

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
2019-YL-017

KEÇİ SÜTÜ BAZLI DEVAM FORMÜLÜNDE
LACTOBACILLUS VE *BIFIDOBACTERIUM* GİBİ
PROBİYOTİKLERİN KULLANIMI VE
BUNLARIN GELİŞİMİ ÜZERİNE
OLİGOSAKKARİTLERİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Rana AĞALDAY

Tez Danışmanı:
Dr. Öğr. Üyesi Selda BULCA

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Rana AĞALDAY tarafından hazırlanan “Keçi Sütü Bazlı Devam Formülünde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* Gibi Probiyotiklerin Kullanımı ve Bunların Gelişimi Üzerine Oligosakkaritlerin Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez, 25.01.2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Selda BULCA	ADÜ	
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Çisem BULUT ALBAYRAK	ADÜ	
Üye : Prof. Dr. Bedia ŞİMŞEK	SDÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN

Enstitü Müdürü

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

25/01/2019

Rana AĞALDAY

ÖZET

KEÇİ SÜTÜ BAZLI DEVAM FORMÜLÜNDE *LACTOBACILLUS* VE *BIFIDOBACTERIUM* GİBİ PROBİYOTİKLERİN KULLANIMI VE BUNLARIN GELİŞİMİ ÜZERİNE OLİGOSAKKARİTLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Rana AĞALDAY

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Selda BULCA
2019, 53 Sayfa

Bu çalışmada fruktooligosakkarit, galaktooligosakkarit ve inülinin *Lactobacillus acidophilus* (NRRL B-1910), *Bifidobacterium bifidum* (DSM 20456), *Lactobacillus plantarum* (NRRL B-4496), *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Lactobacillus rhamnosus* (NRRL B-442), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 11975), *Lactobacillus reuteri* (NRRL B-14172) ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12)'in gelişim performansı ve asitlik geliştirme özelliği üzerine etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Bunun için keçi sütü bazlı devam sütüne, prebiyotikler ve MRS broth içerisinde geliştirilen test bakterileri ilave edilmiş, 37 °C'de 24 saat inkübasyonun sonunda MRS Agar besiyeri kullanılarak test bakterisi sayımları gerçekleştirilmiştir. Sayım sonuçlarına göre FOS ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*'in birlikte kullanıldığında bakteri gelişimini artırdığı ve devam sütünün pH'sında diğer substratlardan daha hızlı düşüş sağladığı gözlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında FOS ve liyofilize formdaki *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* devam formülüne eklenmiş ve devam formülünün nem oranları, pH değeri ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*'in devam formülünde canlılığı saptanmıştır. Nem oranı ve pH değerleri anlamlı farklılık göstermemiştir. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sayısı zamanla azalmasına rağmen önerilen seviye olan 10⁶ log (kob/g)'nin altına düşmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Devam Sütü, Keçi Sütü, Oligosakkarit, Probiyotik

ABSTRACT

THE USE OF PROBIOTICS AS *LACTOBACILLUS* AND *BIFIDOBACTERIUM* IN GOAT MILK BASED FOLLOW-UP FORMULA AND INVESTIGATION OF THE EFFECT OF OLIGOSACCHARIDES ON THE GROWTH OF THESE PROBIOTICS

Rana AĞALDAY

MSc Thesis, Food Engineering Department
Supervisor: Assistant Prof. Dr. Selda BULCA
2019, 53 Pages

In this study, the influence of fructooligosaccharide, galactooligosaccharide and inulin on the growth performance and acidifying activity of *Lactobacillus acidophilus* (NRRL B-1910), *Bifidobacterium bifidum* (DSM 20456), *Lactobacillus plantarum* (NRRL B-4496), *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Lactobacillus rhamnosus* (NRRL B-442), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 11975), *Lactobacillus reuteri* (NRRL B-14172) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) were investigated *in vitro* conditions. Therefore, test bacteria developed in MRS broth and prebiotics added in the goat milk based follow-up formula and after 24 h incubation at 37 °C, test bacteria counts were performed using MRS Agar medium. According to the count of bacteria, when FOS and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* were used together, it is observed that the growth of this bacteria increased and the pH of the follow-up formula decreased rapidly. In a 2nd part of the study, lyophilized *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* was added to a follow-up formula and the moisture content, pH value of follow-up formula and the viability of the *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* were determined. The moisture contents and pH values did not show a significant difference. Although *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* counts decreased with time, they were still above the recommended level of 10⁶ log (cfu/g).

Key Words: Follow-Up Formula, Goat Milk, Oligosaccharide, Probiotic

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bana yol gösteren, ilgi ve desteğini esirgemeyen, birikimleri ile beni yönlendiren saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Selda BULCA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince destekleriyle yanımda olan saygıdeğer Prof. Dr. Atakan KOÇ hocama teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana değerli öneri ve yönlendirmeleri ile her konuda yardımcı olan, kapılarını bana açıp üretimlerimi gerçekleştirmemi sağlayan Keçicik Süt Endüstrisi ve Gıda Sanayi Ticaret A.Ş. ailesine teşekkür ederim.

Hayat boyunca maddi ve manevi destekleriyle her durumda yanımda hissettiğim, hayattaki en büyük şansım canım aileme, bu zorlu tez sürecinde de güvenlerini benden hiç esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında beni hiç yalnız bırakmayan, her türlü desteği bana sağlayan yüksek lisans grubu arkadaşlarıma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezime mali yönden destek olan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Rana AĞALDAY

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	2
2.1.1. Probiyotikler.....	2
2.2. Prebiyotikler	3
2.2.1. Oligosakkaritler	4
2.3. Keçi Sütü	5
2.4. Probiyotik Gıda	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Prebiyotikler.....	14
3.1.2. Test Bakterileri.....	14
3.1.3. Besiyeri ve Kimyasal Maddeler	14
3.1.4. Ambalaj Materyali.....	15
3.1.5. Devam Formülü Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	15
3.2. Yöntem.....	15

3.2.1. Devam Formülü Üretimi	16
3.2.2. Devam Formülünün Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi	18
3.2.2.1. Nem analizi.....	18
3.2.2.2. Yağ Analizi.....	18
3.2.2.3. Protein analizi.....	19
3.2.2.4. Kül analizi	22
3.2.2.5. pH değerinin belirlenmesi	23
3.2.2.6. Karbonhidrat miktarının belirlenmesi	23
3.2.3. Devam Formülünün Mikrobiyolojik Analizleri	23
3.2.3.1. <i>Escherichia coli</i> (kob/g) analizi.....	24
3.2.3.2. Koliform (kob/g) analizi.....	24
3.2.3.3. <i>Salmonella</i> (kob/25g) analizi.....	24
3.2.3.4. <i>Listeria monocytogenes</i> (kob/25g) analizi.....	24
3.2.3.5. <i>Cronobacter sakazakii</i> (kob/25g) analizi	25
3.2.3.6. <i>Bacillus cereus</i> (kob/g) analizi	25
3.2.3.7. Koagülaz pozitif stafilokoklar (kob/g) analizi.....	25
3.2.3.8. <i>Clostridium perfringens</i> (kob/g) analizi	26
3.2.3.9. <i>Enterobacteriaceae</i> (kob/g) analizi	26
3.2.4. Test Bakterilerinin Canlandırılması	26
3.2.4.1. PBS çözeltisinin hazırlanması	26
3.2.4.2. Bakteriyolojik peptonlu suyun hazırlanması	26
3.2.4.3. Test bakterilerinin canlandırılması	27
3.2.4.4. Santrifüj işlemi	27
3.2.4.5. Canlandırılan test bakterisi sayımları	27
3.2.5. Farklı Oligosakkaritler ile Test Bakterilerinin Gelişim Çalışması ve pH Ölçümleri	28

3.2.5.1. Devam formülüne oligosakkarit ilavesi	28
3.2.5.2. Devam formülünün yeniden sulandırılması ve başlangıç pH değerlerinin tespiti	28
3.2.5.3. Sulandırılmış devam sütüne test bakterilerinin ilavesi	29
3.2.5.4. Farklı oligosakkaritler ile test bakterilerinin gelişim çalışması ve inkübasyon sonrası pH ölçümleri.....	29
3.2.6. Probiyotikli Devam Formülü Üretimi	30
3.2.6.1. Probiyotikli devam formülünün kompozisyonunun belirlenmesi	31
3.2.6.2. Probiyotikli devam formülünün mikrobiyolojik analizleri.....	31
3.2.7. Probiyotikli Devam Formülünde Probiyotiğin Canlılık Çalışması ve Probiyotikli Devam Formülünün Nem ve pH Analizleri	31
3.2.8. İstatiksel Analizler.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Devam Formülünün ve Probiyotikli Devam Formülünün Kompozisyonu	33
4.2. Devam Formülünün ve Probiyotikli Devam Formülünün Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	34
4.3. Canlandırılan Test Bakterisi Sayımları	34
4.4. Kontrol ve Oligosakkarit Takviyeli Devam Sütünde <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> Türlerinin Gelişimi.....	35
4.5. Kontrol ve Oligosakkarit Takviyeli Devam Sütlerinin Başlangıç ve İnkübasyon Sonunda pH Değerleri.....	37
4.6. Probiyotikli Devam Formülünde Probiyotiğin Canlılık Çalışması ve Probiyotikli Devam Formülünün Nem ve pH Analizleri	39
5. SONUÇ	45
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	53

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BGLB	: Brilliant-green 2% Bile Broth
BPA	: Baird Parker Agar
FOS	: fruktooligosakkarit
GOS	: galaktooligosakkarit
Kob	: koloni oluşturan birim
MRS Agar	: De Man, Rogosa and Sharpe Agar
MRS Broth	: De Man, Rogosa and Sharpe Broth
MYP Agar	: Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine Agar
NEK	: nekrotizan enterokolit
PBS tablet	: Phosphate buffered saline tablet
TBX Agar	: Tryptone Bile X-glucuronide Agar
TPY Broth	: Tryptone Phytone Yeast Broth
TSC Agar	: Tryptose Sulfite Cycloserine Agar
VRB Agar	: Violet Red Bile Agar
VRBD Agar	: Violet Red Bile Dextrose Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Infrared nem tayin cihazı	18
Şekil 3.2. Gerber yöntemiyle yağ tayini.....	19
Şekil 3.3. Kjeldahl protein tayin cihazı	22



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çeşitli <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> türlerinin gelişimi üzerine prebiyotiklerin etkisine ilişkin seçilmiş çalışmalar	8
Çizelge 3.1. Kullanılan test bakterisi suşları	14
Çizelge 3.2. Devam formülü ve probiyotikli devam formülü üretim akım şeması	17
Çizelge 3.3. Mikrobiyolojik analiz planı.....	23
Çizelge 3.4. Örnek beslenme tablosu	29
Çizelge 3.5. Deneme planı	30
Çizelge 4.1. Üretilen devam formülünün ve probiyotikli devam formülünün kompozisyonu	33
Çizelge 4.2. Canlandırılan test bakterisi sayımları log (kob/ml).....	34
Çizelge 4.3. Kontrol ve oligosakkarit takviyeli devam sütleri içerisinde <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> türlerinin 24 saat 37 °C'de inkübasyon sonunda gelişimi log (kob/ml)	36
Çizelge 4.4. Kontrol ve oligosakkarit takviyeli devam sütlerinin başlangıç pH değerleri.....	37
Çizelge 4.5. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> türlerinin oligosakkarit takviyeli devam sütlerinde 24 saat 37°C'de inkübasyonu sonunda devam sütlerinin pH değerleri.....	38
Çizelge 4.6. Probiyotikli devam formülünde <i>Bifidobacterium animalis</i> subs. <i>lactis</i> (BB-12)'in 3 gün boyunca canlılığı ve probiyotikli devam formülünün nem değerleri	40
Çizelge 4.7. Probiyotikli devam formülünün kutu açıldıktan sonra 3 gün boyunca pH değerleri	40
Çizelge 4.8. Probiyotikli devam formülünde <i>Bifidobacterium animalis</i> subs. <i>lactis</i> (BB-12)'in 15 gün boyunca canlılığı ve probiyotikli devam formülünün nem değerleri	41

Çizelge 4.9. Probiyotikli devam formülünün kutu açıldıktan sonra 15 gün boyunca pH değerleri.....	42
Çizelge 4.10. Probiyotikli devam formülünde <i>Bifidobacterium animalis</i> subs. <i>lactis</i> (BB-12)'in 30 gün boyunca canlılığı ve probiyotikli devam formülünün nem değerleri	43
Çizelge 4.11. Probiyotikli devam formülünün 30 gün depolama süresince pH değerleri.....	43

1. GİRİŞ

Bebekler için anne sütü ideal besin kaynağıdır ve ilk 6 ay boyunca tek besin kaynağı olarak kullanılmalıdır. Fakat bazen annenin bebeği emziremediği ya da emzirmenin yetersiz kaldığı durumlarla karşılaşılabilir. Böyle durumlarda bebek formülleri ve devam formüllerinden yararlanılmaktadır.

Devam formülleri, 6 ay ve üzeri bebeklerin ve küçük çocukların dengeli beslenmesi ve diyetinin bir parçası olarak kullanıma uygundur. 6. aydan sonra tamamlayıcı beslenmeye başlama kararı bebeğin büyüme ve gelişim ihtiyaçları doğrultusunda verilmelidir (TGK, 2014).

Probiyotikler; bağırsak patojenlerinin inhibisyonu, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve bağırsaklarda mikrobiyal dengenin düzenlenmesi gibi sağlığı teşvik edici etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir (Liong, 2007).

Oligosakkaritler, prebiyotik olarak bilinir ve kalın bağırsakta patojen bakterilerin sayısını sınırlayan, probiyotik bakterilerin gelişimini destekleyen ve sindirilemeyen karbonhidratlar olarak tanımlanır (Chandan, 1997; Roberfroid, 2000; Shah, 2001; Holzapfel ve Schillinger, 2002).

Keçi sütünün ve probiyotiklerin beslenmedeki önemi bilinmektedir ve bu ürünlere ilgi günden güne artış göstermektedir. Probiyotiklerin iyi bir gelişme ve asitlendirme performansı gösterebilmesi için ona uygun bir prebiyotik madde seçilmesi de önemli bir noktadır. Ancak piyasada bulunan devam formülleri incelendiğinde çoğunun ham maddesi inek sütüdür ve keçi sütüne dayalı formülasyona sahip sınırlı sayıda ürün bulunmaktadır. Bu ürünlerin yine büyük bir çoğunluğu probiyotik ilavesizdir. Bu tezin amacı, keçi sütünün ve probiyotiklerin kullanım olanaklarının artırılmasına yönelik olarak probiyotik ve oligosakkarit ilaveli keçi sütü bazlı devam formülü üretilmesidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri; laktik asit, asetik asit, bakteriyosinler gibi maddeleri üretmeleri ile kanıtlanmış antibakteriyel etkilere sahiptirler. Böylece bağırsak ortamındaki pH'yı düşürerek patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellerler (Ceyhan ve Alıç, 2012). *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* özellikle anne sütü ile beslenen bebek bağırsak mikroflorasında yaygın olarak bulunmakta, bu bölgede toplam bakteri popülasyonunun çoğunluğunu oluşturmaktadır. Ayrıca kompleks oligosakkaritleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Garrido vd., 2013).

2.1.1. Probiyotikler

Fonksiyonel bileşenleri içeren gıdaların sayısı gün geçtikçe artış göstermektedir. Bu durum aynı zamanda bebek formülü ve devam formüllerinde de bu fonksiyonel bileşenlerin kullanılmasına olanak vermiştir. Araştırma bulguları; oligosakkaritler, prebiyotikler ve probiyotikler gibi çeşitli fonksiyonel gıda bileşenlerinin, bebeklerin bağırsak mikroflorasının bileşimi ve aktivitesinde yararlı etkilerinin bulunduğunu desteklemiştir (Mountzouris vd., 2002). En çok kullanılan fonksiyonel bileşenlerden biri probiyotiklerdir. Probiyotikler, yeterli miktarda alındığında konakta bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır (Guarner vd., 2005). Probiyotiklerin yaygın kullanım alanlarından biri gastrointestinal sistemdir.

