

Elektropüskürtme Yönteminin Probiyotik Mikroorganizmaların Mikrokapsülasyonunda Kullanımı

Firuze Ergin¹ , Ahmet Küçükçetin¹ , Ayhan Oral² , Oğuz Gürsoy³ 

¹Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Çanakkale

³Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 28.06.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 22.08.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): kucukcetin@akdeniz.edu.tr (A. Küçükçetin)

☎ 0 242 310 65 69 📠 0 242 310 63 06

ÖZ

Probiyotik bir üründen beklenen faydaların sağlanabilmesi için ürünün raf ömrü sonuna kadar en az 10^8 - 10^9 kob/g düzeyinde canlı probiyotik mikroorganizma bulundurması gerekmektedir. Probiyotik mikroorganizmaları olumsuz koşullara karşı korumak amacıyla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar, probiyotik mikroorganizmaların canlılığını korumada en etkili yöntemlerden birinin mikrokapsülasyon olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, mikrokapsülasyon işlemi sırasında probiyotik mikroorganizmalar yüksek sıcaklık, dehidrasyon, yüksek osmolarite gibi olumsuz koşullara maruz kalabilmektedir. Elektrohüdrodinamik atomizasyon yani elektroğirme ve elektropüskürtme yöntemleri kullanılarak söz konusu olumsuz koşulların üstesinden gelinebilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; yüksek voltaj altında kapsüller (elektropüskürtme) veya lifler (elektroğirme) üretilmesini sağlayan elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniğinin, probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarının korunması açısından diğer mikrokapsülasyon yöntemlerine alternatif olabileceği belirtilmiştir. Bu derlemede, elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniğinin temelleri ve elektropüskürtme yönteminin probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonunda kullanım olanakları ile ilgili bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Mikrokapsülasyon, Elektropüskürtme

Use of Electrospray Technique in Microencapsulation of Probiotic Microorganisms

ABSTRACT

To provide the expected benefits of probiotic products, a product must contain 10^8 - 10^9 cfu/g of viable probiotic microorganism until end of the shelf life. Numerous methods have been developed to protect probiotic microorganisms against adverse conditions. Studies on the issue show that microencapsulation is one of the most efficient methods for protecting the viability of probiotic microorganisms. However, probiotic microorganisms are exposed adverse conditions such as high temperature, dehydration, high osmolarity etc. during the microencapsulation process. These adverse conditions can be overcome in many cases by using electrohydrodynamic atomization (EHDA), either electrospinning or electrospraying. Recent studies have reported that the electrohydrodynamic atomization technique, which generates the production of capsules (electrospray) or fibers (electrospinning) under high voltage, can be an alternative to other microencapsulation methods in terms of protecting the viability of probiotic microorganisms. In this review, it is aimed to give information about the basics of electrohydrodynamic atomization technique and the possibilities of using electrospray method in microencapsulation of probiotic microorganisms.

Keywords: Probiotic, Microencapsulation, Electrospray

GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin dengeli ve sağlıklı bir diyetle beslenebilmek amacıyla güvenilir ve dengeli beslenme kavramına uygun gıdaları tercih etmesi, probiyotikleri içeren fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesine yönelik ilgiyi arttırmaktadır [1]. Probiyotikler, vücuda yeterli miktarda alındığı zaman konakçıda bağışıklık sistemini düzenleme, bağırsak hastalıklarını engelleme, hipertansiyonu düşürme, kanda kolesterol seviyesini azaltma ve ishali önleme gibi sağlığa yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalardır [2, 3]. Probiyotiklerin sağlığa faydalı etkilerini gösterebilmeleri için ürünlerde en az 10^8 - 10^9 kob/g düzeyinde bulunması gerektiği belirtilmektedir [4, 5]. Fonksiyonel ürünlerin üretimleri ile depolanmaları süresince ve tüketimleri sırasında probiyotik mikroorganizmalar; yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, zengin besin maddeleri gereksinimi, rekabetçi mikroorganizmalar, sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam, safra tuzları gibi canlılıklarını olumsuz etkileyen engellerle karşılaşabilmektedir [6, 7]. Probiyotik mikroorganizmaların olumsuz koşullara karşı korunabilmesi için ürünlerde kullanılmak üzere yüksek aside ve safra tuzlarına karşı dirençli suşların seçilmesi, oksijen geçirgenliği olmayan ambalajların kullanımı, iki aşamalı fermentasyon uygulaması, gelişim ortamına peptit ve aminoasit gibi besin maddeleri ile probiyotiklerin dahil edilmesi, stres koşullarına karşı adaptasyon sağlanması ve mikrokapsülasyon işleminin uygulanması gibi farklı yaklaşımlar önerilmektedir [8].

