

**ELEKTROEĞRİLMİŞ POLİVİNİL ALKOL/SELÜLOZ
ASETAT HİBRİT FİBERLERE PROBİYOTİK
ENKAPSÜLASYONU**

**PROBIOTIC ENCAPSULATION IN ELECTROSPUN
POLYVINYL ALCOHOL/CELLULOSE ACETATE
HYBRID FIBERS**

EMİNE MERVE ÇANGA

DR. ÖĞR. ÜYESİ FAHRİYE CEYDA DUDAK ŞEKER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

ÖZET

ELEKTROEĞRİLMİŞ POLİVİNİL ALKOL/SELÜLOZ ASETAT HİBRİT FİBERLERE PROBİYOTİK ENKAPSÜLASYONU

Emine Merve ÇANGA

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

Ocak 2020, 72 sayfa

Son yıllarda bağırsak sağlığının önemi ilgi çeken konular arasındadır. Probiyotik mikroorganizmaların bağırsak sağlığının devamlılığında oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Ancak sağlık üzerinde olumlu birçok etkisi bulunan bu mikroorganizmalar çeşitli faktörlere karşı yüksek duyarlılığa sahiptir. Probiyotiklerin farklı şartlara karşı direncinin artırılması için enkapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır. Elektroegirme yöntemi probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonunda kullanılan yöntemlerden biridir.

Tez kapsamında yapılan çalışmada, açılı çift nozul elektroegirme sistemi kullanılarak polivinil alkol (PVA) ile selüloz asetat (cellulose acetate, CA) hibrit fiberleri üretilmiştir. İlk kez probiyotik enkapsülasyonu amacıyla CA kullanılan çalışmada sindirim sistemi koşullarına dirençli enkapsülasyon materyali üretmek amaçlanmıştır. Sulu ortamla temas

halinde fiber yapısı bozulacağından, suda çözünen polimerlerin enkapsülasyon amacıyla kullanılması bazı kısıtlamaları beraberinde getirmektedir. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için çalışma kapsamında suda çözünmeyen bir polimer (CA) kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak CA çözeltisi hazırlarken kullanılan solventler mikroorganizmalar üzerinde toksik etki gösterebilmektedir. Bu olumsuz etki, açılı çift nozul elektroğirme sistemi sayesinde solventin mikroorganizma ile teması önlenerek engellenmiştir. Açılı çift nozul elektroğirme yönteminde CA ve PVA çözeltileri sisteme iki ayrı nozuldan beslenmiş ve oluşan fiber jetlerinin çakışmasıyla hibrit bölgeler yaratılmıştır. Kullanılan bu sistem sayesinde PVA çözeltisi içine inoküle edilmiş olan *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), CA'nın çözücüsüne maruz kalmadan hibrit fiberlere enkapsüle edilmiştir. Elektroğirme prosesi öncesinde polimer çözeltilerinin hazırlanmasında farklı çözücüler denenmiş ve damla kusuru olmayan, tek düze fiber üretimine imkan veren CA'nın asetik asit-etanol (8:2 (h/h)) ile hazırlanmış %20 (a/h)'lik çözeltisinin kullanılmasına, PVA'nın % 1.0 (a/a) Triton X-100 içeren 1 mM PBS (pH 7.4) ile hazırlanan %10 (a/h)'lik çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Daha sonra EcN'nin PVA – CA hibrit fiberleri (PVA/CA fiberleri) içerisine enkapsülasyonu (PVA/CA-EcN fiberleri) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere PVA – PVA hibrit fiberleri (PVA/PVA fiberleri) de üretilmiş ve EcN enkapsüle edilmiş PVA/PVA fiberleri (PVA/PVA-EcN fiberleri) üretilmiştir. Enkapsülasyon sonrası elektroğirme prosesinin canlılık üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan enkapsülasyon verimi analizinde her iki hibrit fiberde de %90'nın üzerinde enkapsülasyon verimi elde edilmiştir. Daha sonra sindirim sistemi simülasyonu, hibrit fiberlere enkapsüle edilmiş probiyotik mikroorganizmaların sindirim sistemi direnci araştırılmıştır. PVA/CA-EcN fiberlerinin simülasyon sonuçları değerlendirildiğinde sadece serbest EcN'ye karşı değil aynı zamanda PVA/PVA-EcN fiberlerine kıyasla daha yüksek canlılık sonuçları elde edilmiştir. Bu durum üretilen PVA/CA fiberlerinin probiyotik mikroorganizmaların sindirim sistemi koşullarına direncini arttırmak amacıyla kullanılabilecek bir enkapsülasyon materyali olduğunu göstermektedir.

Son olarak farklı sıcaklıklarda yapılan depolama süresinin sonunda PVA/CA-EcN fiberleriyle probiyotiklerin canlılığının uzun süre korunabildiği görülmüştür. Çalışmanın sonucunda, açılı çift nozul elektroğirme sistemi sayesinde CA'nın solventinin neden

olduğu olumsuz etkiler engellenerek, suda çözünmeme ve sindirim sistemine direnç gibi avantajlarından yararlanılabilen ve probiyotik enkapsülasyonunda kullanılabilen bir hibrit fiber üretilmiştir. Üretilen PVA/CA fiberleri ile sindirim sistemi koşullarına dayanıklı ve bu sayede probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonunda avantaj sağlayabilecek bir enkapsülasyon materyali üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik mikroorganizmalar, enkapsülasyon, elektroğirme, fiber, selüloz asetat.

ABSTRACT

PROBIOTIC ENCAPSULATION IN ELECTROSPUN POLYVINYL ALCOHOL/CELLULOSE ACETATE HYBRID FIBERS

Emine Merve ÇANGA

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

January 2020, 72 pages

The importance of intestinal health has been getting attention in recent years. Probiotic microorganisms are known to be very important for intestinal health. Although these microorganisms affect the health positively, they have high sensitivity to various factors. Encapsulation techniques are used to increase the resistance of probiotics towards different conditions. Electrospinning is one of the encapsulation methods used for probiotic microorganisms. In this thesis, polyvinyl alcohol (PVA) – cellulose acetate (CA) hybrid fibers (PVA/CA fibers) were produced by using angled dual nozzle electrospinning system. The aim of this study is to produce encapsulation material, resistant to digestive system conditions by using CA. CA was used for the first time for probiotic encapsulation with this project. The use of water soluble polymers for encapsulation has some limitations. Fibers lose their integrity due to contact with aqueous media. In order to overcome these limitations, a water insoluble polymer, CA was used for encapsulation. However, it was known that the solvents, which was used to prepare

CA solution, may have toxic effects on microorganisms. This undesirable effect was prevented by angled double nozzle electrospinning system to avoid the contact of the solvent with the microorganism. CA and PVA solutions were fed into the system from different nozzles with angled double nozzle electrospinning system. Hybrid fibers were produced as a result of overlapping fiber jets. Using the developed system, *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), which was inoculated into PVA solution, was encapsulated in hybrid fibers without exposure to the toxic solvent of CA.

Firstly, the solutions which were used to produce hybrid fiber, were optimized. 20% (a/h) CA (acetic acid: ethanol(8:2, v/v)) and 10% (a/h) PVA (1 mM PBS (pH 7.4) containing 1% Triton X-100) solutions were used for uniform and beadless fiber production. Then, EcN was encapsulated into PVA/CA fibers (PVA/CA-EcN fibers). As the control, EcN was encapsulated into PVA – PVA hybrid fibers (PVA/PVA-EcN fibers). It was observed that the electrospinning process had no significant adverse effect on viability. Encapsulation efficiency was found to be over 90% in both hybrid fibers. Digestive resistant of encapsulated probiotic microorganisms was investigated by in vitro simulation. It was observed that higher viability results were obtained from PVA/CA-EcN fibers, compared to not only free EcN but also PVA/PVA-EcN fibers. This results showed that PVA/CA fibers can be used to increase the resistance of probiotic microorganisms to digestion condition. It was found that the stabilization of probiotics encapsulated with PVA/CA-EcN fibers could be protected for a long time. By using angled double nozzle electrospinning, a hybrid fiber has been produced which can be used for probiotic encapsulation without disadvantages of the CA solvent.

The results of the study showed that PVA/CA fibers provided remarkable resistance to digestive system conditions, which is a critical issue for the encapsulation of probiotic microorganisms.

Keywords: Probiotic microorganisms, encapsulation, electrospinning, fiber, cellulose acetate.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansta geçirdiğim yıllar boyunca bilgisini, zamanını, deneyimini benden esirgemeyen ve karşılaştığım her sorunda yanımda olan tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu süreç boyunca her zaman yol gösterici olduğu ve bana yeni bakış açıları kazandırdığı için onun öğrencisi olarak kendimi şanslı hissediyorum.

Her türlü konuda görüşlerini ve desteklerini aldığım, arkadaşlıklarıyla hayatıma renk katan FCD LAB üyeleri sevgili Nurdan ERSÖZ, Hafize Öz, Merve ERMAN ve Nazım Sergen MISIRLI'ya teşekkür ederim.

Tecrübelerinden ve dostluklarından yararlandığım sayın hocalarım Ar. Gör. Seda YILDIRIM ELİKOĞLU ve Uz. Meltem ZENCİR'e teşekkürlerimi sunarım. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünün sayın öğretim üyeleri ve personeline,

Her zaman ve koşulda yanımda yer alan, şefkat ve anlayışlarını hiç esirgmeden yürüdüğüm yolda daima arkamda olduklarını hissettiğim, sevgili annem Sıdika ÇANGA, babam Ahmet ÇANGA, kardeşlerim Fatih ÇANGA, Pınar EROĞLU ve yeğenlerim Muhammed Ali ve Eylül'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ve 1002-1180860 kodlu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Emine Merve ÇANGA

Ocak 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Probiyotik Mikroorganizmalar	3
2.1.1. Probiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri	3
2.1.2. Probiyotik Ürünler	4
2.1.3. Çevresel Faktörlere Duyarlılık ve Efektif Doz	5
2.2. Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu	6
2.2.1. Emülsiyon	7
2.2.2. Ekstrüzyon	7
2.2.3. Sprey Kurutma	8
2.2.4. Dondurarak Kurutma	8
2.3. Elektroğirme.....	9
2.3.1. Elektroğirme Sistemini Etkileyen Parametreler.....	11
2.3.2. Probiyotiklerin Elektroğirme Yöntemiyle Enkapsülasyonu	14
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler	17
3.1.2. Elektroğirme Cihazı	17

3.1.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu	17
3.1.4. Termogravimetrik Analizör.....	18
3.2. Metot 18	
3.2.1. Elektroğirme Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	18
3.2.2. PVA ve CA Fiberlerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu	19
3.2.3. PVA/CA Fiberlerinin Eldesi ve Karakterizasyonu	20
3.2.4. EcN'nin Hibrit Fiberlere Enkapsülasyonu	21
3.2.5. Elektroğirme Prosesinin Mikroorganizma Canlılığına Etkisi ve Enkapsülasyon Verimliliği.....	22
3.2.6. Sindirim Sistemi Simülasyonu	24
3.2.7. Depolama Koşullarının Canlılığa Etkisi	26
3.2.8. İstatistiksel Analiz	27
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Çözelti Özelliklerinin Fiber Morfolojisine Etkisi	28
4.2. Hibrit Fiberlerin Morfolojik ve Termal Karakterizasyonu.....	40
4.3. EcN'nin Hibrit Fiberlere Enkapsülasyonu	46
4.4. Elektroğirmenin EcN Canlılığına Etkisi	49
4.5. Enkapsülasyon Verimliliği	50
4.6. Sindirim Sistemi Simülasyonu	51
4.7. Depolama Koşullarının EcN Canlılığı Üzerine Etkisi	53
5. YORUM	57
6. KAYNAKLAR.....	63
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	71
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Probiyotik ürünler.....	5
Şekil 2.2.	Yıllara göre "electrospinning" konu başlıklı makale sayısı.....	9
Şekil 2.3.	Elektroçirime düzeneğinin şematik gösterimi	10
Şekil 3.1.	Açılı çift nozul elektroçirime sisteminin şematik gösterimi.....	20
Şekil 4.1.	Farklı solventlerle hazırlanmış %17 (a/h) CA çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları.....	30
Şekil 4.2.	Farklı konsantrasyonlardaki CA çözeltilerden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları	32
Şekil 4.3.	Farklı akış hızlarındaki CA (%20 (a/h)) çözeltilerden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları	33
Şekil 4.4.	Farklı konsantrasyonlardaki PVA çözeltilerinden elde edilen ESEM görüntüleri	34
Şekil 4.5.	Farklı solventlerle hazırlanmış %10 (a/h) PVA çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları.....	37
Şekil 4.6.	Farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 kullanılarak hazırlanmış %10 (a/h)'luk PVA (1 mM PBS, pH 7.4) çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları	39
Şekil 4.7.	Farklı akış hızlarında sisteme beslenen % 1.0 (a/a) Triton X-100 içeren %10 (a/h)'luk PVA (1 mM PBS, pH 7.4) çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları	40
Şekil 4.8.	CA/CA fiberlerinin farklı büyütmelelerdeki ESEM görüntüleri.....	41
Şekil 4.9.	PVA/PVA fiberlerinin farklı büyütmelelerdeki ESEM görüntüleri.....	42
Şekil 4.10.	PVA/CA fiberlerinin farklı büyütmelelerdeki ESEM görüntüleri	43
Şekil 4.11.	Hibrit fiberlerin termogravimetrik özellikleri.....	45
Şekil 4.12.	Hibrit fiberlerin DTG analizi.....	45
Şekil 4.13.	PVA/PVA-EcN fiberlerinin farklı büyütmelelerdeki ESEM görüntüleri	47
Şekil 4.14.	PVA/CA-EcN fiberlerinin farklı büyütmelelerdeki ESEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.15.	Sindirim sistemi simülasyonunda bakteri canlılığının zamana bağlı değişimi	52

- Şekil 4.16. Tampon içerisinde depolanan örneklerin zamana bağlı olarak canlılıklarında meydana gelen değişim, A) 20°C; B) 4°C54
- Şekil 4.17. Kuru formda depolanan örneklerin zamana bağlı olarak canlılıklarında meydana gelen değişim, A) 20°C; B) 4°C56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Simüle mide çözeltisi (SMÇ) ve Simüle bağırsak çözeltisi (SBÇ) ortamlarındaki bileşenler	24
Çizelge 4.1. Farklı solventler kullanılarak hazırlanmış %17 (a/h)'lik CA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri	28
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki (% a/h) CA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri.....	29
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki (% a/h) PVA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri.....	34
Çizelge 4.4. Farklı solventler kullanılarak hazırlanmış %10 (a/h)'luk PVA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri	36
Çizelge 4.5. Hibrit fiberlerin farklı bozulma aşamalarındaki T_d ve T_{max} değerleri	44
Çizelge 4.6. Elektroeğirme işleminin E_{cN} 'nin canlılığına etkisi	49
Çizelge 4.7. % Enkapsülasyon verimliliği.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

22G	İç çapı 0.41 mm olan nozul
a/h	Hacimce ağırlık
a/a	Ağırlıkça çözelti
h/h	Hacimce çözelti
M _A	Moleküler ağırlık
T _d	Bozulma başlangıç sıcaklığı
T _{max}	Bozulmanın maksimum olduğu sıcaklık

Kısaltmalar

AAD	Antibiyotikle alakalı diyare
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
CA	Selüloz asetat
CA/CA	Selüloz asetat – selüloz asetat hibrit fiberleri
DMF	Dimetilformamit
DTG	Diferansiyel termogravimetrik analiz
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
EMBA	Eosin Methylene Blue Agar
ESEM	Çevresel taramalı elektron mikroskobu (Environmental scanning electron microscope)
%EV	Yüzde enkapsülasyon verimi
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen
kob	Koloni oluşturan birim

LB	Luria Broth besiyeri
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
PVA	Polivinil alkol
PVA/PVA	Polivinil alkol – polivinil alkol hibrit fiberleri
PVA/CA	Polivinil alkol – selüloz asetat hibrit fiberleri
PVA/PVA-EcN	<i>E. coli</i> Nissle enkapsüle edilmiş polivinil alkol – polivinil alkol hibrit fiberleri
PVA/CA-EcN	<i>E. coli</i> Nissle enkapsüle edilmiş polivinil alkol – selüloz asetat hibrit fiberleri
PEO	Polietilen oksit
SBC	Simüle bağırsak çözeltisi
SMÇ	Simüle mide çözeltisi
TGA	Termogravimetrik analiz
Tukey HSD	Tukey Dürüstçe Anlamlı Fark (Tukey Honestly Significant Difference)

1.GİRİŞ

Patojenik türlerin gelişiminin engellenmesi, bağırsak mikroflorasının sürdürülmesi ve bağırsak hareketlerinin iyileştirilmesi, mineral maddelerin emilimi, vitamin ve antimikrobiyal madde sentezi gibi görevleri olan probiyotik bakteriler, yeterli miktarda alındığında, insan sağlığını olumlu etkiler. Probiyotik mikroorganizmaların bilinen bu etkilerinden dolayı hem probiyotik ilaçların hem de probiyotik gıdaların tüketimine olan talep günümüzde artış göstermektedir. Probiyotik mikroorganizmaların beklenen faydalı etkileri gösterebilmesi için, geliştirilen ürünün raf ömrü süresince belirli sayıda canlı bakteri içermesi ve sindirim sisteminin zor koşullarında da canlılığını koruyarak bağırsak sistemine ulaşması gerekmektedir. Ancak çevresel ortam şartlarına ve sindirim sistemi koşullarına oldukça duyarlı olan bu mikroorganizmaların bağırsağa canlı bir şekilde ulaşabilmesi için olumsuz koşullara karşı direncinin artırılması gerekmektedir.

Yapılan çalışma kapsamında elektroğirme sistemi ile üretilen fiberlere enkapsüle edilen probiyotik mikroorganizmaların bu olumsuz şartlara karşı daha stabil kalması amaçlanmıştır. Mikrometreden nanometre düzeyine kadar çeşitli boyutlarda fiber eldesini sağlayan elektroğirme sistemi, enkapsülasyon materyallerin çok çeşitli olması, yüksek sıcaklık uygulaması gerektirmemesi, elde edilen ürünün yüksek yüzey alanı-hacim oranına sahip olması, kütle taşınımını geliştirmesi ve kontrollü salınımın mümkün olması gibi avantajlara sahip olması nedeniyle enkapsülasyon amacıyla kullanılan bir tekniktir.

Tez kapsamında açılı çift nozul elektroğirme yöntemiyle hibrit fiberler elde etmek için genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) sınıfında yer alan selüloz asetat (cellulose acetate, CA) ve polivinil alkol (PVA) kullanılmıştır. Genel olarak hidrofilik polimerlere kıyasla daha yavaş salınım özelliğine sahip CA'nın, asidik ortamda bazik ortama göre salınım hızının daha yavaş olması avantajından yararlanılarak sindirim sistemine özellikle de mide koşullarına dayanıklı enkapsülasyon materyalinin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamında ilk olarak PVA ve CA polimerlerinin farklı konsantrasyonda ve çözücülerde çözeltileri hazırlanmış ve bu parametrelerin elektroğirme prosesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hazırlanan çözeltilerden elde

edilen fiberlerde çevresel taramalı elektron mikroskobu (environmental scanning electron microscope, ESEM) kullanılarak görüntü analizi yapılmış ve damla kusuru olmayan tekdüze fiberlerin elde edildiği çözeltiler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Kurulan açılı çift nozul elektroğirme sistemi ile PVA – CA hibrit fiberlerinin (PVA/CA fiberleri) üretilip üretilmediğinin kontrolü elde edilen fiberlerinde hibrit bölgelerinin ESEM ile taranmasıyla saptanmıştır. Ayrıca elde edilen fiberlerin termal stabiliteyi termogravimetrik analizör kullanılarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada çeşitli gastrointestinal hastalıklara karşı etkinlik gösterdiği bilinen *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) suşu model probiyotik olarak kullanılmıştır. EcN, toksik özellikte olmayan ve çok iyi fiberleşme özelliklerine sahip olan PVA polimeri ile karıştırılarak sisteme verilmiştir. Açılı çift nozul elektroğirme yönteminin kullanılmasıyla birlikte bir nozuldan sisteme EcN inoküle edilmiş PVA beslenirken, diğer nozuldan beslemesi yapılan CA çözeltisinin solventi olan asetik aside probiyotiklerin teması engellenerek, solventin mikroorganizma üzerindeki toksik etkisi engellenmiş ve EcN enkapsüle edilmiş PVA/CA fiberleri (PVA/CA-EcN fiberleri) elde edilmiştir. Bu çalışma kapsamında üretilen PVA/CA-EcN fiber enkapsülasyonu, CA'nın avantajlarından yararlanılırken, olumsuz etkileri bertaraf edilmiştir. Aynı zamanda bu tez kapsamında ilk kez CA mikroorganizma enkapsülasyonunda kullanılmıştır. Probiyotik enkapsüle edilen fiberlerde, mikroorganizmaların elektroğirme işleminden ne kadar etkilendiği canlılık testleriyle belirlenmiştir. Canlılık analizi sonrası in-vitro sindirim simülasyonu ile PVA/CA-EcN fiberlerinin sindirim sistemi koşullarına karşı direnci araştırılmıştır. Son aşamada enkapsüle haldeki probiyotiklerin 4°C ve 20°C'deki depolama koşullarında canlılıklarını ne kadar süre muhafaza ettikleri analiz edilmiştir.