Bebeklerde akut ishal sık görülen enfeksiyonlar arasındadır. Yapılan birçok kontrollü çalışma, probiyotiklerin çocukluk çağı akut ishallerinin süresini kısalttığını göstermektedir (Vanderhoof ve Young, 2004; O'Sullivan vd., 2005). Nekrotizan enterokolit (NEK) kanlı dışkılama ile karakterize edilen, özellikle 1500 gramın altındaki prematüreler olmak üzere yeni doğan döneminde görülen ve hayatı tehdit eden bir enfeksiyondur (Martin ve Walker, 2008). Düşük doğum ağırlıklı prematüre bebeklerin bağırsak florasında *Clostridium perfringens* ve *Escherichia coli* baskın durumdadır. Nekrotizan enterokolit (NEK) geliştiren bebeklerin %40'ında *Lactobacillus* cinsine ait türlerin oranının azalmış olduğu saptanmıştır. Bu bulgu bizlere *Lactobacillus* oranının azalması ile nekrotizan

enterokolit olasılığının artabileceğini göstermektedir (Bin-Nun vd., 2005). Probiyotiklerin antibiyotik kullanımı sonucu oluşan diyare, *Helicobacter pylori* enfeksiyonları, alerji, yüksek kolesterol üzerine de faydalarının olduğu rapor edilmiştir (Macfarlane ve Cummings, 2002).

Ayrıca gıdalardaki canlı probiyotik organizmaların, farklı kökenli diyarelerin azaltılması ve önlenmesi, bağırsak mikrobiyal dengesinin iyileştirilmesi, laktoz intoleransının hafifletilmesi, bağışıklık gücünün artırılması, antitümörjenik ve antihipertansif özellikler gibi bilimsel olarak belirlenmiş ve/veya klinik olarak kanıtlanmış sağlık etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Liong, 2007). Probiyotikler potansiyel sağlık yararları nedeniyle, genellikle süt preparatlarına sağlıklı fonksiyonel ürünler elde etmek için ilave edilmektedir (Kılıç vd., 2009; Pinto vd., 2006).

Probiyotiklerin yararlı etkiler sergilemeleri için, probiyotik organizmaların sayısının en az 10^6 kob/g olması gerektiği yapılan bazı çalışmalar ile saptanmıştır (Yeo ve Liong, 2010). Minimum terapötik doz ise günlük olarak 10^8 - 10^9 canlı hücredir ve buna da 10^6 - 10^7 kob/g canlı hücre içeren 100 g ürün tüketerek ulaşılabilir (Yeo ve Liong, 2010). Tüketicinin sağlık konusundaki farkındalığının artması, probiyotik içeren fonksiyonel gıdalara olan talebi artırmıştır (Liong, 2007).

2.2. Probiyotikler

Prebiyotikler, konakçı sağlığını artırabilen, kolonda bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyarak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen sindirilemeyen gıda bileşenleridir (Gibson ve Roberfroid, 1995). Probiyotikler, mide ve ince bağırsakta sindirilmeden kalın bağırsağa geçer ve burada bulunan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotiklerin gelişimlerini ve aktivitelerini desteklerler (Yıldırım vd., 2003). Prebiyotik özelliğe sahip en önemli gıda bileşenleri arasında fruktooligosakkarit, inülin, galaktooligosakkarit, glukooligosakkarit, ksilooligosakkarit, izomaltooligosakkarit, gentiooligosakkarit, laktuloz, laktosukroz, polidekstroz, pirodekstrin, rafinoz gelmektedir (Holzapfel ve Schillinger, 2002; Gibson ve Roberfroid, 1995; Ziemer ve Gibson, 1998).

2.2.1. Oligosakkaritler

Oligosakkaritler prebiyotik olarak bilinirler ve kalın bağırsakta patojen bakterilerin sayısını sınırlamaktadırlar. Probiyotiklerin gelişimi, ortamda oligosakkarit olarak bilinen kompleks karbonhidratların bulunması ile bağlantılıdır (Chandan, 1997; Roberfroid, 2000; Shah, 2001; Holzapfel ve Schillinger, 2002). Prebiyotikler; bifidobakteriler, laktobasiller gibi insan sağlığı için önemli bakterilerin gelişimini stimüle ederler (Holzapfel ve Schillinger, 2002). Fruktooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, ksilooligosakkaritler, laktuloz gibi pek çok ürün prebiyotik özelliğe sahiptir. Bu ürünler arasında gıda endüstrisinde özellikle bebek formüllerinde kullanılanlar çoğunlukla galaktooligosakkaritler ve fruktooligosakkaritlerdir (Garrido vd., 2013). Türk Gıda Kodeksi Devam Formülleri Tebliği'nde de (TGK, 2014) devam formüllerine fruktooligosakkaritler ve galaktooligosakkaritlerin ilave edilmesine izin verilmiştir. İlave edilmesi halinde, bunların miktarı, kullanıma hazır üründe 0,8 g/100 ml'yi geçmemelidir.

Galaktooligosakkarit, substrat olarak laktoz kullanılarak, maya veya bakterilerden elde edilen β -galaktosidazlar ile enzimatik transgalaktosilasyon ile sentezlenir (Bode, 2012).

Fruktooligosakkarit ve inülin son zamanlarda prebiyotik olarak dikkat çekmektedir. FOS, glikosidik bağlarla bağlanmış 2–10 fruktoz ünitesini içerirken, inülin, 3-60 birim arası zincirlere sahip çok çeşitli fruktanlar içerir (Rossi vd., 2005). FOS, çoğunlukla hindiba gibi *Compositae* ailesine ait bitkilerden enzimatik sentez yoluyla elde edilir ve çoğunlukla β -2,1 bağlı inülin tipli fruktoz oligomerleridir (Bode, 2012). Fruktooligosakkarit, kalsiyum ve minerallerin emilimi, şeker ve yağın gıda ürünlerinde yer değiştirmesi, kolesterolün azaltılması, çeşitli hastalıkların kontrol altına alınması gibi bilimsel olarak kanıtlanmış sağlık yararları olan, karsinojenik olmayan, düşük kalorili prebiyotiktir (Bali vd., 2015).

Memeli sütleri karşılaştırıldığında oligosakkarit içeriği en yüksek olan tür insandır (700-1200 mg/100 ml). Keçi sütü (25-30 mg/100 ml), inek sütüyle (2-3 mg/100 ml) karşılaştırıldığında yüksek oranda oligosakkarit içeriğine sahip olup, bu özelliği bakımından anne sütüne daha yakındır. Keçi sütünde bulunan oligosakkaritler miktar olarak fazla olmalarının yanında, çeşitlilik açısından da inek ve koyun sütüne göre daha zengindir (Martinez, 2006).

Son yıllardaki araştırmalar, insan sütü oligosakkaritlerinin biyoaktivitesinin anahtar yapısal unsurlarının keçi sütü içerisinde de bulunduğunu göstermektedir. Bu biyoaktif süt oligosakkaritlerinin bir kaynağı olarak keçi sütünün fonksiyonel gıda olduğu düşünölmektedir (Bode, 2012).

2.3. Keçi Sütü

Dünya piyasasını araştırdığımızda keçi sütü esaslı birçok ürün bulunmaktadır. Örneğın tam yağlı mineral ve vitamin katkılı keçi sütü tozları, koyulaştırılmış keçi sütü, keçi sütü yoğurdu tozu, çikolata ve meyve aromalı keçi yoğurdu, anne sütünü artırıcı takviye keçi sütü ve çocuklar için keçi sütü esaslı çikolatalar gibi ürünler teknolojik olarak üretilmektedir.

Ancak piyasadaki mevcut bebek formülü ve devam formüllerine bakıldığında üretimlerinde genellikle inek sütü kullanılmakta ve tasarımlarında anne sütü ile inek sütünün bileşimi arasındaki farklılık, bileşenlerden her birinin rolü, bebeğın beslenme ve bağışıklık bakımından duyduğu gereksinimler esas alınmaktadır (Gürsel, 2007).

Keçi sütünün en önemli özelliklerinden biri, inek sütüne göre hipoalerjenik olmasıdır (El-Agamy, 2007). İnek sütüne kıyasla keçi sütünün α_1 -kazein seviyesi daha düşük olduğu için daha yumuşak kazein pıhtısı oluşturur. Bu sebeple keçi sütü proteinleri, inek sütü proteinlerinden daha kolay sindirilir (Haenlein, 2004; Raynal vd., 2008; Ribeiro, 2010). Ayrıca keçi sütü, inek sütüne göre daha küçük çaplı yağ globülleri içerir. Bu küçük çaplı yağ globülleri de sütte daha homojen bir yağ dağılımı sağılar. Keçi sütü kısa ve orta zincirli tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olup, 6-10 karbonlu olanların oranı inek sütündekinin en az iki katı kadardır (Alichanidis ve Polychroniadou, 1996; Alonso vd., 1999). Orta zincirli yağ asitlerinden, özellikle kaprilik (C8:0) ve kaprik (C10:0) asitler, emilim ve metabolizma bozuklukları, kolesterol problemleri ve yetersiz beslenme bulguları sergileyen hastalarda tedavi edici nitelikler taşımaktadır (Haenlein, 2004).

Ayrıca keçi sütü inek sütünden daha etkili olarak bağışıklık sistemini güçlendirir ve antibakteriyel etkilere de sahiptir (Oliveira vd., 2015). Keçi sütü özellikle laktozdan türetilmiş kompleks oligosakkaritlerce zengindir. Keçi sütünde işlevsel

oligosakkaritlerin keşfedilmesi, insan sağlığını iyileştirme fırsatlarına olanak sağlamaktadır. Özellikle bazı oligosakkaritlerin varlığı özel önem taşımaktadır çünkü bu maddeler prebiyotik özellikleri ve patojen bağlama aktiviteleriyle sağlık avantajları sağlamaktadır. Keçi sütünün inek sütünden daha fazla sayıda oligosakkarit türleri içerdiği bildirilmiştir (Oliveira vd., 2015). Bazı çalışmalarda keçi sütü oligosakkaritlerinin *in vivo* ortamda faydalı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Keçi sütü insan sütüne oranla daha az miktarda laktoz içeriğine sahip olmasına karşın, keçi sütünün insan sütü oligosakkarit profiline inek veya koyun sütlerinden daha yakın olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, keçi sütü oligosakkaritlerinin, özellikle bebek formüllerinin takviyesi için çok umut verici bir fonksiyonel gıda özelliği taşıdığını göstermiştir. Keçi sütü oligosakkaritleri patojen bakterilerin bağırsak epitel zarına yapışmasını önler ve *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotiklerin büyümesini teşvik eder (Oliveira vd., 2015).

2.4. Probiyotik Gıda

Probiyotik gıdalar, genel olarak içerisinde raf ömrü sonuna kadar yeterli miktarda canlı probiyotik mikroorganizma ($1,0 \times 10^6$ kob/g) bulunduran ve bu canlılığı muhafaza eden ürün olarak ifade edilir (TGK, 2006). FAO ve WHO tarafından hazırlanan rapora göre de gıdalarda kullanılan probiyotikler sindirim sistemi boyunca canlı kalabilmeli, gastrik sıvılara ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalı, hızla gelişebilmeli ve bağırsak sisteminde kolonize olabilmelidir. Ayrıca, probiyotikler etkili ve güvenli olmasının yanı sıra bu etkinliğini ürünün raf ömrü boyunca da sürdürebilmelidir (Tsuda ve Miyamoto, 2010).

Süt ürünlerinde bulunan probiyotiklerin canlılık kaybından sorumlu olan ana etkenler, ürün pH'sının azalması, bakterilerin üremesinden kaynaklanan organik asitlerin birikmesidir (Shah ve Jelen, 1990). Ek olarak, bifidobakteriler anaerobik koşullarda gelişen mikroorganizmalardır ve gıdalardaki sayılarında hızlı bir düşüşün, çözünmüş oksijen, hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikalleri (Carlsson vd., 1978) gibi oksijen türevlerine veya ambalajın oksijen geçirgenliğine bağlı olabileceği saptanmıştır. Büyüme faktörlerinin mevcudiyeti, süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin canlılığını da etkilemektedir (Shah, 2000; Conesa vd., 2005).

Probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu ise “sinbiyotik” olarak bilinmektedir. Sinbiyotiğin göstereceği etki, probiyotik ve prebiyotiğin ayrı ayrı göstereceği etkiden daha fazladır. Bu nedenle fonksiyonel gıda üretim formülasyonlarında probiyotik ya da prebiyotiğin tek başına kullanılmaları yerine sinbiyotik olarak kullanılmaları önerilmektedir (Holzapfel ve Schillinger, 2002; Gibson ve Roberfroid, 1995; Ziemer ve Gibson, 1998).

Çizelge 2.1’de çeşitli *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin gelişimi üzerine prebiyotiklerin etkisine ilişkin seçilmiş çalışmalar gösterilmiş ve çalışmalarda kullanılan test bakterilerinin büyüme koşulları, kullanılan prebiyotikler ve bunların gelişme ortamıyla elde edilen bulgular özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Çeşitli *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin gelişimi üzerine prebiyotiklerin etkisine ilişkin seçilmiş çalışmalar

Kullanılan Test Bakterileri	Test Bakterisi Canlandırma Ortamı/İnkübasyon Koşulları	Kullanılan Prebiyotik/ Test Bakterilerinin Gelişme Ortamı	Bulgular	Kaynak
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (ATCC 156961), <i>Bifidobacterium breve</i> (ATCC 15700), <i>Bifidobacterium infantis</i> (ATCC 15697), <i>Bifidobacterium longum</i> (ATCC 157081)	% 0,05 L-sistein HCl ile zenginleştirilmiş MRS broth içerisinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.	Mikroorganizmalar % 2,5 oranında üç tür bebek formülüne (soya, süt veya kazein hidrolizat esaslı) ve yağsız süt içine inoküle edilip 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir.	<i>Bifidobacterium</i> suşlarının gelişiminin, kazein hidrolizat esaslı bebek formülünde en düşük ve süt bazlı bebek formülünde en yüksek olduğu saptanmıştır.	Dubey ve Mistry, 1996
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Reinforced Clostridial Medium besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.	Prebiyotik olarak FOS, inülin, GOS, soya oligosakkariti, ksilooligosakkarit ve laktuloz kullanılmıştır. Prebiyotikleri içeren temel besiyeri ortamlarının her birine <i>B. lactis</i> BB-12 kültürü % 1 oranında inoküle edilmiş 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12'nin gelişimini teşvik etmede prebiyotiklerden en çok KOS etkili olmuştur. Bunu laktuloz ve inülin izlemiştir.	Şener vd.,2008
<i>Bifidobacterium</i> FTDC 8943, <i>B. longum</i> FTDC 8643, <i>Lactobacillus</i> sp. FTDC 2113, <i>L. acidophilus</i> FTDC 8033, <i>L. casei</i> ATCC 393, <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 g L ⁻¹ L-sistein HCl ile takviye edilmiş MRS broth içerisinde 3 kez, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.	Pastörize soya sütü 10 g L ⁻¹ olacak şekilde mannitol, pektin, FOS, inülin ve maltodekstrin ile zenginleştirilmiş, 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir.	FOS ve mannitol ile takviye probiyotiklerin büyümesini teşvik etmede en yüksek etkiye sahiptir. Etki, <i>L. acidophilus</i> FTDC 8033 ile fermente edilen soya sütünde en belirgindir.	Yeo ve Liong, 2010

Çizelge 2.1. Çeşitli *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin gelişimi üzerine prebiyotiklerin etkisine ilişkin seçilmiş çalışmalar (Devamı)