Mikrokapsülasyon, ince film tabakaları veya polimer kapsüller yardımı ile küçük katı partiküllerin sıvı ya da gaz damlacıklarının tutuklanmasına dayanan ve kapsüllenen materyali olumsuz koşullardan koruyan fiziksel bir mikropaketleme tekniği olarak tanımlanmaktadır [9]. Bu tekniğin temel prensibi, probiyotik mikroorganizmaların bir jel içerisinde hapsedilmesi ve bu jel yapısının hedef bölge olan ince bağırsağa ulaşıncaya kadar bütünlüğünü koruyarak, probiyotik mikroorganizmaların zarar görmeden bağırsakta salınımının sağlanması esasına dayanmaktadır [10]. Probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonu için kullanılan en yaygın teknikler ekstrüzyon, emülsiyon, püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma olarak sayılabilmektedir. İlk iki teknik genellikle polimer çapraz bağlarla mikroorganizmaları kapsül içinde tutmakta ve kullanılan polimer çözeltileri gıdalarda kalıntı bırakabilmektedir. Püskürterek kurutma tekniğinde ise uygulama sırasında çıkılan yüksek sıcaklık, dehidrasyon ve oksidatif stres, mikroorganizmaların canlılığını olumsuz etkileyebilmektedir. Dondurarak kurutma ise mikroorganizma canlılığı açısından uygun bir yöntem olsa da, uygulamanın kesikli ve diğer yöntemlere göre pahalı olması yaygın kullanımını engellemektedir [11].

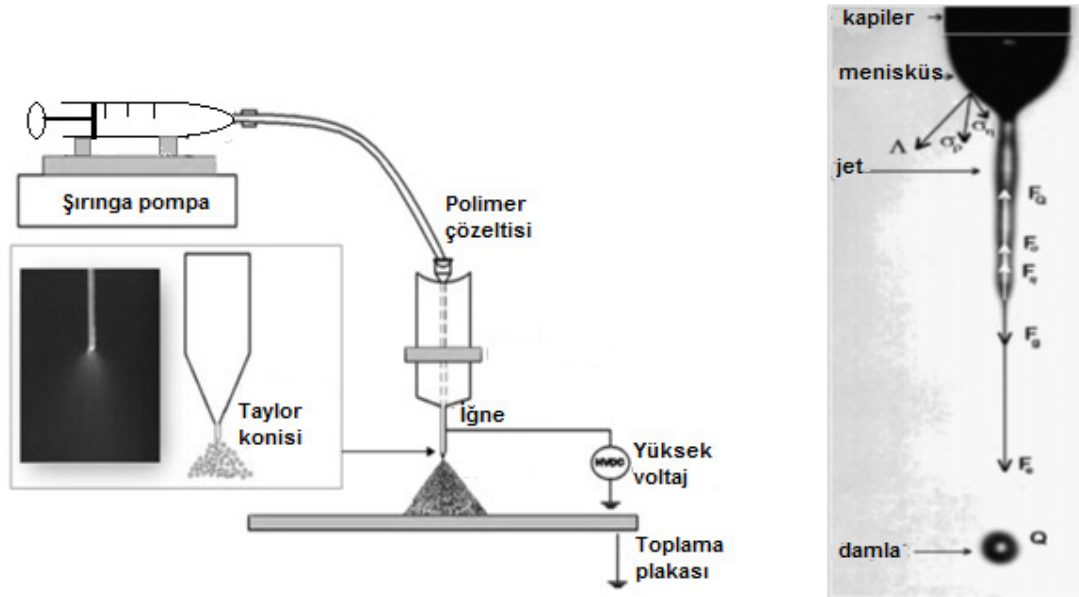
Son yıllarda probiyotik mikroorganizmaların ve biyoaktif gıda bileşenlerinin mikrokapsülasyonunda kullanılmaya başlayan elektropüskürtme yöntemi diğer yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir. Elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsülasyon işlemi oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmekte, uygulama sırasında suda

çözünebilen biyopolimerlerden yararlanılarak organik çözeltilerin kullanımından kaçınılmakta, işlem değişkenleri ve çözelti özellikleri değiştirilerek yüksek yükleme verimliliğinde mikro-nanokapsüller elde edilebilmektedir [12]. Bu derlemede, elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniği ve elektropüskürtme yönteminin probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonunda kullanım olanakları ile ilgili bilgi verilmeye çalışılmıştır.

