örnek No	15. gün	30.gün	45.gün	60	90	120
1	4.8±0.3	4.0±0.4	4.5±0.3	4.2±0.5	4.8±0.5	4.5±0.6
2	4.7±0.4	4.5±0.4	4.0±0.5	4.5±0.7	4.6±0.5	4.3±0.5
3	4.6±0.2	4.6±0.4	4.3±0.4	4.5±0.4	4.2±0.6	4.3±0.6
4	4.3±0.3	4.4±0.2	4.8±0.4	4.3±0.6	4.0±0.4	4.0±0.5
5	4.5±0.3	4.5±0.4	4.5±0.6	4.0±0.5	3.8±0.4	4.0±0.5
6	4.5±0.3	4.4±0.4	3.3±0.7	4.0±0.5	3.4±0.6	3.6±0.7
7	4.8±0.3	4.0±0.5	4.0±0.6	4.2±0.6	3.4±0.5	3.5±0.6
8	4.7±0.4	4.1±0.2	4.0±0.5	3.5±0.4	3.6±0.7	4.0±0.4
9	4.8±0.4	4.2±0.3	4.3±0.5	4.5±0.6	4.0±0.5	4.0±0.5
10	4.6±0.2	3.6±0.3	3.5±0.6	3.5±0.6	3.2±0.3	3.5±0.4
11	4.5±0.4	3.2±0.7	3.5±0.4	3.6±0.7	3.0±0.8	3.2±0.7

Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama tat ve koku değerleri Çizelge 4.17’de topluca verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda dondurma örneklerinin tat ve koku özellikleri üzerinde örnekler arasındaki farkın, depolama süresinin ve örnek x gün etkileşiminin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak buna karşılık 5, 6, 7, 8, 10 ve 11 nolu örnek dışındaki dondurma örneklerinde tat ve koku puanları depolama boyunca, “iyi” olarak değerlendirilen 4.0 ve üzerinde olmuştur (Çizelge 4.17). Söz konusu 5 nolu örnekte tat ve koku puanı yalnızca depolamanın 90. gününde 4.0’ün altına düşmüş (3.8 ± 0.4), depolamanın 120. gününde puan yine 4.0 olmuştur (4.0 ± 0.5), 6 nolu örnekte depolamanın 45. gününde 4.0’ün altına düşen (3.3 ± 0.7) tat ve koku puanları depolamanın 60 gününde 4.0 olmuş depolamanın 90. ve 120. gününde yine 4.0’ün altına düşmüştür (sırasıyla 3.4 ± 0.6 ve 3.6 ± 0.7), 7 nolu örnekte tat ve koku puanları depolamanın 90. ve 120. gününde 4.0’ün altına düşmüştür (sırasıyla 3.4 ± 0.5 ve 3.5 ± 0.6), 8 nolu örnekte tat ve koku puanı depolamanın 60. ve 90. gününde 4.0’ün altına düşmüş (sırasıyla 3.5 ± 0.4 ve 3.6 ± 0.7) depolamanın 120. gününde puan yine 4.0 olmuştur (4.0 ± 0.4), 10 ve 11 nolu örneklerde ise tat ve koku puanları depolamanın 30. gününden başlayarak 4.0’ün altına düşmüş ve daha sonra depolamanın son günü de dahil olmak üzere hep 4.0’ün altında kalmıştır ($3.0 - 3.6$

aralığında). Kontrol dondurma örneğinde de (1 nolu örnek) tat ve koku puanı depolama süresi boyunca 4.0-4.8 aralığında değişim göstermiştir.

Mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin kullanıldığı dondurma örneklerine eklenen kapsüllerin duyuşal yönden etkisini değerlendirmek amacıyla, panelistlerden özellikle tat ve koku değerlendirmesi sırasında dondurma örneklerinin ağızda herhangi bir pürüzlü yapı veya olumsuz bir his uyandırıp uyandırmadıklarına dikkat etmeleri istenmiştir. Depolama süresince gerçekleştirilen duyuşal değerlendirmelerin hiç birinde panelistler tarafından böyle bir olumsuzluk ifade edilmemiştir.

Çeşitli panelistler tarafından düşölen özel notlarda, bazı dondurma örnekleri için “daha fazla şekerli tada sahip” ifadesi yer almıştır. Bu anlamda panelistler tarafından prebiyotik eklenen dondurma örneklerinin “daha fazla şekerli tada sahip” olarak değerlendirilebileceğı düşünölmüş ancak prebiyotik eklenmeyen örnekler için de yer yer böyle bir ifade kullanılmış olmasına herhangi bir açıklama getirilememiştir. Dondurma örneklerinin formölasyonlarına bakılarak, bu farklılığa neden olabilecek herhangi bir gruplandırma da yapılamamıştır. Ancak prebiyotiklerin belli düzeylerde tatlılığa sahip olduğı ve eklendikleri ürüne belli düzeylerde tatlılık kazandıracağı da açıktır.

Dondurma örneklerinin depolama süresince ortamla toplam kabul edilebilirlik değeri Çizelge 4.18’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda dondurma örneklerinin toplam kabul edilebilirlik özellikleri üzerinde örnekler arasındaki farkın, depolama süresinin ve örnek x gün etkileşiminin önemli olduğı bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak buna karşılık 6, 7, 10 ve 11 nolu örnek dışındaki dondurma örneklerinde toplam kabul edilebilirlik puanları depolama boyunca, “iyi” olarak değerlendirilen 4.0 ve üzerinde olmuştur (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Dondurma örneklerinin depolama süresince ortalama toplam kabul edilebilirlik puanları

Örnek No	15. gün	30.gün	45.gün	60. gün	90.gün	120.gün
1	5.0±0.0	4.0±0.4	4.8±0.5	4.0±0.5	4.6±0.2	4.3±0.6
2	5.0±0.0	4.6±0.4	4.0±0.5	4.2±0.6	4.6±0.2	4.0±0.5
3	4.8±0.3	4.6±0.5	4.3±0.5	4.5±0.7	4.6±0.5	4.5±0.6
4	4.8±0.3	4.4±0.4	4.5±0.4	4.6±0.5	4.4±0.4	4.2±0.5
5	4.6±0.2	4.6±0.5	4.5±0.3	4.5±0.4	4.4±0.2	4.0±0.5
6	4.7±0.4	4.4±0.2	3.5±0.6	4.3±0.5	4.2±0.6	4.0±0.4
7	4.8±0.4	4.4±0.2	4.3±0.3	4.2±0.5	3.6±0.4	3.5±0.6
8	4.8±0.3	4.4±0.3	4.3±0.5	4.0±0.4	4.4±0.4	4.2±0.3
9	4.8±0.3	4.4±0.5	4.5±0.6	4.5±0.6	4.4±0.4	4.3±0.5
10	4.6±0.2	4.0±0.5	4.0±0.5	4.2±0.6	3.8±0.4	3.6±0.7
11	4.6±0.2	3.6±0.7	4.0±0.4	3.5±0.4	2.9±0.5	3.0±0.8

