

Mikroorganizma Kültürlerinin Korunmasında Kullanılan Kurutma Yöntemleri

Sevim Öztürk¹, İbrahim Çakır² ✉

¹T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Fatih İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, İstanbul

²Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu

Geliş Tarihi (Received): 03.08.2014, Kabul Tarihi (Accepted): 16.10.2014

✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ibrahimcakir@ibu.edu.tr (İ. Çakır)*

☎ 0 374 254 10 00 / 2620 📠 0 374 253 45 58

ÖZ

Mikrobiyoloji alanında çalışma yapan tüm laboratuvarlar kültür koleksiyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Çünkü yapılan testlerin kontrolü amacıyla laboratuvarların, kullandıkları kültürlerin koleksiyonlarını oluşturması ve bu kültürleri uygun koşullarda muhafaza etmeleri gerekmektedir. Kültür korumanın temel prensibi, varyasyon veya mutasyona uğratmadan mikroorganizmayı saf halde ve uzun süre canlı tutmaktır. Kurutma yöntemi bilinen en eski kültür muhafaza yöntemidir. Ucuz ve kolay bir yöntem olduğundan pek çok mikroorganizma kültürünün muhafazasında sıklıkla kullanılmaktadır. Tüm kurutma yöntemlerinde aşamalar genel olarak birbirine benzemektedir. Öncelikle mikroorganizma kültürü koruyucu maddelerle karıştırılır ve istenilen yöntemle kurutulur. Ardından kurutulan kültür muhafazaya alınır. İhtiyaç duyulduğunda ise kültür rehidre edilerek hücreler aktive edilir. Bu derleme, kumda kurutma, kâğıt disk üzerinde kurutma, jelatin ve silikajelde kurutma ile kendini kurutma (self-drying) gibi basit kurutma yöntemlerinin yanı sıra sprey kurutma, akışkan yatak kurutucularında kurutma, köpük kurutma ve vakumda kurutma gibi liyofilizasyon dışındaki son dönemde ön plana çıkan kurutma yöntemlerini ve kullanım alanlarını irdelemek amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kurutma, Kültür koleksiyonu, Koruma

Drying Methods Used for Preservation of Microbial Cultures

ABSTRACT

All laboratories that do microbiological researches need culture collections because laboratories have to form their own collections and preserve on suitable conditions them for control of testing. Basic principle of culture preservation is to keep cells alive and in pure form for a long time without causing mutations and variations in microorganisms. Drying is the oldest method of culture preservation. Because it is an inexpensive and easy method, it is frequently used for the preservation of microbial cultures. Stages of all drying methods are generally similar to each other. Initially, culture is mixed with protectants and dried with a desired process. Then, dry culture is stored. When needed, cells are activated by rehydrating culture. This review explains simple drying methods like sand drying, drying on paper disc, drying with gelatin and silica gel, self-drying and alternative drying methods (except lyophilization) like spray drying, fluidised bed drying, foam drying and drying under vacuum.

Keywords: Drying, Culture collection, Preservation

GİRİŞ

Çeşitli kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların canlılığını korumak suretiyle uzun süreli muhafaza edilmesi çok önemlidir. Kültürlerin muhafazası, ulusal kültür koleksiyonlarının oluşturulmasında, endüstriyel uygulamalarda, mikrobiyoloji, biyoteknoloji gibi alanlarındaki laboratuvar çalışmalarında ve mikroorganizma kültürlerinin bir yerden başka yere taşınması sırasında gerekli olan bir işlemdir [1, 2]. İlaç, gıda, içecek üretimi gibi sanayi uygulamalarında ve klinik çalışmalarda mikrobiyolojik testlere sıklıkla başvurulmaktadır. Kalite kontrol amacıyla yapılan bu testler sırasında referans olarak pozitif kontrol örnekleri kullanılmaktadır. Bu referans mikroorganizmalar ise ulusal veya uluslararası standart kültür koleksiyonlarından temin edilebilmektedir [3].

Kısa veya uzun dönem kültür muhafazasına başvurulmasının en önemli nedeni, kültürlerin bir ortamdan başka bir ortama aktarılması sırasında gerek fenotipik gerekse genetik yapılarında meydana gelen değişikliklerdir. Her bir aktarma işlemi sonrasında mikroorganizmanın özellikleri ve yapısı daha fazla değişikliğe uğramaktadır [4]. Bu nedenle, kültür korumanın temel prensibi varyasyon veya mutasyona uğratmadan mikroorganizmayı saf halde ve uzun süre canlı tutmaktır. Mikrobiyolojinin gelişme sürecinde kültür korumaya yönelik kolay, pratik, ucuz ve etkin yöntemler geliştirilmiştir. Bu süreç içinde en eski çalışmalardan birinin çiçek aşısı ile yapıldığı kabul edilmektedir. Dr. Carro, 1799 yılında ipliklere emdirilmiş çiçek aşısını 1 yıl süre ile saklamış ve bu süre sonunda aşının etkinliğini koruduğunu tespit etmiştir. Gelişen bilim ve teknoloji sürecinde kültür korumaya yönelik pek çok yöntem bugün başarı ile uygulanmaktadır. Ancak, tüm mikroorganizmalar için aynı yüksek başarı düzeyi ile kullanılabilen tek bir yöntem bulunmamaktadır [5]. Mikroorganizmanın koleksiyona alınmasında kullanılacak yöntemin belirlenmesinde muhafaza yönteminin maliyeti, mikroorganizma türü, laboratuvarın cihaz donanım kapasitesi ve kültürlerin canlı kalabileceği süre uzunluğu gibi faktörler rol oynamaktadır [2].