Tez çalışması sonucunda, PVA/CA fiberleri üretilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu hibrit fiberle yapılan enkapsülasyon sonucunda probiyotik mikroorganizmaların sindirim sistemine daha dayanıklı hale gelebileceği saptanmıştır. Ayrıca belirlenen sıcaklıklardaki depolama koşullarında enkapsüle formdaki EcN'nin canlılığını uzun süre koruduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak üretilen hibrit fiberlerin enkapsülasyonda kullanılmasıyla probiyotiklerin çeşitli şartlardaki direncinin artırılabilceği ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotik Mikroorganizmalar

Tarihi fermente gıdaların tüketimi ile birlikte başlayan probiyotik terimi, Antik Yunanca'da "yaşam için" anlamına gelmektedir [1]. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığında yararlı etkileri ilk kez Ellie Metchnikoff tarafından ortaya konmuştur [2]. Probiyotik terimi ise ilk olarak 1953'te Kollath tarafından kullanılmıştır [3]. Gıda ve Tarım Örgütü'nün yayınlamış olduğu raporda [4] probiyotikler yeterli miktarda alındığında, konakçısının sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır.

Probiyotik mikroorganizmaların çok büyük bir çoğunluğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerindedir. Ancak bu cinslerin yanında bazı koklar, laktik asit bakterisi olmayan bazı türler, mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* ("boulardii")) ve kimi diğer türlerin (EcN, *Sporolactobacillus* spp.) probiyotik özellik gösterdiği gözlenmiştir [2, 5].

En çok araştırılan ve belgelenen probiyotik bakterilerden biri, birinci dünya savaşı sırasındaki yaygın bağırsak rahatsızlıklarından hiç etkilenmemiş bir askerden izole edilen ve şu an farmasötik olarak kullanımı olan EcN adlı suştur [6, 7]. Çok geniş ölçüde güvenli kabul edilen bu suşla ilgili yapılan son çalışmalarda EcN'nin bebekler ve küçük çocuklarda da güvenilir olduğu ortaya konulmuştur [8]. Özellikle otoimmün rahatsızlığının tedavisinde kullanılan EcN, ülseratif kolit, irritabl bağırsak sendromu, antibiyotiğe bağlı diyare ve kronik kabızlık dahil olmak üzere çeşitli gastrointestinal hastalıklara karşı etkinlik göstermiştir [6, 8-10].

2.1.1. Probiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri

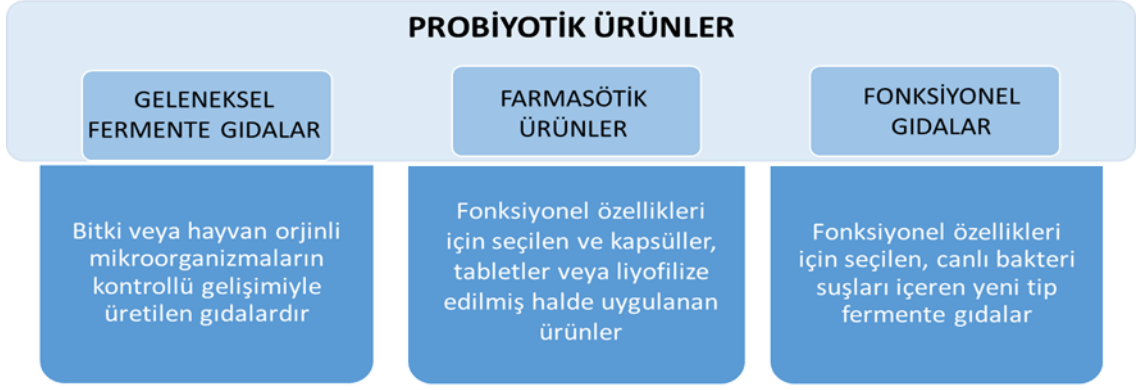
Probiyotik canlıların konakçının sağlığı üzerindeki faydalı etkilerinden dolayı, son yıllarda bu mikroorganizmalar ile ilgili araştırmalar artış göstermektedir. Probiyotik mikroorganizmaların (özellikle *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)) rotavirüsün neden olduğu infantil diarenin önlenmesinde ve hafiflemesinde önemli etkileri olduğu

gösterilmiştir [11]. Ayrıca laktik asit bakterilerinin bağırsak hareketlerini düzenleyerek kabızlığı önlediği bilinmektedir [12]. Bu mikroorganizmaların özellikle bağırsaklardaki doğal ve kazanılmış bağışıklık üzerindeki tesiri ilgi çekmektedir. Ürettikleri metabolitler sayesinde natural killer hücre aktivitesini, fagositozu ve immüoglobulin seviyelerini arttırarak; sitokin profilini değiştirerek etkinlik gösterdikleri ortaya konmuştur [13]. Kesin kanıt olmasa da *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerini içeren fermente gıdaların kolon kanseri riskini azalttığına dair bulgular saptanmıştır [14-16]. *Helicobacter pylori*'nin mide mukozasında kolonizasyonu gastrit, ülser, mide karsinomu ve lenfomaya neden olabilmektedir. Bazı probiyotik suşların in vitro koşullarda bu patojeni inhibe ettiği gözlenmiştir [11, 17, 18]. Konakçı sağlığı üzerindeki bu olumlu etkilerine ek olarak laktoz intoleransının düzenlenmesi, kolesterol ve triasilgliserol plazma konsantrasyonlarının azaltılması, alerjik semptomların azaltılması, patojenik mikroorganizmaların baskılanması, osteoporoz ve ürogenital enfeksiyonların önlenmesi gibi pek çok yararının da bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [2, 19-21].

Probiyotiklerin sağlık üzerinde olumlu etki göstermesini sağlayan belli başlı mekanizmalar : Organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi patojenleri inhibe edici metabolitlerin üretilmesi, bağırsaklardaki adezyon bölgelerine yerleşerek ve besin rekabetine neden olarak patojenlerin inhibasyonuna katkı sağlaması, toksin dedektörlerinin degradasyonu ve toksin üretiminin baskılanması, bağırsak pH'nın düşürülmesi şeklinde sıralanabilmektedir [16, 20, 22-24].

2.1.2. Probiyotik Ürünler

Konakçının sağlığında ciddi olumlu etkiler yaratan probiyotik mikroorganizmalara ilgi her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle probiyotik ürünlerin kullanımı da artış göstermektedir. Probiyotik mikroorganizmalar geleneksel fermente gıdalar, farmasötik ürünler ve fonksiyonel gıdalarda kullanılmaktadır (Şekil 2.1.). Günümüzde fonksiyonel gıdaların yaklaşık %60-70'ini probiyotik gıdalar oluşturmaktadır [2, 5]. Ancak bu ürünlerde proses ve depolama koşulları, yüksek duyarlılıktaki probiyotik mikroorganizmaların canlılığı üzerindeki etkileri, düşünülerek planlanmalıdır [25].



Şekil 2.1. Probiyotik ürünler [2, 5].

2.1.3. Çevresel Faktörlere Duyarlılık ve Efektif Doz

Probiyotik mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyebilmesi için gastroentestinal sistemde canlılığını koruması gerekmektedir. Ancak bu türlerin birçok çevresel faktöre karşı duyarlılığı bulunmaktadır. Oksijen varlığı, asitlik, proses sıcaklığı, depolama sıcaklığı, ürün işleme prosesleri gibi faktörler canlılığı sınırlayan önemli etmenlerdendir [26]. Çevresel faktörlerin yanı sıra sindirim sistemi boyunca maruz kaldığı düşük pH, mide suyu, safra tuzları ve sindirim enzimleri de probiyotik mikroorganizmaların canlılığında önemli azalışlara neden olmaktadır [25, 27]. Hem proses ve depolama koşullarından hem de çevresel faktörlerden etkilenen bu mikroorganizmaların konakçı üzerindeki yararının gözlenebilmesi için başlangıç yükü önem kazanmaktadır.

Probiyotik mikroorganizmaların sahip oldukları bu duyarlılıkları ile birlikte konakçı sağlığı üzerinde olumlu etki gösterebilmeleri için efektif dozda alınmaları gerekmektedir. Yapılan meta analiz çalışmalarında bu mikroorganizmaların efektif dozları genellikle antibiyotikle alakalı diyare (AAD) ve nekrotizan enterokolite karşı etkinlikleri üzerinden belirlenmiştir [28]. LGG, *L. sporogens* ya da *S. boulardii* türlerinin AAD üzerinde daha yüksek etki gösterdiği dozun 10^9 koloni oluşturan birim/gün (kob/gün) ve üstü olduğu bildirilmiştir [29]. Mcfaarland ve ark. [30] tarafından yapılan meta analiz çalışmasında *S. boulardii*, LGG, *Bacillus clausii*, *Bifidobacterium longum*, *Clostridium butyricum* miyairir, *L. acidophilus*, *Enterococcus faecium* SF68 türleri tek başlarına ve ikili karışımlarının etkisi araştırılmıştır. Bu türler için 10^{10} kob/gün'den daha düşük dozlarda

etki gözlenmemiştir. Probiyotik suşların etkin dozunun belirlenmesi için yapılan çalışmalarda çoğunlukla optimum işlevsellik için günlük alımın 10^9 - 10^{10} kob/gün seviyesinde olması gerektiği kabul edilmiştir. Ancak ishal önleyici etki için probiyotik dozunun 10^7 - 10^9 kob/ml seviyesinde yeterli olduğunun gözlenmesi nedeniyle fonksiyonel gıdalarda ve günlük alımlarında, probiyotiklerin minimum 10^6 - 10^7 kob/mL veya g seviyesinde bulunması tavsiye edilir [26]. Uluslararası Süt ve Süt Ürünleri Federasyonu'na göre probiyotik ürünlerde raf ömrü süresince canlılığını ve metabolik aktivitesin korumak şartıyla en az 10^7 kob/g konsantrasyonda probiyotik mikroorganizma bulunmalıdır [31]. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nca 7 Temmuz 2006 tarihinde 26221 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan, Türk gıda kodeksi gıda maddelerinin genel etiketleme ve beslenme yönünden etiketleme kuralları tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ (2006/34)'e göre probiyotik gıdanın en az 10^6 kob/g canlı probiyotik bakteri içermesi gerekmektedir [32].

Probiyotiklerin çevresel şartlara ve probiyotik ürün işleme sırasındaki proses koşullarına karşı duyarlılıkları göz önüne alındığında bu canlıların daha uzun sürelerde metabolik aktivitelerini ve canlılıklarını koruyabilmeleri için çeşitli enkapsülasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

2.2. Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu

Ürüne işlenecek (özellikle gıda ürünleri) probiyotiklerin dondurularak veya püskürtülerek kurutulması, canlılığın korunması için en iyi seçeneklerden değildir. Çünkü mikroorganizmaların ürünle doğrudan temas halinde olması canlılığı azaltabilir, bu da istenen faydalı etkileri elde etmek için gerekli probiyotik sayısına ulaşılmasını engeller [33]. Probiyotiklerin enkapsülasyonu bu problemi çözmek için uygulanan alternatif bir yöntemdir. Çevre şartlarına, proses ve depolama koşullarına, ve sindirim sistemindeki şartlara daha dayanıklı hücreler enkapsülasyonla elde edilebilir [34]. Ayrıca kapsüle edilen probiyotikler olası kontaminasyonlara karşı biyokütle korumasına sahip olurken başlangıç yükünü arttırmak amacıyla herhangi bir konsantrasyon işlemine gerek duyulmadığı için üretim maliyetlerinde azalma gibi avantajlar sağlar [5, 21].

Enkapsülasyon, katı, sıvı veya gaz formundaki maddelerin çeşitli kaplama materyalleri ile sarıldığı fiziko-kimyasal bir işlemdir [35]. Enkapsülasyon sayesinde ilgili bileşenin dış ortamdan izolasyonu ve korunması, taşınması ve salınımı sağlanabilir. Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu sayesinde bu yararlarına ek olarak sindirim sisteminde mikroorganizmaların daha uzun süre canlı kalması ve bağırsağa canlı hücre ulaşması hedeflenir [36, 37]. Enkapsülasyon prosesinde çekirdek/iç faz ve kabuk/duvar materyali olmak üzere 2 tip materyal kullanılır. Çekirdek etken maddenin bulunduğu kısımken, kabukta koruyucu polimerler yer alır. Morfolojik açıdan 3 tür kapsül bulunur: Aktif maddenin koruyucu bir tabaka içine hapsediği kapsül tipi, etken maddenin polimerik ağ boşluklarında bulunduğu matris tipi ve bu iki morfolojik yapının da özelliklerini taşıyan kaplamalı matris tipi.

Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Emülsiyon, ekstrüzyon, sprey kurutma, dondurarak kurutma ve elektroğirme/elektrospreyleme başlıca yöntemlerdir.

2.2.1. Emülsiyon

Emülsiyon tekniği, probiyotik hücrelerin organik fazda dağıtılmasıyla elde edilir. Bu yöntemde, süresiz faz (hücre polimer süspansiyonu), sürekli faza (yağ) eklenir. Daha sonra karışım, yağ içinde su emülsiyonu oluşturmak için homojenleştirilir [36]. Bu yöntemle elde edilen küre formundaki yapılar genellikle 100 µm'nin altındadır. Sodyum aljinatın duvar materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada, *L. casei* 298 NCDC düşük pH, yüksek safra tuzu konsantrasyonu ve ısıl işlem prosesine karşı serbest hücreye göre canlılığını daha yüksek oranda korumuştur [38].

2.2.2. Ekstrüzyon

Bu enkapsülasyon tekniğinde, uygun polimer çözeltisi mikroorganizmalarla karıştırılır ve daha sonra şırınga yardımı ile damlacıklar halinde çapraz bağlama ajanı içine ekstrüzyonlanır [35]. Küre morfolojisinde elde edilen kapsüllerin boyutları ancak 50-100 µm aralığına inilebilmektedir [2, 39]. Chen ve ark.'nın [40] yaptığı bir çalışmada bazı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin sodyum aljinat kullanılarak ekstrüzyon

yöntemiyle yapılan enkapsülasyonunda, enkapsüle edilen mikroorganizmaların serbest hücrelere göre sindirim simülasyonunda canlılıklarını daha uzun süre korudukları gösterilmiştir.

EcN suşu sodyum aljinatın matris olarak kullanıldığı bir çalışmada ekstrüzyon yöntemiyle enkapsüle edilmiştir. 4°C’de yapılan depolama çalışmalarında 40 günü aşan sürede canlılığını serbest hücreye kıyasla daha iyi koruduğu gözlemlenmiştir. Simüle mide çözeltisi (SMÇ) kullanılarak yapılan similasyonda 2 saat sonunda serbest hücrede 1 log (kob/mL) düzeyinde canlılık gözlemlenmişken enkapsüle edilmiş hücrelerde 4.7 log (kob/mL) düzeyindedir. Simüle bağırsak çözeltisi (SBC) ortamında ise serbest hücrelerde 3.2 log (kob/mL); enkapsüle hücrelerde 6.2 log (kob/mL) düzeyinde canlılık gözlemlenmiştir [41].

2.2.3. Sprey Kurutma

Sprey kurutma işleminde ilk olarak enkapsülasyon materyali ve biyoaktif maddenin homojen çözeltisi hazırlanır. Daha sonra hazırlanan çözelti belirli bir akış hızında, sprej kurutma sisteminin bir parçası olan kurutma odasına atomize edilir. Çözeltinin atomizasyonu sırasında sıcaklığın etkisiyle solvent evapore olur ve enkapsülasyon gerçekleşir [35]. 40 µm’nin altında enkapsüle partiküllerin üretilmesine olanak sağlayan bu teknik, gıda endüstrisinde en çok kullanılan yöntemlerden olmasına rağmen uygulanan yüksek sıcaklık prosesi nedeniyle probiyotik enkapsülasyonu için kullanıma uygun değildir. Kurutma için uygulanan sıcaklık hücreler için vital etki yaratabilmektedir [35, 39].

2.2.4. Dondurarak Kurutma

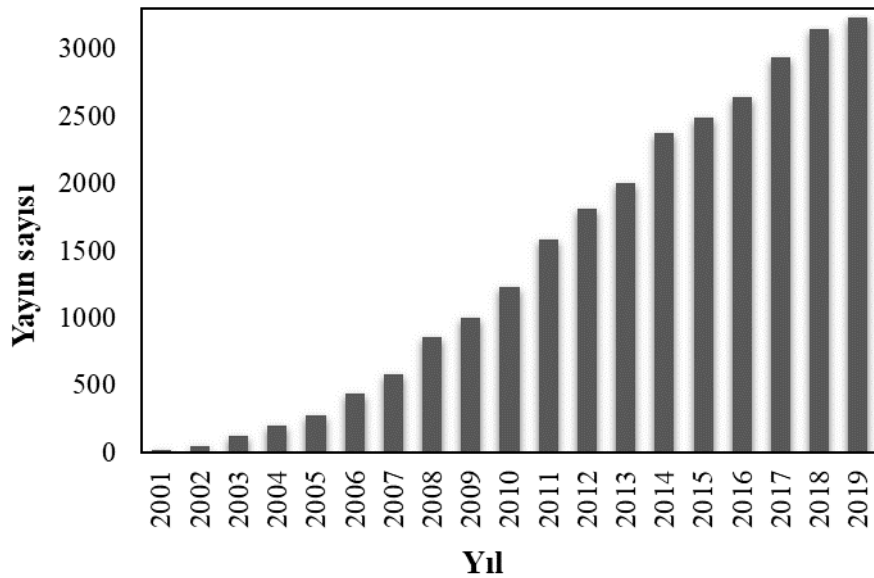
Dondurarak kurutma tekniği probiyotiklerin kurutulması için ticari amaçla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu teknik mikroorganizma enkapsülasyonu için yeni bir konsept olarak kabul edilebilir [35, 36]. Dondurarak kurutma yöntemi mikroorganizmaların aşırı düşük sıcaklıkta dondurulmasının ardından yüksek vakum altında süblimasyon yoluyla kurutulması prensibine dayanır. Proses süresince yüksek sıcaklık uygulanmaması sayesinde sprej kurutmaya göre mikroorganizma canlılığı daha

yüksek oranda korunabilmektedir [42]. Ancak düşük sıcaklık nedeniyle oluşan kristaller, yüksek basınç ve ozmozite mikroorganizmaları olumsuz etkilemektedir. Bu olumsuz şartların etkisini azaltmak için koruyucu çözeltiler kullanılmaktadır [35, 36, 42]. Yapılan bir çalışmada peynir altı suyu proteini ve sodyum aljinat, sprey kurutma ve dondurarak kurutma yöntemlerinde *L. plantarum*'un enkapsülasyon materyali olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda dondurarak kurutma yöntemiyle enkapsüle edilen hücrelerdeki canlılığın, sprey kurutma yöntemiyle enkapsüle edilen mikroorganizmalara göre %9-12 oranında daha yüksek olduğu görülmüştür [43].

2.3. Elektroeğirme

Web of Science veri tabanı [44] incelendiğinde “electrospinning” teriminin ilk kez 1993 yılında Jayesh Doshi ve Darrell H. Reneker tarafından yazılan “Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers” makalesinde rastlanmıştır. Bu tarihten günümüze bu teknik kullanılarak yapılan araştırma sayısı devamlı artış göstermektedir (Şekil 2.2.).

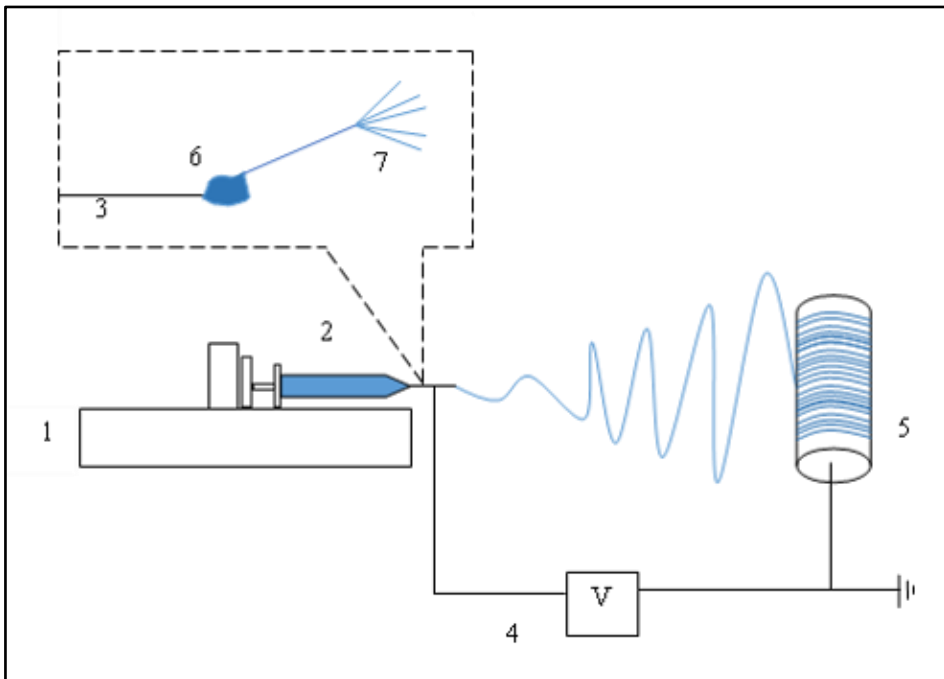
Elektroeğirme sistemi hem kapsül formunda hem de fiber formunda, mikronaltı ve nanometre ölçeğinde enkapsülasyona olanak sağlayan, yüksek voltajlı güç kaynağı, kolektör, şırınga pompa ve metal nozul kullanılan bir enjektördörden oluşan basit bir nanofiber üretme yöntemidir [45, 46].



Şekil 2.2. Yıllara göre "electrospinning" konu başlıklı makale sayısı [44].

Elektroegirme sisteminde metal nozul ile kolektör arasında uygulanan elektrik alan sayesinde nanofiber üretilecek polimer çözeltisi elektrik yüklenir. Voltaj, Taylor konisi adı verilen yapının oluşmasını sağlayacak kritik seviyeye ulaştığında, elektrostatik itme çözeltinin yüzey gerilimini aşar ve kolektöre doğru polimer jeti oluşur (Şekil 2.3.). Jet kolektöre ulaşırken solvent evapore olur ve kolektörde katı formda fiberler toplanır [47]. Elektroegirme ve elektrospreyleme yöntemleri aynı prensibin işlediği, yalnızca proses sonucu elde edilen ürünün morfolojisinin farklı olduğu (elektroegirme yönteminde fiber formunda; elektrospreyleme yönteminde küre formunda) iki tekniktir [45].