Söz konusu 6 nolu örnekte depolamanın 45. gününde 4.0'ün altına düşen (3.5±0.6) toplam kabul edilebilirlik puanları daha sonra depolamanın son günü de dahil olmak üzere hep 4.0 ve üzerinde olmuştur (4.0-4.3 aralığında), 7 nolu örnekte toplam kabul edilebilirlik puanları depolamanın 90. ve 120. gününde 4.0'ün altına düşmüştür (sırasıyla 3.6±0.4 ve 3.5±0.6), 10 nolu örnekte toplam kabul edilebilirlik puanı depolamanın 90. ve 120. gününde 4.0'ün altına düşmüştür (sırasıyla 3.8±0.4 ve 3.6±0.7), 11 nolu örnekte ise toplam kabul edilebilirlik puanları depolamanın 30. gününde 4.0'ün altına düşmüş (3.6±0.7), depolamanın 45. gününde 4.0 puan alan bu örnekte puanlar daha sonra depolamanın son günü de dahil olmak üzere hep 4.0'ün altında kalmıştır. Toplam kabul edilebilirlik puanlarının, 11 nolu örnekte depolamanın özellikle 90. ve 120. günlerinde sırasıyla 2.9±0.5 ve 3.0±0.8 gibi “az kusurlu” olarak değerlendirilen oldukça düşük değerlere düşmesi dikkat çekici bulunmuştur.

Kontrol dondurma örneğinde de (1 nolu örnek) toplam kabul edilebilirlik puanı depolama süresi boyunca 4.0-5.0 aralığında değişim göstermiştir.

Toplam kabul edilebilirlik açısından depolama süresi boyunca belli dönemlerde 4.0'ün altında puan alan 6, 7, 10 ve 11 nolu örnekler, dondurmanın duyuşal değerlendirilmesinde önemli bir yeri olan tat ve koku özelliği (Çizelge 4.17)

yönünden de çok benzeri durum sergilemişlerdir. Buna karşılık depolama süresi boyunca belli dönemlerde 4.0'ün altında tat koku puanı alan 5 ve 8 nolu örnekler depolama boyunca 4.0 ve üzerinde toplam kabul edilebilirlik puanları almıştır.

Dondurma örnekleri tat koku ve toplam kabul edilebilirlik puanları açısından genel bir değerlendirmeye alındığında; 11 nolu örneğin özellikle ileri depolama günlerinde (90. ve 120. günler) 3.0 ve altında puan alması uzun süreli depolamanın bu örnekte olumsuzluk yaratabileceğine işaret etmektedir. Söz konusu 11 nolu dondurma örneği mikroenkapsüle *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 ve % 2 oranında ksilooligosakkarit (KOS) içermektedir. *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 ve % 2 oranında KOS içeren 9 nolu dondurma örnek depolama boyunca “iyi” olarak değerlendirilen 4.0 ve üzerinde tat koku ve toplam kabul edilebilirlik puanları almıştır. Bu iki dondurma örneği arasındaki tek fark üretimlerinde kullanılan probiyotik bakteri suşunun birinde serbest diğeri ise mikroenkapsüle formda olmasıdır. Mikroenkapsüle *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 içeren ancak KOS eklenmemiş 10 nolu sade dondurma örneğinin de depolama süresince belli dönemlerde 4.0'ün altında tat koku ve toplam kabul edilebilirlik puanları almış olması, *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 suşunun mikroenkapsüle formda dondurma üretiminde yararlanılması durumunda özellikle 90 ve 120 gün gibi uzun süreli depolamalarda duyuşal özellikler açısından belli düzeylerde olumsuzluk yaratabileceğini düşündürmektedir.

Bütün bunlara karşılık, bu tez çalışması kapsamında dondurma üretimlerinin yapıldığı işletmenin sorumlularıyla yapılan görüşmelerde, işletmede üretilen dondurmaların bu denli uzun süre depolanmaya hacet kalmadan pazara sürüldüğü ifade edilmiştir.

Duyuşal değerlendirmelerde dikkat çeken diğeri bir husus ise ortalama puanlara ait standart sapma değerlerinin genelde yüksek olması ve depolamanın belli bir döneminde düşük puan alan bir örneğin depolamanın ileri aşamasında daha yüksek puan alabiliyor olmasıdır. Bu durumun, bu tez çalışması kapsamında kullanılan duyuşal analiz yönteminin tümüyle subjektif değerlendirmelere dayandırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; destek materyali olarak aljinat ve pektin kullanılarak gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işlemlerinin, probiyotik bakterilerin asit, safra ve soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özellikleri üzerine etkileri ve mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin dondurma üretiminde kullanılabilirliği değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Araştırmada elde edilen bulgular ve konuyla ilgili literatür bilgilerinin değerlendirilmesiyle de elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Çalışma kapsamında denenen prebiyotiklerin, çalışmada kullanılan probiyotik bakteri suşlarının gelişimini belirli düzeylerde teşvik ettiği belirlenmiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. acidophilus* LA-5 suşlarının gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden prebiyotik maddenin % 2 konsantrasyonunda denenen FOS olduğu, bu prebiyotik maddeyi etki düzeyi açısından INU ve LAK'ın izlediği görülmüştür. *B. bifidum* ATCC 15969 suşunun gelişimini en yüksek düzeyde teşvik eden prebiyotik maddenin % 2 konsantrasyonunda denenen GOS olduğu saptanmış ve bu prebiyotik maddeyi LAK ve SOS'un takip ettiği belirlenmiştir. *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun gelişimini ise, en yüksek düzeyde % 2 konsantrasyonunda denenen KOS teşvik etmiş, bu prebiyotik maddeyi etki düzeyi açısından SOS ve GOS takip etmiştir.