Kurutma, bilinen en eski kültür muhafaza yöntemidir. Ucuz ve kolay bir yöntem olması nedeniyle başta küfler olmak üzere laktik asit bakterileri, patojen mikroorganizmalar gibi pek çok mikroorganizma grubunun muhafazasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bilinen tüm kurutma yöntemleri çoğunlukla hücrelerin canlı kalmasını sağlarken, kültürlerin uzun süreli muhafazasına da izin vermektedir. Mikroorganizmaların muhafazasında kullanılan pek çok kurutma yöntemi olmasına rağmen, tüm yöntemlerde uygulanan aşamalar ana hatlarıyla birbirine benzemektedir [3].

Kurutma işleminde ilk olarak mikroorganizma kültürü koruyucu maddelerle karıştırılır ve arzu edilen yöntemle kültür kurutulur. Ardından kurutulan kültür depolamaya alınır. İhtiyaç duyulduğunda muhafaza edilen kültür rehidre edilir ve hücreler yeniden aktif hale gelir. Mikroorganizmaların gelişme süreci boyunca hangi fazda (lag, logaritmik gelişme, durma ve ölüm fazı)

kültüre alınacağına belirlenmesinde mikroorganizmanın cinsi ve türü önemli rol oynamaktadır. Örneğin yapılan çalışmalar, *Lactobacillus rhamnosus* kültüründe durma fazındaki hücrelerin, kurutma sonrasında canlılığını daha fazla koruduğunu göstermiştir. Hücrelerin %31-50'si daha sonra yeniden geri kazanılabilmekte ve kullanılabilir. Bu oran logaritmik gelişme fazındaki hücrelerde %14 olarak gerçekleşirken, lag fazındaki hücrelerin yalnızca %2 oranında canlılığını koruyabildikleri belirlenmiştir. Mikroorganizmanın türüne bağlı olan diğer bir faktör ise kullanılacak koruyucu ajanının tipidir. Fakat genel olarak bakıldığında, yağsız süt tozu, serum, trehaloz, gliserol, betain, sukroz, glikoz, laktoz, dekstran, silikajel ve jelatin gibi maddeler çoğu mikroorganizma için koruyucu ajan olarak kullanılabilmektedir. Yapılan çalışmalar, trehaloz ve sukrozun kurutma sırasında hidrojen bağları oluşumuyla protein denatürasyonunu önlediğini, böylece yapının korunmasını sağladıklarını göstermiştir. Ayrıca bu şekerlerin suyun varlığında dördüncül yapının yeniden oluşturulmasına yardımcı olduğu bildirilmektedir. Şekerlerden trehaloz kullanımının sukroz kullanımına oranla mikroorganizma canlılığını daha fazla korunduğu da bilinmektedir [3].

Protokantla karıştırılan kültürler çok farklı yöntemlerle kurutulabilmektedir. Bu derlemede, kumda kurutma, kâğıt disk üzerinde kurutma, jelatin ve silikajelde kurutma gibi basit kurutma yöntemlerinin yanı sıra liyofilizasyon (dondurarak kurutma) dışındaki sprey kurutma, akışkan yatak kurutucularda kurutma, köpük kurutma, vakumda kurutma ve kendini (öz) kurutma gibi bazı durumlarda ön plana çıkan kurutma yöntemleri ele alınmıştır.

BASİT KURUTMA YÖNTEMLERİ

Mikroorganizmaların muhafazası amacıyla ilk geliştirilen kurutma yöntemleri kolay gerçekleştirilebilir ve karmaşık sistemlere ihtiyaç duyulmayan yöntemlerdir. Protokant olarak kum, silikajel, gliserol gibi maddeler kullanılmaktadır. Alternatif kurutma yöntemlerinin geliştirilmesiyle birlikte bu yöntemlerin popülerliği azalmıştır.

Kumda Kurutma

Özellikle spor oluşturan bakterilerin ve küflerin uzun yıllar boyunca korunmasında kullanılmaktadır. Bu amaçla yıkanmış ve etüvde sterilize edilmiş kum üzerine spor süspansiyonundan ilave edildikten sonra aseptik koşullarda havada ya da fosforpentaoksit içeren vakum desikatörde kurumaya bırakılır. Yeterli kuruma gözlendiğinde tüpün ağzı lastik bir tıkaçla kapatılır ve buzdolabına alınır [5].