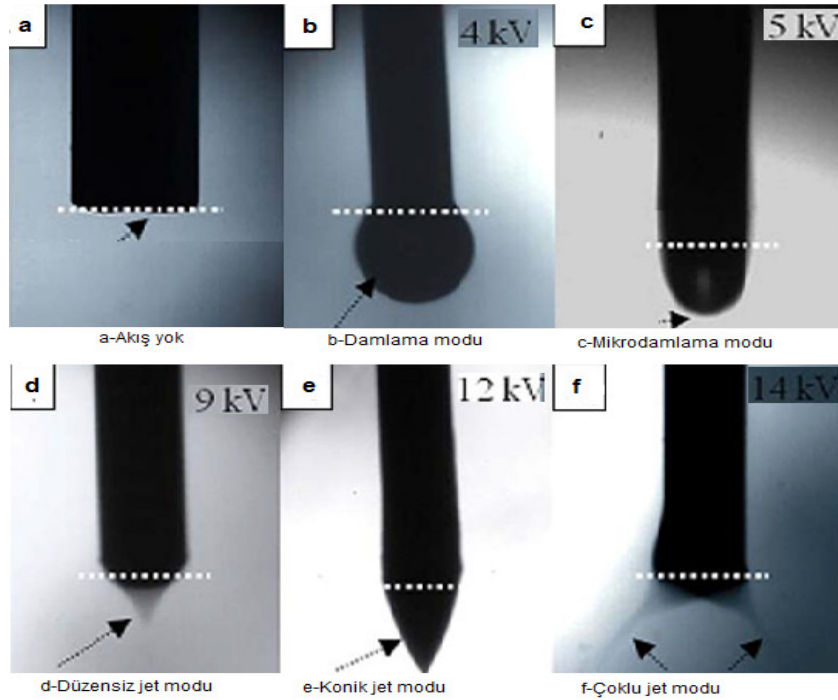
ELEKTROHÜDRODİNAMİK ATOMİZASYON TEKNİĞİNİN ÇALIŞMA PRENSİBİ

İlk olarak Zeleny'nin 1914 yılında farklı sıvıların bulunduğu kapiler boru ile plaka arasındaki elektriksel potansiyel farkı değiştiği zaman sıvıların akış şeklinin değiştiğini gözlemlemesi ile temelleri atılan elektrohüdrodinamik atomizasyon tekniğiyle elektriksel kuvvetler kullanılarak sıvıların atomizasyonu sağlanmaktadır [13]. Elektrohüdrodinamik atomizasyon sistemi, genel olarak kapiler bir püskürtücü iğne, yüksek voltaj güç kaynağı ve halka şeklinde elektrottan meydana gelmektedir (Şekil 1 (a)) [14].

Kapiler püskürtücüye yüksek voltaj uygulandığında iğne ucundaki polimer çözelti damlası elektrostatik kuvvet ile yüklenmektedir. Çözelti sıvısının deforme olup damlamasına, jet üzerindeki yığın kuvvetleri ile sıvı yüzeyindeki normal ve teğetsel gerilmeler (F_0) neden olmaktadır. Jet üzerindeki yığın kuvvetler; elektrik alanının neden olduğu ve elektrik alan ile orantılı olan elektrodinamik kuvvet (F_e), yer çekimi kuvveti (F_g), eylemsizlik (atalet) kuvveti (F_p) ve hareket eden damlacıklar için Stokes kuvveti olarak bilinen sürüklenme kuvveti (F_μ) olarak sayılabilmektedir. Jet yüzeyindeki normal ve teğetsel kuvvetler ise, sıvının yüzey yük yoğunluğundan ve lokal elektrik alandan kaynaklanan elektrodinamik gerilme tensörü, sıvı fazları arasındaki yüzeylerin her iki tarafındaki basınç farkından oluşan gerilme tensörü, sıvının dinamik viskozitesi ve sıvının eylemsizliği nedeniyle oluşan gerilme tensörleridir (Şekil 1 (b)) [17]. Elektrodinamik kuvvet, söz konusu diğer kuvvetleri yendiğinde damlacıklar koniden kopmaya başlayarak bir jet oluşturmaktadır. Bu fenomen ilk defa 1964 yılında Sir Ingram Taylor tarafından açıklandığı için bu jet konisine "Taylor konisi" adı verilmiştir [18]. Yüklü olan damlacıklar, karşı tarafta bulunan elektroda doğru elektriksel alan boyunca hareket etmekte ve polimer çözücünün buharlaşması nedeniyle küçülerek nano ve mikro boyutlarda parçalanmaktadır. Oluşan partiküllerin boyutu ve yapısı, polimer çözeltilerinin elektriksel iletkenliği, yüzey gerilimi, reolojik ve dielektrik özellikleriyle birlikte, üretim aşamasında uygulanan yüksek voltajdan, plaka mesafesinden, polimer çözeltilerinin akış hızından, ortamın sıcaklığı ve nemi gibi birçok faktörden etkilenmektedir [19]. Elektrohüdrodinamik atomizasyon işleminde uygulanan voltaja ve kullanılan sıvının özelliklerine bağlı olarak oluşan partiküllerin yapısı değişmektedir [20]. Elektrohüdrodinamik atomizasyon modları sıvının akış geometrisine bağlı olarak damlatma ve jet olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Damlatma şekilleri, damlama, mikrodamlama, çubuk damlama, çoklu çubuk damlama ve düzensiz damlama olarak; jet modu ise konik jet (Taylor konisi), titrete jet, çoklu jet ve dallanmış jet olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2) [21].



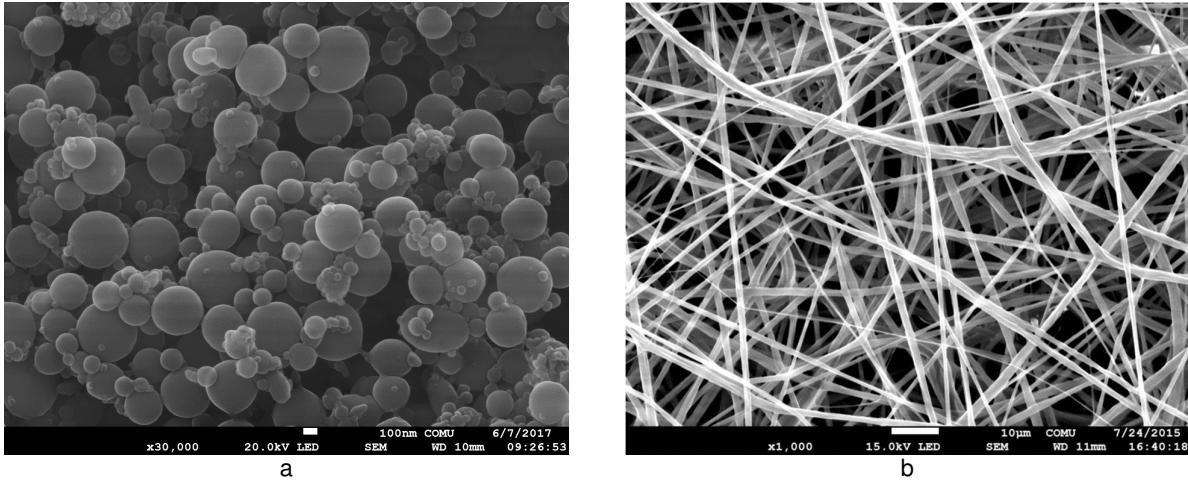
Şekil 1. (a) Elektropüskürtme uygulaması (Anu Bhushani ve Anandharamakrishnan [15]'den uyarlanmıştır), (b) Elektropüskürtme yönteminde polimer jeti oluşumu (Jaworek ve Krupa [16]'den uyarlanmıştır)