2. Çalışma kapsamında *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* LA-5, *B. bifidum* ATCC 15969 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 probiyotik bakteri suşlarının aside direnç özellikleri ve prebiyotiklerin aside direnç özelliği üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

L. acidophilus ATCC 4356 ve *L. acidophilus* LA-5 suşlarının asit direnç özelliklerinin gelişme ortamında INU bulunduğunda daha fazla olduğu saptanmıştır. *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun gelişimi üzerine en yüksek etkiyi FOS'un göstermesine rağmen, INU'nın bu bakteri suşunun aside dirençliliğini daha fazla arttırdığı dikkat çekmiştir.

B. bifidum ATCC 15696 suşunun asit direnç özelliğinin gelişme ortamında GOS bulunduğunda daha fazla olduğu belirlenirken, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12

suşunun gelişme ortamında KOS bulunduğunda asit direncinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca, elde edilen sonuçlardan, *L. acidophilus* LA-5 suşunun aside direnç özelliğinin *L. acidophilus* ATCC 4356 suşundan, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun ise *B. bifidum* ATCC 15696 suşundan daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır.

Denenen tüm probiyotik bakteri suşları için pH 1 olan ortamda 30 dakikalık inkübasyon sonunda canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. Bu sonuç, bu bakteri suşlarının pH 1 ortamına 30 dakikadan daha az bir süre direnç sergilediğine işaret etmektedir. Mide ortamı pH'sının 1.5-2 arasında bir değer olduğu, bazen 1.5 değerinin altına da düşebildiği düşünüldüğünde (Chou and Weimer, 1999), probiyotik bakterileri midenin yüksek asitlik ortamına karşı korumanın ve aside dirençliliğini artırmak amacıyla bir takım önlemler alınması gerekli olduğu açıktır.

3. Çalışmada *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* LA-5, *B. bifidum* ATCC 15696 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 probiyotik bakteri suşlarının safraya direnç özellikleri ve prebiyotiklerin safraya direnç özelliğine etkileri değerlendirilmiştir.

L. acidophilus ATCC 4356 ve *L. acidophilus* LA-5 suşlarının safraya direnç özelliklerinin gelişme ortamında INU bulunduğunda daha fazla olduğu saptanmıştır. *B. bifidum* ATCC 15696 suşunun safraya direnç özelliğinin en fazla olduğu durum gelişme ortamında GOS bulunduğunda elde edilirken, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşu için gelişme ortamında KOS bulunduğunda safraya direncin daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, elde edilen sonuçlardan *L. acidophilus* LA-5 suşunun safraya *L. acidophilus* ATCC 4356 suşundan, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 suşunun ise *B. bifidum* ATCC 15696 suşundan daha fazla dirençli olduğu gözlenmiştir.

4. *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* LA-5, *B. bifidum* ATCC 15696 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 probiyotik bakteri suşlarının soğuk depolama sıcaklıklarına direnç özellikleri araştırılmıştır.

Örneklerin tümünde soğuk depolama süresince canlı bakteri sayılarının genelde giderek azaldığı belirlenmiş, örnekler arasında önemli bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, test edilen prebiyotik bakteri suşlarının soğuk depolamaya direnç özellikleri üzerine olumlu bir etkilerinin olmadığına işaret etmektedir.

5. Prebiyotiklerin çalışmada kullanılan probiyotik bakteri suşlarının β -galaktosidaz aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir.

L. acidophilus suşlarının β -galaktosidaz aktivitesinin gelişme ortamında INU olduğunda daha yüksek olduğu bulunmuştur. *B. animalis* subsp *lactis* ve *B. bifidum* ATCC 15696 bakteri suşları için ise gelişme ortamlarında prebiyotik madde olarak GOS olduğunda β -galaktosidaz aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

6. *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 bakteri suşlarının asit ve safraya dirençlilikleri, test edilen diğer bakterilerden daha fazla olarak belirlenmiştir. Bu nedenle mikroenkapsülasyon işlemlerinde ve dondurma üretiminde kullanılmak üzere bu bakteri suşları seçilmiştir.

7. Mikroenkapsülasyon işlemlerinde destek materyalleri olarak aljinat ve pektin kullanılmıştır. Mikroenkapsülasyon işlemlerinde destek materyali konsantrasyonu, CaCl_2 konsantrasyonu ve karıştırma hızlarının kapsül boyutuna etkileri değerlendirilerek aljinat ve pektin mikrokapsüllerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Destek materyali konsantrasyonu arttıkça mikrokapsül boyutlarının arttığı, CaCl_2 konsantrasyonu arttıkça mikrokapsül boyutlarının küçüldüğü belirlenmiştir. Karıştırma hızı arttıkça mikrokapsül boyutu azalmıştır.

Mikrokapsüllerin karakterizasyonu sonucu; destek materyali olarak aljinat kullanıldığında optimum mikroenkapsülasyon koşulları olarak % 1 aljinat, % 2 CaCl_2 ve 2000 rpm karıştırma hızının kullanılmasına, destek materyali olarak pektin kullanıldığında ise optimum mikroenkapsülasyon koşulları olarak % 2 aljinat, % 6 CaCl_2 ve 2000 rpm karıştırma hızının kullanılmasına karar verilmiştir.

8. Elde edilen mikrokapsüllerin mikroskopik incelemesinde aljinat mikrokapsüllerin topaklaşma gösterdiği gözlemlenmiştir.
9. *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12'nin aljinat ya da pektin kullanılarak mikroenkapsülasyonunun, bakteri hücrelerini asit ortama karşı koruduğu ve bu ortamlara olan dirençlerini arttırdığı gözlenmiştir. Aside dirençlilik açısından, aljinat ve pektin kullanılarak elde edilen mikrokapsüller arasında önemli bir fark görülmemiştir.

Mikroenkapsüle edilmiş *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 için inkübasyon süreleri sonunda belirlenen canlı bakteri düzeyleri, serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 için elde edilen sonuçlardan daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Daha önce de değinildiği gibi, serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin pH 1 ortamına direnç gösteremediği belirlenmiş, inkübasyonun 30. dakikası sonunda dahi canlı bakteri varlığına rastlanmamıştır.

pH 1 ortamında 30 dakikalık inkübasyon sonrasında serbest formdaki *L. acidophilus* LA-5 hücreleri için canlı bakteri sayısı belirlenemezken, bu bakteri suşu aljinat ve pektin ile mikroenkapsüle edildiğinde inkübasyonun 2. saatine kadar canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Mikroenkapsüle *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin aside direnç özelliklerinin araştırıldığı denemelerde de, mikroenkapsüle *L. acidophilus* LA-5 için elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar gözlenmiştir.