Kağıt Disk Üzerinde Kurutma

Bu yöntem, özellikle depolama bakımından çok az yere gereksinim göstermesi gibi büyük bir üstünlüğe sahiptir. *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri bu yöntemle yıllarca korunabilmektedir. Bu yöntemle göre uygun boyutlarda kesilmiş steril filtre kâğıtları 10⁸ adet/mL olacak şekilde bakteri süspansiyonu ile doyurulur. Bu

diskler steril bir ortamda havada ya da vakum desikatörde kurutulur, steril iki plastik levha arasına yerleştirilir. Aynı kültürü içeren çok sayıda disk aynı tüp içinde buzdolabında korunur. Kültürlerin transferi gerektiğinde steril bir pens ile bir disk alınarak sıvı besiyerine aktarılır. Bu yöntem kültürlerin bir başka laboratuvara iletilmesinde en kolay ulaştırma imkânı sağlayan yöntemdir. Steril bir naylon ya da kâğıt zarf içine yerleştirilebilen bu diskler normal posta veya kargo ile bir başka laboratuvara da gönderilebilmektedir. Kâğıt disklerdeki kültürlerin daha uzun süreli korunmalarını sağlamak amacıyla disklerin bulunduğu tüpler vakum desikatöre konularak buzdolabına yerleştirilebileceği gibi, doğrudan vakum altında paketlenerek buzdolabında da saklanabilmektedir [5]. Kâğıt disk olarak boş antibiyogram diskleri kullanılabilir. Kâğıt disk laboratuvarında kaba filtre kağıdından da yapılabilir. Bu yöntemle göre bir tüp içerisine çok sayıda disk konulabileceği için kurutma işleminden sonra her bir kullanım için bir adet diskin çıkarılarak uygun sıvı besiyerine aktarılması yeterli olacaktır. Bu yöntem gerek kültürlerin bir yerden başka bir yere taşınmasında ve depolanmasında gerekse uygulama kolaylığı açısından maliyeti düşük bir koruma yöntemi olarak kabul edilmektedir.

Silikajelde Kurutma

Bu yöntem ilk defa 1958 yılında Hunt ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup, 1962 yılında Perkins adlı araştırmacılar tarafından yöntemle ilgili yeni öngörüler ön plana çıkmıştır. Mikroorganizma hücrelerinin susuz ve indikatörsüz silikajel ile kurutulup muhafaza edilmesi prensibine dayanmaktadır. Yöntem küflerin ve bakterilerin büyük bir kısmının muhafazasında kullanılabilir. Yönteme göre indikatörsüz silikajel bir tüp içinde sterilize edilir. Bunun üzerine yağsız süt besiyerinde geliştirilen bakteri kültüründen damla damla ilave edilir. Tüpler steril kabinde havada veya nem indikatörlü silikajel ya da fosforpentaoksit bulunan vakum desikatörde kurutulur ve buzdolabında muhafaza edilir. Laboratuvarında kurutma amaçlı normal desikatörlerde kullanılan silikajel nem indikatörü olarak kobalt klorür içerdiğinden mikroorganizmalar için toksik etkiye sahiptir. Bu nedenle kültür koruma amaçlı kullanılacak silikajelin indikatör içermemesi gerekmektedir [5, 6, 7].

Silikajelde kurutulmuş muhafaza edilmiş bir kültür tekrar aktifleştirilmek istendiğinde, birkaç silikajel granülü uygun bir sıvı besiyerine aktararak uygun sıcaklıkta aktif kültür elde edilebilmektedir. Kalan dehidre kültür ihtiyaç duyulduğunda tekrar kullanılmak üzere muhafaza koşullarında depolanmaya devam edilir. Yöntem ucuz ve oldukça kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Fakat silikajelde kurutmanın en önemli sakıncası, kuru silikajel üzerine bakterinin yağsız süt kültüründen ilave edildiğinde sıcaklık önemli derecede artarak bakteriye zarar verir. Bu sakıncanın giderilmesi için kuru silikajel içeren tüplerin önce buz banyosunda soğutulması, sonra yağsız süt kültürünün ilave edilmesi önerilmektedir [5, 6].

Silikajelde kurutmanın bir başka uygulamasında ise; önce 150 mm'lik vidalı kapaklı tüpler silikajel veya susuz kalsiyum sülfatla yarıya kadar doldurulur. Üzerine bir düzine porselen boncuk ve gevşek bir cam yünü de tüplere konulduktan sonra sterilize edilen tüpler desikatöre alınarak soğutulur. Alternatif olarak boncuklar önce alevde ısıtılıp, ardından steril tüplere de ilave edilebilmektedir. Stok yapılacak mikroorganizma kültüründen birkaç öze alınarak porselen boncukların üzerine yayılır ve boncuklar oda sıcaklığında hızlı bir şekilde kurutulur. Burada cam yünü yüzey alanının artmasını sağlamaktadır. Daha sonra cam boncuklar tüplere yerleştirilmekte ve vidalı kapaklı tüpler sıkıca kapatılmaktadır. Yöntemin alternatifinde ise kültür inoküle edilen porselen boncuklar öncelikle vakum altında kurutulur ve içinde uygun bir sıvı ortam bulunan tüpün içine yerleştirilmesi şeklinde uygulanmaktadır. Bu yöntemle muhafaza edilen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi pek çok kültür 10 aylık depolama sonrasında bile canlılığını koruyabilmektedir [7].