Elektroegirme sisteminin hem klasik enkapsülasyon yöntemlerinden hem de diğer nanofiber proseslerinden daha avantajlı yönleri bulunmaktadır [48]. Sıcaklık uygulaması içermemesi, büyük yüzey alanına sahip ürün eldesi, yüksek yüzey hacim oranı, çok çeşitli özelliklere sahip polimer ve solvent kullanımına olanak vermesi, basit ve uygun maliyetli bir proses olması ve endüstriyel boyutlarda üretime olanak sağlaması bu yöntemin avantajlarından [42, 48, 49]. Ayrıca polimer özellikleri, sistem ve ortam parametrelerinin ayarlanmasıyla arzu edilen özelliklerde ve boyutlarda (mikro, submikron, nano) materyal üretimi elektroegirme sistemiyle mümkündür [50].



Şekil 2.3. Elektroegirme düzeneğinin şematik gösterimi. (1. şırınga pompa, 2. enjektör, 3. metal nozul, 4. yüksek voltaj kaynağı, 5. kolektör, 6. Taylor konisi, 7. fiber jet)

2.3.1. Elektroğirme Sistemini Etkileyen Parametreler

Elektroğirme uygulanacak olan çözeltilerin özellikleri ve çalışma parametreleri hem elektroğirme işlemini hem de elde edilecek olan yapıların morfolojisini etkilemektedir [45, 46]. Bu parametrelerin uygun seçilmesiyle istenilen morfoloji ve boyuta sahip materyaller elde edilebilmektedir [51].

Elektroğirme çok çeşitli türlerde materyal kullanılarak yapılabilmektedir. İstenilen özelliklere ve morfolojiye göre kullanılacak polimer tipi belirlenmektedir [46]. Enkapsülasyonda kullanılacak olan polimerin, kullanım amacına uygun özelliklere sahip olmasına, çevresel faktörlere karşı koruyuculuğunun olmasına, yüksek konsantrasyonda iyi reolojik özelliklere ve iyi bir duysal kaliteye sahip olmasına ve büyük çaplı üretim için uygun maliyetli olmasına dikkat edilmelidir [2, 52]. Çok sayıdaki organik veya sentetik yapı polimerler, elektroğirme sisteminde en yaygın olarak kullanılan sınıftır [53]. PVA, polietilen oksit (PEO), polilaktikasit gibi polimerler özellikle elektroğirme yönteminde, yüksek fiberleşme özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır [54].

PVA, GRAS olarak bilinen, toksik özellik göstermeyen, yüksek termal ve kimyasal kararlılığa sahip, yarı kristal yapıda, hidrofilik bir polimerdir. Yüksek biyoyumluluğu ve düşük maliyeti nedeniyle elektroğirme sisteminde sıklıkla kullanılmaktadır [31, 55]. Suda çözünen yapısı nedeniyle hücrelerin kolay geri kazanımına imkan verdiği için, probiyotiklerin elektroğirme yöntemiyle enkapsülasyonu amacıyla çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır [31, 56, 57].

Bu polimerler dışında çeşitli karbonhidratlar (nişasta ve selüloz türevleri, gumlar, kitosan, aljinat, karragenan vb.) ve proteinler (kollojen, fibrinojen, jelatin, peynir altı suyu proteinleri, soya proteinleri, zein, kazein, amarant vb.) de elektroğirme sisteminde enkapsülasyon amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır [46, 52]. Proteinler içerdikleri yüksek besin değerleri nedeniyle özellikle fonksiyonel gıda üretimi amacıyla kullanılacağı zaman elektroğirme işleminde tercih edilmektedir. Ancak sahip oldukları ikincil ve üçüncül yapıları gereği çoğu proteinine tek başına elektroğirme uygulanması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle genellikle fiberleşme özelliği iyi olan polimerlerle

kariştirilerek kullanılmaktadır [58]. Doğal ve modifiye edilmiş polisakkaritler, biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilen ve gerekli özellikleri elde etmek için modifiye edilme potansiyeli yüksek olduğu için enkapsülasyon materyali olarak sıklıkla tercih edilmektedir [59]. Ayrıca fonksiyonel grupları sayesinde birçok biyoaktif bileşenin taşınmasında başarılıdırlar. Yüksek sıcaklıklarda protein bazlı polimerlere göre stabilitelerini daha iyi korumaları da sahip oldukları avantajlardandır [60].

Selüloz ve selüloz türevleri elektroğirme işleminde enkapsülasyon materyali olarak en çok kullanılan polisakkaritlerden biridir [59, 61]. CA, selülozun esterleştirilmesiyle elde edilen, en bilinen ve kullanılan selüloz türevlerindedir. Suda çözünmeyen yapıdaki CA sahip olduğu çok iyi su tutma özelliği nedeniyle birçok farklı alanda kullanılmaktadır [62]. Son zamanlarda fiber yapısı ve enkapsüle edilen biyoaktif bileşen arasındaki etkileşimi arttırma kabiliyeti nedeniyle elektroğirme proseslerinde sıklıkla kullanılmaktadır [63]. Aseton, dimetilasetamid, dimetilformamid (DMF), asetik asit, trifloroetilen solventlerinin tek başına veya karişımlarının kullanılmasıyla elde edilen CA çözeltilerinin elektroğirme için uygunluğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [59, 61]. Farklı solvent sistemlerinin kullanıldığı birçok çalışmada CA biyoaktif materyalin enkapsülasyonu için elektroğirme sisteminde kullanılmıştır [64-67]. Enkapsülasyon materyali olarak CA kullanılan bazı çalışmalarda, biyoaktif bileşiğin salınımının yavaş olduğu gözlenmiştir [63, 68]. Ayrıca kimi çalışmalarda pH'a duyarlı, asidik pH'da daha yavaş, bazik ve nötral pH'da daha hızlı, bir salınım izlenmiştir [69, 70]. Bu özellikleri CA'yı kontrollü salınım için uygun bir polimer yapmaktadır. Sahip olduğu avantajlar nedeniyle biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonunda en çok kullanılan materyallerden olmasına rağmen mikroorganizma enkapsülasyonunda bu polimerden yararlanılamamaktadır. Kullanılan solventlerin mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkisi nedeniyle canlılığı olumsuz etkilemesi bunun başlıca nedenidir. Ancak çok sayıda avantajı bulunan bu polimerin mikroorganizma enkapsülasyonunda kullanılamaması büyük bir eksikliklerdir.

Elektroğirme işlemini ve sonuçta elde edilen ürünün morfolojisini en çok etkileyen parametre kullanılan polimer çözeltilisinin özellikleridir [53]. Çözelti konsantrasyonu, önemli parametrelerden biridir [45, 46]. Konsantrasyon çok düşük olduğunda

elektroegirme değil elektrospreyleme yapılabilir ve elde edilen yapılar fiber değil partikül morfolojisine sahiptir. Optimum çözeltili konsantrasyonuna yaklaştıkça damla kusuru olmayan nano fiberler elde edilebilir. Polimer çözeltilisinin konsantrasyonunun çok yüksek olması ise mikro boyutta şeritler elde edilmesine neden olmaktadır [51].

Polimerin moleküler ağırlığı (M_A), konsantrasyon etkisine benzer şekilde elektroegirmeye etki etmektedir. Fiber çapı M_A ile doğru orantılı artmaktadır. Uygun M_A 'ye sahip polimerlerde tekdüze fiberler elde edilebilirken, yüksek M_A 'da şerit morfolojisine sahip yapılar oluşabilmektedir [55].

Viskozite electroegirmeyi etkileyen başka bir polimer özelliğidir. Ayrıca viskozitenin, polimer konsantrasyonunun ve M_A 'nın birbirleriyle ilişkili oldukları unutulmamalıdır [51, 55]. Sürekli ve tekdüze fiberlerin çok düşük viskozitede elde edilemeyeceğini gösteren çalışmalar vardır, ancak çok yüksek viskozite, fiber jetlerinin oluşmasını engellemektedir [71].

Yang ve Wang'ın [72] yüzey geriliminin etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada, konsantrasyon sabitken yüzey gerilimini azaltarak damla kusurlu fiberlerin tekdüze fiberlere dönüştüğü bildirilmiştir.

Çözeltinin kondaktivitesi kullanılan polimerin tipine, solvente ve tuz yoğunluğuna bağlıdır. Polimer çözeltilisinin iletkenliği arttıkça fiber çapı azalır. Ayrıca fiberlerde oluşan damla kusuru çözeltinin iyon yükünün artırılmasıyla giderilebilmektedir [45, 46, 51].

Elektroegirme prosesinde uygulanan parametreler de (voltaj, akış hızı, kolektör ve iğne arası uzaklık vb.) fiber morfolojisini etkilemektedir [73]. Ayrıca optimum proses parametreleri seçilen çözeltiliye göre değişiklik göstermektedir.

Sisteme uygulanan voltaj, elektroegirme prosesini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Bir çalışmada voltaj ile fiber çapının ters orantılı olduğu, voltaj arttıkça çapın küçüldüğü bildirilmiştir. Ancak elde edilen fiberlerdeki damla kusuru da artmıştır [74].

Akış hızı, sisteme enjekte edilen çözeltinin miktarını belirleyen parametredir. Genellikle başarılı fiberlerin eldesi için düşük akış hızları tavsiye edilir. Akış hızı çok yüksekse, solvent evaporasyonu için yeterli zaman olmayacağından, daha büyük çaplı ve damla kusurlu fiberler oluşur [51]. Tekdüze ve stabil fiberlerin eldesi için voltaj ve akış hızı birlikte ayarlanmalıdır. Yapılacak olan çalışmalarda, belirli bir voltajda kararlı bir Taylor konisinin oluşması için uygulanması gereken akış hızı belirlenmelidir [74, 75].

Kollektör ve metal iğne arasındaki mesafe hem elektrik alan şiddetini hem de polimer jetlerin uçuş süresini etkilemektedir [46]. Aradaki mesafe çok kısa olduğu durumda solventin uzaklaşması için gerekli zaman kalmazken, mesafe fazla uzunsa damla kusurlu fiberler elde edilebilmektedir [76].

Sistem parametreleri dışında ortam koşulları da elektroğirme işlemini etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada sıcaklık ve viskozite arasındaki ilişkiye bağlı olarak yüksek sıcaklıklarda daha küçük yarıçaplı fiberler elde edildiği gösterilmiştir [51]. Elektroğirme çemberindeki yüksek nem oranının da porlu fiberlere neden olduğu bilinmektedir [46].

Elektroğirme prosesinin etkileyen parametreler optimum proses için düzenlenirken; bu parametrelerin bireysel değil bütünsel etkilerinin daha önemli olduğu unutulmamalıdır.

2.3.2. Probiyotiklerin Elektroğirme Yöntemiyle Enkapsülasyonu

Fonksiyonel gıda üretiminde probiyotik suşların çeşitli etkenlere karşı stabilizasyonunun artırılması için mikroenkapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır [21]. Çeşitli boyutlardaki fiberlerin yüksek yüzey alanı gibi birçok avantajından dolayı elektroğirme tekniği ile üretilen fiberlerin probiyotik mikroorganizmaların enkapsülasyonunda kullanılmasına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır [31]. Bu alanda hem elektrospreyleme hem de elektroğirme tekniğinin kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada sodyum aljinat kullanılarak *L. plantarum* elektrospreyleme yöntemiyle enkapsüle edilmiştir. SMCÇ ve SBCÇ serbest hücre canlılığında sırasıyla 6 ve 4.2 log (kob/mL) biriminde azalma yaşanırken mikroenkapsüle edilmiş hücrelerde sırasıyla 2.9 ve 2.7 log (kob/mL) azalma gözlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada 4°C’de serbest ve enkapsüle hücrelerin depolanması sonucunda, 21 gün sonunda enkapsüle *L. plantarum*’da 9 log (kob/mL) canlılık gözlenirken; serbest hücrede sadece 1 log (kob/mL) düzeyinde canlı hücre kalmıştır [77]. Aynı suşun kullanıldığı bir başka elektrospreyleme çalışmasında polimer protein altı suyu tozu seçilmiştir. Bu çalışmada probiyotik hücrenin canlılığında elektrospreyleme sonucu sadece 1 log (kob/mL) düşüş yaşanmıştır. Elde edilen mikrokapsüller, yaygın olarak kullanılan dondurarak kurutma yöntemine kıyasla sindirim sisteminde benzer bir koruma sağlarken; yüksek bağıl nem ortamındaki depolamada daha gelişmiş koruma sağlamıştır [78]. Başka bir çalışmada PEO, gliserol ve dekstran enkapsülasyon materyali olarak kullanılmış ve test mikroorganizması olarak kullanılan *E. coli* hücreleri elektroğirme tekniğiyle enkapsüle edilmiştir. Elektroğirme tekniğiyle elde edilmiş enkapsüle fiberlerin oda sıcaklığındaki hücrelerin canlılığını, serbest hücrelere kıyasla daha uzun süre koruduğu gözlenmiştir [79]. PVA’nın polimer olarak kullanıldığı elektroğirme çalışmasında *B. animalis* Bb12 hücrelerinin 20°C, 4°C ve -20°C’deki canlılıkları araştırılmıştır. 20°C’de 40 gün boyunca canlılığını korurken, 4°C ve -20°C’de 140 gün sonrasında canlılığında önemli bir azalma olmamıştır. Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş olan hücreler karşılaştırıldığında ise fiberlere enkapsüle edilmiş olan *B. animalis* Bb12 hücrelerinin farklı sıcaklıklardaki depolama koşullarında daha uzun süre stabil kaldığı gözlemlenmiştir [31].

Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda genellikle suda çözünebilen fiberler kullanılmaktadır. Kullanılan solventin hücreler için toksik olmaması ve canlılık araştırmalarında daha kolay hücre salınımına imkan vermesinden dolayı bu tipteki polimerlerin kullanımı yaygındır [31]. Ancak elektroğirme sırasında suyun hızlı evaporasyonu canlılığı olumsuz etkilemektedir, ayrıca su aktivitesinin yüksek olduğu gıda ve benzeri ortamlarda hücrelerin polimerden hızlı salınımı, mikroenkapsülasyonda kullanılan fiberlerin avantajlarından faydalanılmasını olanaksız hale getirmektedir [80, 81]. Elektroğirme sisteminin var olan avantajlarından su aktivitesi yüksek ortamlarda da faydalanılması amacıyla, suda çözünmeyen polimerlerin enkapsülasyon materyali olarak kullanımı ilgi çekmektedir. Ancak suda çözünmeyen polimerlerin hazırlanmasında

kullanılan solventlerin hücreler üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Bu toksik etkinin bertaraf edilmesi için çeşitli yöntemler önerilmektedir [81].

EcN hücreleri suda çözünmeyen bir polimer olan poli (etilen glikol)–polilaktit polimerine kabuk ve çekirdek solüsyonunun birbirine temas etmeden sisteme basıldığı koaksiyel elektroğirme tekniği kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Suda çözünmeyen polimer içine nano boyutta NaCl eklenerek, fiber yüzeyinde porların oluşturulması ve salınımın sağlanması hedeflenmiştir. Koaksiyel elektroğirme işlemi sonucunda %50 oranda, 5 log (kob/mL) düzeyinde bakteri canlı kalmıştır. Bu oran aynı polimere afinite adsorbsiyonu ve kovalent bağlama teknikleriyle immobilize edilmiş EcN hücrelerinden daha yüksektir. Ayrıca fiberlere enkapsüle edilen hücrelerde 12 saatlik inkübasyon sonucunda gelişme gözlenmiştir [81]. Ancak bu çalışmada sindirim sisteminin ya da depolama koşullarının etkisi incelenmemiştir.

Suda çözünmeyen karakteristiğe sahip Pluronik F127 dimetakrilatın kullanıldığı elektroğirme çalışmasında *Zymomonas mobilis* enkapsüle edilmiştir. Yapılan çalışmada bu türün 4°C’de 1 haftadan, -70°C’de ise 2 aydan daha uzun süre canlılığını koruduğu görülmüştür [80]. Bu çalışmada herhangi bir sindirim sistemi simülasyonu yapılmamıştır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde suda çözünmeyen polimerlerin probiyotik enkapsülasyonunda kullanılmasıyla ilgili çok sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Ek olarak var olan çalışmalarda kapsamlı analizlerin eksikliği gözlenmiştir. Bu tez kapsamında, PVA/CA fiberlerinin özelliklerinden yararlanılarak probiyotik mikroorganizmaların özellikle sindirim sistemi koşullarına daha dirençli hale getirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca CA ilk kez bu tez kapsamında probiyotik enkapsülasyonunda kullanılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan EcN, Mutaflor[®] (Ardeypharm GmbH, Herdecke, Almanya) adıyla ticari ürün olarak satılan tabletlerden tek koloni düşürme yöntemi ile izole edilmiştir. PVA (M_A 85000-124000, %99+ hidrolize), CA (M_A ~30000 Da), Triton X-100, asetik asit (%100), etanol (≥ %99.8), N,N-dimetilformamit (DMF, ≥ %99.8), aseton (≥ %99.9), Luria Broth (LB) besiyesi, Agar, sodyum klorür, potasyum klorür, potasyum fosfat monobazik, sodyum fosfat dibazik, pepsin (≥ 2500 unit/mg protein), pankreatin (8×USP), safra tuzu Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından sağlanmıştır.

3.1.2. Elektroeğirme Cihazı

Yapılan çalışmada fiberlerin üretilmesi için elektroeğirme cihazı kullanılmıştır. Bu amaçla değişken yüksek voltajlı güç kaynağı (8-35 kV) ve hareketli silindir biçimli kolektör entegre edilmiş ELECTROSPINNING ESM 1100 cihazı Solvan A.Ş. (Ankara, Türkiye) firmasından sağlanmıştır. Bu cihazda yüksek voltajlı güç kaynağı, hareketli silindir kolektör, metal nozul kullanılan bir şırınga ve şırınga pompa (NE-300 şırınga pompası, New Era Pump Systems, Inc., New Jersey, A.B.D.) kullanılarak polimer çözeltilerinin beslemesi sağlanmıştır.

3.1.3. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu

Çevresel taramalı elektron mikroskobu (environmental scanning electron microscope, ESEM) analizi öncesi üzerinde fiber toplanmış alüminyum folyoların rastgele birkaç bölgesinden parçalar kesilmiş ve karbon bant kullanılarak SEM stopları (SEM stub) üzerinde örnekler sabitlenmiştir. Elektroeğirme prosesinden elde edilen fiberlerin görüntüsü, her bir numunede iletken bir yüzey sağlamak amacıyla püskürtmeli bir kaplama cihazı (Precision Etching and Coating System 682, Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) kullanılarak, numuneler 10 nm altın-paladyum kaplandıktan sonra, ESEM

(FEIQuanta 200 FEG, Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Bütün fiber görüntüleri 3 spot genişliğinde, 10 kV'de elde edilmiştir.

Fiberlerin çap histogramları ve ortalama çapları, ImageJ yazılımı (NIH, Maryland, ABD) kullanılarak ESEM cihazından alınan görüntülerin işlenmesi ile elde edilmiştir. Ortalama çap değerleri ve standart sapma verileri, en az 2000 ölçüm/mikrograf olacak şekilde belirlenmiştir.

3.1.4. Termogravimetrik Analizör

PVA – PVA hibrit fiberleri (PVA/PVA fiberleri), CA – CA hibrit fiberleri (CA/CA fiberleri) ve PVA/CA fiberlerinin termal stabilitesi, TA Q500 (TA Instruments, New Castle, USA) cihazının kullanıldığı termogravimetrik analiz (TGA) ile belirlenmiştir. Bu cihaz kullanılarak, kontrollü atmosfer ortamında (azot, oksijen veya hava) oda sıcaklığından 1000°C'e varan sıcaklık aralığında örnekteki kütle kaybı ölçülebilmektedir. TGA analizi için örnekler cihaza platin kap kullanılarak yerleştirilmiştir. Örneklerde meydana gelen kütle değişimleri, bozulma başlangıç sıcaklıkları ve maksimum bozulma sıcaklığı TA Instruments Universal Analysis 2000 (TA Instruments, New Castle, USA) yazılımı kullanılarak incelenmiştir. Bozulma başlangıç sıcaklığı termogravimetri (TG) eğrisinden elde edilmiştir. Daha sonra TG eğrisinden diferansiyel termogravimetrik analiz (DTG) eğrisi türetilmiştir. DTG eğrisinden yararlanılarak örneklerin maksimum bozulma sıcaklıkları tespit edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Elektroçözme Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Elektroçözme yöntemi ile fiberlerin eldesi için GRAS sınıfında yer alan CA ve PVA polimerleri tercih edilmiştir. CA çözeltisinin hazırlanması için üç farklı solvent karışımı kullanılmıştır. İlk çözelti asetik asit-etanol (8:2, (h/h)), ikincisi aseton-DMF (2:1, (h/h)), üçüncüsü ise aseton-DMF-su (85:10:5, (h/h)) karışımı kullanılarak hazırlanmıştır. İkinci ve üçüncü çözeltilerde CA konsantrasyonu %17 (a/h)'dir. İlk çözelti ise %10, %12.5, %15, %17, ve %20 (a/h) CA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Optimum konsantrasyonunun belirlenmesi için %8, %10 ve %12 (a/h) oranında PVA içeren çözeltiler 80°C'de ultra saf

su kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra solvent olarak %20 etanol, 10 mM PBS (10 mM fosfat tamponu, 137 mM NaCl, (pH 7.4)) ve 1 mM PBS (1 mM fosfat tamponu, 13.7 mM NaCl, (pH 7.4)) kullanılan %10'luk PVA çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca 1 mM PBS kullanılarak hazırlanan çözeltilere, yüzey gerilimini düşürmek amacıyla, farklı oranlarda (%0.2, %0.5 ve %1 (a/a)) Triton X-100 eklenerek yeni PVA çözeltileri de hazırlanmıştır.