Şekil 2. Farklı voltaj değerlerinde elektrohidrodinamik atomizasyon modları; a-akış yok, b-damlama modu, c-mikrodamlama modu, d-düzensiz jet modu, e-konik jet modu, f-çoklu jet modu (Enayati ve ark. [22]'den uyarlanmıştır)

Elektrohidrodinamik atomizasyon yöntemi polimer çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak elektroçirme ve elektropüskürtme yöntemi olarak ikiye ayrılmaktadır. Elektroçirme yönteminde polimer çözeltisinin konsantrasyonu yüksek olduğu için oluşan

jet stabilize olmakta ve uzun lifler meydana gelmektedir. Elektropüskürtme yönteminde ise polimer çözeltisinin konsantrasyonu düşük olduğu için Taylor konisi şeklinde oluşan jet sonucunda kapsüller oluşmaktadır [15].



Şekil 3. Elektropüskürtme ve elektroçirgirme yöntemiyle üretilen mikro/nano kapsüller (a) ve lifler (b)
(Fotoğraflar: Ayhan Oral)

ELEKTROPÜSKÜRTME YÖNTEMİ İLE PROBIYOTİK MİKROORGANİZMALARIN MİKROKAPSÜLASYONU

Probiyotik mikroorganizmalar, raf ömrü sonuna kadar üründe canlı kalabilmeli ve vücuda alındıktan sonra gastrointestinal sistemden geçişleri süresince yüksek asitlik ve enzim gibi sindirim salgılarına maruz kaldıklarında aktivitelerini koruyarak bağırsak hücrelerine kolonize olabilmelidir [23]. Son yıllarda yapılan çalışmalar elektropüskürtme yönteminin probiyotik mikroorganizmaların canlılığını gerek depolama süresince gerekse gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında koruyabileceğini ortaya koymaktadır [24].

Elektropüskürtme koşullarının optimizasyonunun yapıldığı bir çalışmada, dondurularak kurutulmuş probiyotik bakterinin elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsülasyonunu incelemek için 37°C'de 24 saat durma evresine kadar geliştirilen *Lactobacillus plantarum* CECT 748 T bakterisi 0.1 g/mL maltodekstrin içeren fosfat tampon tuzu içinde dondurularak kurutulmuştur. Dondurularak kurutulan ve kurutulmayan *L. plantarum* CECT 748 T 9-10 log kob/mL düzeyinde olacak şekilde 0.3 g/mL konsantrasyonunda hazırlanan peyniraltı suyu konsantresi ile karıştırılıp, karışıma farklı oranlarda Fibersol (%0, 10 ve 20) ve Tween 20 (%1, 5 ve 9) eklenerek farklı voltaj koşullarında (10, 12 ve 14 kV), 0.15 mL/saat akış hızında elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsüller üretilmiştir. Çalışmada, farklı üretim koşullarında üretilen, en yüksek bakteri canlılığına ve yükleme verimliliğine sahip olan mikrokapsüller seçilerek %53 ve %75 bağıl nem koşullarına dayanıklılıkları ve simüle sindirim sistemi sıvıları içerisindeki salınımları incelenmiştir. En yüksek yükleme verimliliği değerine, %10 oranında Fibersol ile %9 oranında Tween 20 içeren ve 14 kV voltaj uygulanarak üretilen mikrokapsüllerin sahip olduğu belirlenmiştir. *L. plantarum* CECT 748 T'nin canlılığı üzerine elektropüskürtme sırasında uygulanan voltajın ve kaplama çözeltisine eklenen Fibersol miktarının etkisi olmadığı saptanırken, kaplama çözeltisindeki Tween 20