10. Mikroenkapsülasyonun probiyotik bakterilerin safraya dirençlerini arttırdığı tespit edilmiştir. Mikroenkapsüle *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücrelerinin safra bulunan ortamda inkübasyon süreleri boyunca belirlenen düzeylerinin, serbest *L. acidophilus* LA-5 ve *B. animalis* subs. *lactis* BB-12 hücre düzeylerinden daha fazla olduğu görülmüştür. Safraya dirençlilik açısından, aljinat ve pektin kullanılarak elde edilen mikrokapsüller arasında önemli bir fark görülmemiştir.
11. Dondurma üretimlerinde kullanılan mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin enkapsülasyon işlemlerinde destek materyali olarak pektinin kullanılması tercih edilmiştir. Literatürde probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda destek materyali

olarak aljinatın kullanıldığı ve aljinatla mikroenkapsüle edilen probiyotiklerin dondurma üretiminde kullanımına yönelik pek çok çalışma yer almaktadır. Çalışmamızın özgünlüğünü artırmak ve probiyotiklerin enkapsülasyonu uygulamalarında aljinata alternatif destek materyali önermek amacıyla, çalışmanın dondurma üretimi aşamasında destek materyali olarak pektinden yararlanılarak mikroenkapsüle edilen probiyotiklerin kullanımına karar verilmiştir.

12. Serbest ve mikroenkapsüle probiyotik bakteriler ve bu bakteriler için seçilen prebiyotik maddeler kullanılarak farklı dondurma örnekleri üretilmiştir.

Dondurma işlemi öncesi ve sonrası alınan dondurma örneklerine uygulanan mikrobiyolojik analizler ile dondurma işleminin örneklerdeki canlı bakteri düzeyine etkisi değerlendirilmiştir.

Örneklerin bazılarında dondurma işlemi sonrası canlı bakteri sayılarında önemsenmeyecek düzeyde azalmalar tespit edilmiş ve bu sonuca göre de dondurma işleminin örneklerdeki canlı bakteri düzeyleri üzerinde önemli derecede etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Soğuk depolamanın dondurma örneklerindeki canlı bakteri düzeyine etkisi de araştırılmıştır. Soğuk dolaplarda (-22 °C'de) depolanan dondurma örneklerindeki canlı bakteri sayıları 4 aylık depolama süresince belirli dönemlerde tespit edilmiştir. Soğuk depolamanın örneklerdeki bakteri sayılarında azalmaya neden olmadığı ve 4 aylık soğuk depolama boyunca örneklerdeki canlı bakteri düzeylerinde önemli bir değişiklik meydana gelmediği saptanmıştır.

Dondurma örnekleri soğuk depolama süresince panelistler tarafından duyuusal özellikleri yönünden (renk, görünüş, yapı, kıvam, tat, koku ve toplam kabul edilebilirlik) değerlendirilmiştir. Duyusal değerlendirmeler sırasında panelistler tarafından, mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin eklendiği dondurma örneklerinin ağızda herhangi bir pürüzlü yapı veya olumsuz bir his uyandırdığı, pürüzlü bir yapı veya olumsuzluğa sahip olduğu yönünde bir ifadeye bulunulmamıştır. Duyusal analiz sonuçları, dondurma üretiminde mikroenkapsüle probiyotik bakteri ve prebiyotik kullanımının dondurma

örneklerinin duyuşal özelliklerini normal depolama süreleri içinde olumsuz yönde etkilemeyeceğine ancak uzun süreli depolamalar söz konusu olduğunda, dondurma üretiminde kullanılacak olan mikroenkapsüle probiyotik bakteri çeşidinin bu yönden önemli olabileceğine ve buna bağılı olarak da mikroenkapsüle edilecek probiyotik bakterinin seçiminde dikkatli olunmasının gerekliliğine işaret etmektedir.

13. Dondurma üretimleri Algida-Unilever San ve Tic. Türk A. Ş, Çorlu fabrikasındaki pilot düzeyde üretim yapılan ARGE biriminde gerçekleştirilmiştir. Bu açıdan yapılan çalışmanın üniversite-sanayi işbirliğine büyük katkı sağlayacağı ve özendirici bir etki yaratacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; probiyotik ve prebiyotiklerin birlikte kullanıldığı simbiyotik ürün fomülasyonlarında kullanılan probiyotik bakteri için doğru prebiyotik seçiminin önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Probiyotiklerin eklendiğı gıda fomülasyonlarına aynı zamanda prebiyotik madde ya da maddeler de eklenmek isteniyorsa, eklenmesi istenen probiyotik bakterinin gelişimini ve asit ve safra direnci gibi bazı teknolojik özellikleri üzerine prebiyotiklerin etkisi araştırılarak, uygun prebiyotik madde/maddelerin seçilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen analizler sonucunda probiyotik bakterilerin mikroenkapsüle edilmesinin bu bakterileri asit ve safra gibi olumsuz çevre koşullarına karşı koruduğı açık olarak görölmektedir. Probiyotik bakterilerin literatürde sözü edilen sağılık faydalarını gösterebilmeleri için, kolona belli bir düzeyde canlı bakterinin ulaşması gerektiğı bilinmektedir. Diğer taraftan, eklendikleri gıdada bulundukları sürece ve tüketilmelerinden sonra kolona ulaşana kadar mide ortamında karşılaştıkları asit ortamı ile ince bağırsakta salgılanan safra nedeniyle probiyotiklerin canlı hücre düzeylerinde azalmaların olduğu da bilinen bir gerçektir (Lankaputhra ve Shah, 1995; Shah, 2000; Krasaekoopt, 2003; Vinderola and Reinheimer, 2003). Bu nedenle probiyotik bakterilerin eklenecekleri ürüne, serbest formda eklenmek yerine ürünün yapısal ve teknolojik özellikleri açısından bir sakınca bulunmadığında mikroenkapsüle formlarının eklenmesinin daha yararlı olacağı düşünülmektedir.

Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda destek materyali olarak aljinat kullanımı ile ilgili olarak literatürde birçok çalışma vardır. Ancak, aljinatın probiyotik bakterilerin sahip olması gereken özellikleri üzerinde yarattığı belirtilen olumsuzluklar nedeniyle aljinat mikrokapsüllerinin son yıllarda özellikle başka polimer maddeler ile kaplanması uygulamaları üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Champagne et al., 1992; Sheu and Marshall, 1993; Larisch et al., 1994; Krasaekoopt et al., 2004).