Farklı solventler kullanılarak, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin karakterizasyonu için viskozite (görünür) ve kondaktivite analizleri yapılmıştır. Çözeltilerin viskozite analizi, viskozite değerlerine göre seçilmiş olan SC4-25 ve LV3 (63) milleri kullanılarak Brookfield Viscometer DV-II+Pro viskozimetresi (Brookfield Engineering Laboratories INC., Middleboro, MA, USA) ile yapılmıştır. 25°C'de yapılan ölçümlerde, kullanılan viskozimetrenin talimatlarına uygun olarak, % 10-90 tork aralığındaki (güvenilir ölçüm aralığı) viskozite değerleri kaydedilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin kondaktivite değerleri HI 8633 kondüktivimetre (Hanna Instruments, Woonsocket, A.B.D.) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. pH ve kondaktivite analizleri için yapılan ölçümlerde üç paralel kullanılmıştır.

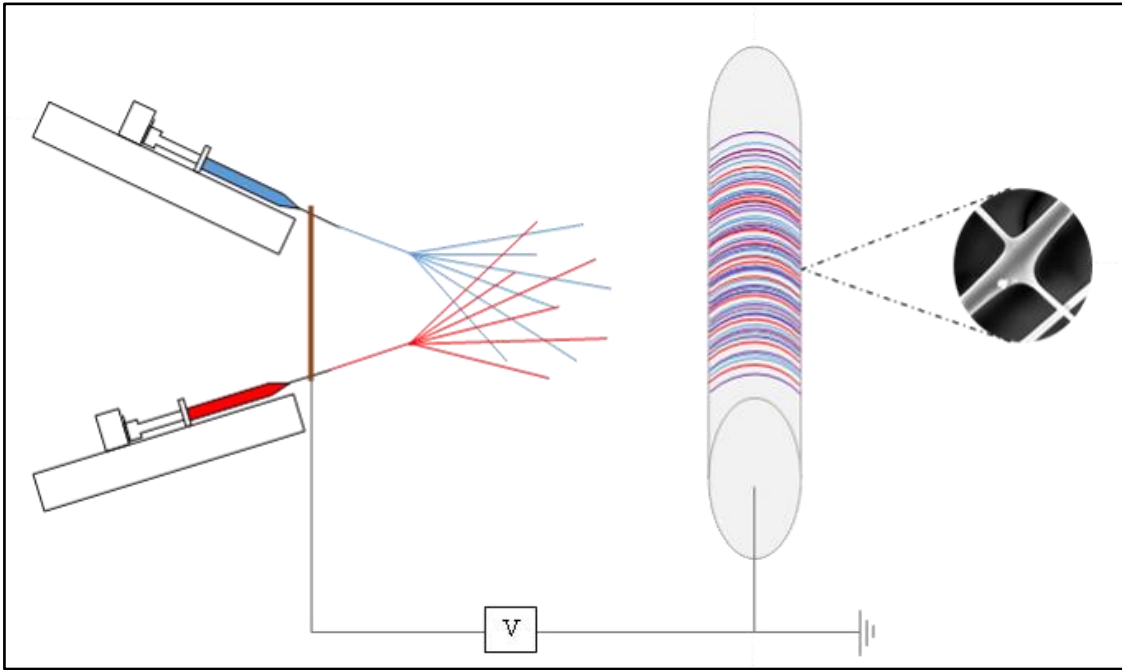
3.2.2. PVA ve CA Fiberlerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

Hazırlanan farklı özellikteki çözeltilerden PVA ve CA fiberlerinin elde edilmesi için tek nozullu elektroğirme sistemi (Şekil 2.3.) kullanılmıştır. Bu sistemde bütün çözeltiler kolektör ve nozul arası mesafe 8 cm olacak şekilde, 25 kV'de, şırınga pompa kullanılarak, iç yarıçapı 0.41 mm (22 Gauge (22G)) olan metal nozuldaki, çeşitli hızlarda sisteme beslenmiştir. Elektroğirme prosesinde, çözeltilere uygulanan yüksek voltaj sayesinde üretilen fiberler, hareketli silindir kolektöre sarılan alüminyum folyo üzerinde toplanmıştır.

Üretilen fiberlerin ESEM cihazı kullanılarak görüntüleri elde edilmiş ve görüntüler ImageJ yazılımı ile işlenerek fiberlerin ortalama çapları hesaplanmıştır.

3.2.3. PVA/CA Fiberlerinin Eldesi ve Karakterizasyonu

PVA/CA fiberlerinin üretimi için %10 (a/h)'lik PVA (1 mM PBS (pH 7.4) - %1 (a/a) Triton X-100) ve %20 (a/h)'lik CA (asetik asit-etanol (8:2 (h/h))) çözeltileri açılı çift nozul elektroğirme sisteminde (Şekil 3.1.) kullanılmıştır. Sistemin kurulumu Liao vd.'nin [82] çalışmasındaki protokolün modifikasyonu ile yapılmıştır. Açılı çift nozul elektroğirme sistemi yüksek voltajlı bir güç kaynağı, hareketli silindir kolektör ve iki polimer çözeltisinin ayrı ayrı sisteme beslenmesi için iki şırınga pompadan oluşmaktadır. 22 Gauge (22G) çaplı iki metal nozul, aralarında 80° açı bulunacak şekilde bakır tel kullanılarak birbirlerine bağlandıktan sonra güç kaynağına bağlanmıştır. Bu sistemde oluşan fiber jetlerinin kolektör nozul arası alanda, nozullar arası açının sayesinde birbiriyle etkileşerek hibrit fiberlerin oluşması sağlanmaktadır [83]. Bu sayede probiyotik mikroorganizmaların asetik asidin olumsuz etkilerine mazur kalmadan CA ile enkapsülasyonu sağlanacaktır.



Şekil 3.1. Açılı çift nozul elektroğirme sisteminin şematik gösterimi.

Hibrit fiber üretmek için PVA 1 mL/sa, CA ise 0.4 mL/sa akış hızında sisteme beslenmiştir. Elektroğirme prosesi 25 kV'da, nozullar ile kolektör arası uzaklık 8 cm olacak şekilde ayarlama yapıldıktan sonra başlatılmıştır. Hibrit fiberler kolektöre sarılan alüminyum folyo üzerinde toplanmıştır.

Açılı çift nozul elektroğirme sistemi ile PVA/PVA, CA/CA ve PVA/CA fiberleri üretilmiştir. Bir önceki aşamada olduğu gibi fiberlerin ESEM ile görüntüleri elde edilmiştir. Hibrit fiberlerin kesişim bölgeleri yine ESEM kullanılarak araştırılmıştır. Daha sonra elde edilen görüntüler ImageJ yazılımı ile işlenerek fiberlerin ortalama çapları kaydedilmiştir.

Ayrıca TGA ile elde edilen fiberlerin termal özellikleri araştırılmıştır. TGA için her bir hibrit fiberden ~3 mg'lık örnekler hazırlanmış ve analizde platin kap kullanılmıştır. TA Q500 cihazı kullanılarak 60 mL/dk akış hızındaki azot atmosferi altında, 10°C/dk'lık ısıtma hızında, rampa modu (ramp mod) kullanılarak örnekler analiz edilmiştir. Bu yöntemle örnekler ilk önce 35°C'den 100°C'e kadar ısıtılıp daha sonra tekrar 35°C'e soğutulmuştur. Bunun amacı fiberlerde iz miktarda kalan solventin evaporasyonunu sağlamaktır. Son olarak hibrit fiberler 35°C-600°C aralığında ısıtılarak örneklerde meydana gelen kütle değişimleri kaydedilmiştir.

3.2.4. EcN'nin Hibrit Fiberlere Enkapsülasyonu

EcN ticari tabletlerden elde edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak kapsülün dış çeperi kırılmış ve toz içerik 5 mL LB besiyerinde 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon ortamında mikroorganizma dışındaki içeriğin giderilmesi için bu ortamdan 200 µL örnek alınarak tekrar bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda yaygın olarak koliform ve fekal koliformların izolasyonu ve ayrımı için kullanılan selektif Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) besiyerine tek koloni düşürme tekniğine uygun olarak ekim yapılmış ve petri kapları 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası mavi-siyah merkezli yeşil metalik koloniler *E. coli* hücreleri olarak seçilmiştir. EMBA besiyerinden izole edilen EcN kolonisi LB besiyerinde geliştirildikten sonra kültür 1:1 (h/h) oranda gliserol ile karıştırılarak stok hazırlanmış ve -20°C'de depolanmıştır. Daha sonraki bütün analizlerde hazırlanan bu stok kullanılmıştır.

Elektroğirme işlemi öncesi stoktan alınan 200 µL EcN, 5 mL LB besiyerinde gece boyu inkübe edilmiştir. Gece boyu inkübe edilen kültürün 4 mL'si, 100 mL LB besiyerine

inoküle edilmiş ve 4 saat boyunca 37°C’de inkübe edilerek taze EcN kültürü hazırlanmıştır. MEGA STAR 1.6R (VWR International, LLC., A.B.D.) soğutmalı santrifüj kullanılarak 100 mL’lik besiyeri 16000×g’de 15dk santrifüj edilmiştir. Başlangıç mikroorganizma yükünü konsantre etmek amacıyla elde edilen hücre pelleti 10 mL PBS (1mM, pH 7.4) ile süspanse edilmiştir.

Elektroegirme prosesinde kullanılacak PVA çözeltisinin son konsantrasyonunun %10 olması için, %20 (a/h)’lik PVA çözeltisi hazırlanmış ve 1:1 (h/h) oranda EcN kültürü ile 1 saat boyunca karıştırılmıştır. İşlem sonucunda EcN inoküle edilmiş, %10 (a/h)’lik PVA (1 mM PBS - %1 (a/a) Triton X-100) çözeltisi elde edilmiştir.

Açılı çift nozul elektroegirme işlemi bir önceki aşamada bahsedilen yöntem ve parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada hem PVA/PVA fiberlerine hem de PVA/CA fiberlerine EcN’nin enkapsülasyonu sağlanmıştır. Elde edilen EcN enkapsüle edilmiş PVA/CA fiberlerini (PVA/CA-EcN fiberleri) ESEM kullanılarak incelenmiş ve PVA/CA-EcN fiberlerindeki kesişim noktaları araştırılmıştır.

3.2.5. Elektroegirme Prosesinin Mikroorganizma Canlılığına Etkisi ve Enkapsülasyon Verimliliği

PVA/CA-EcN fiberlerinde ilk önce elektroegirme işleminin etkisi araştırılmıştır. Kullanılan sistemle CA’nın mikroorganizma üzerindeki olumsuz etkisinin önlenip önlenmediğinin kontrolü amacıyla EcN enkapsüle edilmiş PVA/PVA fiberleri (PVA/PVA-EcN) bu aşamada kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Elektroegirme işleminin canlılık üzerine etkisinin anlaşılması için öncelikle, proses öncesi EcN inoküle edilmiş PVA çözeltisinden örnek alınmıştır. Bu amaçla teorik olarak hibrit fiber içindeki ağırlıkça 10 mg PVA fiberine denk gelecek şekilde çözeltiden 84 µL alınmış ve 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) kullanılarak süspanse edilmiştir. Daha sonra bu çözeltinin seri dilisyonları hazırlanmıştır. LB Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemine uygun olarak ekim yapılmış ve petri kapları bir gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan plaklar sayılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

Kontrol olarak kullanılacak olan PVA/PVA-EcN fiberlerinden her bir paralel için 10 mg tartılmıştır ve üzerine 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) eklemiştir. Sadece fiber yüzeyine tutunmuş olup enkapsüle olmayan EcN'lerin tespiti için PBS (10 mM, pH 7.4) ile yıkama yapılmıştır. Bu amaçla PBS (10 mM, pH 7.4) ile süspansiyon edilen örnekler 10 s vorteksledikten sonra 5000×g'de 20 s santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın seri dilisyonları PBS (10 mM, pH 7.4) ile hazırlanmış ve dilisyonlardan LB Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemine uygun olarak ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca inkübasyona sonrası petri kaplarındaki EcN kolonileri sayılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir. Bu aşamanın sonunda yıkama sonrası süpernatantta bulunan ve enkapsüle olmamış olan EcN sayısı (kob/mL) belirlenmiştir.

PVA/PVA-EcN fiberlerindeki toplam bakteri sayısının tespiti için 10 mg fiber numunesi 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) ile süspansiyon edildikten sonra çözelti fiber içindeki EcN'nin salınımı için oda sıcaklığında (~25°C) karıştırıcıda 4 saat çalkalanmıştır. Daha sonra örnekler 5000×g'de 20 sn santrifüjlenmiş ve süpernatantın seri dilisyonlarından LB besiyerine yüzeye yayma yöntemine uygun olarak ekim yapılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonrası plaklar sayılarak sonuçlar kaydedilmiştir.

PVA/CA-EcN fiberlerinde elektroğirmenin etkisinin belirlenmesi için 20 mg'lık (teorik olarak 10mg PVA fiberine ağırlıkça denk miktar) numuneler kullanılmıştır. PVA/CA fiberlerine enkapsüle olmayan EcN ve fiberdeki toplam bakteri sayısının tayini için PVA/PVA-EcN fiberlerine yapılan işlemler bu aşamada da uygulanmıştır.

Elektroğirme işleminin EcN'nin canlılığına etkisinin tespiti için EcN inoküle edilen PVA çözeltisinden alınan sayım sonuçları ile elektroğirme işlemi sonucu elde edilen hibrit fiberlerdeki toplam bakteri sayısı (kob/mL) karşılaştırılmış ve logaritmik düşüş olup olmadığı incelenmiştir.

Enkapsülasyon verimi (%EV) (Eşitlik 3.1) ise fiberlerdeki toplam bakteri sayısı ile, fiberlere yapılan yıkama işlemi sonucunda elde edilen enkapsüle olmamış

mikroorganizma sayıları karşılaştırılarak hesaplanmıştır (a: PVA çözeltisindeki EcN sayısı, b: hibrit fiberdeki toplam bakteri sayısı). Bu aşamadaki bütün analizler üç paralel ile gerçekleştirilmiştir.

$$\%EV = \left(\frac{a-b}{a}\right) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

3.2.6. Sindirim Sistemi Simülasyonu

Çalışma kapsamında, uygulanan enkapsülasyon yöntemlerinin model probiyotik mikroorganizmayı sindirim sistemi koşullarına karşı daha dirençli hale getirip getirmediği araştırılmıştır. Sindirim simülasyonunda mide ve bağırsak ortamları taklit edilmiştir. Minekus vd. [84] ve Annan vd. [85]'nin çalışmalarında yer alan yöntemin modifikasyonu ile hazırlanan SMC ve SBC'nin bileşenleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Simüle mide çözeltisi (SMC) ve Simüle bağırsak çözeltisi (SBC) ortamlarındaki bileşenler

Bileşenler	SMC (pH 2)	SBC (pH 8.5)
PBS	10 mM	10 mM
Pepsin	2000 U/mL	-
Pankreatin	-	100 U/mL tripsin eşdeğerliğinde
Safra tuzu	-	% 4.5 (a/h)

Simülasyon çözeltilerini hazırlarken ilk önce SMC için 10 mM PBS (pH 2.0) ve SBC için % 4.5 (a/h) konsantrasyonda safra tuzu içeren 10 mM PBS (pH 8.5), 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Kullanılan enzimler Çizelge 3.1.'e uygun şekilde analizin hemen öncesinde ilgili çözeltilere eklenmiştir.

Serbest hücrelerin sindirim simülasyonu için 5 mL, 4 saatlik taze EcN kültürleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında 16000×g'de 15 dk'lık santrifüj işlemi ile elde edilen hücre pelletleri 5 mL SMC ile süspanse edilmiş ve pH 2'ye ayarlanmıştır.

Mide simülasyonu 37°C’de devamlı hafif çalkalama ile 2 saatte tamamlanmıştır. Mide simülasyonu sonrası çözelti SBC ile 1:1 h/h oranda karıştırılmış, pH 8.5’e ayarlanmış ve 37°C’de devamlı hafif çalkalama ile 2 saatlik bağırsak simülasyonu başlatılmıştır. Sindirim simülasyonunun en başında ve daha sonraki her 20 dakikada bir simülasyon çözeltilerinden örnek alınarak canlılıktaki değişim takip edilmiştir. Bu amaçla periyodik olarak alınan örneklerin PBS (10 mM, pH 7.4) ile seri dilisyonları hazırlanmış ve bu dilisyonlardan LB Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır. Sayım sonuçları bir gecelik inkübasyonun sonrasında alınmıştır.

PVA/PVA-EcN fiberlerinin sindirim simülasyonu için 50 mg fiber 5 mL SMÇ ile karıştırılıp pH 2.0’ye ayarlanmıştır. Mide simülasyonu 37°C’de hafif çalkalamalı ortamda gerçekleştirilmiştir. 2 saat süren simülasyonunun başında ve sonraki her 20 dakikada bir çözeltilerden canlılık analizlerinde kullanılmak üzere örnek alınmıştır. Mide simülasyonu sonunda SMÇ ile SBC 1:1 h/h oranda karıştırılıp pH 8.5’e ayarlanmıştır. Bağırsak simülasyonunda da her 20 dakikada bir alınan örneklerin PBS (10 Mm, pH 7.4) ile dilisyonları hazırlanmış ve LB Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemine uygun olarak ekim yapılmıştır. Ekim sonuçları bir gecelik inkübasyon sonucunda petri kaplarında oluşan EcN plaklarının sayılması ile hesaplanmıştır.

PVA/CA-EcN fiberlerinin sindirim simülasyonu için 100 mg fiber (teorik olarak 50 mg PVA fiberine denk miktar) kullanılmıştır. Mide ve bağırsak simülasyonları, PVA/PVA-EcN fiberleri ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Sindirim simülasyonu analizinde periyodik olarak SMÇ ve SBC’den alınan örneklerle ek olarak aynı zamanda ortamdan fiber örnekleri de alınmış ve PBS (10 mM, pH 7.4) ortamında salınımına devam etmesi sağlanmıştır. Bu işlem bütün fiber örneklerinde toplam salınım süresi 4 saat (fiberlerde %100 salınımın gerçekleştiği süre) olacak şekilde uygulanmıştır. Bu süre sonunda salınım ortamından alınan örneklerin PBS (10 mM, pH 7.4) ile hazırlanan dilisyonları daha önceki aşamadaki prosedüre uygun olarak inkübe edilmiş ve sayım sonucu alınmıştır. Yapılan bu analiz ile salınmayıp hibrit fiber içinde tutuklu kalan probiyotik sayısının tespiti amaçlanmıştır. Sindirim simülasyonu aşamasındaki sonuçlar, aynı sürede sindirim çözeltisinden alınan örnekteki ve PBS (10

mM, pH 7.4)'de salınımına devam ettirilen fiberin salınımı sonucu elde edilen sayım sonuçlarının toplanmasıyla elde edilmiştir.

Ayrıca PVA/PVA-EcN ve PVA/CA-EcN fiberlerinin pepsin içermeyen SMÇ (pH 2) ve pankreatin ve safra tuzu içermeyen SBÇ (pH 8.5) ortamlarında da aynı yöntemle sindirim simülasyonu gerçekleştirilmiş ve sayım sonuçları alınmıştır. Bu aşama ile sindirim simülasyonu boyunca canlılıktaki değişimde temel olarak pH değerinin mi sindirim enzimlerinin ve safra tuzunun mu etkili olduğunun anlaşılması amaçlanmıştır. Sindirim simülasyonundaki bütün analizler ikili paralel şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Depolama Koşullarının Canlılığa Etkisi

4°C ve 20°C'de fiber formunda ve PBS (10 mM, pH 7.4) içinde süspansiyon halinde olan örneklerin zamana bağlı canlılıklarındaki değişim incelenmiştir. Bu analiz kapsamında 10 mg PVA/PVA-EcN ve 20 mg PVA/CA-EcN fiberleri numune olarak kullanılmıştır. Depolanan bütün paralellerde 2 ay boyunca periyodik olarak canlılık analizleri yapılmıştır.

PBS içinde süspansiyon fiber numuneleri ile karşılaştırılmak üzere 4 saatlik taze EcN kültürü 1 mL'lik paralellere bölünmüş ve 16000×g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Besiyerinin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla santrifüj ile elde edilen hücre pelletleri 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) ile süspansiyon edilmiş ve 4°C ve 20°C'de depolanmıştır. Hibrit fiber numunelerinde ise belirtilen miktarlarının 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) ile süspansiyonu hazırlanarak elde edilen paraleller aynı sıcaklıklarda depolanmıştır. Serbest ve hibrit fiberlere enkapsüle edilmiş halde depolanan EcN örnekleri vortekslendikten sonra PBS (10 mM, pH 7.4) kullanılarak dilisyonları hazırlanmış ve LB Agar besiyerine yüzeye yayma yöntemine uygun şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapılan örneklerin bir gecelik inkübasyonu sonucunda sayım sonuçları kaydedilmiştir.