Kullanılan Test Bakterileri	Test Bakterisi Canlandırma Ortamı/İnkübasyon Koşulları	Kullanılan Prebiyotik/ Test Bakterilerinin Gelişme Ortamı	Bulgular	Kaynak
<i>Lactobacillus reuteri</i> C1, C10 ve C16; <i>Lactobacillus gallinarum</i> I16 ve I26; <i>Lactobacillus brevis</i> I12, I23, I25, I218 ve I211 <i>Lactobacillus salivarius</i> I24	MRS broth içerisinde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.	Oligosakkaritler % 1 (w/v) olacak şekilde bazal MRS ortamına eklenmiştir. Oligosakkaritin, probiyotik <i>Lactobacillus</i> suşunun büyümesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için ortama <i>Lactobacillus</i> kültürü ile 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.	İzomaltooligosakkarit, 11 adet <i>Lactobacillus</i> suşunun tümü için bakteri gelişimini en fazla teşvik etmiştir. Bunu galaktooligosakkarit, gentiooligosakkarit ve fruktooligosakkaritin izlediği saptanmıştır.	Saminathan, 2011
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356, <i>L. acidophilus</i> LA-5 (Chr. Hansen), <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 15969, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 (Chr. Hansen)	MRS broth ile, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.	FOS, inülin, GOS, soya oligosakkariti, ksilooligosakkarit ve laktuloz solüsyonları ve canlandırılmış bakteri kültürleri MRS broth içerisine ilave edilip 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 ve <i>L. acidophilus</i> LA-5'in gelişimi en iyi FOS tarafından desteklenmiştir. <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 gelişimi en iyi XOS ile desteklenmiştir.	Mumcu ve Temiz, 2014
<i>Lactobacillus brevis</i> NM101-1	MRS broth içerisinde 2 kez, 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.	Prebiyotiklerin (hindiba, soğan ekstraktı, sarımsak ekstraktı, fruktooligosakkarit, laktuloz, rafinoz) tek karbon kaynağı olarak <i>L. brevis</i> 'in gelişimi üzerine etkisi 35°C'de 96 saat inkübasyon ile belirlenmiştir.	En iyi gelişim sarımsak ve soğan ekstreleri ile inkübasyon sonunda elde edilmiş, canlı hücre sayısı sırasıyla 14,55 ve 13,24 log (kob/ml) olarak kaydedilmiştir.	Gomaa, 2017

Çizelge 2.1 de görüldüğü gibi Dubey ve Mistry (1996)'in çalışmalarında soya (SB), süt (MB) veya kazein hidrolizat esaslı (CH) bebek formülü ve yağsız sütte (NM) bebek bağırsağı kökenli dört farklı *Bifidobacterium* türünün büyümesi *in vitro* olarak incelenmiştir. *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 156961), *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700), *Bifidobacterium infantis* (ATCC 15697) ve *Bifidobacterium longum* (ATCC 157081) % 0,05 L-sistein HC1 ile zenginleştirilmiş MRS brothta 37 °C'de geliştirilmiş ve % 2,5 oranında üç tür bebek formülüne (soya, süt veya kazein hidrolizat esaslı) ve yağsız süte inoküle edilip 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonundaki probiyotik sayımları; *B. bifidum* için SB'de 6,78 kob/ml, CH'de 7,04 kob/ml, MB'de 9,15 kob/ml ve NM'de 9,25 kob/ml'dir. *B. breve* için SB'de 9,08 kob/ml, CH'de 8,4 kob/ml, MB'de 9,36 kob/ml ve NM'de 9,43 kob/ml'dir. *B. infantis* için SB'de 8,38 kob/ml, CH'de 7,83 kob/ml, MB'de 8,57 kob/ml ve NM'de 8,91 kob/ml'dir. *B. longum* için SB'de 8,41 kob/ml, CH'de 7,77 kob/ml, MB'de 8,34 kob/ml ve NM'de 9,11 kob/ml'dir. *Bifidobacterium* suşlarının gelişiminin, kazein hidrolizat esaslı bebek formülünde en düşük ve süt bazlı bebek formülünde en yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuçlar *Bifidobacterium* suşlarının bebek formülündeki büyüme özelliklerinin, türe özgü ve formüle bağımlı olduğunu ve büyümenin süt esaslı formülde maksimum olduğunu göstermiştir.

Şener vd. (2008) tarafından yapılan bir başka çalışmada, çeşitli prebiyotiklerin *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin gelişim performansı üzerine etkileri araştırılmıştır. Temel gelişim besiyeri olarak karbonhidrat içermeyen RCM besiyeri kullanılmıştır. Prebiyotik olarak fruktooligosakkarit, inülin, galaktooligosakkarit, soya oligosakkariti, ksilooligosakkarit ve laktuloz kullanılmıştır. Prebiyotikleri içeren temel besiyeri ortamlarının her birine RCM besiyerinde aktifleştirilmiş *B. lactis* BB-12 kültürü % 1 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak prebiyotik madde içermeyen temel besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda RCM besiyeri kullanılarak dökme plak yöntemiyle örneklerin probiyotik sayımları gerçekleştirilmiştir. Test edilen prebiyotiklerin tümünün bakteri gelişimini teşvik ettiği saptanmıştır. Canlı bakteri düzeyinde sağlanan en yüksek artış 2,2 log(kob/ml) artışla ksilooligosakkarit kullanıldığında elde edilmiştir. Ayrıca 2,18 log(kob/ml) artış sağlayan galaktooligosakkarit ve 2,23 log (kob/ml) artış sağlayan soya oligosakkaritinin *B. lactis* BB-12 gelişimini olumlu yönde teşvik ettiği ve bu üç

prebiyotiklerin bakteri gelişimini teşvik etme bakımından yakın etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Yukarıda belirtilen prebiyotikler dışında bakteri gelişimini sırasıyla 1,99 log (kob/ml) artışla fruktooligosakkarit, 1,88 log (kob/ml) artışla laktuloz ve 1,82 log (kob/ml) artışla inülinin teşvik ettiği saptanmıştır.

Yeo ve Liong (2010)'un çalışmasında *Lactobacillus* sp. FTDC 2113, *Lactobacillus acidophilus* FTDC 8033, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Bifidobacterium* FTDC 8943 ve *Bifidobacterium longum* FTDC 8643, prebiyotik takviyeli soya sütünde gelişimleri açısından değerlendirilmiştir. FOS, inülin, mannitol, maltodekstrin ve pektin varlığında, tüm suşlar 24 saat inkübasyon sonunda 7 log (kob/ml)'nin üzerinde bir canlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Soya sütü maltodekstrin, pektin, mannitol ve FOS ile takviye edildiğinde, suşların gelişiminin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. İncelenen tüm suşların, prebiyotik eklenmiş soya sütünde, 7,08 ila 9,10 log (kob/ml) arasında değişen oranlarda geliştiği gözlenmiştir. FOS ve mannitol ile takviye probiyotiklerin gelişimini teşvik etmede en yüksek etkiye sahip olmuştur. Etki, *L. acidophilus* FTDC 8033 ile fermente edilen soya sütünde en belirgindir. Bu suşun gelişimi prebiyotik takviyesiz kontrol örneğinde 8,61 kob/ml'dir. FOS ve mannitol takviyesi ile bu suşun gelişiminin 24 saat 37 °C'de inkübasyon sonunda sırasıyla 8,98 ve 8,95 kob/ml olduğu tespit edilmiştir. FOS ve mannitol takviyesi, bu suşun gelişimini 24 saat sonra kontrolle karşılaştırıldığında, sırasıyla % 4,30 ve % 3,95 artırmıştır. Maltodekstrin ile takviye, *L. casei* ATCC 393 ve *Bifidobacterium* FTDC 8943 suşlarının gelişimini olumlu etkilemiştir. Kontrol örneğinde *L. casei* ATCC 393 suşu 7,76 kob/ml iken maltodekstrin ile takviye edilmiş soya sütünde 8,24 kob/ml'dir. Kontrol örneğinde *Bifidobacterium* FTDC 8943 suşu 8,26 kob/ml iken maltodekstrin ile takviye edilmiş soya sütünde 8,99 kob/ml olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak prebiyotik takviyesinin, büyümeyi önemli ölçüde etkilediği ancak etkinin suşa bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Saminathan vd. (2011)'in çalışmalarında, tavukların gastrointestinal sistemlerinden izole edilen 11 *Lactobacillus* suşunun (*Lactobacillus reuteri* C1, C10 ve C16; *Lactobacillus gallinarum* I16 ve I26; *Lactobacillus brevis* I12, I23, I25, I218 ve I211, *Lactobacillus salivarius* I24) büyümesi üzerine piyasada bulunan 10 oligosakkaritin (Galaktooligosakkarit, laktuloz, gentiooligosakkarit, ksilooligosakkarit, fruktooligosakkarit, izomaltoligosakkarit, Raftilose P95, Raftilose L60, Raftiline LS ve mannanoligosakkarit) etkisi *in vitro* olarak analiz

edilmiştir. Oligosakkaritler son konsantrasyonu %1 (w/v) olacak şekilde bazal MRS ortamına eklenmiştir. Oligosakkaritin, probiyotik *Lactobacillus* suşunun büyümesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için ortama *Lactobacillus* kültüründen % 1 (v/v) oranında inoküle edilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Optik yoğunlukları ölçülerek mikroorganizma gelişimi karşılaştırılmıştır. Oligosakkaritlerin kullanımı 11 adet *Lactobacillus* suşu arasında oldukça değişken olduğu ve suşa bağlı olarak önemli farklılıklara rastlandığı belirtilmiştir. İzomaltooligosakkarit, 11 *Lactobacillus* suşunun tümü için bakteri gelişimini en fazla teşvik ettiği, bunu galaktooligosakkarit, gentiooligosakkarit ve fruktooligosakkaritin izlediği saptanmıştır. Raftilose L60, Raftilose P95, Raftiline LS ve mannanoligosakkarit gibi oligosakkaritlerin, tüm *Lactobacillus* suşları tarafından daha az kullanıldığı gözlenmiştir. Sonuçlar, 11 probiyotik *Lactobacillus* suşunun oligosakkaritleri kullanma kabiliyetinin hem suşa hem de substrata bağlı olduğunu göstermiştir. Bu da uygun probiyotik ve oligosakkaritlerin seçilmesinin sinbiyotik özelliğin görülebilmesi için önemli olduğunu göstermiştir.

Mumcu ve Temiz (2014)’in çalışmasında, prebiyotik olarak kullanılan fruktooligosakkarit, inülin, galaktooligosakkarit, soya oligosakkariti, ksilooligosakkarit ve laktulozun, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *L. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen), *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15969 ve *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Chr. Hansen) suşlarının gelişme ve asitlendirme aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Prebiyotikler ve canlandırılmış bakteri kültürleri (% 1) bazal MRS broth içerisine ilave edilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda canlı hücre sayısı dökme plak yöntemiyle belirlenmiştir. Probiyotik bakterilerin, gelişme ve asitlendirme aktivitesi üzerindeki etkileri prebiyotik çeşidine bağlı olarak değişim göstermiştir. *L. acidophilus* türündeki suş farklılığı, suşların gelişme performansı ve asitlendirme aktivitesi üzerinde önemli bir etki yaratmamıştır. Buna karşılık *Bifidobacterium* cinsindeki tür farklılığının önemli etkisi olmuştur. *L. acidophilus* ATCC 4356’in (2,1 log kob/ml probiyotik artışı) ve *L. acidophilus* LA-5’in gelişimi (1,8 log kob/ml probiyotik artışı) FOS ile en yüksektir. *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12’nin gelişiminde XOS ile 2,3 log(kob/ml) artış görülmüştür. % 2 konsantrasyonda GOS, *B. bifidum* ATCC 15696’nın gelişiminde 2,4 log(kob/ml) artış ile en iyi etkiyi göstermiştir. Araştırma sonuçları bir probiyotik bakteri suşunun iyi bir gelişme ve asitlendirme

performansı gösterebilmesi için ona uygun bir prebiyotik madde seçilmesinin gerekliliğini göstermiştir.

Gomaa (2017), 6 adet ticari prebiyotiğin, (hindiba, soğan ekstraktı, sarımsak ekstraktı, fruktooligosakkarit, laktuloz, rafinoz) *Lactobacillus brevis* NM101-1'in büyümesi ve asitlendirme aktivitesi üzerindeki etkisini *in vitro* olarak araştırmıştır. Prebiyotiklerin tek karbon kaynağı olarak *L. brevis*'in gelişimi üzerine etkisi, her bir prebiyotiğin % 1 (v/v) oranında bazal MRS ortamına ilavesi ve broth ortamında inkübasyonu ile araştırılmıştır. *L. brevis* ile inokule edilen broth 35 °C'de 96 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol için sadece glukoz içeren MRS broth, negatif kontrol için hiçbir karbonhidrat kaynağı içermeyen MRS broth kullanılmıştır. Probiyotik bakteri suşunun büyüme performansı, kullanılan karbon kaynağının türüne bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Suşun başlangıçtaki canlı hücre sayısı 4,5 log (kob/ml)'dir. En iyi gelişim sarımsak ve soğan ekstraktları ile inkübasyon sonunda elde edilmiş, canlı hücre sayısı sırasıyla 14,55 ve 13,24 log (kob/ml) olarak kaydedilmiştir. Bunu 72 saat inkübasyon süresinin ardından 11,02 log (kob/ml) canlı hücre sayısı ile hindiba unu izlemiştir. Fruktooligosakkarit ve laktuloz sırasıyla 10,2 ve 9,27 log (kob/ml) 'ye ulaşan nispeten düşük büyüme etkilerine sahipken, rafinoz mikroorganizmanın gelişimini 7,5 log (kob/ml) canlı hücre sayısı ile en az etkilemiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Prebiyotikler

Kullanılan prebiyotikler; fruktooligosakkarit (Sigma-Aldrich), galaktooligosakkarit (Magazym) ve inülin (Sigma-Aldrich)'dir.

3.1.2. Test Bakterileri

Test bakterileri, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından, Akdeniz Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından ve Christian Hansen firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan test bakterileri aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.1. Kullanılan test bakterisi suşları

No	Test Bakterisi	Suş Numarası
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NRRL B-1910
2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM 20456
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NRRL B-4496
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA-5
5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	NRRL B-442
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 11975
7	<i>Lactobacillus reuteri</i>	NRRL B-14172
8	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB-12

3.1.3. Besiyeri ve Kimyasal Maddeler

Besiyeri olarak De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Broth (Merck Ürün Kodu: 1.10661.0500), MRS Agar (Merck Ürün Kodu: 1.10660.0500), Violet Red Bile (VRB) Agar (Merck Ürün Kodu: 1.01406.0500), Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar (Merck Ürün Kodu: 1.10275.0500), Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine (MYP) Agar (Merck Ürün Kodu: 1.052670500), Baird Parker (BPA) Agar (Merck Ürün Kodu: 1.05406.0500), Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar (Merck Ürün Kodu: 1.11972.0500), RAPID'*Salmonella* Ready to use 90 mm x 20 plates (Bio-Rad Ürün Kodu: 3563961), RAPID'*L. mono* Ready to use 90 mm x 20 plates (Bio-Rad Ürün Kodu: 3563964), RAPID'*Sakazakii* Ready to use 90 mm x 20 plates (Bio-Rad Ürün Kodu: 3563971), Fraser *Listeria* Selective

Enrichment Broth (Merck Ürün Kodu: 1.10398.0500) kullanılmıştır. Ayrıca Egg yolk emulsion (Merck Ürün Kodu: 1.03784.0001), *Bacillus cereus* selective supplement (Merck Ürün Kodu: 1.09875.0010), Egg yolk tellurit emulsion (Merck Ürün Kodu: 1.03785.0001), *Clostridium perfringens* supplement (Merck Ürün Kodu: 1.00888.0010), RAPID'*Salmonella* Enrichment supplement capsules (Bio-Rad Ürün Kodu: 3564710), bacteriological peptone (Oxoid Ürün Kodu: LP0037), Phosphate buffered saline tablet (Sigma-Aldrich Ürün Kodu: P4417), L-sistein HCl anhydrous (Sigma-Aldrich Ürün Kodu: C1276), %90-91'lik sülfürik asit (Merck Ürün Kodu: 1.00748.2500), n-amyl alcohol (Merck Ürün Kodu: 8.07500.2500), kjeldahl tablets (Merck Ürün Kodu: 1.15348.1000), sulfuric acid %95-97 (Merck Ürün Kodu: 1.00731.2511), boric acid (Merck Ürün Kodu: 1.00165.1000), Sodyum Hidroksit Boncuk (Tekkim Ürün Kodu: TK.170510.25006), Hydrochloric acid fuming % 37 (Merck Ürün Kodu: 1.00317.2500), anaerobic jar (Merck Ürün Kodu: 1.16387.0001), Microbiologia Anaerocult A (Merck Ürün Kodu: 1.13829.0001), Microbiologie Anaerotest (Merck Ürün Kodu: 1.15112.0001) kullanılmıştır.