miktarı arttıkça *L. plantarum* CECT 748 T'nin canlılığının korunduğu tespit edilmiştir. Farklı koşullarda üretilen tüm mikrokapsüller için *L. plantarum* CECT 748 T sayısının 8.7 ile 9.3 log kob/g arasında değiştiği, elektropüskürtme uygulaması sonunda en fazla azalmanın 0.99 log kob/g olduğu belirlenmiştir. Dondurularak kurutulmuş mikrokapsüle *L. plantarum* CECT 748 T sayısının %75 bağıl nem altında bir gün sonunda 1 log kob/g azaldığı ve bir haftalık depolama periyodu sonunda ortamda canlı hücre kalmadığı saptanmıştır. Bağıl nemin %53 olduğu koşullar altında kurutma işlemi uygulanmayan mikrokapsüle *L. plantarum* CECT 748 T'nin sayısının 45 gün sonunda yaklaşık 7.0 log kob/g olduğu tespit edilmiştir. Dondurularak kurutulduktan sonra mikrokapsüllenen *L. plantarum* CECT 748 T sayısının 37°C'de 2 saat süresince simüle mide sıvısına (pepsin (2000 U/mL), pH 3.0) maruz kaldıktan sonra yaklaşık 2.0 log kob/g azaldığı saptanmıştır. Simüle bağırsak sıvısına (safra ekstraktı ile pankreatin, pH 7.0) 2 saat süresince maruz bırakılan dondurularak kurutulmayan *L. plantarum* CECT 748 T içeren mikrokapsüllerdeki bakteri canlılığının, dondurularak kurutulmuş *L. plantarum* CECT 748 T içeren mikrokapsüllerdekine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [25].

Yapılan bir çalışmada, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 4552 maltodekstrin, peyniraltı suyu konsantresi, zein ve polivinilpirolidon ile elektropüskürtme yöntemi ile kaplanmıştır. Elektropüskürtme uygulaması için %20 oranında maltodekstrin ve %20 oranında peyniraltı suyu konsantresi içeren çözeltiler ile %12'lik zein ve %10'luk polivinilpirolidon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin viskozitelerinin sırasıyla 2.45, 27.15, 18.77 ve 202.39 cP olduğu belirlenirken, yüzey gerilimi değerlerinin sırasıyla 25.90, 31.73, 25.50 ve 30.30 mN/m olduğu tespit edilmiştir. *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 bakterisi 48 saat süresince 37°C'de geliştirildikten sonra 10 log kob/mL olacak şekilde %10'luk maltodekstrin çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra kapsülasyon işlemi için kullanılmak üzere dondurularak kurutulmuştur. Elektropüskürtme ile mikrokapsülasyon uygulaması üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci

aşamada, farklı kaplama materyalleri kollektör üzerine elektropüskürtülmüştür. İkinci aşamada, dondurularak kurutulmuş toz halindeki *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 bakterisi kollektör üzerindeki alt katman üzerine serilmiştir. Üçüncü aşamada, tam kapsülasyonu sağlayabilmek için dondurularak kurutulmuş bakteri üzerine tekrar farklı kaplama materyalleri elektropüskürtülmüştür. Maltodekstrin ve peyniraltı suyu konsantresi ile elde edilen partiküllerin küre şeklinde ve ortalama boyutlarının sırasıyla 1.95 ve 2.47 µm olduğu saptanırken, polivinilpirolidon çözeltisi ile elde edilen partiküllerin lif yapısında ve ortalama boyutlarının 0.15 µm olduğu belirlenmiştir. Viskozite ve yüzey gerilimi değerlerinin partiküllerin yapısının şekillenmesinde etkin rol aldığı değerlendirilmiştir. Farklı kaplama materyalleri ile kaplanmış ve serbest formdaki *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 bakterisi 23°C'de %23 ve %0 bağıl nem değerleri ile 37°C'de %23 bağıl nem değerine sahip koşullarda depolanmış ve bakteri canlılığı incelenmiştir. Depolama sıcaklığının 37°C ve bağıl nemin %23 olduğu ortama maruz bırakılan serbest formdaki *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552'nin 10 günün sonunda canlılığını tamamen kaybettiği saptanırken, polivinilpirolidon ile kaplanan *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 sayısında 10 günün sonunda yaklaşık 4 log azalma olduğu belirlenmiştir. Depolama sıcaklığının 23°C, bağıl nemin ise %23 ve %0 olduğu koşullar altında serbest formdaki dondurularak kurutulmuş *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552'nin canlılığını sırasıyla 600 ve 700 gün süresince koruduğu tespit edilmiştir. Peyniraltı suyu konsantresi ile kaplanan *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552 sayısının 23°C'de %23 ve %0 bağıl nemde 600 gün sonunda sırasıyla yaklaşık 6.0 ve 4.0 log kob/g olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, peyniraltı suyu konsantresinin kaplama materyali olarak kullanıldığı mikrokapsüllerin *B. longum* subsp. *infantis* CECT 4552'nin canlılığını diğer kaplama materyalleri ile üretilen mikrokapsüllerden daha iyi koruduğu değerlendirilmiştir [26].

López-Rubio ve ark. [27] yaptıkları çalışmada, fosfat tampon tuzu ve yağsız sütle hazırladıkları %30'luk peyniraltı suyu konsantresi çözeltisine 10¹⁰ hücre/mL düzeyinde olacak şekilde *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ekledikten sonra elektropüskürtme tekniğini (0.3 mL/saat akış hızında, 7 cm kollektör uzaklığında ve 12-14 kV yüksek voltaj koşullarında) kullanarak kaplayıp, ürettikleri mikrokapsüllerin morfolojik özellikleri ile farklı depolama koşullarında (4 ve 20°C'de % 0, 11, 53 ve 75 bağıl nemde) mikrokapsüle, serbest ve dondurularak kurutulmuş *B. animalis* Bb 12'nin canlılığını incelemişlerdir. Çalışmanın kontrol gruplarını 10¹⁰ hücre/mL düzeyinde *B. animalis* Bb 12 içeren PBS (fosfat tampon tuzu) ve yağsız süt, %30 oranında peyniraltı suyu konsantresi ve 10¹⁰ hücre/mL düzeyinde *B. animalis* Bb 12 içeren PBS (fosfat tampon tuzu) ve yağsız süt çözeltileri ile söz konusu çözeltilerin dondurularak kurutulmuş formları oluşturmuştur. Peyniraltı suyu konsantresinin yağsız süt ile hazırlanan karışımı ile kaplanarak elde edilen mikrokapsüllerin boyutlarının 1 µm'den büyük olduğu ve elektropüskürtme sırasında iplik yapısının oluşmadığı saptanmıştır. Depolama sıcaklığının 20°C olduğu koşullarda, yağsız sütte 62. günün sonunda, peyniraltı