Kuru fiber formunda depolama yapılan örneklerde, yapılan analizlerde canlılık analizleri öncesi hibrit fiberler 1 mL PBS (10 mM, pH 7.4) ile süspansiyon edilmiş ve enkapsüle hücrelerin salınımı için oda sıcaklığında 4 saat boyunca çalkalanmıştır. Bu süre sonunda

bütün örneklerin PBS (10 mM, pH 7.4) ile dilisyonları hazırlanmış ve ekim daha önceki aşamalarda olduğu şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada analizler iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sayım sonuçları % Canlılık olarak verilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Viskozite, kondaktivite, ortalama fiber çapları, %EV, sindirim sistemi simülasyonu ve depolama koşullarının etkisinin araştırılması için yapılan analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistik analizi için Tukey'in Dürüstçe Anlamlı Fark (Tukey Honestly Significant Difference (HSD)) çoklu karşılaştırma testleri ($\alpha=0.05$) ile birlikte tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. İstatistik analizi JMP Trial (Version 15.0.0, SAS Institute Inc., Carolina, A.B.D.) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Çözelti Özelliklerinin Fiber Morfolojisine Etkisi

Damla kusuru olmayan ve tek düze boyutlara sahip fiberler, başarılı fiber yapıları olarak belirlenmiş ve daha sonraki aşamalara bu fiber formlarının üretilebildiği çözeltilerle devam edilmiştir. Ayrıca nano boyutun sağladığı avantajlardan yararlanmak amacıyla genel olarak daha düşük ortalama çapa sahip fiberler tercih edilmiştir. Hibrit fiberlerin üretilebilmesi için PVA ve CA çözeltilerinin karakterizasyonu yapılmış ve alınan sonuçlar değerlendirilerek en uygun bulunan PVA ve CA çözeltilerinin daha sonraki aşamalarda aynı parametrelerle kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimum CA çözeltisinin hazırlamasında ilk önce kullanılacak solvent tipine karar verilmiştir. Bu amaçla %17 (a/h) CA çözeltisi aseton-DMF (1:1), aseton-DMF-su (85:15:5) ve asetik asit-etanol (8:2) kullanılarak hazırlanmıştır. Farklı solventler kullanılarak üretilen fiberlerin görüntülerinden (Şekil 4.1.) yararlanılarak boyut analizleri yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı solventler kullanılarak hazırlanmış %17 (a/h)'lik CA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri

Solvent	Viskozite (mPa·s)	Kondaktivite (mS/cm)	Ortalama Fiber Çapı (nm)
Aseton-DMF	1278±6 ^a	0.653±0.010 ^d	1564±780 ^g
Aseton-DMF-su	768±1 ^b	0.693±0.020 ^e	852±335 ^g
Asetik asit-etanol	1833±3 ^c	0.083±0.001 ^f	956±667 ^g

Sonuçlar üç paralelin ortalaması ± standart sapma (SS) olarak verilmiştir. ^{a-c; d-f; g} Farklı harfler, örneklerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$).

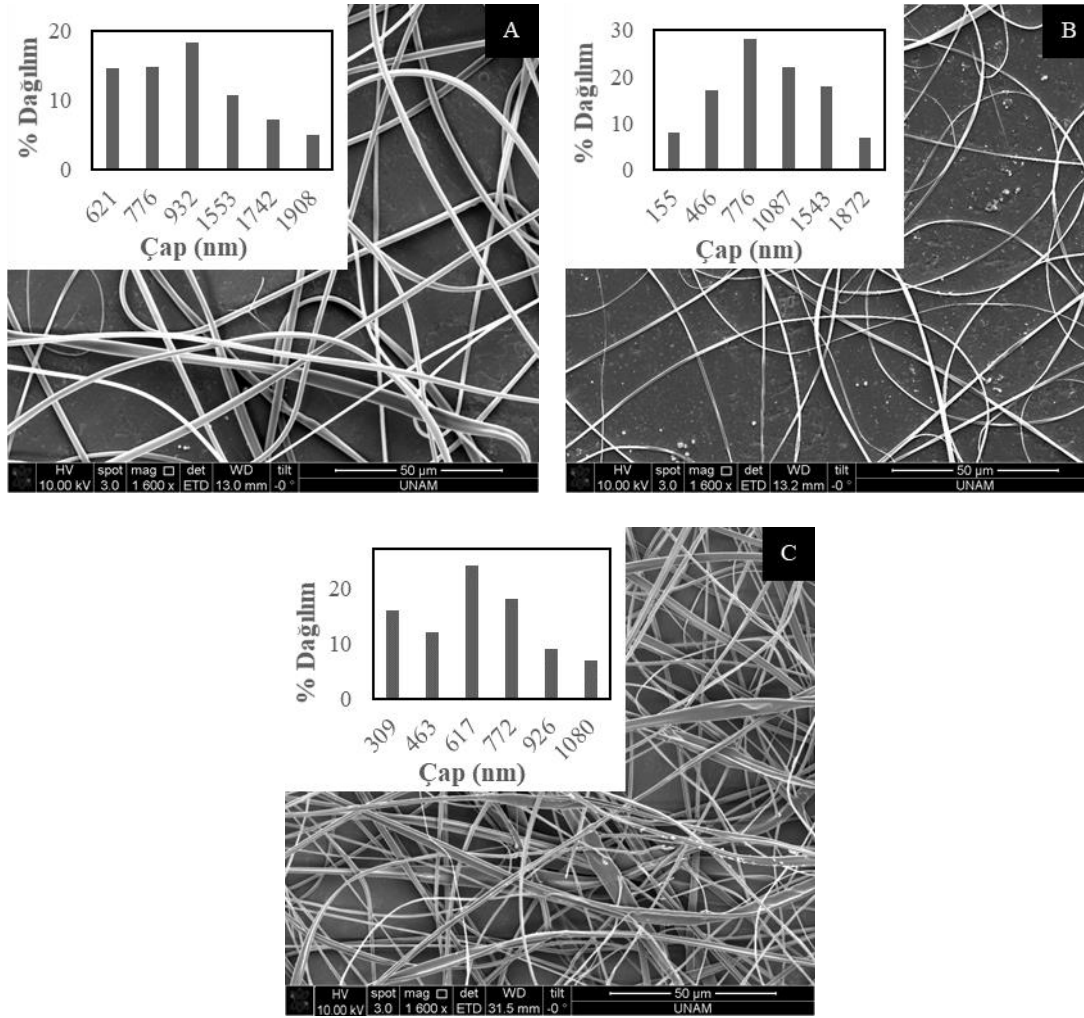
Farklı solventler kullanılarak hazırlanan çözeltilerin viskozite ve kondaktivite verileri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Aseton-DMF ve aseton-DMF-su karışımları kullanılan çözeltilerde beklendiği gibi viskozite ve kondaktivite artışıyla birlikte fiber çapında azalma görülmüştür. Ortalama fiber çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da daha küçük standart sapma ile en küçük ortalama fiber çapı değerine sahip olduğu için, aseton-DMF-su karışımı ile hazırlanan çözelti CA için diğer solvent karışımlarından daha avantajlı durmaktadır (Çizelge 4.1.). Ancak solvent karışımlarında aseton kullanılan polimerlerde, Taylor konisi yapısındaki çözeltide aseton evaporasyonuna bağlı olarak zamanla kuruma meydana gelmiş, bu durumda sürekli fiber üretimini imkansız kılmıştır. Bu nedenle daha sonraki aşamalarda asetik asit-etanol karışımının kullanılmasına karar verilmiştir.

Solvent seçiminden sonra optimum konsantrasyonun seçilmesi için %10.0, %12.5, %15.0, %17.0, ve %20.0 (a/h) CA çözeltileri hazırlanmış ve çözeltiler karakterize edilmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki (% a/h) CA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri

CA (a/h) Konsantrasyonu	Viskozite (mPa·s)	Kondaktivite (mS/cm)	Ortalama Fiber Çapı (nm)
% 10.0	441±1 ^a	0.106±0.001 ^f	-
% 12.5	748±3 ^b	0.099±0.001 ^g	-
% 15.0	867±3 ^c	0.086±0.001 ^h	812±366 ^k
% 17.0	1833±3 ^d	0.083±0.001 ⁱ	956±667 ^k
% 20.0	2286±2 ^e	0.079±0.001 ^j	990±424 ^k

Sonuçlar üç paralelin ortalaması ± SS olarak verilmiştir. ^{a-c; f-j; k} Farklı harfler, örneklerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$).



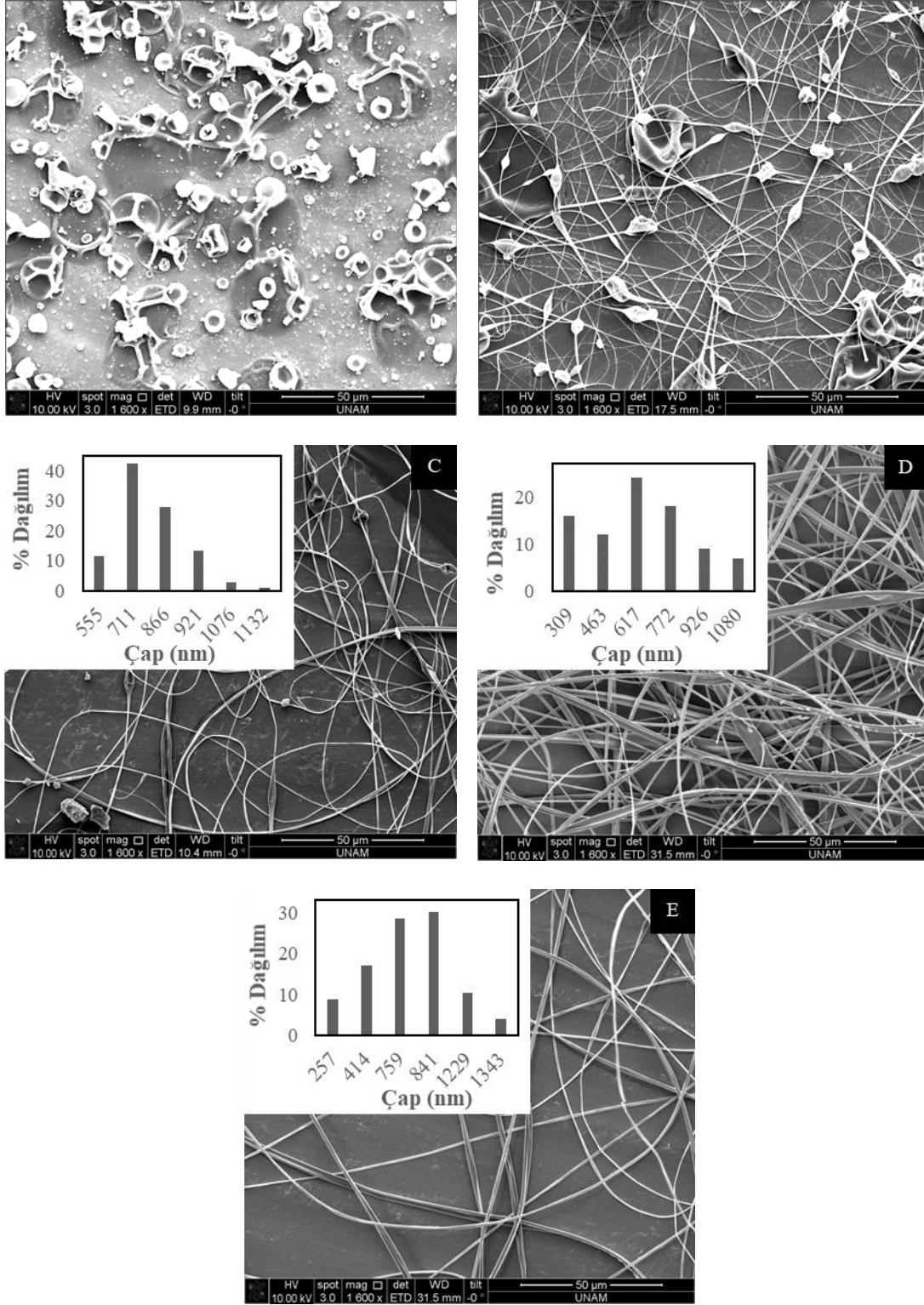
Şekil 4.1. Farklı solventlerle hazırlanmış %17 (a/h) CA çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları. A) aseton-DMF, B)aseton-DMF-su, C) asetik asit-etanol. Büyütme 1600X

%10.0 (a/h) CA çözeltisinin sahip olduğu düşük viskozite nedeniyle fiber üretilememiştir. Konsantrasyon değerleri %10.0'dan %17.0'ye (a/h) çıktıkça fiber morfolojisi iyileşmiş ve damla kusuru giderilmiştir (Şekil 4.2.). %12.5 ve %15.0 (a/h) konsantrasyonlara sahip CA çözeltilerinde, viskozite değerlerine bağlı olarak, damla kusurlu fiberler üretildiği için bu iki konsantrasyon ileriki aşamalar için uygun bulunmamıştır. %17.0 (a/h)'lik CA çözeltisinde en yüksek konsantrasyona kıyasla istatistiksel olarak da anlamlı olan daha düşük viskozite ve yüksek kondaktivite değerlerine bağlı olarak, daha küçük ortalama çapa sahip fiberler üretilmiştir. %17.0 ve %20.0 (a/h)'lik CA'lardan elde edilen fiberlerin ortalama çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da, %17.0 (a/h)'lik CA çözeltisinden elde edilen ortalama fiber çaplarında standart sapma değerinin

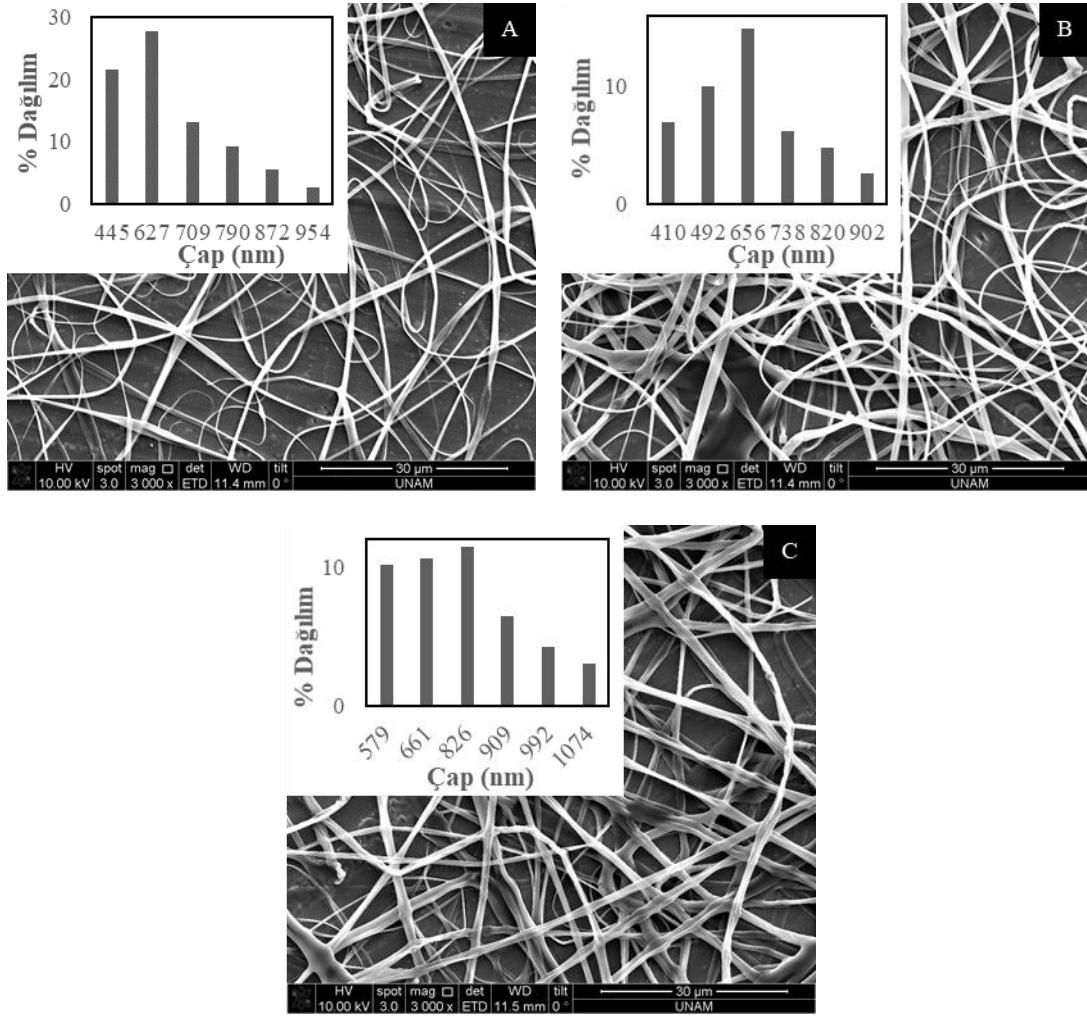
daha yüksek olduğu gör÷lmektedir. Bu nedenle tek düze fiber üretimine olanak sağlayan ve daha küçük standart sapmalı ortalama fiber çaplarına sahip olan %20.0 (a/h) CA çözeltisinin daha sonraki aşamalarda hibrit fiberlerin üretiminde kullanılmasına karar verilmiştir.

CA çözeltisinin optimizasyonunda bu aşamaya kadar 0.5 mL/sa akış hızında, 25kV yüksek voltajda ve nozul ile kolektör arası mesafe 8 cm olacak şekilde yürüt÷len elektroğirme prosesinde, son olarak seçilen CA çözeltisinin (%20 (a/h) CA (asetik asit-etanol (8:2 (h/h))) akış hızı optimize edilmiştir. Yapılan morfolojik analiz sonrasında 0.2, 0.4 ve 0.6 mL/sa akış hızları ile üretilen fiberlerin sırasıyla 606 ± 200^a , 679 ± 188^a , 999 ± 69^b nm ortalama çaplara sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). Beklendiği gibi akış hızının artmasıyla birlikte fiber çapı artmıştır. 0.2 ve 0.5 mL/sa akış hızlarında elde edilen ortalama fiber çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Ancak 0.2 mL/sa akış hızında CA çözeltisinin elektroğirme sistemine sürekli beslenmesinde sorun yaşanması, 0.6 mL/sa akış hızında ise tercih edilmeyen fiber çapına ulaşılması nedeniyle bu akış hızları optimizasyonda elenmiştir.

Özetle CA çözeltisinin optimizasyonu sonucu hibrit fiber üretimi için %20 (a/h) (asetik asit-etanol (8:2 (h/h))) konsantrasyondaki CA çözeltisinin elektroğirme sistemine 0.4 mL/sa akış hızında beslenmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki CA çözeltilerden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları. A) %10.0 (a/h) CA; B) %12.5 (a/h) CA; C) %15.0 (a/h) CA; D) %17.0 (a/h) CA; E) %20.0 (a/h) CA. Büyütme 1600X



Şekil 4.3. Farklı akış hızlarındaki CA (%20 (a/h)) çözeltilerden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları. A) 0.2; B) 0.4; C) 0.6 mL/sa, Büyütme 3000X

CA çözeltisinin optimizasyonu sonrasında PVA çözeltisinin optimizasyonuna geçilmiştir. Bu aşamada ilk olarak 80°C ultra saf su kullanılarak %8, %10 ve %12 (a/h) konsantrasyonlarında PVA çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin karakterizasyonu amacıyla viskozite ve kondaktivite ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 4.3.).

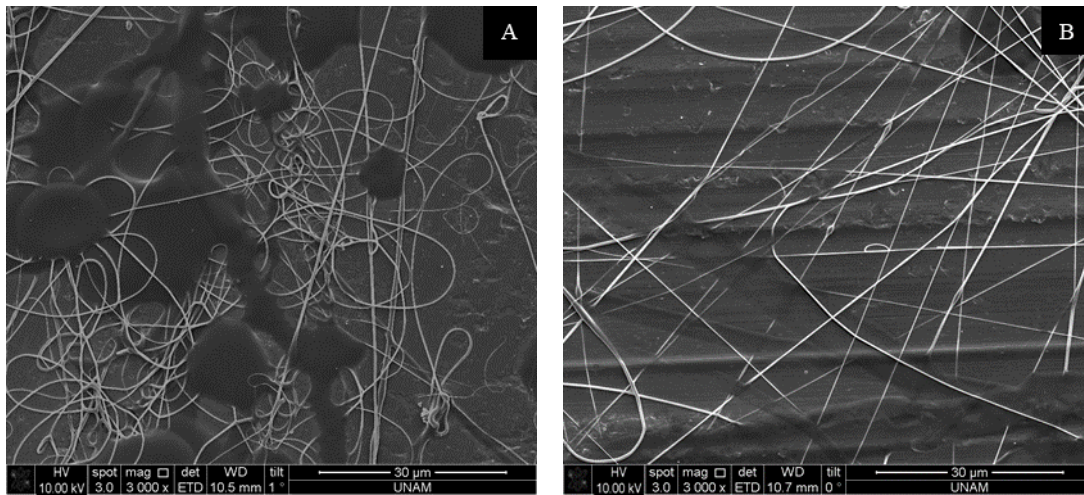
Konsantrasyonu %12 (a/h) olan PVA çözeltisinin yüksek viskozite değerine bağlı olarak elektroğirme işleminde fiber jetleri oluşturulamadığı için, bu konsantrasyonda görüntü elde edilmemiştir. Fiber jetleri elde edilemeyen bu çözeltinin kullanılmayacağına karar

verilmiştir. %8 (a/h)'lik PVA çözeltisinde ise elde edilen ESEM görüntüleri incelenmiş ve sadece fiber değil aynı zamanda film formunda PVA kütlelerinin bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.). Tek düze fiber yapılarının elde edilemediği bu konsantrasyon daha sonraki aşamalarda kullanılmamıştır. Optimizasyon için hazırlanan üç çözeltiden ikisinin tez kapsamında yapılan çalışmada kullanıma uygun olmaması nedeniyle ileriki aşamalarda kullanılmak üzere %10 (a/h) PVA konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki (% a/h) PVA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri

PVA (a/h) Konsantrasyonu	Viskozite (mPa·s)	Kondaktivite (mS/cm)
% 8	185±2 ^a	1.1±0.1 ^a
% 10	646±2 ^b	1.3±0.1 ^{a,b}
% 12	1356±2 ^c	1.5±0.2 ^b

Sonuçlar üç paralelin ortalaması ± SS olarak verilmiştir. ^{a-c} Farklı harfler, örneklerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki PVA çözeltilerinden elde edilen ESEM görüntüleri. A) %8 (a/h) PVA; B) %10 (a/h) PVA, Büyütme 3000X

Ancak bu konsantrasyondan elde edilen fiber yapıları yeterli görülmediği için farklı solventler kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla %10 (a/h) PVA çözeltisi %20'lik etanol, 10 mM PBS (pH 7.4) ve 1 mM PBS (pH 7.4) kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanılan solvent sistemlerinde etanolün kullanılma amacı evaporasyonun kolaylaştırılması; PBS'in ise içerdiği iyon yüküyle çözeltinin kondaktivitesinin artırılmasıdır. Hazırlanan çözeltilerde viskozite ve kondaktivite analizleri yapılmış ve beklendiği gibi PBS eklenmesiyle çözelti iletkenliği artmıştır (Çizelge 4.4.).