3.1.4. Ambalaj Materyali

Ambalaj materyali olarak hermetik olarak kapatılmış teneke kutu kullanılmıştır. Ambalajlar, Silgan Öntaş Amb. San. ve Tic. A.Ş. (İzmir)'den temin edilmiştir.

3.1.5. Devam Formülü Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Devam formülü üretimi, Keçicik Süt Endüstrisi ve Gıda Sanayi Ticaret A.Ş. (Aydın) firmasının bebek formülü ve devam formülü fabrikasında gerçekleştirilmiştir. Devam formülü üretiminde kullanılan keçi sütü ve diğer ham maddeler yine Keçicik firması tarafından sağlanmıştır.

3.2. Yöntem

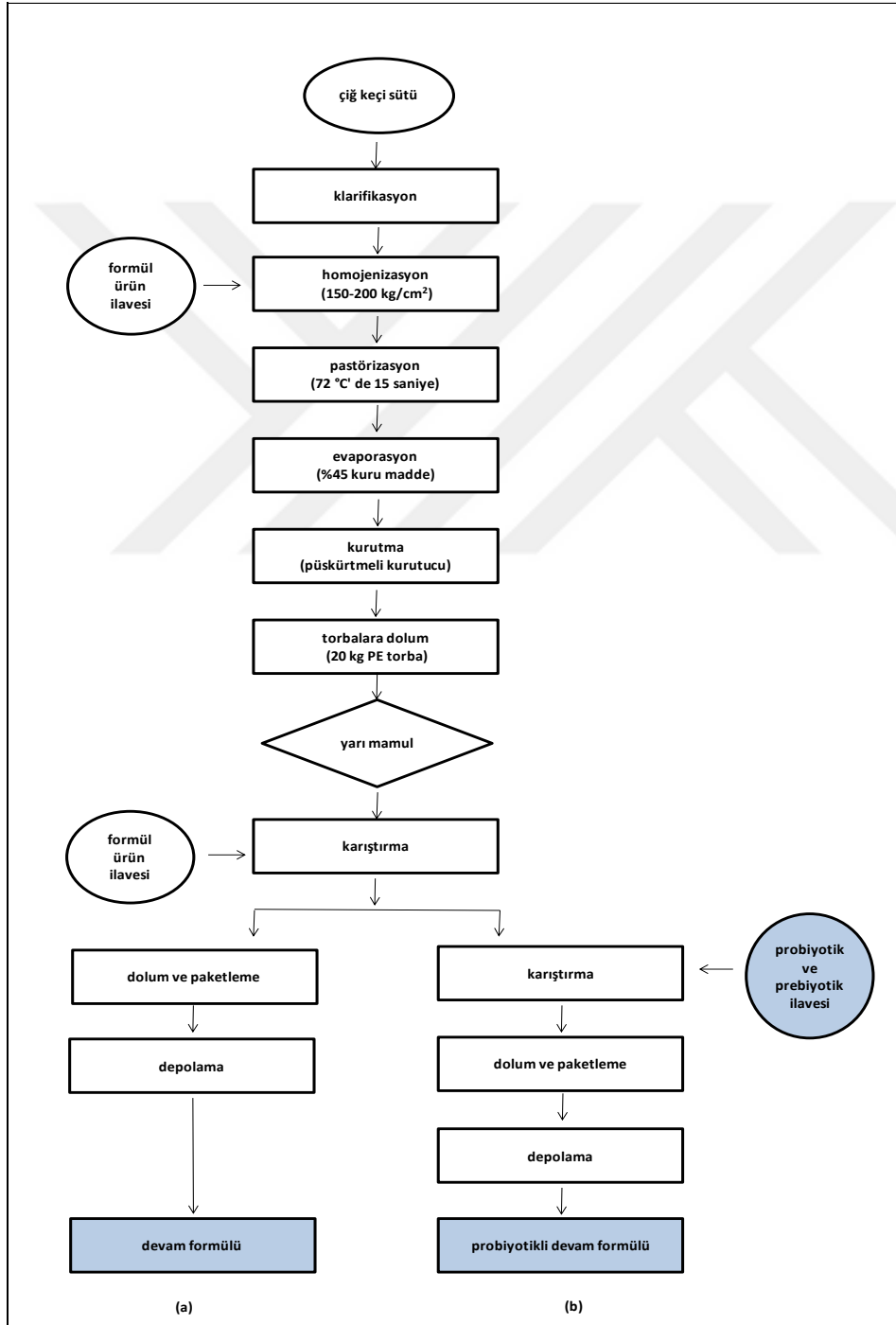
Keçicik Süt Endüstrisi ve Gıda Sanayi Ticaret A.Ş. tarafından üretilen devam formülünün kimyasal kompozisyonu belirlenmiş ve mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Devam formülündeki olası bir patojen deneyler sırasında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gelişimini baskılayabileceğinden ürünün mikrobiyolojik analizler önem taşımaktadır.

Test edilecek bakterilerin canlandırılmasının ardından, farklı oligosakkaritler ile test bakterilerinin gelişim çalışması ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Gelişim çalışması ve pH değerlerine göre seçilen test bakterisi devam formülüne ilave edilmiş ve probiyotikli devam formülü üretimi gerçekleştirilmiştir. Probiyotikli devam formülünün 3 gün, 15 gün ve 30 gün süresince nem ve pH analizleri gerçekleştirilmiş ve devam formülünde probiyotiğin canlılığı test edilmiştir.

3.2.1. Devam Formülü Üretimi

Keçicik Süt Endüstrisi ve Gıda Sanayi Ticaret A.Ş. tarafından devam formülü üretimi gerçekleştirilmiştir. Çiğ keçi sütüne klarifikasyon işleminin ardından formül ürün ilavesi yapılmış ve homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. 72 °C’de 15 saniye pastörizasyon işleminin ardından %45 kuru madde oranına kadar evaporasyon işlemi uygulanmıştır. Püskürtmeli kurutucuda kurutma işleminin ardından 20 kg’lık PE torbalara dolumla yarı mamul elde edilmiştir. Yarı mamule formül ürün ilavesinin ardından karıştırma işlemi uygulanmıştır. Dolum, paketleme ve depolama işlemleriyle devam formülü üretimi Çizelge 3.2a’de görüldüğü gibi tamamlanmıştır. Devam formülünün Türk Gıda Kodeksi Devam Formülleri Tebliği’ne (TGK, 2014) uygunluğunun belirlenmesi için kompozisyonu değerlendirilmiş ve mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır.

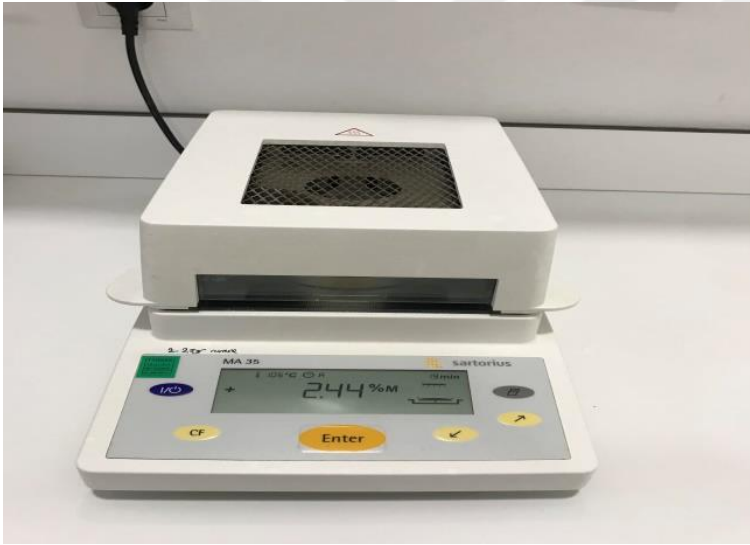
Çizelge 3.2. Devam formülü ve probiyotikli devam formülü üretim akım şeması



3.2.2. Devam Formülünün Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi

3.2.2.1. Nem analizi

Infrared nem tayin cihazı (Sartorius MA35) kullanılarak belirlenmiştir. Cihazın alüminyum ölçüm kabının darası alınarak 2,5 g numune tartılıp 105 °C’de cihaz çalıştırılmıştır. Numunenin nemin uçurularak sabit ağırlığa ulaşması ilkesine dayanarak termogravimetrik yöntem ile % nem olarak üründeki nem miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Infrared nem tayin cihazı

3.2.2.2. Yağ Analizi

Gerber Yöntemi ile yağ dışındaki bileşenlerin derişik sülfürik asit ile yakılarak amil alkol eşliğinde ayrılan yağ oranının bütirometre aracılığı ile belirlenmesi ilkesine göre üründeki yağ miktarı yüzdesel olarak belirlenmiştir (Metin ve Öztürk, 2010).

% 8’lik yağ içeriğini gösterebilen süt bütirometresine % 90-91’lik 10 ml sülfürik asit koyulmuş ve üzerine 3 ml saf su ilave edilmiştir. Hassas terzide 1,69 g devam formülü tartılarak saf suyun üzerine eklenmiştir. 1 ml amil alkol ilave edilmiştir. Bütirometre tepe boşluğuna kadar saf su ile tamamlanmıştır. Bütirometrenin ağız esnek bir tıpa ile sıkıca kapatılıp alt üst edilerek beyaz partikül kalmayıncaya

kadar iyice karışması sağlanmıştır. Bütirometrenin tıpalı kısmı alta gelecek şekilde ısıtıcılı santrifüje (Funke Gerber, Nova Safety Gerber Santrifüj) yerleştirilerek 65 °C sıcaklıkta 7 dakika, 1350 devir/dakikada santrifüj edilmiştir. Süre sonunda bütirometrenin tıpası oynatılarak içindeki yağ, skaladaki başlangıç derecesine getirilerek göz hizasında okuma yapılmıştır. Yağ miktarı aşağıdaki formülasyona göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yağ} = B \times 6,67$$

B = Bütirometrede okunan değer



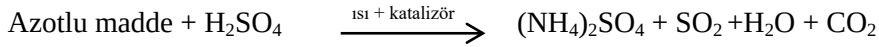
Şekil 3.2. Gerber yöntemiyle yağ tayini

3.2.2.3. Protein analizi

Protein miktarının belirlenmesinde Kjeldahl yöntemi (TS EN ISO 8968-1, 2014) kullanılmıştır. Protein tayini, kjeldahl metodu ile numunedeki nitrojenin uygun bir katalizör eşliğinde, H_2SO_4 'te parçalanıp; alkali ortamda borik asidin içinde toplanması ve standart bir asit çözeltisi ile titre edilmesine dayanır. Bulunan sonuç literatürlerde önerilen protein çevirme faktörü ile çarpılarak protein miktarı hesaplanmıştır. Kullanılan cihazlar; ön yakma ünitesi (Behr), Azot distilasyon ünitesi (Behr) ve titrasyon ünitesi (Behr)'dir.

1. Yakma

Sütün bileşimindeki azot, katalizör ve sülfürik asit varlığında amonyağa dönüştürülür ve amonyak, amonyum sülfat olarak tutulur.



amonyum
sülfat sülfür
 dioksit

2. Distilasyon

Tüpe ilave edilen NaOH amonyağı, amonyum sülfattan ayırır ve distilasyon yardımıyla ayrılan amonyak, borik asit ile amonyum borat olarak tutulur.



amonyum sülfat

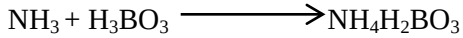
sodyum
sülfat

amonyum
hidroksit



amonyum hidroksit

amonyak

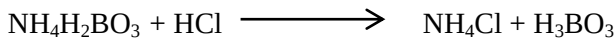


borik asit

amonyum borat

3. Titrasyon

Amonyum borat, HCl asit ile titre edilerek, azot ve buradan örnekteki protein miktarı hesaplanır.



amonyum borat

amonyum
klorür

borik
asit

- Azot tayini için, 1 g devam formülü tartılarak kjeldahl balonuna koyulmuştur. Üzerine 2 adet kjeldahl katalizör tableti ve 25 ml derişik % 95-97'lik H_2SO_4 ilave edilmiştir. Köpüklenmeyi önlemek için 2-3 damla parafin eklenmiştir. Ardından çözelti berraklaşınca kadar yakma

ünitesinde kaynatılmıştır. Kjeldahl balonundaki kaynamış ve berraklaşmış olan çözelti soğumaya bırakılmıştır.

- Kjeldahl balonu distilasyon ünitesine yerleştirilmiştir. Cihaz buhar jeneratörünü besleyen su besleyicisi ile otomatik 50 ml saf su çekmiştir. Cihaz % 4'lük borik asitten 25 ml, % 40 lık NaOH'tan 50 ml çekmiş ve 5 dakikalık distilasyon işlemi otomatik olarak başlamıştır. Böylece oluşan amonyakın (NH_3) tümü borik asit çözeltisinin içinde toplanmıştır.
- Borik asit içinde toplanan amonyak, 0,1 N HCl ile otomatik olarak titre edilmiştir. Kör deneme için tüm işlemler içerisine örnek koymadan uygulanmıştır. Harcanan HCl sarfiyatına göre cihaz aşağıdaki eşitliği kullanarak % azot'u hesaplamış ve cihaz ekranından okunmuştur.

$$\% \text{ Azot} = [(S - S_{\text{kör}}) * N * F * 0,014 * 100] / m$$

S: Titrasyonda harcanan 0,1 N HCl miktarı (ml)

$S_{\text{kör}}$: Kör deneme için harcanan 0,1 N HCl miktarı (ml)

N: HCl çözeltisinin normalitesi (0,1 N)

F: HCl çözeltisinin faktörü

m: kullanılan örnek miktarı (g)

0,014: azotun mili ekivalent ağırlığı

- Ekranda okunan % azot protein faktörü ile çarpılarak protein miktarı hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Azot} * F$$

F: Protein çevirme faktörü

Protein çevirme faktörü devam formülü için 6,25'tir.



Şekil 3.3. Kjeldahl protein tayin cihazı

3.2.2.4. Kül analizi

Üründeki organik maddeleri 550 °C 'yi geçmeyen özel yakma fırınlarında iyice yaktıktan sonra kalan kısımdan yani külden yüzde miktarın hesaplanmasını kapsar.

- Porselen kroze boş ve açık olarak 105 ± 2 °C'ye ayarlanmış etüvde 1 saat süreyle bırakılmıştır. Desikatöre alınarak oda sıcaklığına kadar soğutulup darası alınmıştır. (dara)
- Darası alınmış porselen krozeye 2-2,5 g örnek alınmış ve tartılmıştır. (numune miktarı)
- Krozeler kül fırınına koyulmuştur.
- Fırının sıcaklığı 550 °C'ye ayarlanarak çalıştırılmıştır.
- Kül fırınına koyulan kaplar örneğin bütün organik maddeleri tümüyle yanıncaya yani kül homojen beyazımsı renk alıncaya kadar bekletilmiştir.
- Desikatöre alınan örnekler soğutulup tartılmıştır. (son tartım)
- Dara ile arasındaki fark örnekteki kül miktarını vermiştir.
- Buradan kül miktarı % olarak hesaplanmıştır.
- % Kül = $\frac{(\text{Son Tartım} - \text{Dara})}{\text{Numune Miktarı}} \times 100$ eşitliğine göre hesaplanmıştır.

3.2.2.5. pH değerin belirlenmesi

Ürünün pH ölçümleri, pH metre (Mettler Toledo seven2go, Almanya) ile yapılmıştır.

3.2.2.6. Karbonhidrat miktarının belirlenmesi

% Karbonhidrat=100-(nem+protein+yağ+kül) eşitliğine göre hesaplanmıştır.