Bu tez çalışmasında pektinin probiyotiklerin mikroenkapsülasyon işlemleri için uygun bir materyal olabileceği belirlenmiştir. Pektin ayrıca kolona spesifik bir çok ilacın enkapsülasyonunda da kullanılmaktadır (Rubinstein et al., 1993; Aydın and Akbuğa, 1996; Wakerly et al., 1996; Srimornsak and Nunthanid, 1998; Srimornsak and Nunthanid, 1999; Sungthongjeen et al., 1999; Wong et al., 2002; Jain et al., 2007). Çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizler sonucu ve literatürden pektin konusunda elde edilen bilgiler ışığında, pektinin probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu uygulamalarında aljinat ve bu amaçla kullanılan diğer destek materyallerine bir alternatif oluşturabileceği ve pektin kullanılarak elde edilen mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin gıdaya eklenmesinin uygun olabileceği düşünülmektedir. Ancak pektin kullanılarak elde edilen mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin eklendikleri gıdada, gıdaya uygulanan işlemler ve depolama boyunca stabilitesinin daha detaylı incelenmesi, pektin mikrokapsüllerin çalışmada araştırılmamış olan bir takım olumsuz çevre koşullarına dayanımı ile mekanik dayanımları ve pektin mikrokapsüllerin kolon mikroflorasında yer alan ve pektik enzimler üretme yeteneğinde olan bakteriler tarafından parçalanma durumları gibi çeşitli özelliklerinin belirlenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U., Fernando, L., 2000, Viability of microencapsulated *Bifidobacteria* in set yogurt during refrigerated storage. Journal Dairy Science, 83, 1946-1951.
- Anal, A. K., Singh, H., 2007, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science & Technology, 18(5), 240-251.
- Annan, N.T., Borza, A.D., Hansen L. T., 2008, Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Research International, 41(2), 184-193.
- Aydın, Z., Akbuğa, J., 1996, Preparation and evaluation of pectin beads. International Journal of Pharmaceutics, 137(1), 133-136.
- Berrada, N., Lemeland, J., Laroche, G., Thouvenot, P., Piaia, M., 1991, *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. Journal Dairy Science, 74, 409-413.
- Can, A., Özçelik, B., 2003, Prebiyotik süt ürünleri ve insan sağlığı üzerindeki etkileri. SEYES 2003, Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 22-23 Mayıs, İzmir, Bildiri No: P64, 257-261.
- Chamdramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M., 2004, An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. Journal of Microbiological Methods, 56, 27-35.
- Champagne, C. P., Gaudy, C., Poncelet, D., Neufeld, R. J. 1992, *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. Applied and Environmental Microbiology, 58 (5), 1429-1434.

- Champagne, C. P., Fustier, P., 2007, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Charpentier, C. A., Gadille, P., Digat, B., Benoit, J. P., 1998, Microencapsulation of rhizobacteria by spray-drying: formulation and survival studies. *Journal of Microencapsulation*, 15, 639-659.
- Chou, L. and Weimer, B., 1999, Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal Dairy Science*, 82, 23-31.
- Christiansen, P. S., Edelsten, D., Kristiansen, J. R., Nielsen, E.W., 1996, Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*, *Milchwissenschaft*, 51 (9), 502-504.
- Clark, P. A., Cotton, L. N., Martin, J. H., 1993, Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II. Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* 28 (4), 11-14.
- Clark, P. A., Martin, J. H., 1994, Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III. Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.* 29 (3), 18-21.
- Crociani, F., Biavati, B., Alassandrini, A., Chiarini, C., Scardovi, V., 1996, *Bifidobacterium inopinatum* sp.nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp.nov., two new species isolated from human dental series. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 564-571.
- Çakır, İ. ve Çakmakçı, M. L., 2004, Probiyotikler: tanımı, etki mekanizması, seçim ve güvenilirlik kriterleri. *Gıda*, 29 (6), 427-434.
- Davidson, R. H., Duncan, S. E., Hackney, C. R., Eigel, W. N., Boling, J. W., 2000, Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *Journal Dairy Science*, 83, 666-673.

- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballaré, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garelo, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M., Capurso, L., 2006, Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38, S248-S255.
- Denkbaş, E. B., Odabaşı, M., 2000, Chitosan microspheres and sponges: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 76(11), 1637-1643.
- Ding, W. K., Shah, N. P., 2007, Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), 446-450.
- Dziezak, J. D., 1988, Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 42, 136-151.
- Eikmeier, H., Rehm, H. J., 1987, Stability of calcium-alginate during citric acid production of immobilized *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 105-111.
- Fooks, L. J., Fuller, R., Gibson, G. R., 1999, Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9, 53-61.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B., 1995, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.
- Godward, G., Kailasapathy, K., 2003, Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in Ice cream. *Milchwissenschaft*, 58, 161-164.
- Gombotz, W. R., Wee, S. F. 1998, Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 276-285.
- Gouin, S., 2004, Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.

- Hagen, M. and Narvhus, J. A., 1999, Production of ice cream containing probiotic bacteria, *Milchwissenschaft*, 54 (5), 265-268.
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., Paulson, A. T., 2002, Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19 (1), 35-45.
- Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., Fleet, G. H., 2004, Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 37, 461-466.
- Hekmat, S. and McMahon, D. J., 1992, Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal Dairy Science*, 75, 1415-1422.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, H., 1998, Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 85-101.
- Holzapfel, W. H., Schillinger, U., 2002, Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116.
- Hood, S. K., Zottola, M., L., 1998, Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cell. *Journal of Food Science*, 53, 1514-1516.
- Hoover, D. G., 1993, Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Technol.* 47, 120-124.
- Hyndamn, C. L., Groboillot, A. F., Poncelet, D., Champagne, C. P., Neufeld, R. J., 1993, Microencapsulation of *Lactococcus lactis* with cross-linked gelatin membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56(3), 259-263.
- <http://www.gidabilimi.com/haberler/1-son-haberler/2219-dondurma-timi-art>
- Ishibashi, N., Shimamura, S., 1993, Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technol.* 6, 126-136.

- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C., 2004, Probiotics. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 18 (2), 299-313.
- Iwana, H., Masuda, H., Fujisawa, T., Suzuki, H., Mitsuoka, T., 1993, Isolation and identification of *Bifidobacterium* spp. in commercial yogurts sold in Europe. Bifido. Microflora 12, 39-45.
- Jackson, L. S., Lee, K., 1991, Microencapsulation and the food industry. Lebensmittel Wissenschaft Technologie, 24(4), 289-297.
- Jain, A., Gupta, Y., Jain, S. K., 2007, Potential of calcium pectinate beads for target specific drug release to colon. Drug Development and Industrial Pharmacy, 25 (12), 1271-1276.
- Jankowski, T., Zielinska, M., Wysłowska, A., 1997, Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. Biotechnology Techniques, 11(1), 31-34.
- Kalantzopoulos, G., 1997, Fermented products with probiotics qualities. Anaerobe, 3, 185-190.
- Kandler, O., Weiss, N. 1986, Genus *Lactobacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Mair, N., Sharpe, E., Holt, J. G. (eds.), Vol. 2, Williams and Wilkins, New York, pp.1209-1234.
- Khalida, S., Georgia, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K., 2000, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. International Journal of Food Microbiology, 62, 47-55.
- Khalil, A. H., Mansour, E. H., 1998, Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. Journal of Food Science, 6(4), 702-705.
- Kim, I. K., Baek, Y. J., Yoon, Y. H., 1996, Effects of rehydration and immobilisation in Ca-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. Korean Journal of Dairy Science, 18(3), 193-198.

- Kim, S., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O., Shin, S., Cha, D. S., Park, H. J., 2008, Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. LWT-Food Science and Technology, 41(3), 493-500.
- Klaenhammer, T. R. and Kullen, M. J., 1999, Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 50, 45-57.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2003, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal, 13, 3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2004, The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. International Dairy Journal, 14, 737-743.
- Krochta, J. M., De Mulder-Johnston, C., 1997, Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. Food Technology, 51, 61-74.
- Kurmann, J. A., Rasic, J. L., 1991, The health potential of products containing bifidobacteria. Elsevier Appl. Food Sci. Ser. pp. 117-157.
- Lankaputhra, W. E. V., Shah, N. P., 1995, Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. Cultured Dairy Products Journal, 30(3), 2-7.
- Larisch, B. C., Poncelet, D., Champagne, C. P. 1994, Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Journal of Microencapsulation, 11(2), 189-195.
- Lee, Y., Salminen, S. 1995, The coming of age of probiotics. Trends in Food Science & Technology, 6(7), 241-245.
- Lee, K., Heo, T., 2000, Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Applied and Environmental Microbiology, 66 (2), 869-873.

- Lian, W., Hsiao, H., Chou, C., 2003, Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 293-301.
- Liserre, A. M., Ré, M. I., Franco, B. D. G. M., 2007, Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, 21(1), 1-16.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C., 2001, Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1-17.
- Mandal, S., Puniya, A. K., Singh, K., 2006, Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190-1195.
- McKnight, C. A., Ku, A., Goosen, M. F. A. 1988, Synthesis of chitosan-alginate microcapsule membranes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 3(8), 334-354.
- McNaught, C. E., MacFie, J., 2001, Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutrition Research*, 21, 343-353.
- Mitsuoka, T., 1982, Recent trend in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, 1, 3-24.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., Sohrabvandi, S., 2007, Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1-18.
- Mosilhey, S. H., 2003, Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Doktora tezi olarak hazırlanmıştır. (http://hss.ulb.uni-bonn.de/ulb_bonn/diss_online/landw_fak/2003/mosilhey_sameh_hassan/0154.pdf)

- Nahaisi, M.H., 1986, *Lactobacillus acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. Developments in Food Microbiology, vol. 2, London, Elsevier Applied Science Publishers, p. 153-178.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A. 1999, Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB), Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38(1), 13-126.
- Onsøyen, E., 1992, Alginates. Thickening and Gelling Agents for Food. Imeson, A. (Ed.), 1st edition, London, Chapman & Hall, pp. 1-24.
- Palmer, G. H., Dixon, D. G., 1966, Effect of pectin dose on serum cholesterol levels. American Journal of Clinical Nutrition, 18, 437-442.
- Park, J. K., Chang, H. N., 2000, Microencapsulation of microbial cells. Biotechnology Advances, 18(4), 303-319.
- Pereira T., Millar T.J., Chuck J. 2005, Viability analysis of alginate encapsulated micro-organisms using fluorescent stains. Journal of Microencapsulation, 22(7), 787-792.
- Picot, A., Lacroix, C., 2004, Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. International Dairy Journal, 14, 505-515.
- Pochart, P., Marteau, P., Goderel, B. Y., Bourlioux, P. I., Rambaun, J. C., 1992, Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. Am. J. Clin. Nutr. 55, 78-80.
- Ravula, R. R., Shah, N. P., 1998, Viability of probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. Food Australia, 50(3), 136-139.
- Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., Champagne, C. P., 2005, Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. Journal of Microencapsulation, 22(6), 603-619.

- Reuter, G., 1990, Bifidobacteria cultures as components of yogurt-like products. *Bifido Microflora* 9, 107-118.
- Richardson, D., 1996, Probiotics and product innovation. *Nutrition & Food Science*, 96 (4), 27-33.
- Roberfroid, M. B., 2000, Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.*, 71(suppl):1682S-7S.
- Rogosa, M., 1974, *Bifidobacterium*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Buchanan, R. E. and Gibsons, N. E. (Eds.), 8th Ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 669.
- Rubinstein, A., Radai, R., Ezra, M., Pathak, S., Rokem, J. S., (1993). In vitro evaluation of calcium pectinate: potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharmaceutical Research*, 10, 258-263.
- Saarela, M., Mogensen G., Fonden, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T., 2000, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Review article. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminenand, S., Mattila-Sandholm, T., 2002, Gut bacteria and health foods - the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 99-117.
- Sanders, M. E., 1998, Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 341-347.
- Savage, D. C., 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31, 107-133.
- Scheinbach, S., 1998, Probiotics: Functionality and commercial status. *Biotechnology Advances*, 16 (3), 581-608.
- Schiffrin, E. J., Blum, S., 2001, Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(5), 499-502.