%20'lik etanolün solvent olarak kullanıldığı çözeltide hem istenmeyen büyüklükte ortalama fiber çapı elde edilmiş (1044 ± 711 nm) hem de bu çözeltide yapılan ön denemelerde probiyotiklerin çözelti içinde canlılıklarını yitirdikleri gözlenmiştir. 10 mM PBS (pH 7.4) ile hazırlanan çözeltide kondaktivite değeri daha yüksek olmasına rağmen, 1 mM PBS (pH 7.4) kullanılan çözelti ile viskozite değerleri ve ortalama fiber çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.4.).

Ancak fiber görüntüleri incelenmiş ve solvent olarak 10 mM PBS (pH 7.4) kullanılan çözeltiden üretilen fiberlerin yüzeyinde yoğun miktarda tuz kristalleri olduğu ve damla kusurlu fiberler elde edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.). Bu nedenle daha sonraki aşamalarda bu çözelti ile hazırlanan PVA çözeltileri kullanılmamış ve 1 mM PBS (pH 7.4)'in solvent olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

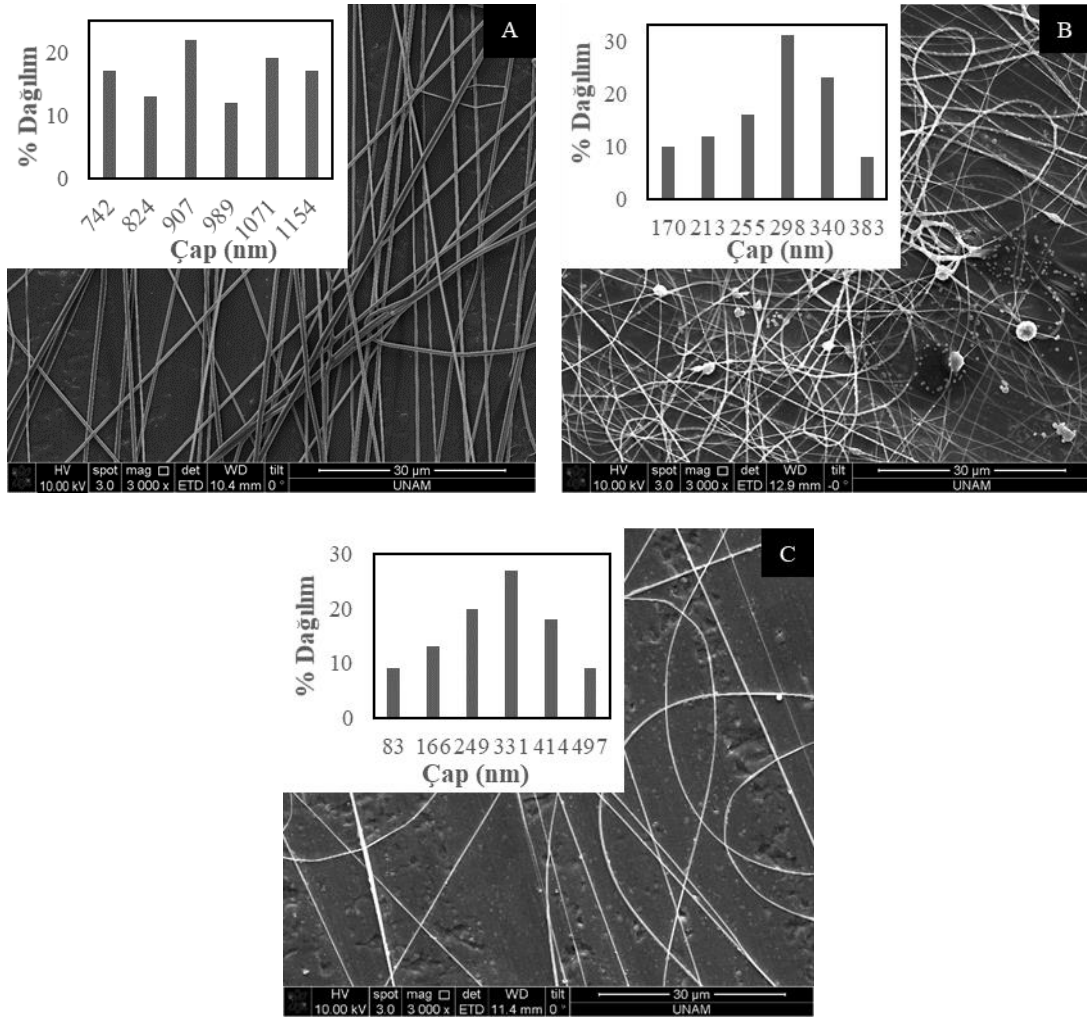
PVA çözeltisinin optimizasyonunda kullanılan farklı solventlerin ve konsantrasyonların bazılarında istenilen çapa sahip fiberler elde edilmiş olsa da, fiber üretme prosesi kesikli olarak devam etmiş, stabil fiber jetleri elde edilememiştir. Bu sorunun giderilmesi için çözeltinin yüzey gerilimini düşürmek amacıyla Triton X-100 kullanılmasına karar verilmiştir [86].

Çizelge 4.4. Farklı solventler kullanılarak hazırlanmış %10 (a/h)'luk PVA çözeltilerinin viskozite, kondaktivite ve ortalama çap değerleri

Solvent	Viskozite (mPa·s)	Kondaktivite (mS/cm)	Ortalama Fiber Çapı (nm)
%20 (a/h) Etanol	1308±2 ^a	0.9±0.2 ^e	1044±511 ^h
10 mM PBS	756±2 ^b	12.8±0.1 ^f	377±137 ⁱ
1 mM PBS	759±3 ^{b,c}	2.6±0.2 ^g	384±116 ⁱ
1 mM PBS (%0.2 (a/a) Triton X-100)	765±2 ^c	2.6±0.1 ^g	380±105 ⁱ
1 mM PBS (%0.5 (a/a) Triton X-100)	806±4 ^d	2.6±0.0 ^g	357±218 ⁱ
1 mM PBS (%1.0 (a/a) Triton X-100)	813±2 ^d	2.6±0.1 ^g	364±70 ⁱ

Sonuçlar üç paralelin ortalaması ± SS olarak verilmiştir. ^{a-d}; ^{e-g}; ^{h-i} Farklı harfler, örneklerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Solvent olarak 1 mM PBS (pH 7.4) kullanılan %10 (a/h)'luk PVA çözeltilisine % 0.2, % 0.5 ve % 1.0 (a/a) Triton X-100 eklenerek yeni çözeltiler elde edilmiştir. Fiber üretim aşamasına geçmeden önce kullanılan yoğunluklardaki Triton X-100'ün mikroorganizma canlılığına etkisi araştırılmış ve herhangi bir etki göstermediği anlaşılmıştır.

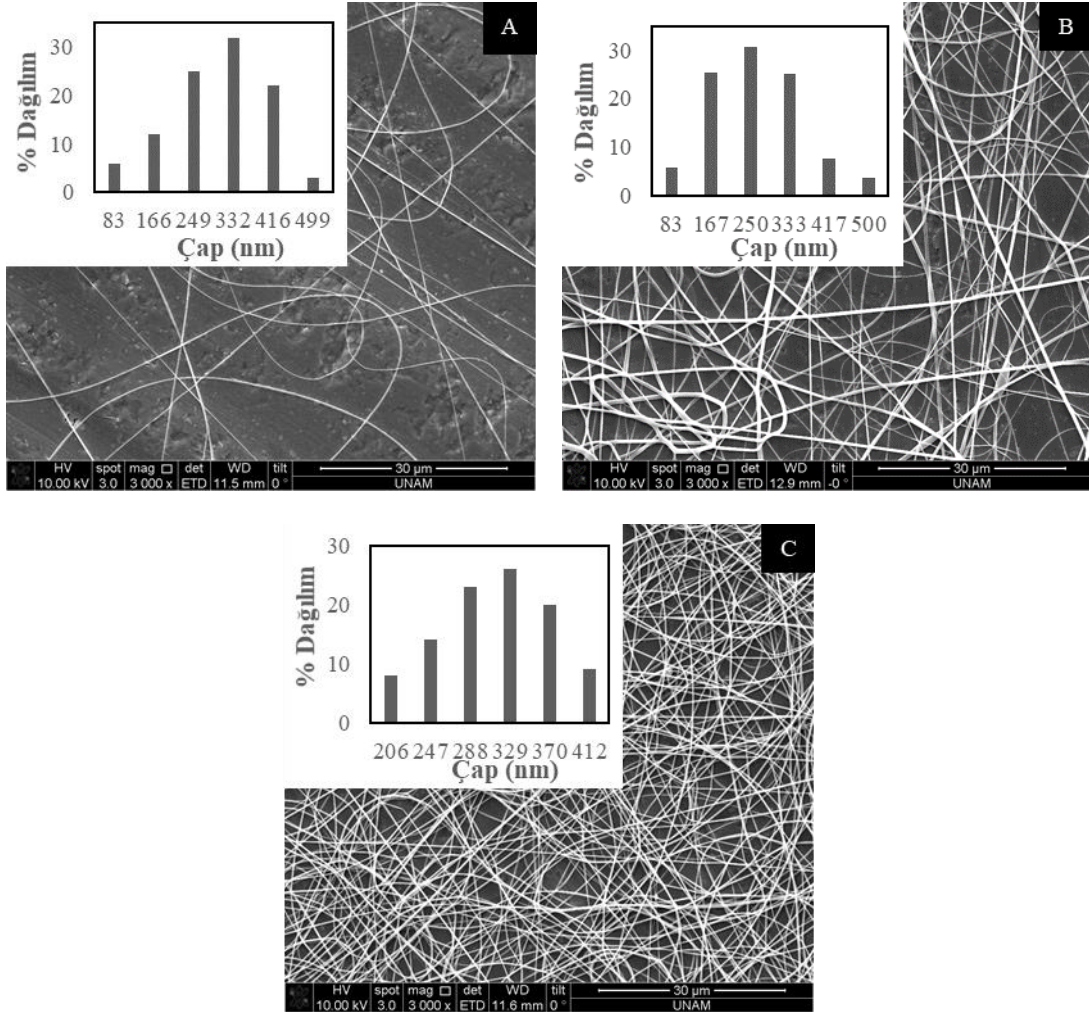


Şekil 4.5. Farklı solventlerle hazırlanmış %10 (a/h) PVA çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları. A) %20 etanol (h/h); B) 10 mM PBS (pH 7.4); C) 1 mM PBS (pH 7.4), Büyütme 3000X

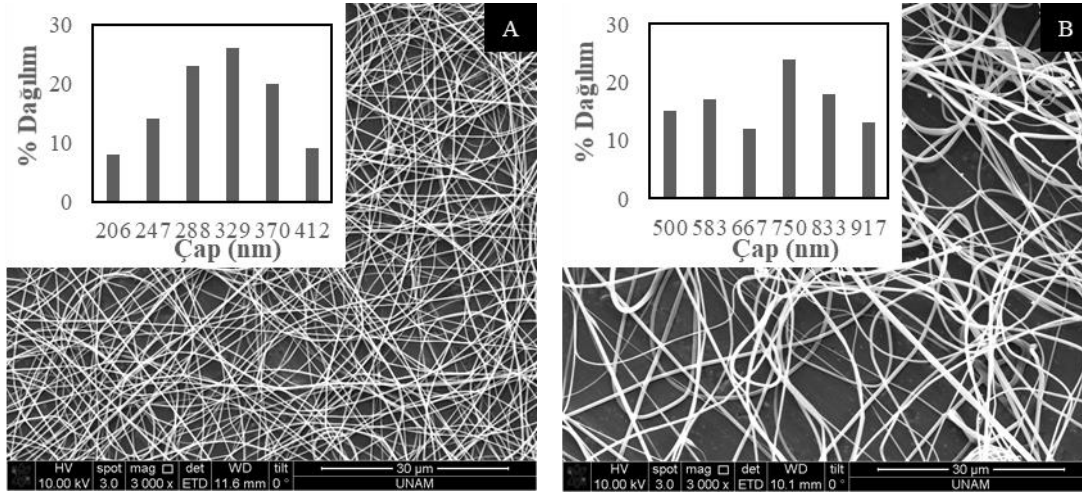
Çözelti karakterizasyonu sonrası 1 mM PBS (pH 7.4) ile % 0.2 (a/a) Triton X-100 eklenerek hazırlanan çözeltilerin viskozite değerleri arasında anlamlı istatistiksel fark oluşmamıştır. Aynı şekilde % 0.5 ve % 1.0 (a/a) Triton X-100 eklenerek hazırlanan çözeltilerin viskozite verileri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu çözeltilerde viskozite değerlerindeki değişim, katı madde miktarına bağlı olarak gerçekleşmiştir. Triton X-100'ün iyonik olmayan özellikteki yapısından dolayı, 1 mM PBS (pH 7.4) ve triton X-100 eklenen çözeltilerin kondaktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır (Çizelge 4.4.). Ortalama fiber çaplarındaki iyileşmenin yüzey geriliminin düşmesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Triton X-100 kullanılan çözeltilerden elde edilen fiberlerin (Şekil 4.6.) boyut analizleri yapıldığında ortalama fiber çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.4.). Ancak % 0.2 (a/a) Triton X-100 kullanılan çözeltide, stabil fiber jetlerindeki sorun giderilemediği için bu oran elenmiştir. Diğer iki farklı Triton X-100 konsantrasyonunda ise standart sapma değeri daha küçük olup, daha tek düze fiber üretimine olanak sağlamış % 1.0 (a/a) Triton X-100 içeren, % 10 (a/h)'luk PVA (1 mM PBS, pH 7.4) çözeltisinin hibrit fiber üretimi için kullanılmasına karar verilmiştir.

PVA çözeltilerinden fiber elde edilirken bu aşamaya kadar elektroğirme sistemi 1 mL/sa akış hızında, 25kV yüksek voltajda ve nozul ile kolektör arası mesafe 8 cm olacak şekilde kullanılmıştır. Son olarak akış hızının optimizasyonu için % 1.0 (a/a) Triton X-100 içeren % 10 (a/h)'luk PVA (1 mM PBS, pH 7.4) çözeltisi, 1 ve 2 mL/sa akış hızında sisteme beslenmiştir. Sonuç olarak elde edilen görüntüler (Şekil 4.7.) incelenip analiz edildiğinde 1 mL/sa akış hızında 364 ± 70^a nm, 2 mL/sa akış hızında ise 765 ± 363^b nm ortalama çap değerlerine sahip fiberlerin üretildiği görülmüştür. 2 mL/sa akış hızında elde edilen ortalama fiber çapı değerinin arzu edilen değerden yüksek olması nedeniyle, daha sonraki aşamalarda seçilen PVA çözeltisinin sisteme 1 mL/sa akış hızında beslenmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 kullanılarak hazırlanmış %10 (a/h)'luk PVA (1 mM PBS, pH 7.4) çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları. A) % 0.2 (a/a) Triton X-100; B) % 0.5 (a/a) Triton X-100; C) % 1.0 (a/a) Triton X-100), Büyütme 3000X



Şekil 4.7. Farklı akış hızlarında sisteme beslenen % 1.0 (a/a) Triton X-100 içeren %10 (a/h)'luk PVA (1 mM PBS, pH 7.4) çözeltilerinden elde edilen fiberlerin ESEM görüntüleri ve boyut dağılımları. A) 1 mL/sa; B) 2 mL/sa, Büyütme 3000X.

4.2. Hibrit Fiberlerin Morfolojik ve Termal Karakterizasyonu

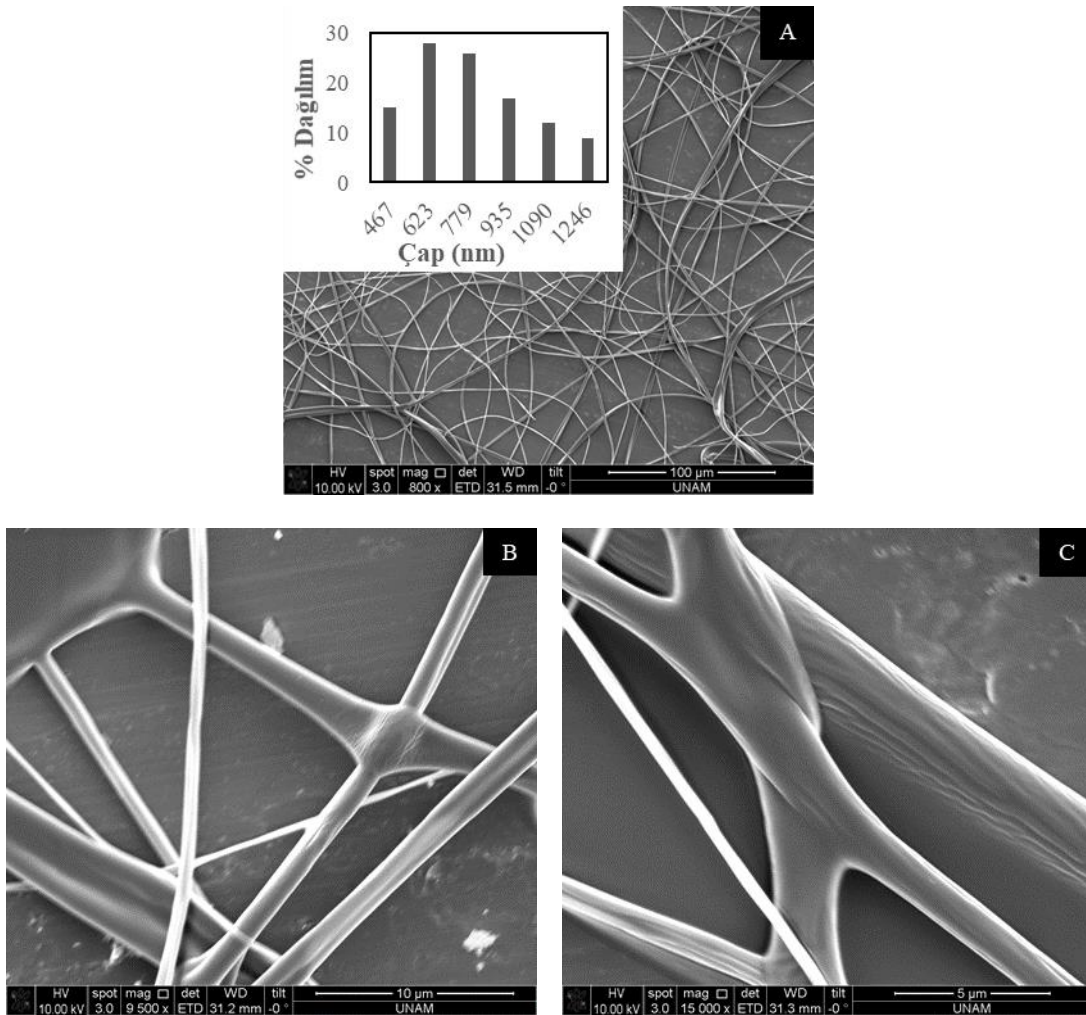
PVA ve CA çözeltilerinin optimizasyonu sonucunda, CA'nın asetik asit-etanol (8:2 (h/h) ile hazırlanmış %20 (a/h)'lik çözeltisinin kullanılmasına, PVA'nın % 1.0 (a/a) Triton X-100 içeren 1 mM PBS (pH 7.4) ile hazırlanan %10 (a/h)'luk çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Daha sonraki aşamada hibrit fiberlerin üretilmesi amacıyla, PVA çözeltisi 1 mL/sa akış hızında, CA çözeltisi ise 0.4 mL/sa akış hızında sisteme beslenmiştir.

PVA/CA fiberlerinin üretilmesinden önce PVA/PVA ve CA/CA fiberleri de üretilmiş ve elde edilen görüntülerde hibrit bölgeleri aranmıştır (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.). Böylece kurulan açılı çift nozul elektroçirme sistemi ile hibrit fiber üretilip üretilmediğinin ön denemeleri yapılmıştır.

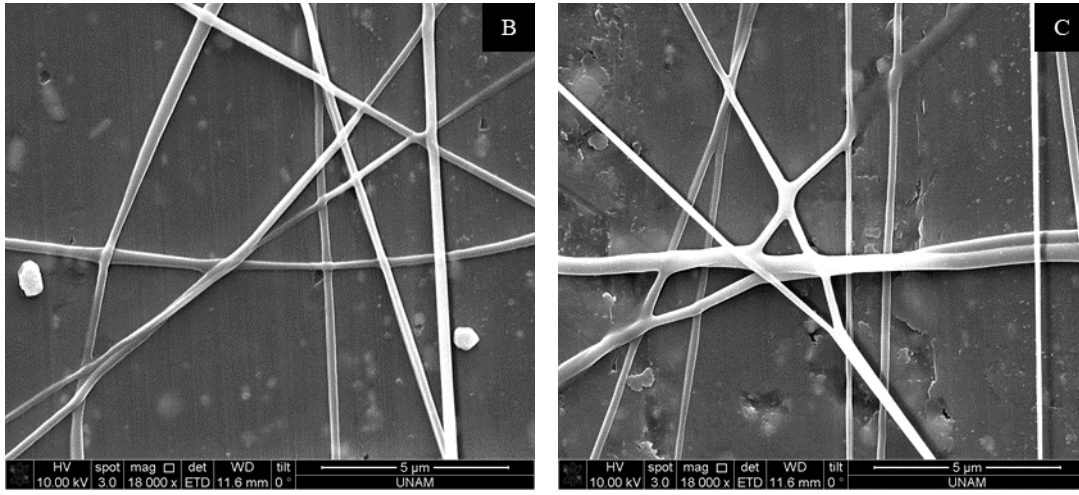
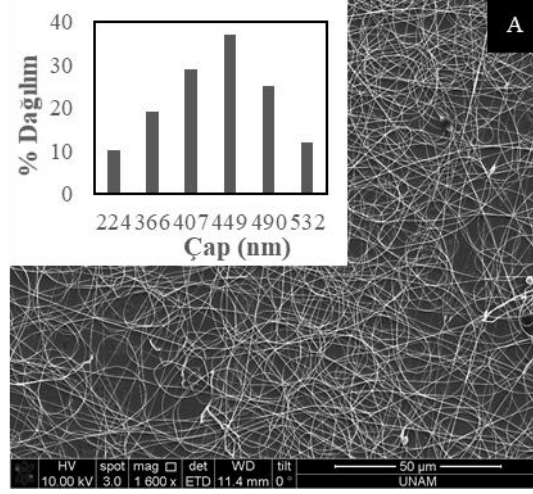
Elde edilen ESEM görüntüleri incelendiğinde hibrit bölgelerinin varlığı gözlenmiştir. PVA/PVA ve CA/CA fiberlerinden elde edilen görüntülerde ayrıca boyut analizi de yapılmıştır (Çizelge 4.5.). Analiz sonucunda PVA/PVA fiberlerinin ortalama fiber çapı 416 ± 120^a nm, CA/CA fiberlerinin ise 971 ± 131^b nm olarak tespit edilmiştir. Hibrit

fiberlerin ortalama çaplarının, aynı polimerden elde edilen ve hibrit yapısında olmayan fiberlerden daha büyük olduğu anlaşılmıştır. Hibrit bölgelerinden kaynaklı bu durum literatüre uygundur [82, 87].