Jelatinde Kurutma

Bu yöntemde önce bakteriler uygun bir besiyerinde üretilir ve kültür, besiyerinden ayrıldıktan sonra yoğun bir bakteri süspansiyonu elde edilir. Bu süspansiyondan sıcaklığı 30°C'a ayarlanan Nutrient Jelatin besiyerine (Nutrient Broth + %10 (w/v) jelatin) ekim yapılır ve bakteri sayısı yaklaşık 10^{10} adet/mL oluncaya kadar 30°C 'de inkübasyona bırakılır. Bu şekilde elde edilen kültür Petri kutularındaki steril mumlu kâğıt üzerine pastör pipeti ile damlatılır. Mumlu kâğıt disk yoksa Petri kutuları silikon ile sıvanır. Nutrient Jelatin kültürleri daha sonra vakum desikatöre alınır ve burada kurutulur. Vida kapaklı tüplere alınan diskler yine vakum desikatör içinde buzdolabına yerleştirilir. Nutrient Jelatin besiyeri hazırlanırken %0,25 (w/v) askorbik asit ilave edilmesi ve hazırlanan besiyerlerinin hazırlandıktan hemen sonra, taze olarak kullanılması gerekmektedir [4].

Kendini (Öz) Kurutma

Mikroorganizmaların muhafazası amacıyla kullanılan çoğu yöntemde, oldukça spesifik muhafaza sistemlerine, çok sayıda teknik ekipmana ve düşük sıcaklıkta depolama ortamlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca kültür koruma yöntemleri etkili yöntemler olmakla birlikte, genellikle maliyeti yüksek, teknik donanım ve bilgi isteyen yöntemlerdir. Bu nedenle daha pratik ve ekonomik yöntemler geliştirme konusunda yapılan araştırmalar süregelmektedir. Bu araştırmaların bir tanesinde Hays ve ark. 2005 yılında yaptıkları araştırma sonucunda prokaryotik hücrelerin uzun dönem muhafazasında kullanılmak üzere yeni bir kültür koruma yöntemi tanımlamışlardır. Yöntem kurutma boyunca canlılığı maksimum düzeyde tutmak için hücreler üzerinde en az stresi yaratacak, hızlı bir kurutma sistemi ile kombine edilmiştir. Bu sistemde bakteri süspansiyonundan 1 µL alınarak, önceden kurutulmuş aktif kömür kumaşı matrisine inoküle edilir. Aktif kömür kumaşı, viskoz ve suni bir ipek kumaşın oksijensiz karbonizasyonu ile üretilmektedir. Aktif kömür kumaşı, çok büyük bir yüzey alanına ve yüksek geçirgenliğe

sahip olan bir kumaş türüdür. Mikroorganizmalar bu geniş yüzeylere tutundurulmakta ve muhafaza gerçekleştirilmektedir. Aktif kömür kumaşı işlem sonrasında depolanabilmekte ve yeniden kullanılabilir. Bu basit ve kolay uygulanabilir bir yöntem olup, hazırlık aşamasında ve kurutma sonrasındaki gereksinimleri tamamen ortadan kaldırmaktadır [2].

Bu yöntem kullanılarak yapılan bir çalışmada standart *E. coli* suşu 4, 20 ve 30°C'lerde 390 günlük depolama sonunda başarılı bir şekilde yeniden aktif hale getirilebilmiştir. İlk inokülasyon oranı $1,1 \times 10^8$ kob/ μ L olan hücrelerin verilen sıcaklıklarda sırasıyla %20, %6 ve %0.1 oranında canlılıklarını sürdürebildikleri tespit edilmiştir. Bu oranlar, oldukça önemli bir canlılık kaybı olduğunu göstermekle birlikte, kültür koleksiyonu için gerekli olacak sayıda hücre yeniden geri kazanılabilmektedir [2].

ALTERNATİF KURUTMA YÖNTEMLERİ

Çalışmanın bu bölümünde, mikroorganizma kültürlerinin korunması ve koleksiyon oluşturulması konularında son yıllarda ön plana çıkan teknikler ele alınmıştır. Bu yöntemler genellikle teknik donanım ve özel alet-ekipman gerektirmekle birlikte, yüksek hacimlerde ve sürekli kurutmaya olanak sağladıkları için özellikle endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma tekniğinde nemli hammadde, kurutma odasına yüksek bir hız ve basınçla püskürtülmekte ve işlem sonunda granül halinde kurutulmuş ürün elde edilmektedir. Odanın içinde dolaşan havanın sıcaklığı 200°C'ye kadar çıkabilmektedir. Yöntem, mikroorganizmaların muhafazası amacıyla kullanıldığında, benzer şekilde sıvı kültür, bir atomizerden geçirilerek, 150-200°C sıcaklığındaki sıcak odaya yüksek bir hızla püskürtülmekte ve işlem sonunda 10-200 mikron büyüklüğünde dehidre kültür elde edilmektedir. Püskürterek kurutma yönteminin patenti 1872 yılında Samuel Percy tarafından alınmıştır. Bu yöntemin mikroorganizmaların muhafazasında kullanımı ile ilgili yapılmış çok sayıda araştırma bulunmaktadır [8, 9]. Proses, mikroorganizmalar için ilk olarak 1914 yılında Rogers adlı araştırmacının kurutulmuş laktik asit bakterilerinin elde edilmesi çalışmalarında kullanılmıştır. Son zamanlarda ise nispeten ekonomik bir yöntem olması sebebiyle laktik asit bakterileri ve probiyotiklerin muhafazasında daha sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [3].