3.2.3. Devam Formülünün Mikrobiyolojik Analizleri

Türk Gıda Kodeksi Devam Formülleri Tebliği (TGK, 2014) ve Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne (TGK, 2011) göre üretilen devam formülünde mikrobiyolojik analiz planı Çizelge 3.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Mikrobiyolojik analiz planı

Mikroorganizma	Değerler				
	n	c	m	M	birim
<i>Bacillus cereus</i>	5	1	5x10 ¹	5x10 ²	kob/g
<i>Cronobacter sakazakii</i>	10	0	0/25 g		kob/25g
<i>Salmonella</i>	10	0	0/25 g		kob/25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	0/25 g		kob/25g
Enterobacteriaceae	10	0	10 g'da bulunmayacak		kob/g
<i>Clostridium perfringens</i>	5	0	0	0	kob/g
Koagülaz pozitif stafilokoklar	5	0	0	0	kob/g
<i>Escherichia coli</i>	5	0	0	0	kob/g
Koliform	5	0	0	0	kob/g

n: deney numune sayısı

c: 'm' ile 'M' arasındaki mikroorganizma sayısını bulunduran kabul edilebilir en fazla örnek sayısı

m: (n-c) deney numunesinde bulunmasına müsaade edilen mikroorganizma sayısı

M: 'c' sayısındaki deney numunesinin gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

3.2.3.1. *Escherichia coli* (kob/g) analizi

TBX Agar besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılarak 44 ± 1 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonucu oluşan mavi-yeşil renkli koloniler sayılmaktadır (TS ISO 16649-2, 2012).

3.2.3.2. Koliform (kob/g) analizi

Yeni hazırlanarak mikrodalga ya da su banyosunda eritilen VRB Agar besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapıp katılaştıktan sonra ikinci bir kat daha 4ml VRB Agar besiyeri dökülür. 30 °C'de 24 ± 2 saat inkübasyon sonucu etrafında zonlu 0,5 mm ya da daha büyük çaptaki parlak pembe-kırmızı oluşan koloniler şüpheli koloni olarak kabul edilir. Bu şüpheli kolonilerden petriyi temsil etmesi için ortalama 5 koloniden BGLB bulunan durham tüplü tüplere inokule edilir, 24 saat 30 °C' de inkübe edilir. Gaz oluşumu gözlenirse koliform için pozitif sonuç verilir. Koliform sayısı petriden sayı ile seyreltim katsayısı çarpılarak bulunur. Sonuç kob/g olarak verilir (TS ISO 4832, 2010).

3.2.3.3. *Salmonella* (kob/25g) analizi

İçerisine RAPID'*Salmonella* kapsülü eklenmiş 225 ml tamponlanmış peptonlu su içerisine 25 g örnek eklenir. $41,5\pm1$ °C'de 18 ± 2 saat inkübasyon ile ön zenginleştirmesi yapılan numune, RAPID'*Salmonella* plate üzerine öze ile önce petrinin yarısına kadar daha sonra petriyi 45 derece çevirerek yine petrinin yarısına kadar çizerek inoküle edilir, 37 ± 1 °C'de 24 ± 2 saat inkübasyon sonucu oluşan magenta renkli koloniler sayılır (TS EN ISO 6579-1, 2014).

3.2.3.4. *Listeria monocytogenes* (kob/25g) analizi

225 ml half fraser broth içerisine 25 g örnek tartılır. 30 °C'de 24 ± 2 saat inkübasyon ile ön zenginleştirmesi yapılan numuneden steril pipet ile 100 µl alınır ve RAPID'*Listeria* plate üzerine öze ile önce petri üzerinde tamamen daha sonra petriyi 45 derece çevirerek petrinin yarısına kadar çizerek inoküle edilir. 37 °C'de 24 ± 2 saat inkübasyon sonucu oluşan gri-mavi koloniler sayılır (TS EN ISO 11290-1, 2017).

3.2.3.5. *Cronobacter sakazakii* (kob/25g) analizi

225 ml tamponlanmış peptonlu içerisinde 25 g örnek tartılır. 37 °C’de 18 saat inkübasyon ile ön zenginleştirmesi yapılan numune, klasik çizme yöntemiyle RAPID’ *Sakazakii* besiyerine plate üzerine inoküle edilir ve 44 °C’de 24 saat inkübasyon sonucu oluşan mavi koloniler sayılır (ISO 22964).

3.2.3.6. *Bacillus cereus* (kob/g) analizi

450 ml MYP Agar besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra 45’ °C ye kadar soğuduğunda aseptik olarak 1 şişe *Bacillus cereus* selective supplement ve 50 ml Egg Yolk emulsion ilavesi sonrasında homojenize edilir. Daha sonra 12,5 ml olarak petrilere dökülür. Petrilere streç filmlere sarılarak buzdolabında saklanır. Örnekten yayma plak yöntemiyle ekim yapılır ve 30 °C’de 24 saat inkübasyon sonunda çevresinde opak zon oluşan pembe renkli koloniler sayılır. Reaksiyon net değilse, 24 saat daha inkübasyona bırakılır. Doğrulama testi için bu kolonilerden Nutrient agar üzerine çizim yapılır. 30 °C’de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda geniş pembe ve lesitinaz presipitasyon zonu oluşturan şüpheli kolonilerden 5 tanesi öze yardımıyla MYP Agar besiyerine ekilir ve 30±1 °C ‘de 18-24 saat inkübe edilerek saflaştırılır. Bazı *Bacillus cereus* suşlarının lesitinaz aktivitesi göstermemesi nedeniyle presipitasyon zonu oluşturmayan geniş pembe kolonilerde şüpheli koloni olarak değerlendirilmelidir. Doğrulama için hemoliz testi gerçekleştirilir.

Hemoliz Testi: kanlı agar besiyerine MYP Agar üzerindeki şüpheli kolonilerden öze ile çizgi ekim yapılır ve 30±1 °C ‘de 22±2 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda hemoliz zonu varlığı pozitif sonuç olarak kabul edilir (TS EN ISO 7932, 2009).

3.2.3.7. Koagülaz pozitif stafilokoklar (kob/g) analizi

475 ml BPA besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra 50’ °C ye kadar soğuduğunda aseptik olarak 1 şişe 25 ml Egg Yolk tellurite emulsion ilavesinden sonra homojenize edilir. Daha sonra 12,5 ml olarak petrilere dökülür. Petrilere streç filmlere sarılarak buzdolabında saklanır. Örnekten yayma plak yöntemiyle ekim yapılır ve 35±1 °C’de 24 saat inkübe edilir. 24 saat sonra mat ortamda yuvarlak, konveks, pürüzsüz, dar, parlak zonlu bölge ile çevrili, 1,5-2,5 mm çapındaki siyah-

gri, parlak ve dış bükey koloniler muhtemel koagulaz pozitif stafilokok kolonileridir.

Koagulaz Testi: Tipik kolonilere koagulaz testi uygulanır. Bunun için piyasada ticari olarak satılan koagülaz testler kullanılır. Hazır koagulaz testleri direkt tipik koloniler alınıp uygulanabilir ve aglutinasyon oluşması gözlenir (TS 6582-1 EN ISO 6888-1, 2001).

3.2.3.8. *Clostridium perfringens* (kob/g) analizi

TSC Agar besiyerine 2 katlı dökme plak yöntemiyle ekim yapılarak 37 °C’de 48 saat anaerobik inkübasyon sonucu oluşan parlak siyah koloniler sayılır (TS EN ISO 7937, 2006).

3.2.3.9. *Enterobacteriaceae* (kob/g) analizi

Yeni hazırlanarak mikrodalga ya da su banyosunda eritilen VRBD Agar besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapıp katılaştıktan sonra ikinci bir kat daha 4 ml VRBD besiyeri dökülür. 37 °C’ de 24±2 saat süren inkübasyon sonucu oluşan kolonilerden menekşemsi zon oluşturanların sayısı belirlenip kaydedilir (TS EN ISO 21528-2, 2018).

3.2.4. Test Bakterilerinin Canlandırılması

3.2.4.1. PBS çözeltisinin hazırlanması

200 ml saf suya 1 adet Phosphate buffered saline (PBS) tablet eklenmiş, magnetik karıştırıcıda homojen olarak karıştırma sonucu PBS sıvı ortamı elde edilmiştir.

3.2.4.2. Bakteriyolojik peptonlu suyun hazırlanması

0,1 g bakteriyolojik pepton tartılıp 100 ml balonjojede saf su ile tamamlanmıştır. Magnetik karıştırıcıda homojen dağılımı sağlanıp %0,1 (w/v)’lik bakteriyolojik peptonlu su elde edilmiştir. Daha sonra 9 ml’lik tüplere dağıtılıp otoklavlanmıştır.

3.2.4.3. Test bakterilerinin canlandırılması

Stok test bakterileri -20 °C’de steril gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. 1,5 g L⁻¹ L-sistein HCl ile takviye edilmiş MRS broth hazırlanmış, kültürler deneyden önce bu takviye edilmiş MRS broth (%1 v/v inokulum) ortamında 3 kez, 24 saat 37 °C’de inkübasyon ile aşağıda anlatıldığı gibi canlandırılmıştır.

Derin dondurucudaki test bakterileri kullanım durumlarına göre analiz edilmeden önce L-sistein HCl ile takviye edilmiş 2 ml’lik MRS brotha öze ile aktarılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişmeleri sağlandıktan sonra tekrar L-sistein HCl ile takviye edilmiş 2 ml’lik MRS broth ortamına 20 µl olacak şekilde pasaj işlemi uygulanmış ve yine 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme sağlandıktan sonra 30 ml’lik steril halde falkon tüplerde bulunan L-sistein HCl ile takviye edilmiş MRS brotha 300 µl olacak şekilde aktarma yapılmış ve analize hazır olmaları için 37 °C’de 24 saat gelişmeleri sağlanmıştır.

3.2.4.4. Santrifüj işlemi

MRS broth ortamında 3 kez, 24 saat 37 °C’de inkübasyon ile gibi canlandırılmış, falkon tüplerde bulunan test bakterilerine santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi 15 dakika 5000 rpm olacak şekilde yapılmıştır. Çöken test bakterilerinin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve 10 ml PBS ile vortex cihazı kullanılarak yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkama uygulandıktan sonra tekrar santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış ve yeniden 10 ml PBS ile ikinci bir yıkama işlemi uygulanmıştır. Sonrasında tekrar 15 dakika 5000 rpm’de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp PBS ile test bakterileri deneye hazır hale getirilmiştir.

3.2.4.5. Canlandırılan test bakterisi sayımları

Deneye hazır hale getirilmiş test bakterisi çözeltisinden 1 ml alınarak peptonlu su içerisinde dilüsyonlar hazırlanmıştır. 1,5 g L⁻¹ L-sistein HCl ile takviye edilmiş MRS agar kullanılarak 2 katlı dökme plak yöntemiyle 3 paralel olacak şekilde ekimler yapılmış ve 37 °C sıcaklıkta 48 saat anaerobik kavanoz ve anaerocult A yardımıyla sağlanan anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. Böylece canlandırılan test bakterisi sayımları gerçekleştirilmiştir. Anaerobik ortamın sağlanıp

sağlanmadığı anaerotest şeridi ile kontrol edilmiştir. Yaklaşık 4 saat sonunda şeridin mavi renginin renksiz olması anaerobik ortamın sağlandığının göstergesidir. Canlandırılan kültür, devam sütüne %1 (v/v) oranında 3.2.5.3'te anlatıldığı şekilde inoküle edilmiştir.

3.2.5. Farklı Oligosakkaritler ile Test Bakterilerinin Gelişim Çalışması ve pH Ölçümleri

3.2.5.1. Devam formülüne oligosakkarit ilavesi

Devam formülleri tüketime hazır hallerinde %0,8 (w/v) olacak şekilde oligosakkarit içerebilmektedir.

Tüketime hazır sulandırılmış devam sütünde %0,8 (w/v) olacak şekilde test edilecek oligosakkaritler aşağıdaki gibi ilave edilmiştir.

1. % 0,8 (w/v) olacak şekilde fruktooligosakkarit ilave edilmiştir.
2. % 0,8 (w/v) olacak şekilde galaktooligosakkarit ilave edilmiştir.
3. % 0,8 (w/v) olacak şekilde inülin ilave edilmiştir.
4. Kontrol örneği için oligosakkarit ilave edilmemiştir.

3.2.5.2. Devam formülünün yeniden sulandırılması ve başlangıç pH değerlerinin tespiti

Üretilen toz devam formülü, test bakterilerinin devam sütünde gelişimi ve devam sütünün başlangıç pH'sının belirlenmesi deneyleri için Çizelge 3.4'teki örnek beslenme tablosuna göre rekonstitüe edilmiştir. 1 ölçek toz devam formülü yaklaşık 4,3 gramdır. Yani 240 ml su içerisine 34,4 g toz devam formülü ilave edilerek devam sütü solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyon test bakterilerinin devam sütünde gelişim çalışmasında ve devam sütünün başlangıç pH'sının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Örnek beslenme tablosu

Yaş (Ay)	Su (ml)	Ölçek sayısı	Günlük Öğün Sayısı
6-12 ay	240	8	4

Zengin bir besiyeri olan MRS agarın deneyler sırasında oksidasyonunu engellemek için otoklav sonrasında 1,5 g L⁻¹ L-sistein HCl indirgeyici madde olarak kullanılmıştır. Ayrıca inokülasyondan önce sulandırılmış devam sütü de 1,5 g L⁻¹ olacak şekilde L-sistein HCl ile takviye edilmiştir.

3.2.5.3. Sulandırılmış devam sütüne test bakterilerinin ilavesi

Oligosakkarit ilavesinden sonra rekonstitüe edilmiş ve L-sistein HCl ile takviye edilmiş devam sütlerine %1 (v/v) olacak şekilde 3.2.4.4'te anlatıldığı gibi deneye hazır hale getirilen test edilecek bakteri ilave edilmiştir. 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak oligosakkarit ilave edilmemiş devam sütü inoküle edilmiştir.

3.2.5.4. Farklı oligosakkaritler ile test bakterilerinin gelişim çalışması ve inkübasyon sonrası pH ölçümleri

%1 (v/v) olacak şekilde test edilecek bakteri ilave edilip 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmış devam sütlerinde, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* kültürlerinin gelişimi, 1,5 g L⁻¹ L-sistein HCl ile takviye edilmiş MRS agar kullanılarak 2 katlı dökme plak yöntemi ile belirlenmiştir. Petriler 48 saat 37 °C'de anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda pH ölçümleri yapılmıştır. Deneme planı Çizelge 3.5'te görülmektedir.

Çizelge 3.5. Deneme planı

Deneme No	Kullanılan Test Bakterisi	Kullanılan Oligosakkarit
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)	kontrol
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)	FOS
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)	inülin
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)	GOS
5	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)	kontrol
6	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)	FOS
7	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)	inülin
8	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)	GOS
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)	kontrol
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)	FOS
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)	inülin
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)	GOS
13	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	kontrol
14	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	FOS
15	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	inülin
16	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	GOS
17	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)	kontrol
18	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)	FOS
19	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)	inülin
20	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)	GOS
21	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	kontrol
22	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	FOS
23	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	inülin
24	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	GOS
25	<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)	kontrol
26	<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)	FOS
27	<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)	inülin
28	<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)	GOS
29	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)	kontrol
30	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)	FOS
31	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)	inülin
32	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)	GOS

3.2.6. Probiyotikli Devam Formülü Üretimi

Kullanılan oligosakkaritler ile gelişme kabiliyetlerine ve devam sütünün pH düşüşüne göre seçilen probiyotik (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12) ve oligosakkarit (FOS) ilave edilerek probiyotikli keçi sütü bazlı devam formülü üretilmiştir.

Probiyotikli devam formülü üretim akım şeması (Çizelge 3.2b), probiyotik ve prebiyotiğin eklendiği aşamayı göstermektedir. Formül ürün karıştırıldıktan sonra liyofilize formdaki *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12 (Christian Hansen, İzmir) eklenmiştir. Bu işlem hijyen önlemleri alınarak, ürünün oksidasyonunu ve probiyotiklerin sayısının azalmasını önlemek için nitrojen açısından zengin bir atmosferde gerçekleştirilmiştir.