- Shah, N. P., Lankaputhra, W. E. V., 1997, Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. International Dairy Journal, 7, 349-359.
- Shah, N. P., 2000, Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci. 83, 894-907.
- Shah, N. P., Ravula, R. R., 2000, Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. Australian Journal of Dairy Technology, 55, 139-144.
- Shah, N. P., 2001, Functional foods from probiotics and prebiotics. Food Technology, 55 (11), 46-53.
- Shahidi, F., Han, X., 1993, Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33(6), 501-547.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T., Heymann, H., 1993, Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. Journal of Dairy Science, 76 (7), 1902-1907.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T., 1993, Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. Journal of Food Science, 58(3), 557-561.
- Shortt, C., 1999, The probiotic century: historical and current perspectives. Trends in Food Science & Technology, 10, 411-417.
- Sriamornsak, P., Nunthanid, J., 1998. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. International Journal of Pharmaceutics, 160, 207-212.
- Sriamornsak, P., Nunthanid, J., 1999. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: II. Effect of formulation and processing variables on drug release. J. Microencapsulation, 16 (3), 303-313.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K., 2000, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-

- starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55.
- Sun, W., Griffiths, M. W., 2000, Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 17-25.
- Sungthongjeen S., Pitaksuteepong, T., Somsiri, A., Sriamornsak, P., 1999, Studies on pectins as potential hydrogel matrices for controlled-release drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25 (12), 1271-1276.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K., 2004, The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 5, 1-8.
- Tamime, A. Y., Marshall, V. M. E., Robinson, R. K., 1995, Microbiological and technological aspects of milks fermented by Bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*, 62, 151-87.
- Tsen, J., Huang, H., Lin, Y., King, V. A., 2007, Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *Journal of Microbiological Methods*, 70(3), 561-564.
- Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W., Gibson, G. R., 2003, Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8 (15), 692-
- Turgut, T., Çakmakçı, S., 2003, Probiyotik bakterilerin dondurma üretiminde kullanımı. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu (SAYES)*, 22-23 Mayıs, İzmir, Bildiri No:P75, 277-281.
- Vandemme, Th. F., Lenourry, A., Charrueau, C., Chaumeil, J. C., 2002. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, 48, 219-231.

- Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A., 2003, Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895-904.
- Wakerly, Z., Fell, J. T., Attwood, D., Parkins, D. A., 1996, In vitro evaluation of pectin-based colonic drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 129(1-2), 73-77.
- Wang, Q., Pagan, J., Shi, J., 2002. Pectin from Fruits. *Functional foods: Biochemical and Processing Aspects*. Shi, J., Mazza, G. and Maguer, M. (eds.), CRC Press LLC, pp. 263-309.
- Wells, A. F., Ershof, B. H., 1961, Beneficial effects of pectin in prevention of hypercholesterolemia and increase in liver cholesterol in cholesterol-fed. *Journal of Nutrition*, 74, 87-92.
- Wong, T. W., Lee, H. Y., Chan, L. W., Heng, P. W. S., 2002, Drug release properties of pectinate microspheres prepared by emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2), 233-237.
- Yaeshima, T., 1996. Benefits of bifidobacteria to human health. *IDF Bulletin*. 313, 36-42.
- Yıldırım, Z., Bayram, M., Yıldırım, M., 2003, Probiyotik, Prebiyotik ve insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu (SAYES)*, 22-23 Mayıs, İzmir, Bildiri No:P66, 267-272.
- Yücecan, S., 2001, Sağlıklı yaşam süresinde fonksiyonel besilerin yeri ve önemi, *Dünya Sağlık Örgütü Türkiye İrtibat Ofisi, Gıda ve Beslenme Bülteni*, Ekim 2001, Ankara, <http://195.142.135.65/who/index.html>
- Ziemer, C. J., Gibson, G. R., 1998, An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8, 473-479.

EKLER

EK 1. Besiyerleri ve Çözeltiler

Temel Besiyeri-A:

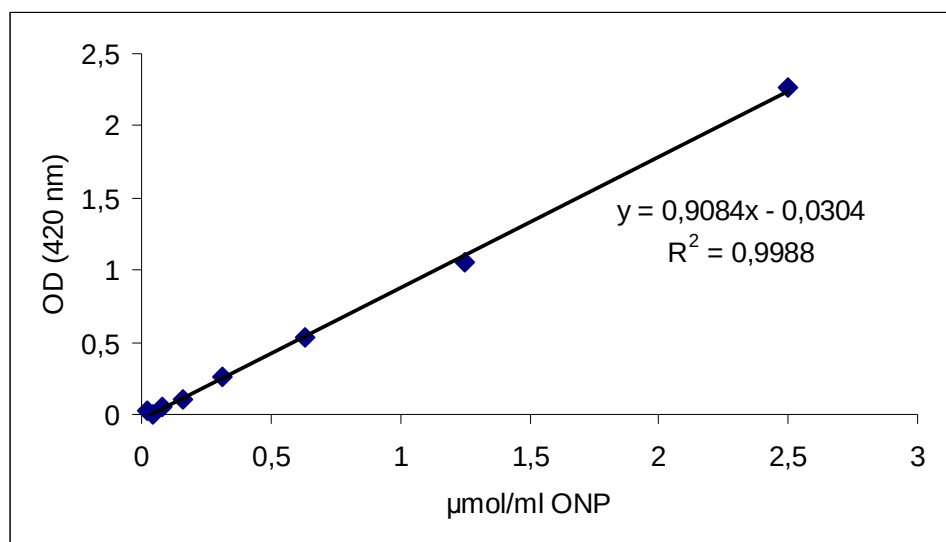
Bileşen	Miktar (gr)
Pepton from casein	10.0
Meat extract	8.0
Yeast extract	4.0
dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Tween® 80	1.0
di-ammonium hydrogen citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
Magnesium sulfate	0.2
Manganese sulfate	0.04
Distile su	1000 ml

Temel Besiyeri-B:

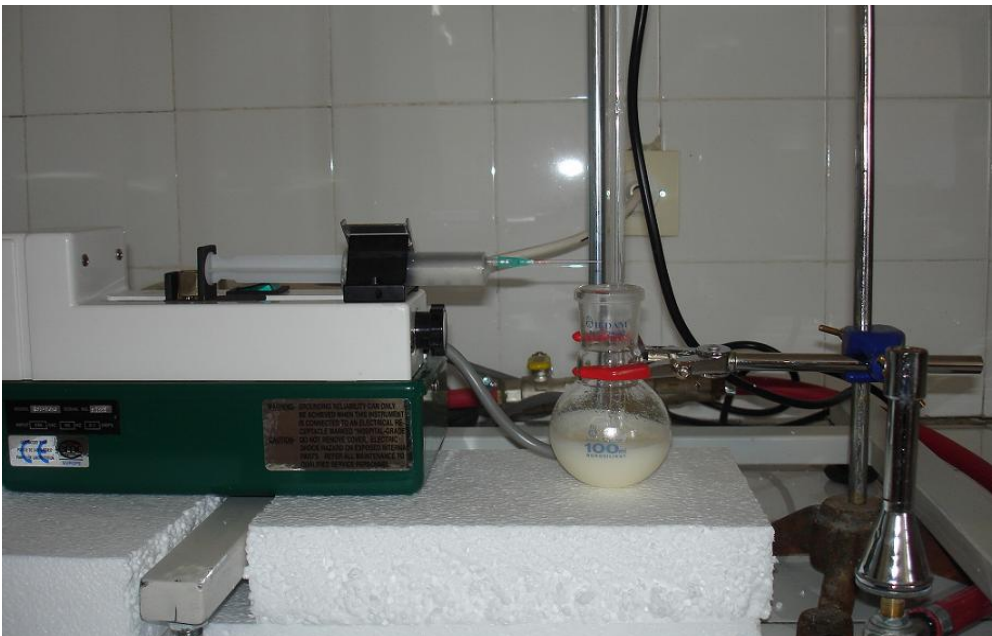
Bileşen	Miktar (gr)
Meat extract	10.0
Peptone	5.0
Yeast extract	3.0
Starch	1.0
NaCl	5.0
Sodium acetate	3.0
L-Cysteinium chloride	0.5
Distile su	1000 ml

Z tamponu: 0.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 ml 1 M KCl, 0.05 ml 1 M MgSO_4 ve 0.135 ml β -mercaptoethanol 50 ml saf su içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır.

EK 2. ONP Grafiği



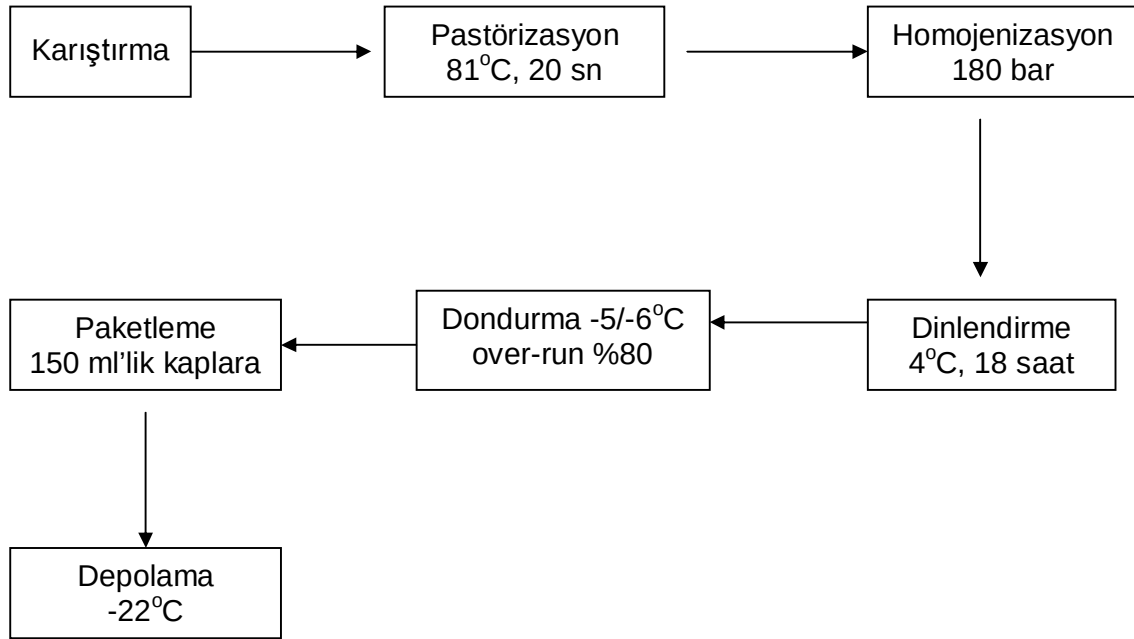
EK 3. Mikrokapsül Hazırlama Düzeneği



EK 4. Dondurma üretiminde kullanılan klasik sade dondurma bileşimi

Bileşenler	Miktar (%)
Süt kreması	17.90
Şeker	19.00
Emülgatör karışımı	0.30
Yağsız süt tozu	3.70
Peynir suyu protein konsantratu	1.30
Peynir suyu tozu	4.50
Stabilizatör	0.36
Su	52.85

EK 5. Dondurma üretimi akım şeması



EK 6. Dondurma örnekleri için duyuşal muayene değeriendirme puan cetveli

Özellik	Nitelik	Puan
Renk ve Görünüş	ÇOK İYİ	5
	İYİ a) Net olmayan renk b) Görünümü biraz bozuk	4
	AZ KUSURLU a) Tabii olmayan renk	3
	KUSURLU a) Görünüm çok bozuk	2
Yapı ve Kıvam	ÇOK İYİ	5
	İYİ a) Sert ve sıkı	4
	AZ KUSURLU a) Delikli hava kabarcıklı b) Yapışkan c) Gevşek dağılan d) Çamurumsu, ıslak	3
	KUSURLU a) Kristalleşmiş	2
Tat ve Koku	ÇOK İYİ	5
	İYİ a) Düşük asitlik (çeşidine göre) b) Şeker azlığı (çeşidine göre) c) Şeker fazlalığı (çeşidine göre)	4
	AZ KUSURLU a) Acı, yanığımı, maltımsı b) Sütten gelebilecek yem kokusu c) Aroma eksikliği d) Aroma fazlalığı e) Pişmiş tat f) Yüksek asitlik	3
	KUSURLU a) Küf tadı b) Ekşimsi c) Mayamsı d) Acı ve sabunumsu	2
Toplam Kabul Edilebilirlik	ÇOK İYİ (Çok beğendim)	5
	İYİ (Tüketebilirim)	4
	AZ KUSURLU (Düzeltilmeli)	3
	KUSURLU (Hiç beğenmedim)	2

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ayla ŞENER

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1978

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 1993-1995 Farabi Lisesi-Ankara

Lisans : 1995-2000 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği
Bölümü - Ankara

Yüksek Lisans : 2000-2003 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği
Bölümü - Ankara

Doktora : 2003- Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği
Bölümü - Ankara

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi 2003-2009 Araştırma Görevlisi
Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği
Bölümü - Ankara

2009- Mühendis
Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve
Kontrol Genel Müdürlüğü - Ankara