su konsantresi içeren çözeltilerin dondurularak kurutulmasıyla elde edilen örneklerde 70. günün sonunda ve elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsül örneklerinde 140. günün sonunda *B. animalis* Bb 12 tespit edilemezken, 4°C'de depolanan mikrokapsül örneklerinde 140. günün sonunda *B. animalis* Bb 12 sayısının 10⁶ hücre/mL olduğu belirlenmiştir. Yüksek bağıl nem koşullarında bakteri canlılığının azaldığı, en yüksek canlılığın %11 bağıl nemde depolanan örneklere ait olduğu tespit edilmiştir. Dondurularak kurutulmuş örneklerde %11 bağıl nemde 82. günün sonunda bakterilerinin tamamının inhibe olduğu saptanırken, mikrokapsül örneklerinde *B. animalis* Bb 12 sayısının 120. günde yaklaşık 10⁶ hücre/mL olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada, %4.0'lük düşük metoksili sitrik pektin çözeltisi ile desteklenmiş %4.0'lük aljinat çözeltisi ile %3.0'lük aljinat çözeltilerine 11.0 log kob/mL düzeyde olacak şekilde *Lactobacillus plantarum* BL011 eklenmiştir. Hazırlanan karışımlar 2.0 mL/saat akış hızında, 24 kV voltaj altında ve 15 cm uzaklıktan elektropüskürtme cihazı ile 0.5 M CaCl₂ çözeltisi içine püskürtülerek mikrokapsül oluşturulmuş ve mikrokapsüller 4°C'de 21 gün süresince depolanmıştır. Mide sıvısını simüle etmek için 3.0 g/L pepsin ile %0.5 NaCl içeren ve pH değeri 2.0 olan 1.8 mL çözelti içine 0.4 mL serbest ve mikrokapsül formda *L. plantarum* BL011 konulup 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. Simüle mide sıvısı içinde 120 dakika sonunda, sadece aljinat ve düşük metoksili sitrik pektin içeren aljinat çözeltileri kullanılarak mikrokapsüllenen *L. plantarum* BL011 sayısının sırasıyla yaklaşık 8.0 ve 7.0 log kob/mL olduğu belirlenirken, serbest formdaki *L. plantarum* BL011 sayısının yaklaşık 4.0 log kob/mL olduğu saptanmıştır. Bağırsak sıvısını simüle etmek için 1.0 g/L safra tuzu ile %0.5 NaCl içeren ve pH değeri 8.0 olan 1.8 mL çözelti içine 0.4 mL serbest ve mikrokapsül formda *L. plantarum* BL011 konulup 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. Simüle bağırsak sıvısı içinde 120 dakika sonunda serbest formdaki *L. plantarum* BL011 sayısının yaklaşık 5.0 log azaldığı, sadece aljinat ve düşük metoksili sitrik pektin içeren çözeltileri kullanılarak mikrokapsüllenen *L. plantarum* BL011 sayısının sırasıyla yaklaşık 1.0 ve 1.5 log azaldığı tespit edilmiştir. Depolamanın 21. gününde kaplama çözeltileri içinde saklanan serbest formdaki *L. plantarum* BL011 sayısının 1 log kob/mL olduğu saptanırken, mikrokapsüle *L. plantarum* BL011'in sayısının ise yaklaşık 9 kob log/mL olduğu belirlenmiştir [28].

Coghetto ve ark. [12] yaptıkları diğer bir çalışmada, %3.0 oranında sodyum aljinat çözeltisine 10.5 log kob/mL düzeyinde *Lactobacillus plantarum* BL011 ekleyerek karışımı 2.0 mL/saat akış hızında, 24 kV voltaj altında ve 15 cm uzaklıktan elektropüskürtme cihazı ile 0.5 M CaCl₂ çözeltisi içine püskürtülerek mikrokapsül oluşturulmuştur. Elde edilen mikrokapsüller -50°C'de 24 saat süresince dondurularak kurutulmuş ve 25°C'de 6 ay süresince depolanmıştır. Kurtulmuş mikrokapsüller portakal suyuna *L. plantarum* BL011 sayısı 10 log kob/200 mL olacak şekilde konulmuş ve 0.4 mL portakal suyu 1.8 mL simüle mide (3.0 g/L pepsin ile %0.5 NaCl, pH 2.0) ve bağırsak (1.0 g/L