Probiyotikli devam formülünün içerisine eklenen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) ve FOS'un varlığı dışında devam formülü (Çizelge 3.2a) ve probiyotikli devam formülü (Çizelge 3.2b) aynı bileşenlere sahiptir.

Üretilen probiyotikli devam formülü net ağırlığı 400 gram olacak şekilde teneke kutu ile hermetik olarak kapatılmıştır.

3.2.6.1. Probiyotikli devam formülünün kompozisyonunun belirlenmesi

Üretilen probiyotikli devam formülünün, 3.2.2'de açıklandığı gibi nem, yağ, protein, kül ve karbonhidrat analizleri yapılmıştır ve böylece devam formülünün kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir.

3.2.6.2. Probiyotikli devam formülünün mikrobiyolojik analizleri

Probiyotikli devam formülünün mikrobiyolojik analizleri 3.2.3'te açıklandığı gibi yapılmıştır.

3.2.7. Probiyotikli Devam Formülünde Probiyotiğin Canlılık Çalışması ve Probiyotikli Devam Formülünün Nem ve pH Analizleri

Çizelge 3.4'teki örnek beslenme tablosuna göre günlük devam formülü tüketim miktarı; $4,3 \text{ gram} \times 8 \text{ doz} \times 4 \text{ günlük öğün sayısı} = 137,6 \text{ gram} / \text{gün'dür}$. Ambalajlı 400 gramlık probiyotikli devam formülünün bitme süresi yaklaşık 3 gündür.

Üç günlük çalışmada probiyotikli devam formülü tüketimi, evde annelerin devam formülünü kullanımı taklit edilerek tasarlanmıştır. Birinci gün, kutu açılmıştır ve takip eden her gün, bebek tarafından günlük olarak tüketilmesi gereken miktarda probiyotikli devam formülü kutudan alınmış ve tüm ambalaj (400 g) bitinceye

kadar yani 3 gün boyunca devam formülünün nem analizleri, pH analizleri ve devam formülünde probiyotiğin canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir.

İkinci bir çalışmada kutu açıldıktan sonra 15 gün süresince devam formülünün nem analizleri, pH analizleri ve devam formülünde probiyotiğin canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz edilecek bir numune alındıktan sonra kalan probiyotikli devam formülü oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Üretilen probiyotikli devam formülünün 400 gramlık kapalı teneke kutuda 1 ay boyunca depolanması süresince de devam formülünün nem analizleri, pH analizleri ve devam formülünde probiyotiğin canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz edilecek bir numune alındıktan sonra kalan probiyotikli devam formülü oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Canlılık analizleri için probiyotikli devam formülünden 10 g alınıp 90 ml PBS içerisinde (Macfarlane ve Englyst 1986; Ingham 1999) süspanse edilmiş (ilk dilüsyon) ve 30 dakika oda sıcaklığında numunenin dağılımına kadar tutulmuştur. Daha sonra bu ilk dilüsyondan başlayarak % 0,1 lik peptonlu su içerisinde seri dilüsyonlar hazırlanmış ve numunenin seri dilüsyonlarından 3'er paralel olarak çalışılmıştır.

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* (BB-12) sayımı L-sistein HCI ile desteklenmiş MRS agar ile 2 katlı dökme plak yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Petriler, 37 °C'de 48 saat süreyle anaerobik olarak inkübe edilmiş, sonuçlar log (kob/g) olarak belirlenmiştir.

3.2.8. İstatiksel Analizler

Devam sütlerine inkübasyon öncesi eklenen farklı oligosakkaritlerin, devam sütlerinin başlangıç pH'sı, inkübasyon sonundaki pH'sı, inkübasyon sonundaki test bakterisi sayısı üzerine etkisi ANOVA analizi gerçekleştirilerek SPSS paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen verilere Duncan Çoklu Karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Devam Formülünün ve Probiyotikli Devam Formülünün Kompozisyonu

Devam formülünün ve probiyotikli devam formülünün kuru madde, protein, yağ, karbonhidrat, kül ve nem değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Üretilen devam formülünün ve probiyotikli devam formülünün kompozisyonu

	Devam Formülü	Probiyotikli Devam Formülü
Nem (%)	2,53 ± 0,04	2,47 ± 0,036
Protein (%)	14 ± 0,065	13,1 ± 0,035
Yağ (%)	26,9 ± 0,381	25,13 ± 0,387
Kül (%)	2,94 ± 0,051	2,95 ± 0,05
Karbonhidrat (%)	53,66 ± 0,309	56,36 ± 0,333

Sonuçların uygunluğu Türk Gıda Kodeksi Devam Formülleri Tebliği’ne (TGG, 2014) göre kontrol edilmiş ve uygun bulunmuştur.

Bu konuda yapılan araştırmalar tarandığında çok fazla çalışmanın yapılmadığı görülmüş ve en yakın çalışma olarak da Dubey ve Mistry (1996)’nin yaptığı araştırma bulunmuştur. Bu çalışmada soya (SB), süt (MB) veya kazein hidrolizat esaslı (CH) bebek formülü ve yağsız sütte (NM) kimyasal kompozisyon belirlenmiştir. Tüketime hazır halde protein miktarı; SB’de %1,8, CH’de %2, MB’de %1,5 ve NM’de %3,5’dur. Yağ miktarı; SB’de %3,6, CH’de %2,7, MB’de %3,5 ve NM’de %0,07’dir. Kül miktarı; SB’de %0,37, CH’de %0,34, MB’de %0,26 ve NM’de %0,61’dir. Karbonhidrat miktarı; SB’de %6,6, CH’de %8,6, MB’de %7,1 ve NM’de %5’dir. Dubey ve Mistry (1996)’nin çalışmasında tüketime hazır bebek formülü ile çalışılmış olup, bizim ürünümüzün tüketime hazır haldeki protein, yağ, karbonhidrat ve kül değerlerinin Dubey ve Mistry (1996)’nin süt bazlı bebek formülü ile yaptığı çalışma sonuçları ile paralellik gösterdiği saptanmıştır.

4.2. Devam Formülünün ve Probiyotikli Devam Formülünün Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Devam formülü ve probiyotikli devam formülü örneklerinin hiçbirinde Koliform, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, Koagulaz pozitif stafilokoklar, *Clostridium perfringens* ve *Enterobacteriaceae*’e rastlanmamıştır. Bulunan bu sonuçlar Türk Gıda Kodeksi Devam Formülleri Tebliği (TGK, 2014) ve Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği’ne (TGK, 2011) uygun olduğu saptanmıştır.

4.3. Canlandırılan Test Bakterisi Sayımları

Canlandırılan test bakterisi sayımları log (kob/ml) olarak Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelge 4.2’de verildiği gibi canlı bakteri sayısı, test bakteri suşuna bağlı olarak $8,87 \pm 0,05$ ve $9,25 \pm 0,019$ arasında değişmektedir.

Çizelge 4.2. Canlandırılan test bakterisi sayımları log (kob/ml)

Canlandırılan Test Bakterisi Sayımları log (kob/ml)	Test Bakterisi Suşu
$8,87 \pm 0,05$	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)
$9,08 \pm 0,011$	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)
$9,18 \pm 0,027$	<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)
$8,93 \pm 0,031$	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)
$9,25 \pm 0,019$	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)
$9,12 \pm 0,017$	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)
$9,16 \pm 0,026$	<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)
$9,02 \pm 0,019$	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)

Bizim çalışmamızda canlandırılan test bakterisi sayımları önerilen ekleme miktarı olan 6 log (kob/ml)’nin üzerindedir. Canlandırılan bu test bakterileri %1 (v/v) olacak şekilde devam sütüne ilave edilmiştir.

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* ile çalışılan ve canlı bakteri sayımları yapılan yayınlar incelendiğinde Conesa vd. (2005)’nin çalışmasında *Bifidobacterium bifidum* (CECT 870), *Bifidobacterium breve* (CECT 4839) *Bifidobacterium longum* biotype *infantis* (CECT 4551) ve *Bifidobacterium longum* (BB536); kontrol ve oligosakkarit takviyeli TPY broth içerisinde gelişimleri açısından değerlendirilmiştir. Kısa zincirli fruktooligosakkarit, oligofruktoz, inülin ve 4’-GOS varlığında tüm suşlar gelişimleri açısından karşılaştırılmıştır.

Mikroorganizma sayımları 8,78 log (kob/ml) (6×10^8 kob/ml)' a ulaştığında suşlar %1 oranında farklı oligosakkaritleri içeren TPY broth içerisine inoküle edilmiştir. Gerek kullanılan suşlar gerekse çalışma koşulları farklı olmasına rağmen başlangıç mikroorganizma sayımları bizim çalışmamızla paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

4.4. Kontrol ve Oligosakkarit Takviyeli Devam Sütünde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* Türlerinin Gelişimi

Kontrol ve oligosakkarit takviyeli devam sütü içerisinde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin 24 saat 37 °C'de inkübasyon sonunda gelişimi log (kob/ml) olarak Çizelge 4.3'te görülmektedir. İncelenen tüm suşlar, oligosakkarit takviyeli devam sütünde 8,28 ile 9,51 log (kob/ml) arasında değişen sayımlarla gelişmiştir. Oligosakkarit desteği test bakterisi gelişimini önemli ölçüde etkilendiği saptanmıştır.

İnkübasyon sonunda *Lactobacillus acidophilus* (NRRL B-1910), *Lactobacillus rhamnosus* (NRRL B-442) ve *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 11975) substrat olarak GOS kullanıldığında en yüksek gelişimi göstermişlerdir. Bu suşların gelişimi GOS takviyesi ile kontrolle karşılaştırıldıklarında sırasıyla %2,95, %1,63 ve %2,52 artmıştır. *Lactobacillus reuteri* (NRRL B-14172) 8,76 log(kob/ml) sayımla kontrol örneğinde en yüksek gelişimi göstermiştir. *Bifidobacterium bifidum* (DSM 20456), *Lactobacillus plantarum* (NRRL B-4496), *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) substrat olarak FOS kullanıldığında en yüksek gelişimi göstermişlerdir. Bu suşların gelişimi FOS takviyesi ile kontrolle karşılaştırıldıklarında sırasıyla %3,27, %3,42 ve %3,9 arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. Kontrol ve oligosakkarit takviyeli devam sütleri içerisinde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin 24 saat 37 °C'de inkübasyon sonunda gelişimi log (kob/ml)

Test Bakterisi Suşu	Devam sütünde 24 saat, 37 °C 'de İnkübasyon Sonunda Test Bakterisi Sayımları Log (kob/ml)			
	Kontrol	FOS*	İnülin	GOS**
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)	8,12 ± 0,017 ^a	8,3 ± 0,018 ^a	8,28 ± 0,017 ^a	8,36 ± 0,035 ^a
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)	8,56 ± 0,065 ^c	8,84 ± 0,061 ^c	8,66 ± 0,019 ^c	8,75 ± 0,081 ^c
<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)	8,18 ± 0,024 ^a	8,46 ± 0,144 ^b	8,29 ± 0,018 ^a	8,34 ± 0,129 ^a
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	9,14 ± 0,017 ^e	9,48 ± 0,039 ^d	9,15 ± 0,021 ^d	9,41 ± 0,016 ^d
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)	8,58 ± 0,063 ^c	8,71 ± 0,085 ^c	8,6 ± 0,096 ^c	8,72 ± 0,052 ^c
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	8,32 ± 0,044 ^b	8,51 ± 0,121 ^b	8,41 ± 0,036 ^b	8,53 ± 0,04 ^b
<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)	8,76 ± 0,057 ^d	8,73 ± 0,064 ^c	8,65 ± 0,025 ^c	8,52 ± 0,072 ^b
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)	9,15 ± 0,084 ^e	9,51 ± 0,118 ^d	9,35 ± 0,014 ^e	9,44 ± 0,037 ^d

Not: Sütunların üzerindeki farklı harfler (a, b, c, d veya e) eklenen oligosakkarite bağlı olarak test bakterisi çeşidine göre devam sütlerinin inkübasyonu sonunda test bakterisi gelişimleri arasındaki önemli farkı göstermektedir. (n=6) FOS*: fruktooligosakkarit, GOS**: galaktooligosakkarit

Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, Akalın vd., (2004)'nin çalışmasında FOS içeren ve prebiyotik içermeyen yoğurtlarda depolama süresince *B. animalis* (BB-12) ve *B. longum* (Bb-46)'un canlılığı test edilmiştir. Bifidobakterilerin yoğurt içerisindeki canlılığı, bifidobakterinin türünden ve FOS'un varlığından etkilenmiştir. *Bifidobacterium animalis*, yoğurtta *B. longum*'dan daha iyi stabilize göstermiştir. *B. animalis* için depolama boyunca önerilen 1 milyon hücre seviyesi aşılmıştır. *Bifidobacterium animalis* ve FOS birlikte kullanıldığında depolama süresince 7,35-7,56 log (kob/g) (2,25-3,59 x10⁷ kob/g) sayımlarla *B. longum*'a göre daha yüksek mikroorganizma gelişimi gözlenmiştir. Bulunan bu sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Bizim çalışmamızda da FOS ile takviye test bakterilerinin gelişimini teşvik etmede daha yüksek etkiye sahiptir. Etki, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) ile fermente edilen devam

sütünde en belirgindir. BB-12 sayımları FOS takviyeli devam sütünde 24 saat inkübasyondan sonra 9,51 log(kob/ml) olarak bulunmuştur. FOS takviyesi, bu suşun gelişimini, devam sütünde 24 saat inkübasyondan sonra kontrolle karşılaştırıldığında % 3,9 oranında artışı gözlenmiştir.

4.5. Kontrol ve Oligosakkarit Takviyeli Devam Sütlerinin Başlangıç ve İnkübasyon Sonunda pH Değerleri

Kontrol ve oligosakkarit takviyeli devam sütlerinin başlangıç pH değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kontrol ve oligosakkarit takviyeli devam sütlerinin başlangıç pH değerleri

Test Bakterisi Suşu	Devam Sütlerinin Başlangıç pH Değerleri			
	Kontrol	FOS*	İnulin	GOS**
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)	6,95 ± 0,017 ^b	6,93 ± 0,012 ^a	6,97 ± 0,017 ^c	6,89 ± 0,017 ^b
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)	6,97 ± 0,015 ^b	6,94 ± 0,012 ^b	6,88 ± 0,031 ^a	6,96 ± 0,01 ^c
<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)	6,95 ± 0,012 ^b	6,94 ± 0,017 ^b	6,98 ± 0,017 ^c	6,79 ± 0,023 ^a
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	6,96 ± 0,01 ^b	6,83 ± 0,025 ^b	6,96 ± 0,038 ^c	6,97 ± 0,02 ^c
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)	6,95 ± 0,015 ^b	6,93 ± 0,026 ^b	6,95 ± 0,031 ^{b,c}	6,97 ± 0,01 ^c
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	6,95 ± 0,032 ^b	6,95 ± 0,026 ^b	6,93 ± 0,042 ^{a,b,c}	6,97 ± 0,015 ^c
<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)	6,88 ± 0,04 ^a	6,94 ± 0,021 ^b	6,95 ± 0,035 ^{b,c}	6,97 ± 0,012 ^c
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)	6,93 ± 0,055 ^{a,b}	6,91 ± 0,026 ^b	6,89 ± 0,04 ^{a,b}	6,97 ± 0,023 ^c

Not: Sütunların üzerindeki farklı harfler (a, b veya c) eklenen oligosakkarite bağlı olarak test bakterisi çeşidine göre devam sütlerinin başlangıç pH'ları arasındaki önemli farkı göstermektedir. (n=6) FOS*: fruktooligosakkarit, GOS**: galaktooligosakkarit

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* türlerinin oligosakkarit takviyeli devam sütlerinde 24 saat 37°C'de inkübasyonu sonunda devam sütlerinin pH değerleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin oligosakkarit takviyeli devam sütlerinde 24 saat 37°C'de inkübasyonu sonunda devam sütlerinin pH değerleri