Starter kültürlerin muhafazasında en fazla kullanılan teknik olan liyofilizasyona kıyasla püskürterek kurutma yöntemi enerji maliyetleri daha düşük olduğu için ekonomik bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Püskürterek kurutma yönteminin diğer avantajları yüksek hızda kurutma yapılmasına ve sürekli kurutma işlemine olanak sağlamasıdır. Bu avantajlara rağmen püskürterek kurutma yöntemi bazı olumsuzluklar

nedeniyle liyofilizasyon kadar yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Bunun nedeni kurutma işlemi süresince mikroorganizmaların yüksek oranda canlılığını yitirmesi, kültürlerin depolama süresince düşük stabilite göstermesi ve rehidrasyon sırasında meydana gelebilecek güçlükler olarak belirlenmiştir [10].

Püskürterek kurutma yönteminde partiküllerden nemin uçurulması ve kuru parçacıkların oluşumu sırasında sıcaklık ve hava akımı şartları kontrol altında tutulmaktadır. Proses koşulları ve kurutucuların dizaynı son ürünün spesifik ve kurutma özelliklerine göre belirlenmektedir. Püskürtmeli kurutma sistemleri; besleme pompası, atomizer, havayı ısıtan fanlar, hava dağıtıcı, kurutma odası ve ürünün sistemden alınması, taşınması, paketlenmesi ile havanın sistemden atılmasını sağlayan alet ve ekipmanlardan oluşmaktadır. Püskürtmeli kurutucularda kullanılan atomizerler kullandıkları enerji türüne göre 4 grup altında toplanabilmektedir. Bunlar; santrifüj, basınç, hareket ve sonik atomizerlerdir [10].

Laktik asit bakterilerinin püskürterek kurutma yöntemi ile muhafazasında kültürlerin canlılığını kaybetmemesi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörlerden ilki sıcaklıktır. Genellikle kurutucu bölmenin iç sıcaklığı yükseldikçe hücrelerin canlılığını kaybetme ihtimalinin de arttığı bildirilmektedir. Ancak, sıcaklık artışı ile inaktivasyon oranı arasında direkt bir korelasyon yoktur ve sıcaklığın etkisi düşünülen daha azdır. Bakterilerin inaktivasyonunda daha çok sıcaklık-süre kombinasyonu rol oynamaktadır. Çeşitli araştırmacılar da püskürterek kurutmada sonraki çıkış sıcaklığında meydana gelen artışların mikroorganizmaların canlılığını azalttığını bildirmişlerdir. Mikrobiyal inaktivasyonda sıcaklıkla birlikte rol oynayan diğer bir parametre ise nem oranıdır. Püskürterek kurutmada sıcaklık değişimi ve nemin uçurulması oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak da çok hızlı inaktivasyon meydana gelmekte ancak, nem oranı azaldıkça inaktivasyon da azalmaktadır [10].

Püskürterek kurutma yöntemi ile kurutulmuş laktik asit bakterileri ve probiyotiklerin canlı kalma oranlarını etkileyen bir diğer parametre kurutucudan çıkış sıcaklığıdır. Çıkış sıcaklığı, havanın iç sıcaklığı, hava akım oranı, ürün besleme oranı, ortam kompozisyonu ve zericiklerin büyüklüğüne bağlıdır. Ancak, bu değişkenlerin hepsinin önceden doğru bir şekilde ayarlanabilmesi çok güçtür, bu da kurutulmuş kültürlerin canlı kalma oranlarında büyük farklılıklara yol açmaktadır. Çoğu araştırmacı, düşük çıkış sıcaklıklarında mikrobiyal hücrelerinin canlılıklarının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Özet olarak, püskürterek kurutma sırasında 2 farklı mekanizma ile inaktivasyon meydana gelebilmektedir. Bunlardan biri sıcaklık ile inaktivasyon, diğeri ise dehidrasyon ile inaktivasyondur. Bunlardan hangisinin daha tehlikeli olduğu açık değildir; çünkü ikisi de aynı anda gerçekleşmektedir. DNA, RNA ve proteinler gibi bazı makromoleküller, membranlar ve ribozomlar ısı etkisi ile zarar görmektedir ama ribozomlar ısı ile inaktivasyonda mikroorganizmaların kritik yapı taşlarıdır. Çünkü ribozomların deformasyonu sonucu hücrelerin protein

sentezleme mekanizmaları zarar görmekte, dolayısı canlılıklarını kaybetmektedirler. Püskürterek kurutma sırasında hücrelerin canlılık durumunu etkileyecek bir diğer faktör ise atomizerin basıncıdır. Basınç belirli değerleri aştığında hücrelerin ölümüne yol açabilmektedir [10].

Püskürterek kurutma yönteminde atomizer sıcaklığı ve basıncının laktik asit bakterileri ve probiyotiklerin canlılığı üzerindeki etkisinin araştırıldığı pek çok çalışma vardır. Örneğin Fu ve Etzel'in 1995 yılında yaptıkları araştırma sonucunda *Lactococcus lactis* hücrelerinin püskürterek kurutucuda kurutma süresince atomizerde sıcaklığa maruz kalması hücrelerin zarar görmesine yol açmaktadır [11]. Lievense ve van't Riet (1994) yaptıkları çalışmada atomizasyon basıncının bazı durumlarda hücrelerin üzerinde negatif bir stres etkisi yaratarak, hücrelerin zarar görmesine ve kaybına yola açtığını bildirmiştir [12]. Riveros ve arkadaşları ise 2009'da yaptıkları çalışmada püskürterek kurutma işleminde atomizerde uygulanan basıncın 100 kPa'dan 50 kPa'a düşürülmesiyle *Lactobacillus acidophilus* hücrelerinin canlılık oranının arttığını bulmuşlardır [13].