pankreatin ile %0.5 NaCl ve pH 8.0) sıvıları ile karıştırılarak 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince simüle mide ve bağırsak sıvılarından her 30 dakikada bir örnek alınarak *L. plantarum* BL011 sayısı belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca mikrokapsüle *L. plantarum* BL011 içeren portakal suyunda duyu analizi gerçekleştirilmiştir. Simüle mide ve bağırsak sıvıları için portakal suyu ile verilen mikrokapsüle *L. plantarum* BL011 sayısının 120 dakika sonunda sırasıyla 8.3 ve 9.2 log kob/mL olduğu belirlenmiştir. Çalışmada portakal suyuna ilave edilen serbest formdaki *L. plantarum* BL011'in simüle mide ve bağırsak sıvılarındaki canlılığı incelenmiş ve 120 dakika sonunda mide ve bağırsak sıvıları içindeki *L. plantarum* BL011 sayıları sırasıyla yaklaşık olarak 3.0 ve 4.5 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Yapılan duyu analizi sonucunda mikrokapsüle bakteri içeren portakal suyu ile içinde bakteri bulunmayan portakal suyu arasında görünüş, renk, koku, tat ve kıvam puanları açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır. Çalışma sonunda elektropüskürtme yöntemi ile mikrokapsülasyon işleminin probiyotik bakterilerin canlılığını simüle gastrointestinal sıvılar içinde koruduğu ve mikrokapsüllerin ürünün duyu kalitesi üzerine olumsuz etki göstermediği değerlendirilmiştir.

Lactobacillus acidophilus TISTR 1338'in elektropüskürtme yöntemi kullanılarak zein-aljinat çözeltisi ile mikrokapsülendiği bir çalışmada, farklı voltaj (4, 6 ve 10 kV) uygulamalarının mikrokapsüllerin yapısına ve *L. acidophilus* TISTR 1338'in canlılığına olan etkisi incelenmiştir. Mikrokapsüllerin üretilmesi için 20 mL steril %8.0 oranında gliserol içeren %1.4'lük aljinat çözeltisi içine 1.0 mL 10⁹ kob/mL düzeyinde *L. acidophilus* TISTR 1338 içeren çözeltiden ilave edilerek, %7.0 oranında hazırlanan zein çözeltisi içerisinde 4, 6 ve 10 kV voltaj altında 10 mL/saat akış hızında, 6 cm uzaklıktan püskürtülmüştür. Mikrokapsüllerin ortalama büyüklüklerinin 4, 6 ve 10 kV değerleri için sırasıyla 543±88, 313±69 ve 259±62 µm olduğu belirlenmiştir. Uygulanan voltaj değeri yükseldikçe yüklü moleküller arasındaki elektriksel itme kuvvetinin artması sonucunda oluşan partiküllerin daha küçük olduğu bildirilmiştir. *L. acidophilus* TISTR 1338 sayısının 4, 6 ve 10 kV uygulanarak üretilen mikrokapsüllerde sırasıyla 8.85±0.21, 8.29±0.41 ve 8.31±0.23 log kob/mL olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca simüle mide sıvısında (pH 1.2) mikrokapsüle ve serbest formdaki *L. acidophilus* TISTR 1338'in canlılığındaki değişim belirlenmiştir. Simüle mide sıvısı içinde 37°C'de 2 saat tutulan serbest formdaki *L. acidophilus* TISTR 1338'un sayısının yaklaşık 5.0 log kob/mL azaldığı, 6 ve 10 kV voltaj altında üretilen mikrokapsüle *L. acidophilus* TISTR 1338 sayısının sırasıyla yaklaşık 1.2 ve 1.7 log kob/mL azaldığı saptanmıştır [11].

Elektropüskürtme yöntemiyle probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsüllemesinde ajinat başta olmak üzere peyniraltı suyu konsantresi, zein gibi protein yapıdaki bileşikler; maltodekstrin, pektin gibi karbonhidrat yapıdaki bileşikler ile PVP gibi sentetik bileşikler kullanılabilir. Kullanılan kaplama materyallerinin konsantrasyonlarına, viskozitelerine, yüzey gerilim ve iletkenlik değerlerine bağlı olarak elde

edilen mikrokapsüllerin şekil ve büyüklük gibi fiziksel özelliklerinin yanı sıra probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını korumadaki etkinlikleri de değişmektedir. Mikrokapsülasyon sırasında uygulanan voltaj değerlerindeki artış ile birlikte elde edilen mikrokapsüllerin boyutları küçülmektedir [30]. Çalışmalar, elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsüllerin *in vitro* koşullar altında simüle mide ve bağırsak sıvılarında probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını yeterli düzeyde koruduklarını ortaya koymuştur. Depolama sıcaklığı ile bağlı nemdeki artışın mikrokapsüle probiyotik mikroorganizmaların canlılığını genel olarak olumsuz etkilediği; ancak aynı depolama koşulları altında mikrokapsüle probiyotik bakterilerin canlılıklarının, dondurularak kurutulmuş ve serbest haldeki örneklerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu değerlendirilmiştir.