Test Bakterisi Suşu	Devam Sütlerinin Son pH Değerleri			
	Kontrol	FOS*	İnülin	GOS**
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NRRL B-1910)	5,13 ± 0,04 ^b	4,88 ± 0,04 ^{a,b}	5,02 ± 0,053 ^b	4,96 ± 0,035 ^{b,c}
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (DSM 20456)	5,14 ± 0,076 ^b	4,86 ± 0,023 ^a	4,87 ± 0,044 ^a	5,02 ± 0,046 ^c
<i>Lactobacillus plantarum</i> (NRRL B-4496)	5,13 ± 0,031 ^b	5,12 ± 0,078 ^d	5,05 ± 0,095 ^b	4,87 ± 0,017 ^a
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5)	4,97 ± 0,046 ^a	4,89 ± 0,031 ^{a,b}	4,94 ± 0,049 ^{a,b}	4,93 ± 0,061 ^{a,b}
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (NRRL B-442)	4,99 ± 0,031 ^a	4,96 ± 0,057 ^{b,c}	4,98 ± 0,052 ^{a,b}	4,98 ± 0,051 ^{b,c}
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 11975)	5,03 ± 0,07 ^a	5,05 ± 0,081 ^{c,d}	5,07 ± 0,056 ^b	4,98 ± 0,036 ^{b,c}
<i>Lactobacillus reuteri</i> (NRRL B-14172)	4,97 ± 0,02 ^a	4,97 ± 0,055 ^{b,c}	5,01 ± 0,09 ^b	4,94 ± 0,067 ^{a,b,c}
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (BB-12)	4,99 ± 0,059 ^a	4,83 ± 0,025 ^a	4,94 ± 0,093 ^{a,b}	4,93 ± 0,03 ^{a,b}

Not: Sütunların üzerindeki farklı harfler (a, b, c veya d) eklenen oligosakkarite bağlı olarak test bakterisi çeşidine göre devam sütlerinin son pH'ları arasındaki önemli farkı göstermektedir. (n=6) FOS*: fruktooligosakkarit, GOS**: galaktooligosakkarit

Kontrol ve oligosakkarit takviyeli devam sütlerinin başlangıç pH değerleri 6,79 ile 6,97 arasında değişim göstermiştir. Inkübasyon sonunda *Lactobacillus plantarum* (NRRL B-4496), *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Lactobacillus rhamnosus* (NRRL B-442), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 11975), *Lactobacillus reuteri* (NRRL B-14172) substrat olarak GOS kullanıldığında en yüksek pH düşüşünü göstermişlerdir. Bu suşların pH düşüşü GOS takviyesi ile başlangıç pH'sı ile karşılaştırıldığında sırasıyla %28,31, %29,32, %28,74, %28,52 ve %29,51 olarak belirtilmiştir.

İnkübasyon sonunda *Lactobacillus acidophilus* (NRRL B-1910), *Bifidobacterium bifidum* (DSM 20456), ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) substrat olarak FOS kullanıldığında en hızlı pH düşüşünü göstermişlerdir. Bu suşların pH düşüşü FOS takviyesi ile başlangıç pH'sı ile karşılaştırıldığında sırasıyla %29,66, %29,97, %30,05'tir. Devam sütü ile yapılan denemelerde *Bifidobacterium*

animalis subsp. *lactis* (BB-12), FOS varlığında 37°C’de 24 saat inkübasyon sonunda diğerlerine kıyasla %30,05 ile daha hızlı pH düşüşü sağlamıştır.

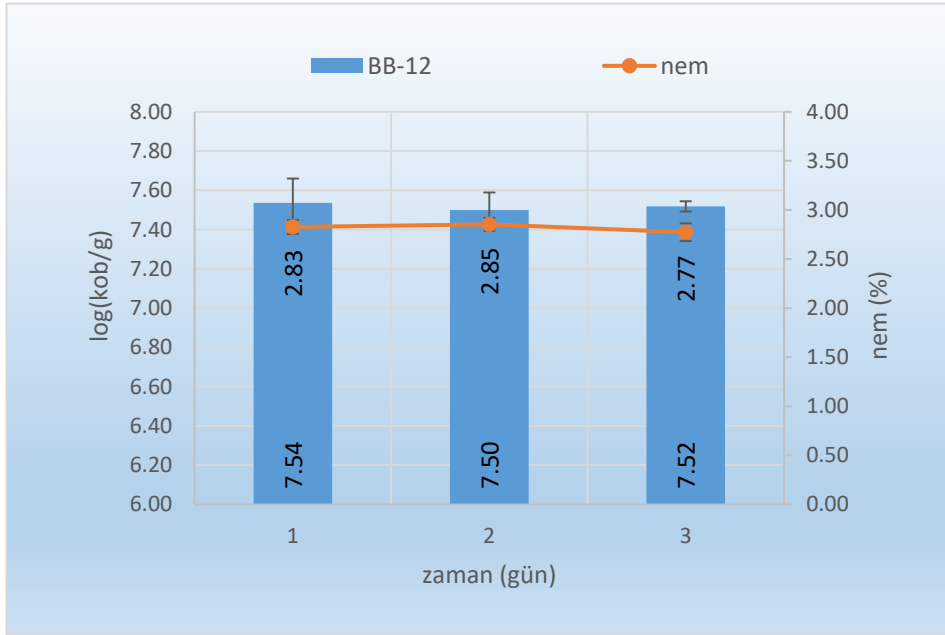
Bu konuda yapılan yayınlar incelendiğinde Dubey ve Mistry (1996)’nin çalışmasında soya (SB), süt (MB) veya kazein hidrolizat esaslı (CH) bebek formülü ve yağsız sütte (NM) bebek bağırsağı kökenli dört farklı *Bifidobacterium* türünün kullanılmasıyla bebek formülünün pH değişimi karşılaştırılmıştır. Süt esaslı bebek sütlerinde (MB) başlangıç pH’ları *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 156961), *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700), *Bifidobacterium infantis* (ATCC 15697) için sırasıyla; 6,38; 6,65; 6,49’dur. Son pH’lar ise yine sırasıyla 4,58; 4,88; 4,80’dır. Bakteri gelişimiyle devam sütünün pH’sı sırasıyla %28,2; %26,61 ve %26,04 düşüş göstermiştir. Gerek kullanılan suşlar gerekse çalışma koşulları farklı olmasına rağmen bizim çalışmamız ile benzer pH düşüşü görülmüştür.

Bizim çalışmamızda devam formülünde kullanıldığında en yüksek gelişimi (%3,9 artış) ve en hızlı pH düşüşünü (%30,05) sağlayan oligosakkarit ve test bakterisi ikilisi çalışmanın bu aşamasında seçilmiştir. Seçilen FOS ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12), çalışmanın ikinci aşamasında probiyotikli devam formülü üretiminde kullanılmıştır.

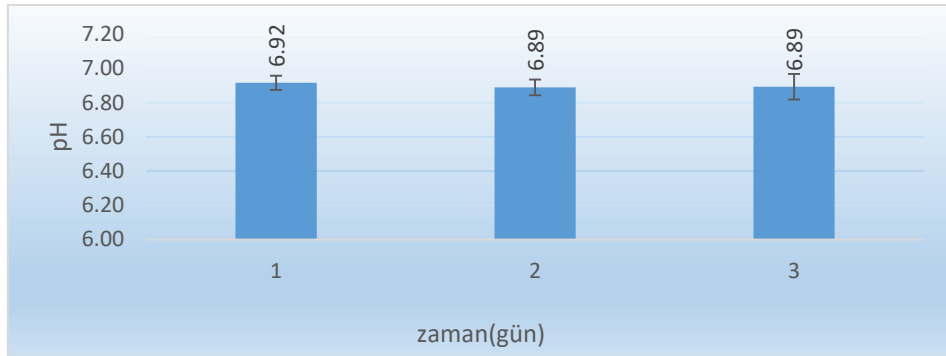
4.6. Probiyotikli Devam Formülünde Probiyotiğin Canlılık Çalışması ve Probiyotikli Devam Formülünün Nem ve pH Analizleri

Üç günlük çalışmada birinci gün devam formülü kutusu açılmıştır ve takip eden her gün, bebek tarafından günlük olarak tüketilmesi gereken miktarda (137,6 g) probiyotikli devam formülü kutudan alınmış ve tüm ambalaj (400 g) bitinceye kadar yani 3 gün boyunca devam formülünün nem analizleri, pH analizleri ve devam formülünde probiyotiğin canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Probiyotikli devam formülünde *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12)’in 3 gün boyunca canlılığı ve probiyotikli devam formülünün nem değerleri Çizelge 4.6’da gösterilmiştir. Üç günlük çalışmada probiyotikli devam formülünün pH değerleri Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Probiyotikli devam formülünde *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* (BB-12)'in 3 gün boyunca canlılığı ve probiyotikli devam formülünün nem değerleri



Çizelge 4.7. Probiyotikli devam formülünün kutu açıldıktan sonra 3 gün boyunca pH değerleri

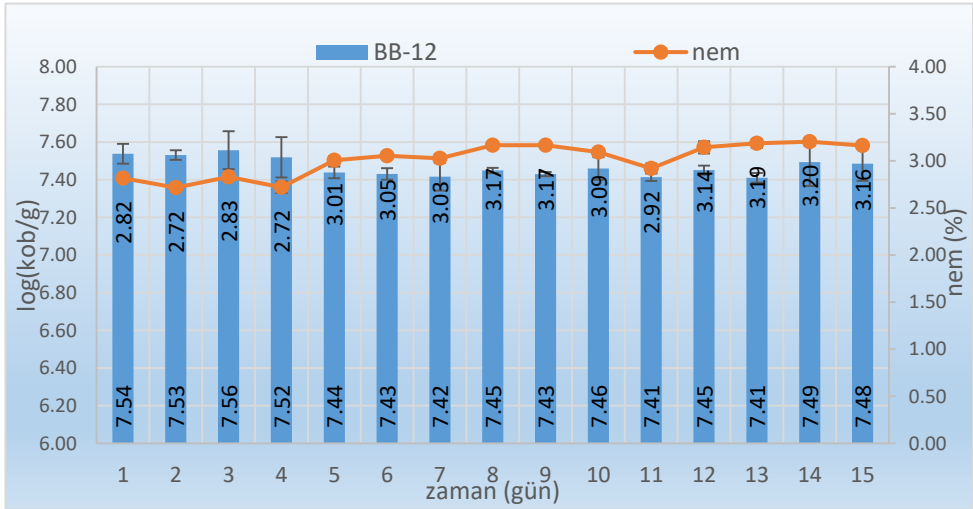


Üç gün boyunca yapılan çalışmada, probiyotikli devam formülünden örnekler alınmıştır. Devam formülünün nem içeriğinde bir artış olup olmadığını belirlemek için numunelerin nemi ölçülmüştür. Nem % 2,77 ile % 2,83 arasında değişmiş, anlamlı fark göstermemiştir. Bifidobakterinin canlılığını etkileyen diğer bir faktör, probiyotik bakterileri içeren ürünün pH'sıdır. Ürünün pH değeri ilk gün 6,92 ve

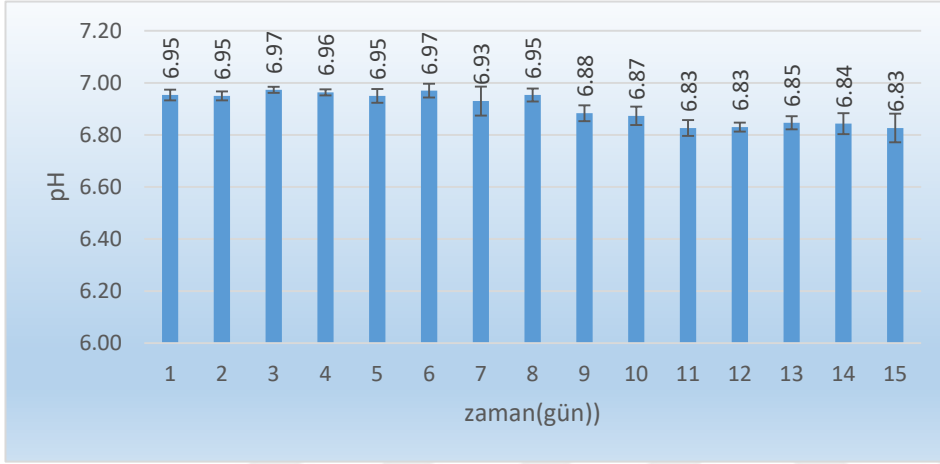
son iki gün 6,89 bulunmuştur ve anlamlı farklılık göstermemiştir. Canlılık çalışmasında *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12)'in ilk sayımları 7,54 log (kob/g)'dır ve anlamlı farklılık göstermemiştir. Sayımların sağlık yararlarını sağlamak için önerilen ekleme seviyesinin (6 kob/g) üzerinde kaldığı saptanmıştır.

Bir başka deneme olarak da kutu açıldıktan sonra 15 gün süresince devam formülünün nem analizleri, pH analizleri ve devam formülünde probiyotiğin canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz edilecek bir numune alındıktan sonra kalan probiyotikli devam formülü oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Probiyotikli devam formülünde *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B- 12)'in 15 gün boyunca canlılığı ve devam formülünün nem değerleri Çizelge 4.8'de görüldüğü gibidir. 15 günlük çalışmada probiyotikli devam formülünün pH değerleri Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Probiyotikli devam formülünde *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* (BB-12)'in 15 gün boyunca canlılığı ve probiyotikli devam formülünün nem değerleri



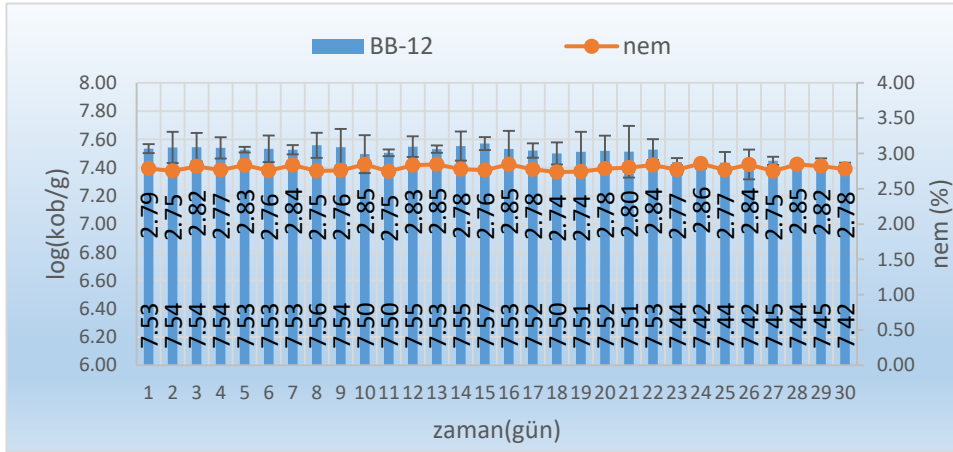
Çizelge 4.9. Probiyotikli devam formülünün kutu açıldıktan sonra 15 gün boyunca pH değerleri



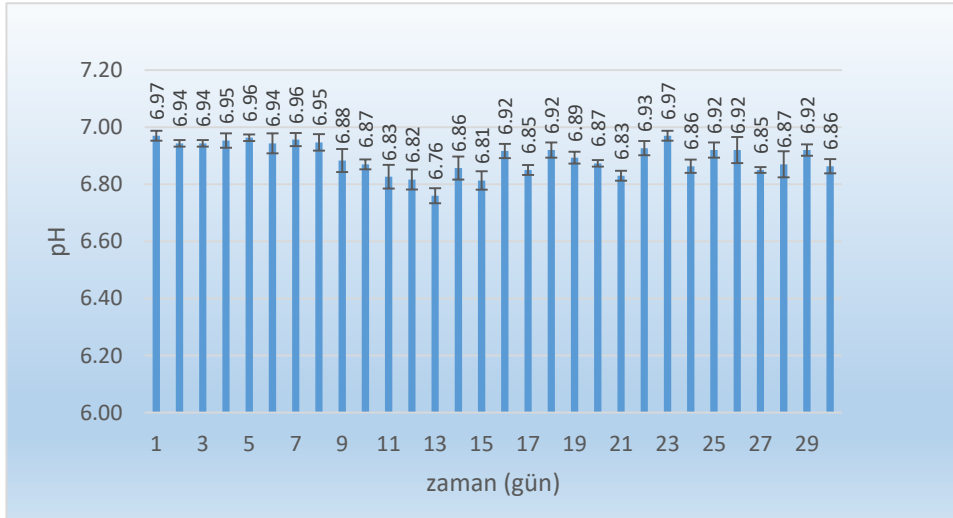
Çizelge 4.9 da görüldüğü gibi nem oralarının 15 günlük çalışmada % 2,72 ile % 3,2 arasında değiştiği saptanmıştır. Ürünün pH değeri de 6,83 ile 6,97 arasında değişmiştir. On beş gün boyunca yapılan çalışmada (Çizelge 4.8), beşinci günde probiyotik sayımları azalmış, 7,44 log (kob/g)’a düşmüştür, ancak sağlık yararları sağlamak için önerilen ekleme seviyesinin (10^6 kob/g) üzerinde kalmıştır. Takip eden günlerde, sayımlar, 7,41 log (kob/g)’a kadar düşmüştür. Ancak 3 günlük çalışmada olduğu gibi, sayım son günde de önerilen ekleme seviyesinin üzerinde kalmıştır ve anlamlı farklılık göstermemiştir.