Kültürlerin püskürterek kurutma yöntemiyle kurutulması ve ardından depolanması sırasında starter kültürlerin korunması amacıyla kriyoprotektan maddelerin kullanılması yaygın bir uygulamadır. Koruyucu ajanlar basit veya kompleks yapıda olabilmektedir. Farklı şekerler (örneğin, glikoz, fruktoz, laktoz, mannoz, sukroz, sorbitol, adonitol, trehaloz), yağsız süt, akasya gamı, monosodyum glutamat, nişasta ve oligosakkaritler gibi bileşiklerin koruyucu ajan olarak kullanımlarına ilişkin pek çok araştırma yapılmıştır. Bulunan sonuçlar içinde en çok göze çarpanı fermente olabilen şekerlerin kullanımı sonucunda açığa çıkan mannitol gibi metabolitlerin kurutma sonrasında hücrelerin canlılıklarını arttırmasıdır. Fermente olamayan şekerler ise ortamın ozmotik basıncını arttırmakta ve bu nedenle ozmotik strese maruz kalan hücreler canlılıklarını kaybedebilmektedir [10].

Rehidrasyon işlemi, püskürterek kurutulmuş laktik asit kültürlerinin yeniden aktif hale getirilmesinde en kritik aşamadır. Rehidrasyon amacıyla kullanılan çözeltiler ve rehidrasyon şartları kurutulmuş mikrobiyel kültürlerin canlılık oranını etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada 20°C'deki yağsız süt, MRS broth, deiyonize su ve fosfat tamponunun rehidrasyon çözeltisi olarak kullanılmasının hücrelerin canlılık oranları arasında önemli bir farklılığa neden olmadığı belirtilmiştir. Rehidrasyon sıcaklığı da sprey kurutma sonrası hücrelerin canlılık oranlarını etkileyebilmektedir [14]. Yapılan çalışmalar, rehidrasyon sıcaklığının 4-50°C arasında yükseltilmesiyle *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus* ve *B. longum* hücrelerinin canlılık oranlarının doğrusal bir şekilde arttığını ortaya koymuştur [8].

Tüm kurutma yöntemlerinde olduğu gibi püskürterek kurutma yönteminde de kurutma sonrası kültürün uygun koşullarda muhafazasının sağlanması önem taşımaktadır. Muhafaza koşulları denildiğinde muhafaza sıcaklığı, bağıl nem, depolama yeri, ışık ve oksijen

miktarı gibi faktörlerin birlikte ele alınması gerekmektedir. Tüm bu koşulların optimizasyonu sonucunda, kültürlerin muhafaza süresi uzatılabilmektedir. Püskürterek kurutma işleminde, kurutma sonrasında hücrelerin canlılık oranları azalmasına rağmen, bu yöntem mikroorganizma hücrelerinin muhafazası için endüstriyel uygulamalarda liyofilizasyon ile birlikte en fazla tercih edilen yöntem olarak kabul edilmektedir [3].

Akışkan Yataklı Kurutucularda Kurutma

Akışkan yataklı kurutucularda kurutma yöntemi, granül şeklinde katılar için uygun bir yöntemdir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri, granüle edilmiş ürünü bir materyalle kaplayabilen bir püskürtücünün sisteme ilave olarak monte edilebilmesidir. Püskürtmeli kurutucular gibi akışkan yataklı kurutucularda sürekli endüstriyel proseslerde kullanılabilir. Akışkan yataklı kurutucularda, katı ürünün üzerinde akışkan bir etki yaratmak için mekanik sallanma ve yukarı akışlı sıcak hava kullanılmaktadır. Ürünün bu iki hareket ile etkileşimi sayesinde kurutulurken sabit kalmaması, ısı transfer katsayısının yükselmesine ve aynı zamanda iyi bir karışım sağlanıp tekdüze bir kurutma işleminin gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. Akışkan yataklı kurutma işlemlerinde kullanılacak sıcaklık ve hava debisi öncelikli olarak belirlenmesi gereken parametrelerdir. Kurutma işlemi 30-40°C'de yaklaşık 20 dakikada gerçekleştirilebilmektedir. Akışkan yataklı kurutucularla mikroorganizma kültürlerinin korunması amacıyla yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [3].

Larena ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada *Penicillium oxalicum* küfünün liyofilizasyon, püskürterek kurutma ve akışkan yataklı kurutucularda kurutulması sırasındaki canlılıklarını kıyaslamışlardır. Araştırmada liyofilizasyon ve akışkan yataklı kurutucularda kurutma sonucunda hücrelerin canlılıklarının %100 oranında korunduğunu saptamışlardır. Liyofilize kültürlerde kurutma sonrası canlılığın korunması amacıyla bir protektant kullanılması gerektiği tespit edilmiş, püskürterek kurutma işleminde ise 80°C'yi aşan çıkış sıcaklığında mikroorganizma kültürlerinin yalnızca %20'sinin canlı kalabildiği belirlenmiştir. Akışkan yataklı kurutucularda kurutulan kültürler oda sıcaklığında 30 gün muhafaza edildiklerinde hücrelerin %100'ünün canlı kaldıkları ancak, 60 gün sonunda bu oranın %40'a düştüğü ve bu oranın 180 gün boyunca sabit kaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar *Penicillium oxalicum* kültürlerinin uzun dönem muhafazasında akışkan yataklı kurutucularda korunmasının liyofilizasyon ve sprey kurutmaya oranla canlılık kayıpları açısından daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir [3,15].