SONUÇ

Elektropüskürtme yöntemi ile mikrokapsülasyon probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarının korunması için kullanılacak gelişmekte olan etkili bir kaplama tekniğidir. Yapılan çalışmalar elektropüskürtme yöntemiyle mikrokapsülasyon işleminin probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını farklı depolama koşullarında korumada başarılı olduğunu göstermekle birlikte, elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsüle probiyotik mikroorganizmaların gıdalarda kullanımına ve depolama süresince gıdalardaki canlılıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar mevcut değildir. Konu ile ilgili yapılacak çalışmalarda, özellikle gıda üretiminde kullanılacak ve gıdaların raf ömürlerinin sonuna kadar stabilitesini koruyabilecek mikrokapsüllerin oluşturulmasına odaklanılmalıdır. Bununla birlikte elektropüskürtme yöntemiyle üretilen mikrokapsüle probiyotik mikroorganizmaların stabilitesinin insan gastrointestinal sistemini daha iyi simüle edebilecek dinamik *in vitro* sistemlerde ve ayrıca *in vivo* olarak araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Terpou, A., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A. A., Nigam, P., 2017. Enhanced probiotic viability and aromatic profile of yogurts produced using wheat bran (*Triticum aestivum*) as cell immobilization carrier. *Process Biochemistry* 55: 1-10.
- [2] Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., Shao, D., Xu, X., Shi, J., Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT - Food Science and Technology*: Accepted manuscript.
- [3] Anonim, 2006. FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.
- [4] Chaikham, P., Kemsawasd, V., Seesuriyachan, P., 2017. Spray drying probiotics along with maoulang juice plus *Tiliacora triandra* gum for exposure to the *in vitro* gastrointestinal environments. *LWT - Food Science and Technology* 78: 31-40.

- [5] Shori, A.B., 2017. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences* 24(1): 1-5.
- [6] Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., Wani, S. M., 2017. Effect of double alginate microencapsulation on *in vitro* digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT - Food Science and Technology* 83: 50-58.
- [7] Çomak Göçer, E. M., Aşçı Arslan, A., Ergin, F., Küçükçetin, A., 2013. Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu. *Yetişkin ve Çocuklarda Probiyotikler* (1): 63-69.
- [8] Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., Morales, M. E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 27: 15-25.
- [9] Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N. S., Grosso, C. R. F., Gigante, M. L., 2014. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International* 66: 424-431.
- [10] Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C. J., Adhikari, B. P., 2017. *In-vitro* digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Food Chemistry* 227: 129-136.
- [11] Laelorspoen, N., Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., Devahastin, S., 2014. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein-alginate core-shell microcapsules via electrospraying. *Journal of Functional Foods* 7: 342-349.
- [12] Coghetto, C. C., Flores, S. H., Brinques, G. B., Ayub, M. A. Z., 2016. Viability and alternative uses of a dried powder, microencapsulated *Lactobacillus plantarum* without the use of cold chain or dairy products. *LWT-Food Science and Technology* 71: 54-59.
- [13] Karakaya, M. C., Abdullahoğlu, R., Tunçer, O., Kızıl, H., Trabzon, I., 2014. Bir elektrosprey enjektörün deneysel incelenmesi. *Isı Bilimi ve Teknigi Dergisi/Journal of Thermal Science & Technology* 34(1): 63-76.
- [14] Badilli, U., Tarımcı, N., Elektro-püskürtme yöntemi ve nanoteknolojideki uygulamaları. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 38(2): 117-135.
- [15] Anu Bhushani, J., Anandharamakrishnan, C., 2014. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology* 38(1): 21-33.
- [16] Jaworek, A., Krupa, A., 1999. Classification of the modes of EHD spraying. *Journal of Aerosol Science* 30(7): 873-893.
- [17] Jaworek, A., Sobczyk, A., 2008. Electrospinning route to nanotechnology: an overview. *Journal of electrostatics* 66(3): 197-219.
- [18] Bock, N., Dargaville, T. R., Woodruff, M. A., 2012. Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: state of the art. *Progress in polymer science* 37(11): 1510-1551.
- [19] Okutan, N., Terzi, P., Altay, F., 2014. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids* 39: 19-26.
- [20] Cloupeau, M., Prunet-Foch, B., 1994. Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review. *Journal of Aerosol Science* 25(6): 1021-1036.
- [21] Jaworek, A., Krupa, A., 1999. Jet and drops formation in electrohydrodynamic spraying of liquids. A systematic approach. *Experiments in fluids* 27(1): 43-52.
- [22] Enayati, M., Chang, M.-W., Bragman, F., Edirisinghe, M., Stride, E., 2011. Electrohydrodynamic preparation of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 382(1): 154-164.
- [23] Chen, H.-Y., Li, X.-Y., Liu, B.-J., Meng, X. H., 2017. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods* 29: 248-255.
- [24] Ghorani, B., Tucker, N., 2015. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids* 51: 227-240.
- [25] Gomez-Mascaraque, L. G., Morfin, R. C., Pérez-Masiá, R., Sanchez, G., Lopez-Rubio, A., 2016. Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT-Food Science and Technology* 69: 438-446.
- [26] Librán, C., Castro, S., Lagaron, J., 2017. Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 39: 216-222.
- [27] López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., Lagaron, J. M., 2012. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* 28(1): 159-167.
- [28] Coghetto, C. C., Brinques, G. B., Siqueira, N. M., Pletsch, J., Soares, R. M. D., Ayub, M. A. Z., 2016. Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. *Journal of Functional Foods* 24: 316-326.
- [29] Khan, M. K. I., Nazir, A., Maan, A. A., 2017. Electrospinning: a Novel Technique for Efficient Coating of Foods. *Food Engineering Reviews*: 1-8.