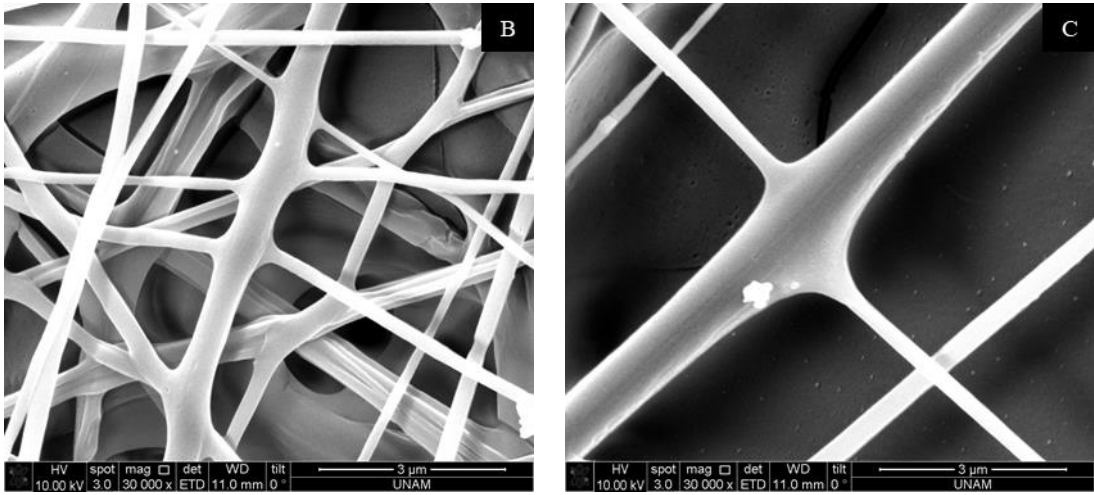
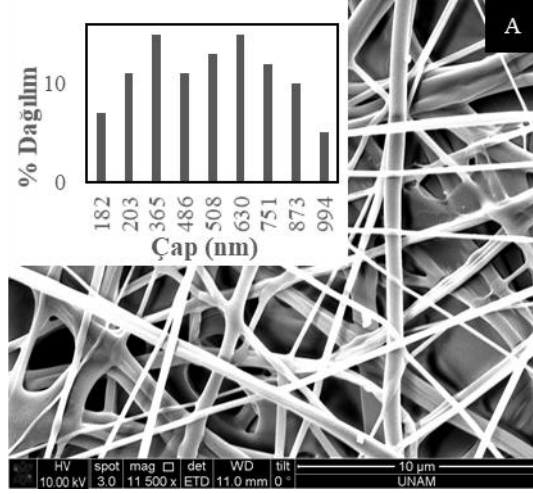
Bu aşamadan sonra arzu edilen hibrit fiberlerin üretilmesi için açılı çift nozul elektroğirme sistemi kullanılarak PVA/CA fiberleri üretilmiştir. PVA/CA fiberlerinin görüntüleri incelendiğinde PVA ve CA'nın hibrit yaptığı bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 4.10.). ESEM görüntüsünün analiz edilmesiyle, bu fiberlerin $754\pm 497^\circ$ nm ortalama çapa sahip olduğu anlaşılmıştır. Tek başlarına farklı ortalama çap değerlerine sahip PVA ve CA'nın hibrit fiberi olmasından dolayı, PVA/CA fiberlerinin ortalama çap değerine ait standart sapmanın yüksek olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.8. CA/CA fiberlerinin farklı büyütmelerdeki ESEM görüntüleri. A) Büyütme 800X, B) Büyütme 9500X, C) Büyütme 15000X



Şekil 4.9. PVA/PVA fiberlerinin farklı büyütmelerdeki ESEM görüntüleri. A) Büyütme 1600X, B) ve C) Büyütme 18000X



Şekil 4.10. PVA/CA fiberlerinin farklı büyütmelerdeki ESEM görüntüleri. A) Büyütme 11500X, B) ve C) Büyütme 30000X

Elde edilen hibrit fiberlerin termal karakterizasyonu için TGA uygulanmıştır. Bu amaçla ~3 mg'lık örnekler, nitrojen atmosferi altında, 35°C-600°C aralığında ısıtılarak kütledeki değişimler kaydedilmiştir. Hibrit fiberlerin termal stabilitesi TGA ile araştırılmış ve bu datalar işlenerek bozulma aşamalarının başlangıç sıcaklıkları (T_d) hesaplanmıştır. DTG kullanılarak maksimum bozulma sıcaklıkları (T_{max}) elde edilmiştir (Çizelge 4.5.).

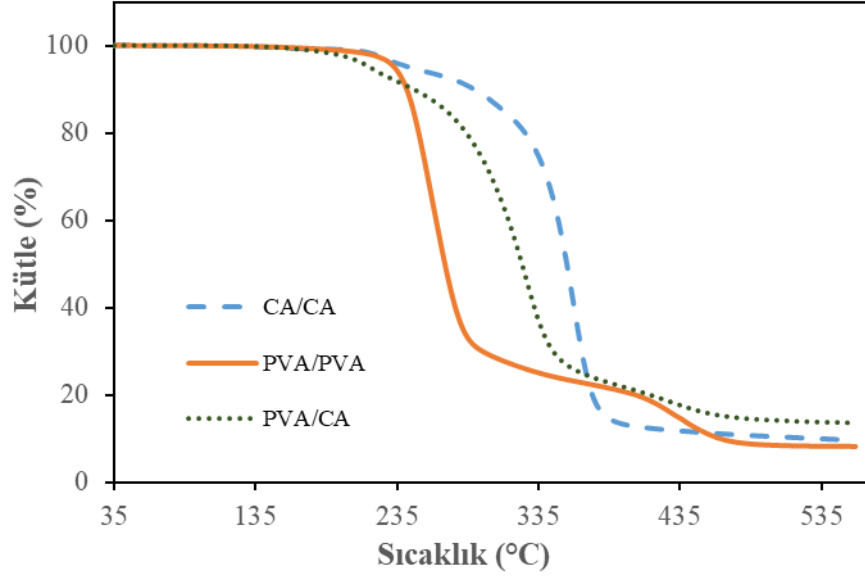
CA/CA fiberlerinde, TGA eğrisinde iki ana kütle değişim bölgesi tespit edilmiştir. 200°C - 250°C aralığındaki kütle kaybının nedeni, uçucu maddelerden ve adsorbe edilmiş nemden kaynaklanmıştır. Fiberde meydana gelen asıl kütle kaybı, CA'nın büyük ölçüde degradasyonu nedeniyle 320°C'nin üzerinde meydana gelmiştir [88]. Diğer hibrit PVA/PVA fiberlerinde de iki aşamalı kütle kaybı gözlenmiştir. İlk kütle kaybı yaklaşık

240°C'de PVA'nın yapısındaki yan zincirlerin dekompozisyonu nedeniyle başlamıştır. İkinci kütle kaybı, PVA ana zincirinin dekompozisyonu nedeniyle yaklaşık 410°C'de gözlemlenmiştir [89] (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.). PVA/CA fiberlerinde ise kütle kaybının üç aşamada meydana geldiği tespit edilmiştir. İlk aşama yapısındaki CA'ya bağlı olarak yaklaşık 201°C'de başlamıştır. Bu aşama uçucu maddelerin ve adsorbe edilen nemin uzaklaşmasını temsil etmektedir. Yaklaşık 290°C - 410°C aralığında gerçekleşen kütle kaybının ikinci aşamasında hem CA hem de PVA dekompozisyonu gerçekleşmektedir. Son kütle kaybı aşaması ise hibrit fiber yapısındaki PVA kaynaklıdır ve bu bölgede nitrojen atmosferi altındaki PVA dekompozisyonu tamamlanır [90].

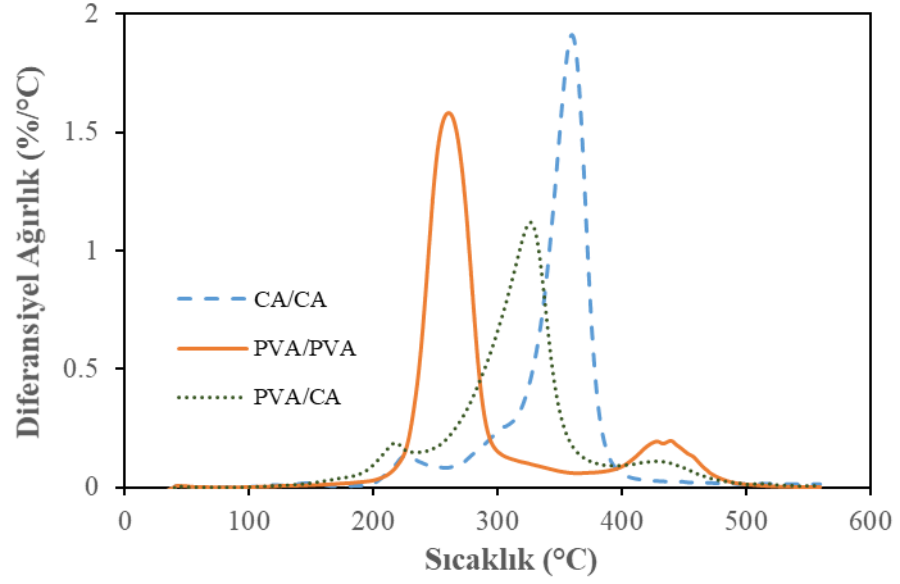
Termal stabilite analizleri değerlendirildiğinde PVA/CA fiberlerinin, PVA ve CA'ya benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Sonuç olarak üretilen hibrit fiberlerin termal stabilitesinde herhangi bir değişim olmadığı anlaşılmıştır.

Çizelge 4.5. Hibrit fiberlerin farklı bozulma aşamalarındaki T_d ve T_{max} değerleri

Fiberler	Birinci bozulma bölgesi		İkinci bozulma bölgesi		Üçüncü bozulma bölgesi	
	T_d (°C)	T_{max} (°C)	T_d (°C)	T_{max} (°C)	T_d (°C)	T_{max} (°C)
CA/CA	205	226	326	359	-	-
PVA/PVA	238	261	411	439	-	-
PVA/CA	201	210	295	326	410	428



Şekil 4.11. Hibrit fiberlerin termogravimetrik özellikleri.



Şekil 4.12. Hibrit fiberlerin DTG analizi.

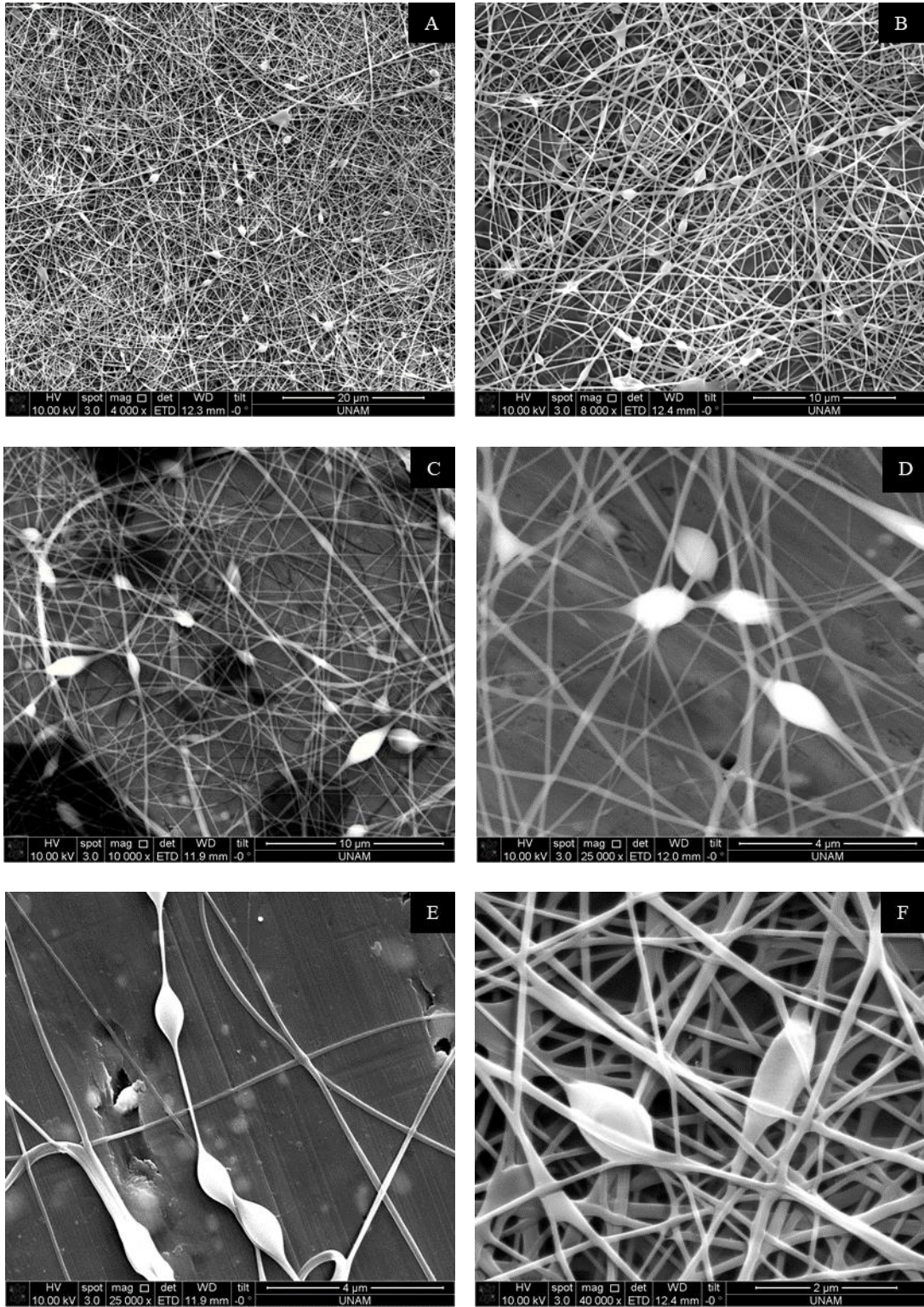
4.3. EcN'nin Hibrit Fiberlere Enkapsülasyonu

Termal karakterizasyonun sonunda EcN'nin enkapsülasyonuna geçilmiştir. Bu amaçla 2X konsantrasyondaki PVA çözeltisi ve 10 mL PBS (1 mM, pH 7.4) içinde süspansiyon edilmiş taze EcN kültürü ile 1:1 (h/h) oranda karıştırılmıştır. Sonuç olarak elektroçizme çözeltisi olarak EcN inoküle edilmiş %10 (a/h) PVA (% 1.0 (a/a) Triton X-100 içeren 1 mM PBS (pH 7.4)) kullanılmıştır.

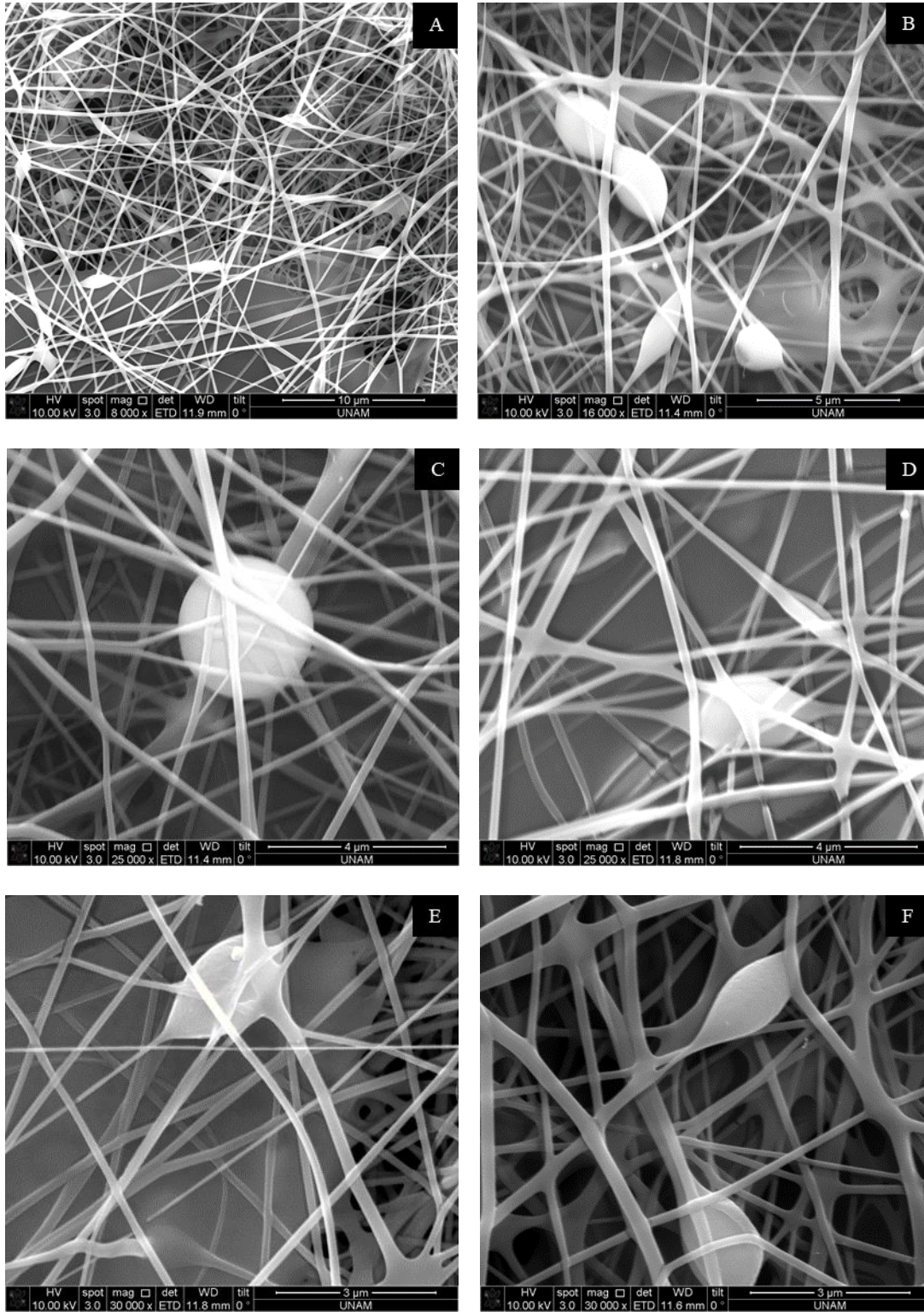
İlk olarak diğer analizlerde kontrol grubu olarak kullanılacak olan PVA/PVA-EcN fiberleri üretilmiştir. Bu amaçla 1 mL/sa hızda EcN inoküle edilmiş PVA çözeltisi beslenen açılı çift nozul elektroçizme prosesi, 25 kV'de, nozullar ile kolektör arası mesafe 8 cm olacak şekilde çalıştırılmış ve alüminyum folyo üzerinde toplanan PVA/PVA-EcN fiberlerinin görüntüsü (Şekil 4.13.) ESEM kullanılarak elde edilmiştir.

PVA/CA-EcN fiberlerinin üretilmesi için daha önceki karakterizasyon analizleri sonucunda seçilen %20 (a/h) CA (asetik asit: etanol (8:2)) kullanılmıştır. Bir nozuldan 0.4 mL/sa akış hızında CA çözeltisinin, diğer nozuldan ise 1 mL/sa akış hızında EcN inoküle edilmiş PVA çözeltisinin elektroçizme sistemine beslemesi yapılmıştır. Açılı çift nozul elektroçizme sistemi daha önceki aşamalarda olduğu gibi nozullar ve kolektör arası mesafe 8 cm olacak şekilde, 25 kV'de yürütülmüştür. Proses sonunda elde edilen hibrit fiberlerin görüntüleri (Şekil 4.14.) ESEM kullanılarak elde edilmiştir.