Yukarıda belirtilen avantajlarına rağmen akışkan yataklı kurutucularda kurutma yöntemi, liyofilizasyon ve püskürterek kurutma kadar endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak canlı mikroorganizma sayısının önemli olduğu ve canlılığın uzun süre korunmasının hedeflendiği uygulamalarda alternatif bir yöntem olarak potansiyelini koruduğu belirtilmektedir [3].

Köpük Kurutma

Köpük kurutma ilk olarak, 1996 yılında Bronshtein tarafından önerilen, koruyucu ajan olarak şeker matrislerinin kullanıldığı ve hücre süspansiyonlarının mekanik yöntemle stabil kuru köpüklere dönüştürüldüğü yeni bir kurutma yöntemidir. Bu köpükler, vitrifikasyon olarak adlandırılan bir proses sayesinde vakum altında kaynatılarak oluşturulmaktadır. Vitrifikasyon prosesi ile bir sıvıdan doğrudan hareketsiz, amorf ve kristal yapıda olmayan, cam köpükler elde edilmektedir. Köpükler oluşturulduktan sonra ortam sıcaklığındaki stabilitelelerinin artırılması amacıyla yüksek sıcaklıklarda kurutma işlemine tabi tutulur. Bu proses, dondurmaya duyulan gereksinimi ve dondurma ile meydana gelecek sakıncalı durumları ortadan kaldırmaktadır. Diğer benzer buharlaşma tekniklerinin ticarî olarak uygulanabilirliği uzun zaman alıyor ve büyük hacimlerde çalışılmıyorken, köpük kurutma yönteminde büyük hacimlerle çalışmak mümkündür. Ayrıca bu proseste iç kaynatma yapılması nedeniyle harcanan süre diğer yöntemlere göre daha azdır. Yöntemin bir diğer avantajı ise kurutma boyunca yüksek buhar basıncı altında çalışıldığı için aseptik bir ortam yaratılıyor olmasıdır [3].

Bu yöntem ile 37°C'nin üstündeki sıcaklıklarda *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *E. coli* gibi bazı gram negatif bakterilerin %40 gibi bir hücre kaybı ile stabil halde muhafaza edilebileceği bildirilmiştir. %40'luk hücre kaybı önemli bir kayıptır ve köpüklerin 37°C'de hücrelerin canlılıklarını istikrarlı bir şekilde koruyamadığı ortaya çıkmıştır [3].

Zubaedah ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yoğurt starter kültürü köpük kurutma yöntemi ile muhafazaya alınmıştır. Muhafaza işlemi sırasında karşılaşılan en önemli güçlük, hücrelerin canlılık oranını yüksek tutmak amacıyla sıcaklığın düşük tutulması ve bu nedenle kurutmanın daha uzun zaman almasıdır. Çalışmada starter ortamına yumurta beyazı eklenmesiyle hem kurutma süresi kısaltılmış, hem de hücrelerin canlılık oranı artırılmıştır. Çalışmada yumurta akının %5, 10, 15, 20 ve 25 olmak üzere 6 farklı konsantrasyonu 50°C vakum altında kültürlerle muamele edilmiş ve en uygun konsantrasyon oranının %15 olduğu bulunmuştur. Kurutma 3,16 saatte gerçekleştirilmiştir. Yumurta ve şekerin bir arada olması köpük oluşumunu kolaylaştırmıştır [16].

Vakum Kurutma

Vakum altında kurutma, mikroorganizmaların muhafazasında kullanılan diğer bir kurutma yöntemidir. Bu yöntemde kurutma bölgesindeki basınç normal atmosfer basıncının altında bir değere düşürülmüştür. Vakum ne kadar arttırılırsa sıcaklık da o derecede düşecektir. Bu yöntem sayesinde hücrelerin canlılıkları büyük oranda korunabilmektedir. Fakat maliyeti yüksek bir yöntem olması sebebiyle yaygın bir kullanım alanı yoktur. Vakum altında kurutma, bakteri ve bakteriyofajların korunmasında etkili ve pratik bir yöntemdir. Yöntemde dondurma olmaksızın kurutma işlemi gerçekleştirilmekte ve kontaminasyonu önlemek amacıyla tüplerin ağzında pamuk-yün tıplar

kullanılmaktadır. Kurutma koşulları sıcaklık, vakum ve örneklerin nem değerlerinin ölçülmesiyle değerlendirilmektedir. Yapılan ölçümler sonucunda pamuk-yün tıpanın bir tampon ve kurutucu olarak işlev gördüğü bulunmuştur. Böylece örnekler depolama boyunca optimal koşullara ulaşmaktadır. Bu yöntemin önemli bir avantajı da kurutma boyunca örneklerin sıcaklığının 2-5°C arasında olmasıdır. Bu yüzden, suyun evaporasyonu hızlı gerçekleştirilmekte ve kurutma süresi de kısalmaktadır [17].