Üretilen probiyotikli devam formülünün 400 gramlık kapalı teneke kutuda 1 ay boyunca depolanması süresince de devam formülünün nem analizleri, pH analizleri ve devam formülünde probiyotiğin canlılık analizleri gerçekleştirilmiş. Probiyotikli devam formülünde *Bifidobacterium animalis* subp. *lactis* (BB-12)’in 30 gün boyunca canlılığı ve devam formülünün nem değerleri Çizelge 4.10’da görüldüğü gibidir. 30 günlük çalışmada probiyotikli devam formülünün pH değerleri Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Probiyotikli devam formülünde *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* (BB-12)'in 30 gün boyunca canlılığı ve probiyotikli devam formülünün nem değerleri



Çizelge 4.11. Probiyotikli devam formülünün 30 gün depolama süresince pH değerleri



Nem 30 günlük çalışmada ise % 2,75 ile % 2,86 arasında değişmiştir. Ürünün pH değeri 6,76 ile 6,97 arasında değişmiştir. 30 gün boyunca yapılan çalışmada, sayımlar 7,42 log (kob/g)'a kadar düşmüştür. Ancak *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB- 12) sayısı son günde de önerilen ekleme seviyesinin üzerinde kalmıştır ve anlamlı farklılık göstermemiştir.

Süt ürünlerinde bifidobakterilerin yaşayabilirliği hakkında bilimsel birçok çalışma, çeşitli sürelerde buzdolabında saklanan yoğurtlar veya fermente süt ürünlerinde araştırılmıştır. Akalın vd. (2004)'ün çalışmasında yoğurt FOS ile takviye edilmiştir. FOS içeren yoğurtta *Bifidobacterium longum*'un canlılığı, 21 güne kadar 10^6 kob/g'ın üzerinde kalırken, herhangi bir prebiyotik içermeyen yoğurtta sadece 7 gün boyunca muhafaza edilmiştir. Bizim çalışmamızda, ürün pH değeri hiçbir zaman 6,81'in altına düşmemiş ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) sayısı önerilen ekleme seviyesi olan 6 log(kob/ml)'nin üzerinde kalmıştır.

Jayamanne ve Adams (2004)'ün çalışmasına göre plastik kaplarda fermente edilmiş manda sütlerinde, cam şişelerde fermente edilenlere kıyasla *Bifidobacterium longum* NCTC11818'in canlılığı önemli ölçüde azalmıştır. Bizim çalışmamızda ise hermetik olarak kapatılmış teneke kutu kullanılmış, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) sayısı önerilen seviyenin üzerinde kalmıştır.

Tedarik zincirinin (üretim, depolama, dağıtım araçları, ticari depolama yerleri ve ev koşulları) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12'nin canlılığını etkileyebileceği hesaba katılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, probiyotikli devam formülünde *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) sayısının, probiyotikler için önerilen ekleme seviyesinin (10^6 kob/ g) üzerinde kaldığını göstermiştir. Bu duruma, muhtemelen toz formdaki devam formülünün oda koşullarında muhafaza edilmesi, pH stabilitesi, koruyucu atmosferde paketlenmesi, düşük nem seviyesi ve oksijen geçirimsiz ambalaj materyali kullanılması katkıda bulunmuştur.

5. SONUÇ

Anne sütünün kullanılmasının mümkün olmadığı ya da yetersiz olduğu durumlarda ikame olarak kullanılabilecek özel ürünler gündeme gelmektedir ki bu alternatif gıdalar da bebek ve devam formülleridir. Piyasada bulunan formüller incelendiğinde marketlerde ve eczanelerde bulunanların çoğunun hammaddesinin inek sütüne dayalı olduğu görülmektedir. Sınırlı sayıda keçi sütüne dayalı formülasyona sahip ürün dikkat çekmektedir. Bu ürünlerin de yine büyük bir çoğunluğu probiyotik ilavesizdir. Son yıllarda keçi sütünün insanların beslenmesinde düşük alerjik etkileri nedeniyle daha yoğun kullanılması ve probiyotiklerin bilinen yararlı özelliklerinin bebek formülasyonlarına aktarılması bu çalışmanın ortaya çıkmasında bir etken olmuştur.

Bu çalışmanın ilk bölümünde çeşitli oligosakkaritlerin, test bakterilerinin gelişimi üzerine etkileri belirlenmiştir ve devam sütünde birlikte kullanıldığında en iyi gelişim performansı ve asitlik gelişimi sağlayan oligosakkarit (fruktooligosakkarit) ve test bakterisi (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) seçilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında seçilen FOS ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) devam formülüne ilave edilmiştir ve tüketileceği süre üzerinden canlılık çalışması yapılmıştır. Fermente süt ürünlerinde bifidobakterinin canlılığı için en önemli dezavantajlardan biri ürünün pH değerinin düşmesidir. Bizim çalışmamızda toz haldeki devam formülü, fermente edilmiş ürünlerden farklı olarak rekonstitüe edilip beklemeden hemen tüketildiği için pH değişimi çok olmamaktadır.

Çalışmanın ilk bölümüne ilişkin olarak, fruktooligosakkaritin daha karmaşık bir bakteriyel ortam üzerindeki etkisini değerlendirmek için daha fazla canlı modeli çalışması gerekmektedir. İleriki çalışmalarda canlı hücre hatları kullanılarak, hücre kültür analizleri ile *in vivo* çalışmalar yapılırsa oligosakkaritlerin test bakterileri üzerindeki etkisini değerlendirmek için daha gerçekçi bir ortam sağlanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akalın, A.S., Fenderya, S., Akbulut, N. 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International journal of food science & technology**, 39(6): 613-621.
- Alichanidis, E., Polychroniadou, A. 1996. Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. In *Production and utilization of ewe and goat milk, Crete (Greece), 19-21 Oct 1995*. International Dairy Federation.
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J., Juárez, M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. **Journal of dairy science**, 82(5): 878-884.
- Bali, V., Panesar, P.S., Bera, M.B., Panesar, R. 2015. Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, 55(11): 1475-1490.
- Bin-Nun, A., Bromiker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M., Hammerman, C. 2005. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. **The Journal of pediatrics**, 147(2): 192-196.
- Bode, L. 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, 22(9): 1147-1162.
- Carlsson, J., Nyberg, G. Wrethen, J. 1978. Hydrogen peroxide and superoxide radical formation in anaerobic broth media exposed to atmospheric oxygen. **Applied and environmental microbiology**, 36(2): 223-229.
- Ceyhan, N., Alıç H., 2012. Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 5(1): 107-113.
- Chandan, R. 1997. Properties of milk and its components. *Dairy-Based Ingredients. Eagan Press Handbook, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN*, 1-10.
- Dubey, U.K., Mistry, V.V. 1996. Growth Characteristics of Bifidobacteria in Infant Formulas1. **Journal of dairy science**, 79(7): 1146-1155.

- El-Agamy, E.I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, 68(1-2): 64-72.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Jimenez-Espinoza, R., Eom, H.J., Block, D.E., Mills, D.A. 2013. Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. **Food microbiology**, 33(2): 262-270.
- Gibson, G.R. ve Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**, 125(6): 1401-1412.
- Gomaa, E.Z. 2017. Effect of prebiotic substances on growth, fatty acid profile and probiotic characteristics of *Lactobacillus brevis* NM101-1. **Microbiology**, 86(5): 618-628.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic?. **British Journal of Nutrition**, 93(6): 783-786.
- Gürsel, A. 2007. Süt esaslı ürünler teknolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayın no :1554 Ankara
- Haenlein, G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, 51(2): 155-163.
- Holzapfel, W.H. ve Schillinger, U. 2002. Introduction to pre-and probiotics. **Food Research International**. 35(2-3): 109-116.
- Ingham, S.C. 1999. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. **Journal of food protection**, 62(1): 77-80.
- ISO 22964: Gıda zinciri mikrobiyolojisi – *Cronobacter* spp. ‘nin tespiti için yatay metot, 2017.
- Jayamanne, V.S., Adams, M.R. 2004. Survival of probiotic bifidobacteria in buffalo curd and their effect on sensory properties. **International journal of food science & technology**, 39(7): 719-725.

- Kılıç, G.B., Kuleaşan, H., Eralp, İ., Karahan, A.G. 2009. Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. **LWT-Food Science and Technology**, 42(5): 1003-1008.
- Liong, M.T. 2007. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesteroleemics, and perimenopausal treatments. **Nutrition reviews**, 65(7): 316-328.
- Macfarlane, G.T., Cummings, J.H. 2002. Probiotics, infection and immunity. **Current opinion in infectious diseases**, 15(5): 501-506.
- Macfarlane, G.T., Englyst, H.N. 1986. Starch utilization by the human large intestinal microflora. **Journal of Applied Bacteriology**, 60(3): 195-201.
- Martin, C.R., Walker, W.A. 2008. Probiotics: role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis. In *Seminars in perinatology* (Vol. 32, No. 2, pp. 127-137). WB Saunders.
- Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C.A., Pohlentz, G., Boza, J.J., Kunz, C. 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. **International Dairy Journal**, 16(2): 173-181.
- Metin, M., Öztürk, G.F. 2010. Süt ve mamülleri analiz yöntemleri:(duyusal, fiziksel ve kimyasal analizler). Ege Üniversitesi.
- Mountzouris, K.C., McCartney, A.L., Gibson, G.R. 2002. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. **British Journal of Nutrition**, 87(5): 405-420.
- Mumcu, A., Temiz, A. 2014. Effects of prebiotics on growth and acidifying activity of probiotic bacteria. **GIDA-Journal of Food**, 39(2): 71-77.
- Oliveira, D.L., Wilbey, R.A., Grandison, A.S., Roseiro, L.B. 2015. Milk oligosaccharides: A review. **International journal of dairy technology**, 68(3): 305-321.
- O'sullivan, G.C., Kelly, P., O'Halloran, S., Collins, C., Collins, J.K., Dunne, C., Shanahan, F. 2005. Probiotics: an emerging therapy. **Current Pharmaceutical Design**, 11(1): 3-10.

- Pérez-Conesa, D., López, G., Rosau, G. 2005. Fermentation capabilities of bifidobacteria using nondigestible oligosaccharides, and their viability as probiotics in commercial powder infant formula. **Journal of food science**, 70(6): 279-285.
- Pinto, M.G.V., Franz, C.M., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International journal of food microbiology**, 109(3): 205-214.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small ruminant research**, 79(1): 57-72.
- Ribeiro, A.C., Ribeiro, S.D.A. 2010. Specialty products made from goat milk. **Small Ruminant Research**, 89(2-3): 225-233.
- Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?-. **The American journal of clinical nutrition**, 71(6): 1682-1687.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. **Applied and environmental microbiology**, 71(10): 6150-6158.
- Saminathan, M., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Abdullah, N., Ho, Y.W. 2011. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. **African Journal of Microbiology Research**, 5(1): 57-64.
- Shah, N., Jelen, P. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. **Journal of Food Science**, 55(2): 506-509.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of dairy science**, 83(4): 894-907.
- Shah, N.P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food technology**, 55(11): 46-53.

- Şener, A., Temiz, A., Toğay, S.Ö., Bağcı, U. 2008. Çeşitli prebiyotiklerin *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12'nin gelişimi ve asitlik geliştirme özelliği üzerine in vitro etkileri. **Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü**, Türkiye, 10: 889-892.
- TGK. 2006. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliği. T.C. Resmi Gazete 07.07.2006, Sayı: 26221.
- TGK. 2011. Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete 29.11.2011, Sayı: 28157.
- TGK. 2014. Türk Gıda Kodeksi, Devam Formülleri Tebliği. 2008/52. T.C. Resmi Gazete 15.08.2014, Sayı: 29089.
- TS 6582-1 EN ISO 6888-1. 2001. Gıda ve hayvan yemlerinin-Mikrobiyolojisi-Koagulaz-Pozitif stafilokokların (*staphylococcus aureus* ve diğer türler) sayımı için yatay metot-Bölüm 1: Baird-Parker agar besiyeri kullanarak.
- TS EN ISO 11290-1. 2017. Gıda zinciri mikrobiyolojisi – *Listeria monocytogenes* ve *Listeria spp.* 'nin aranması ve sayımı için yatay metot Bölüm 1: Arama metodu.
- TS EN ISO 21528-2. 2018. Gıda zinciri mikrobiyolojisi-Enterobacteriaceae'nin tespiti ve sayımı için yatay yöntem -Part 2: Koloni sayım tekniği.
- TS EN ISO 6579-1. 2014. Besin zincirinin mikrobiyolojisi - *Salmonella*'nın tespiti, sayımı ve serotiplendirmesi için yatay yöntem - Bölüm 1: *Salmonella spp.*
- TS EN ISO 7932. 2009. Gıda ve hayvan yemlerinin mikrobiyolojisi - Muhtemel *bacillus cereus* sayımı için yatay yöntem - 30°C 'ta koloni sayım tekniği.
- TS EN ISO 7937. 2006. Gıda ve hayvan yemlerinin mikrobiyolojisi - *clostridium perfringens* sayımı için yatay yöntem - koloni sayım tekniği.
- TS EN ISO 8968-1. 2014. Süt ve Süt Ürünleri- Azot içeriği tayini- Bölüm 1: Kjeldahl prensibi ve ham protein hesaplanması.
- TS ISO 16649-2. 2012. Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Beta-Glucuronidase-Positive *escherichia coli*'nın sayımı için yatay yöntem-Bölüm 2: 5-Bromo-4-Chloro-3-İndolyl beta-D-Glucuronide kullanılarak 44°C'da koloni sayım yöntemi.

- TS ISO 4832. 2010. Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi - Koliformların sayımı için yatay yöntem - Koloni sayım tekniği.
- Tsuda, H., Miyamoto, T. 2010. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, 2002. **Food science and technology research**, 16(1): 87-92.
- Vanderhoof, J.A., Young, R.J. 2004. Current and potential uses of probiotics. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, 93(5): 33-37.
- Yeo, S.K., Liong, M.T. 2010. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90(2): 267-275.
- Yıldırım, Z., Bayram, M., Yıldırım, M. 2003. Probiyotik, prebiyotik ve insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Bildiriler Kitabı. Bildiri*, (P66).
- Ziemer, C.J. ve Gibson, G.R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**. 8(5-6): 473-479.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Rana AĞALDAY

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul / 21.01.1991

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi, İzmir

Yüksek Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Bildiriler

-Uluslararası

Ağalday, R., Bulca, S. 2017. The effect of selected oligosaccharides on the growth of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and the use of probiotics in the production of goat milk based follow-up formula. Agriculture for life, life for Agriculture, June, 8-10, 2017, Romania (Poster Sunumu).

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Keçicik Süt Endüstrisi ve Gıda Sanayi Ticaret A.Ş. / 2016- devam etmektedir.

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : ranaagalday@hotmail.com

Tarih : 25/01/2019