Vakum kurutma, hücrelerin uzun dönem muhafazası için bir uygun bir yöntemdir. Bakteri kültürü süspansiyonları düşük sıcaklıklarda muhafaza edilen, bir kondansatör ve manifolda bağlı küçük ampüller içinde hazırlanmaktadır. Yönteme göre manifold açıldığında ve ampüllerin içindeki basınç hızla düştüğü için ampüllerdeki su kaynamakta, bakteriler ise soğumaktadır. Kütürde bulunan su düşük sıcaklık ve basınçta bakterilerden uzaklaştırılıp kondansatörde toplanmaktadır. Ampüllerdeki su içeriği stabil hale geldikten sonra, vakum altında kuruma tamamlanıp kültürler muhafazaya alınmaktadır. Bu işlemde ampüllerin basıncının, kondansatör sıcaklığındaki suyun buhar basıncından daha yüksek olması gerekmektedir [18]. Vakum kurutma, pahalı bir yöntem olması sebebiyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak mikroorganizmaların uzun dönem muhafazasında oldukça etkili olup, hücrelerin en az zarar gördüğü yöntemler arasında yer almaktadır.

SONUÇ

Kurutma yöntemi, mikroorganizmaların en temel ihtiyaçlarından biri olan suyun uçurulmasına dayanan bir kültür koruma yöntemidir. Mikroorganizmaların kurutma yöntemiyle korunması, test edilmiş teoriler ve gerçeklerden ziyade deneysel testlere dayalı olarak ortaya çıkmaktadır. Literatürde farklı türler ve hatta aynı türe ait farklı suşlar için bile farklı yöntemler tanımlanmaktadır. Kumda kurutma, kâğıt disk üzerinde kurutma, jelatin ve silikajelde kurutma, kendini (öz) kurutma gibi basit kurutma yöntemlerinin yanı sıra sprey kurutma, akışkan yatak kurutucularında kurutma, köpük kurutma ve vakum altında kurutma gibi alternatif kurutma yöntemleri bunlardan en çok öne çıkanlardır. Uygulanan bu yöntemlerden her birinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır. Fakat ekonomik olarak uygun, kolay uygulanabilir, mikroorganizma canlılığının maksimum düzeyde korunduğu ve hücrelerin geri kazanımının yüksek olduğu yöntemler daha çok tercih edilmektedir. Daha ucuz, kullanışlı, karmaşık sistemlere ihtiyaç duyulmayan yeni yöntemler geliştirebilmek amacıyla araştırmalar devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Krumnow, A.A., Sorokulova, I.B., Olsen, E., Globa, L., Barbaree, J.M., Vodyanov, V.J., 2009. Preservation of bacteria in natural polymers. *Journal of Microbiological Methods* 78: 189–194.
- [2] Hays, H.C.W., Millner, P.A., Jones, J.K., Rayner-Brandes, M.H., 2005. A novel and convenient self-

- drying system for bacterial preservation. *Journal of Microbiological Methods* 63: 29-35.
- [3] Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G., 2006. Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods* 66: 183-193.
- [4] Suslow, T.W., Schroth, M.N., 1981. Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. *Applied and Environmental Microbiology* 42(5): 872-877.
- [5] Anonymous, 2005. Kültür Koleksiyonu ve Otokontrol. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları 9. Bölüm. Editör: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 s.
- [6] Grivell, A.R., Jackson, J.F., 1969. Microbial culture preservation with silica gel. *Journal of General Microbiology* 58: 423-425.
- [7] Hunt, G.A., Gourevitch, A., Lein, J., 1958. Preservation of cultures by drying on porcelain beads. *Journal of Bacteriology* 76(4): 453-54.
- [8] Wang, Y.C., Yu, R.C., Chou, C.C., 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology* 93: 209-217.
- [9] Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P., Stanton, C., 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6): 2605-2612.
- [10] Peighambardoust, S.H., Tafti, A.G., Hesari, J., 2011. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. *Trends in Food Science and Technology* 22(5): 215-224.
- [11] Fu, W.Y., Etzel, M.R., 1995. Spray drying of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* C2 and cellular injury. *Journal of Food Science* 60: 195-200.
- [12] Lievense, L.C., van't Riet, K., 1994. Convective drying of bacteria. II. Factors influencing survival. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 51: 71-89.
- [13] Riveros, B., Ferrer, J., Borquez, R., 2009. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology* 27: 123-132.
- [14] Teixeira, P., Castro, H., Kirby, R., 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology* 78(4): 456-462.
- [15] Larena, I., Melgarejo, P., Cal, A.D., 2003. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* 151(11-12): 600-606.
- [16] Zubaedah, E., Kusnadi, J., Andriastuti, I., 2003. Production of dried yoghurt starter using foam-mat drying method: Effect of egg white foam addition on physical and chemical characteristics. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan* 14(3): 258-262.
- [17] Iijima, T., Sakane, T., 1973. A method for preservation of bacteria and bacteriophages by drying in vacuo. *Cryobiology* 10(5): 379-385.
- [18] Fletcher, M.J., Young, J.M., 1998. Studies on vacuum-drying for the preservation of plant pathogenic bacteria. *Journal of Culture Collection* 2: 21-25.
-
-