Elde edilen görüntüler incelendiğinde PVA/PVA ve PVA/CA fiberleri ile başarılı bir şekilde EcN'nin enkapsülasyonunun yapılabildiği görülmüştür. Görüntüler incelendiğinde PVA/CA-EcN fiberlerinde hem PVA hem de CA fiberleri tarafından sarılmış mikroorganizmaların varlığı tespit edilmiştir. Daha sonraki aşamalarda enkapsüle halde EcN içeren hibrit fiberlerin analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.13. PVA/PVA-EcN fiberlerinin farklı büyütme ölçeklerindeki ESEM görüntüleri. A) Büyütme 4000X; B) Büyütme 8000X; C) Büyütme 10000X; D) ve E) Büyütme 25000X; F) Büyütme 40000X



Şekil 4.14. PVA/CA-EcN fiberlerinin farklı büyütmelelerdeki ESEM görüntüleri. A) Büyütme 8000X; B) Büyütme 16000X; C) ve D) Büyütme 25000X; E) ve F) Büyütme 30000X

4.4. Elektroğirmenin EcN Canlılığına Etkisi

EcN'nin hibrit fiberlere enkapsülasyonu amacıyla açılı çift nozul elektroğirme işlemi kullanılmıştır. Elektroğirme prosesinde daha önceki aşamalarda optimum olarak belirlenen sistem parametreleri kullanılmıştır. EcN inoküle edilmiş PVA (elektroğirme çözeltisi) sisteme bir nozuldan 1 mL/sa hızda beslenirken diğer nozuldan 0.4 mL CA beslenmiştir. Elektroğirme sistemi 25 kV'de ve nozullar ile kollektör arası 8 cm olacak şekilde başlatılmıştır. Hem PVA/PVA-EcN hem de PVA/CA-EcN fiberlerinden alınan numunelerden sayım sonucu alınmıştır. Çalışmanın bu aşamasında hem elektroğirme işleminin hem de CA'nın mikroorganizma canlılığı üzerindeki etkisi gözlenmiştir.

Bu analizde, elektroğirme çözeltisindeki ve proses sonucu elde edilen hibrit fiberlerdeki sayım sonuçları (Çizelge 4.6.) dikkate alınmıştır.

Çizelge 4.6. Elektroğirme işleminin EcN'nin canlılığına etkisi

	Canlılık Sonuçları (log, kob/mL)	
	Elektroğirme Çözeltisi	Hibrit Fiber
PVA/PVA-EcN	9.51±0.05	8.75±0.28
PVA/CA-EcN	10.6±0.16	8.71±0.10

Sonuçlar üç paralelin ortalaması \pm SS olarak verilmiştir.

Sayım sonuçları incelendiğinde PVA/PVA-EcN fiberlerinde elektroğirme işlemi sonucu canlılıkta ~ 1 log (kob/mL) biriminde azalma olduğu görülmüştür. Ancak literatürdeki çalışmalarda bu seviyedeki ve üstündeki düşüşler dahi kabul edilebilir görülmüştür [56, 91, 92]. Bu açıdan bakıldığında tercih edilen parametrelerle yapılan elektroğirme işleminin EcN canlılığını ciddi anlamda etkilemediği ve probiyotik enkapsülasyonu amacıyla uygulanabilir olduğu kabul edilmiştir. PVA/CA-EcN fiberlerinde ise bakteri

canlılığında ~2 log (kob/mL) azalma tespit edilmiştir. CA'nın hazırlanmasında kullanılan asetik asidin mikroorganizmalar üzerinde toksik etkili olduğu ve canlılıkta azalmaya neden olduğu bilinmektedir [93]. EcN canlılığındaki düşüşün elektroğirme prosesi sırasındaki asetik asit evaporasyonu nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir. Ancak ~2 log (kob/mL) düşüşün normal kabul edildiği toksik etkeni olmayan çözeltilerle yapılan elektroğirme çalışmalarının [56, 92] bulunması ve canlılıktaki azalmaya rağmen PVA/CA-EcN fiberlerinde ~9 log (kob/mL) düzeyinde canlı mikroorganizmanın bulunması, kurulan açılı çift nozul elektroğirme işlemi ile CA'nın probiyotik enkapsülasyonunda kullanılabilirliğini göstermektedir.

4.5. Enkapsülasyon Verimliliği

Kullanılan çözeltilerin etkinliğinin daha iyi gözlenebilmesi için mikroorganizmaların fiber yüzeyine immobilize değil fiber içine enkapsüle olmaları gerekmektedir. Bu nedenle enkapsülasyon yöntemlerinin tamamında enkapsülasyon verimliliği önemli parametrelerdendir.

Bu çalışmada, fiberlere enkapsüle olmamış bakteri sayısı üretilen fiberlerin PBS ile yıkanmasıyla elde edilen süpernatanttan yapılan ekimler sonucunda belirlenmiştir. Hibrit fiberlerdeki toplam bakteri sayısı ile, fiberlere enkapsüle olmamış bakteri sayısından yararlanılarak (Eşitlik 3.1.) %EV hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7. % Enkapsülasyon verimliliği

Fiberler	% EV
PVA/PVA-EcN	% 91±1 ^a
PVA/CA-EcN	% 96±2 ^b

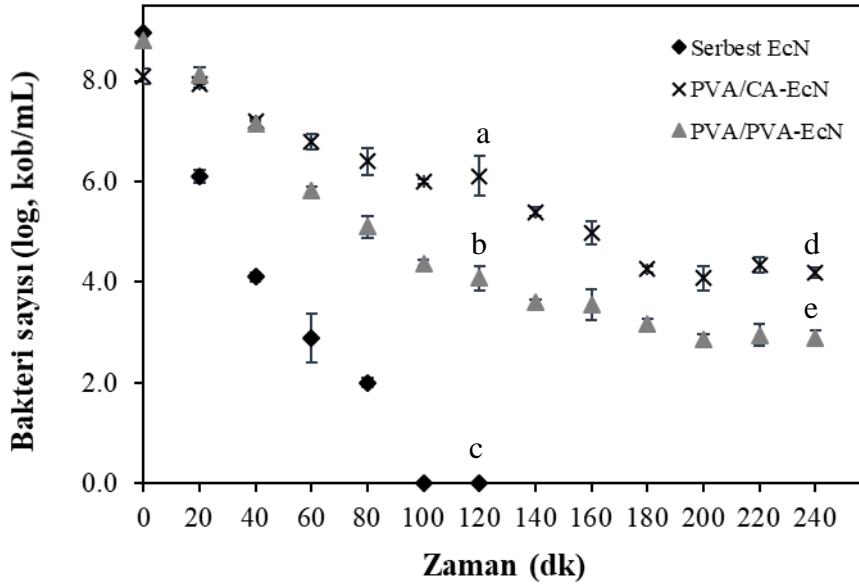
Sonuçlar üç paralelin ortalaması ± SS olarak verilmiştir. ^{a-b} Farklı harfler, farklı hibrit fiberlerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Sonuçlar incelendiğinde hem PVA/PVA-EcN hem de PVA/CA-EcN fiberlerinin yüksek enkapsülasyon verimine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.7.). İki farklı hibrit fiberin enkapsülasyon verimlilikleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. PVA/PVA-EcN'nin daha düşük %EV'ye sahip olmasının nedeni, PVA'nın suda çözünür yapısından dolayı, tamamen PVA'dan oluşan hibrit fiberlerde yıkama sırasında da düşük miktarda da olsa salınımın gerçekleşmiş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca PVA/CA-EcN fiberlerinde oransal olarak daha az PVA bulunması ve CA fiberlerinin PVA'yı bazı bölgelerde kaplaması da PVA/CA-EcN fiberlerinde, daha yüksek %EV sağlamış olabilir.

4.6. Sindirim Sistemi Simülasyonu

Mide ve bağırsak ortamlarının simüle edildiği sindirim simülasyonu analizinde EcN canlılığında enkapsülasyon matrislerinin etkileri araştırılmıştır. Ayrıca enzim ve safra tuzu bulundurmayan simülasyon çözeltilerinin de etkisi gözlenmiştir. Enzim içermeyen bu ortamlarda da EcN canlılığında düşüş olduğu, ancak elde edilen sonuçların (sonuçlar gösterilmemiştir) enzim içeren simülasyon ortamındakilerle karşılaştırılması sonucu, canlılığı asıl etkileyen durumun enzimlerin varlığı olduğu anlaşılmıştır.

SMÇ ve SBC ortamlarında yapılan sindirim simülasyonunda ~ 9 log (kob/mL) başlangıç yüküne sahip olan serbest formdaki EcN, mide simülasyonunun 100. dakikasında canlılığını tamamen kaybetmiştir (Şekil 4.15.). PVA/PVA-EcN fiberlerinde ise 120 dakikalık mide simülasyonu sonucu mikroorganizma canlılığında ~ 5.0 log (kob/mL) azalma yaşanmış ve bağırsak simülasyonu 4.1 log (kob/mL) EcN ile başlamıştır. Bağırsak simülasyonu sonucunda ise canlılıkta ~ 1 log (kob/mL) düşüş yaşanmıştır. Sonuç olarak sindirim simülasyonu sonucu PVA/PVA fiberleri ile yapılan enkapsülasyonda EcN sayısında toplamda ~ 6.0 log (kob/mL) azalma görülmesine karşın, simülasyon sonucunda bağırsaklarda 2.9 log (kob/mL) probiyotik canlılığını sürdürmektedir (Şekil 4.15.). Serbest formdaki EcN'nin sindirim simülasyonu sonucu düşünüldüğünde, açılı çift nozul elektroegirme sistemi ile yapılan probiyotik enkapsülasyonunun sindirim sisteminin olumsuz koşullarına karşı mikroorganizmayı koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.15. Sindirim sistemi simülasyonunda bakteri canlılığının zamana bağlı değişimi. Hata çubukları ortalamaların standart sapmasını temsil etmektedir (n = 2), ^{a-e} farklı harfler, farklı hibrit fiberlerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir (p ≤ 0.05)

PVA/CA-EcN fiberlerinin sindirim sistemi simülasyonu incelendiğinde, CA kullanımıyla birlikte, mide simülasyonu sonucu bu hibrit fiberin EcN'nin canlılığını hem serbest formdaki EcN'den hem de PVA/PVA-EcN fiberlerinden daha iyi koruduğu gözlemlenmiştir. SMCÇ'deki 120 dakika sonunda PVA/CA fiberleri ile enkapsüle edilen probiyotiklerde ~2.0 log (kob/mL) düşüş gözlenmiş ve 6.1 log (kob/mL) düzeyinde EcN canlı kalabilmiştir. CA'nın özellikle düşük pH'lardaki salınım hızının düşük olmasının, PVA/PVA-EcN fiberlerine karşı avantajlı olan bu sonucu sağladığı düşünülmektedir. 240 dakikalık sindirim simülasyonu sonucunda, PVA/PVA-EcN fiberlerinden ~1.5 log (kob/mL) biriminde daha yüksek olmak üzere, 4.2 log (kob/mL) EcN canlılığını sürdürmektedir (Şekil 4.15.).

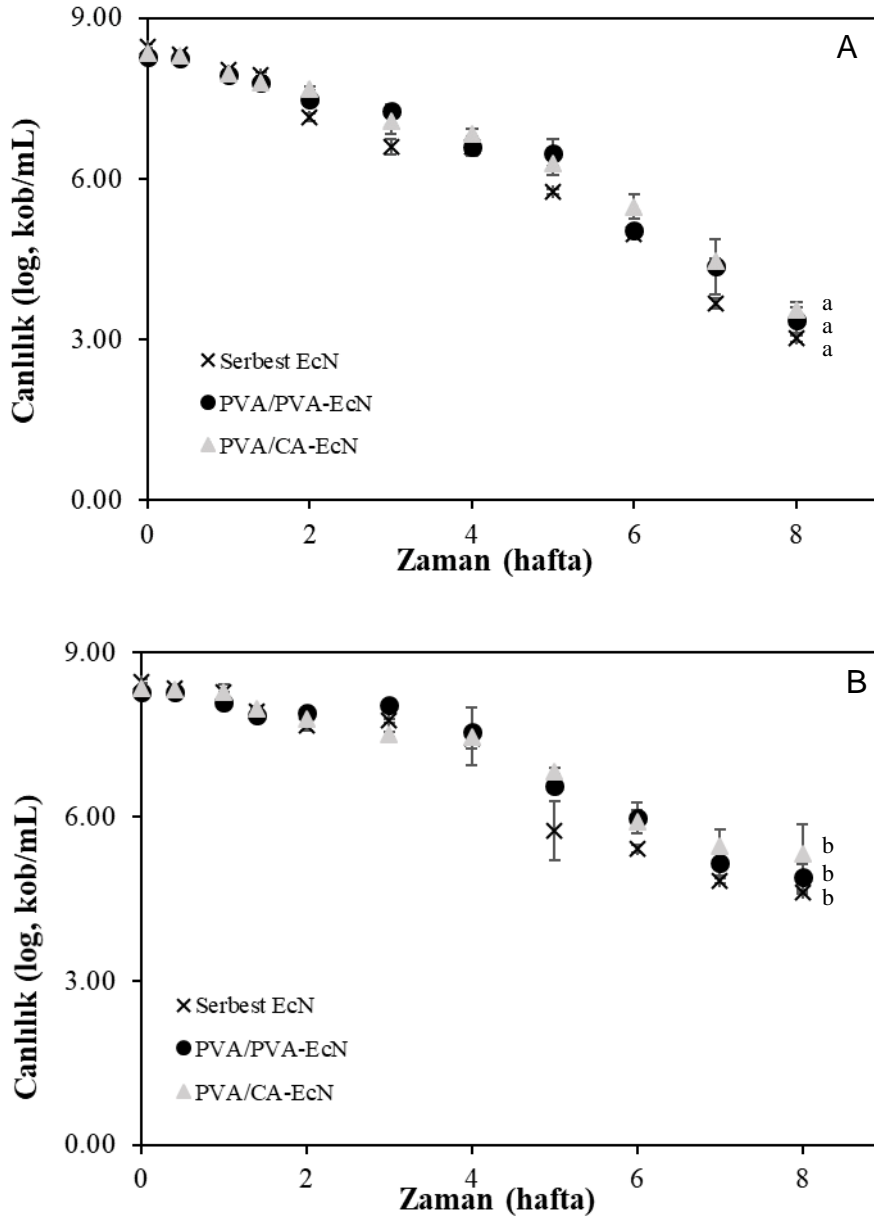
Mide simülasyonunun ve sindirim sistemi simülasyonunun sonunda yapılan istatistik analizleri, serbest EcN, PVA/PVA-EcN ve PVA/CA-EcN fiberlerinden elde edilen dataların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar CA kullanımının sindirim sistemindeki avantajını sergilemektedir. Yapılan çalışmada kullanılan açılı çift nozul elektroğirme işlemi ile CA'nın solventlerinin toksik etkisine maruz kalmadan, probiyotik mikroorganizmalara sindirim sistemi koşullarına karşı direnç kazandırılabilmesi anlaşılmıştır. Sonuç olarak açılı çift nozul elektroğirme sisteminde CA kullanımıyla sindirim sistemi koşullarına dayanıklı enkapsülasyon materyallerinin üretilabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca aynı sistemle, hazırlanmasında toksik olabilecek solventlerin kullanıldığı polimerlerin bu etkilerinin bertaraf edilerek avantajlarından yararlanılabileceği yeni enkapsülasyon materyallerinin de üretilabileceği gösterilmiştir.

4.7. Depolama Koşullarının EcN Canlılığı Üzerine Etkisi

Depolama koşullarının EcN'nin canlılığı üzerine etkisinin anlaşılması için 4°C ve 20°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta 2 ay boyunca kontrol grubu olan serbest EcN ile birlikte hibrit fiberler depolanmıştır. Aynı zamanda hem PBS (10 mM, pH 7.4) tamponu hem de kuru formda depolanan fiberlerin zamana bağlı canlılıklarındaki değişim incelenerek, hibrit fiberlerin depolanması için en iyi yöntem belirlenmiştir.

Tampon içinde 20°C'de depolanan numunelerin hepsinde 2 ay sonunda canlılık devam etmektedir. Serbest EcN'de iki ay sonunda ~3.0 log (kob/mL) olan EcN sayısı, depolama süresince ~5.5 log (kob/mL) azalmıştır. PVA/PVA-EcN ve PVA/CA-EcN fiberlerinin numunelerinden yapılan analizlerde ise benzer canlılık sonuçları elde edilmiştir. Depolama süresi sonunda bu hibrit fiberde de ~3.5 - 4.0 log (kob/mL) aralığında EcN tespit edilmiştir (Şekil 4.16.). Mikroorganizmaların daha stabil olduğu 4°C'de, bütün numunelerde beklendiği gibi 20°C'de yapılan depolamaya göre daha yüksek canlılık sonuçları elde edilmiştir ve sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. 4°C'de tampon içinde iki aylık depolama sonucunda, serbest EcN'de 4.32 log (kob/mL), PVA/PVA-EcN fiberlerinde 4.70 log (kob/mL), PVA/CA-EcN fiberlerinde 5.02 log (kob/mL) EcN canlılığını sürdürmüştür (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Tampon içerisinde depolanan örneklerin zamana bağlı olarak canlılıklarında meydana gelen değişim, A) 20°C; B) 4°C. Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n = 2), farklı harfler, farklı örneklerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$)

Sonuçlar incelendiğinde tampon kullanılarak yapılan depolamada, enkapsüle olmayan ve enkapsüle EcN'nin canlılıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yapılan çalışmanın daha önceki aşamalarında dört saatte hibrit fiberdeki mikroorganizmaların salınımının tamamlandığı görülmüştür. Uzun süreli depolama

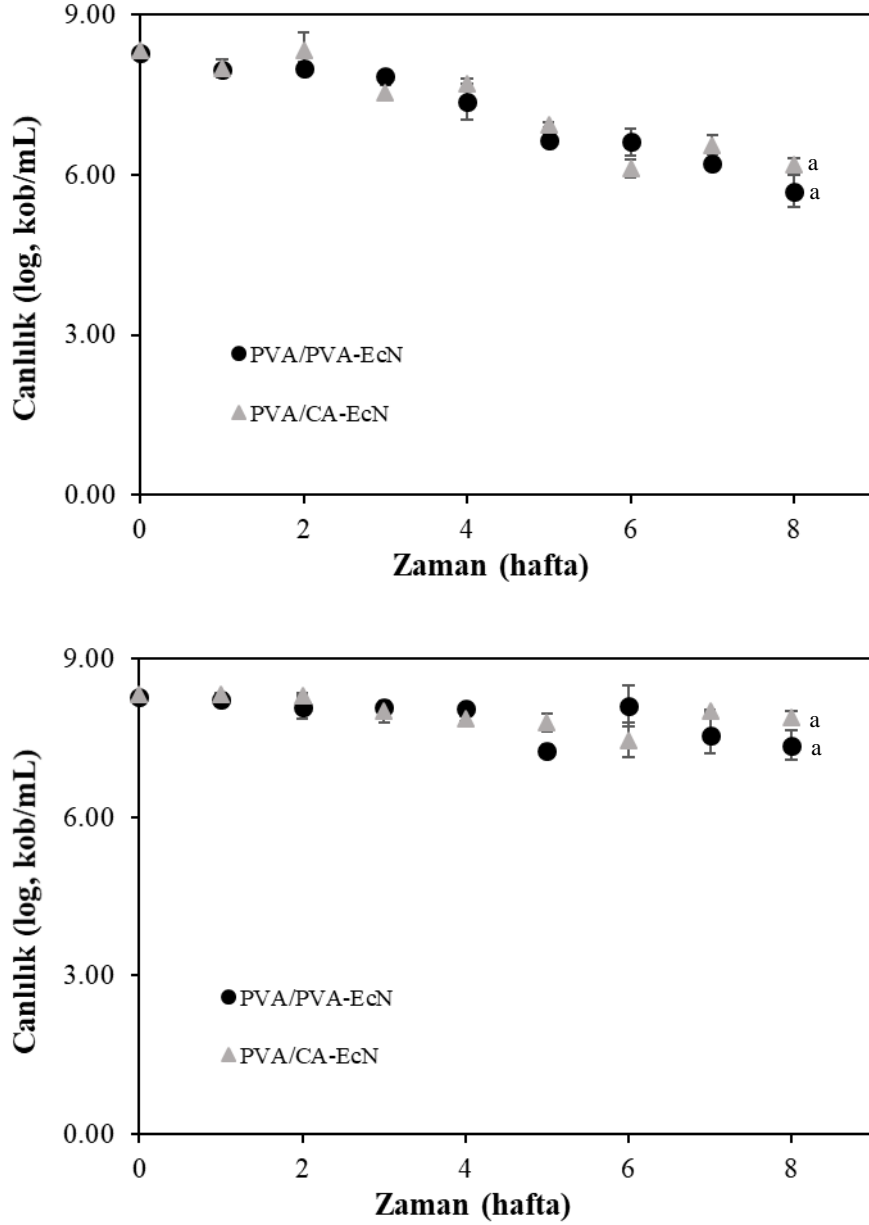
sırasında probiyotik mikroorganizmaların salınımının tamamlanması nedeniyle enkapsüle oldukları hibrit fiberlerin koruyuculuklarını kaybettikleri ve bu nedenle serbest EcN'ye yakın bir canlılık sonucu elde edildiği düşünülmektedir.

Tampon çözelti olmaksızın kuru formda saklanan probiyotik enkapsüle edilmiş fiberlerde, 20°C'de yapılan depolamada PVA/PVA-EcN fiberlerinde canlılıkta ~2.6 log (kob/mL) azalma görülürken, PVA/CA-EcN fiberlerinde probiyotik mikroorganizmanın canlılığında ~2.2 log (kob/mL) azalma olmuştur (Şekil 4.17.). Bu sıcaklıktaki depolama süresi sonucunda probiyotik canlılığı ~6.0 log (kob/mL) biriminde korunmuştur. Sonuçlar düşük sıcaklık değerlerine gerek duyulmadan, üretilen fiberler ile bir aylık bir süre boyunca, canlılıkta önemli bir kayıp yaşanmadan depolama yapılabileceğini göstermektedir. Bu analizde 20°C ve 4°C'deki, 8 hafta sonundaki canlılık sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Kuru formdaki depolamada fiberlerin 4°C'de depolanması sonucu EcN canlılığında önemli bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.17.). Bu sonuç değerlendirildiğinde, -20°C'ye ihtiyaç duyulmaksızın, hibrit fiberler kullanılarak enkapsüle edilen EcN'nin buzdolabı sıcaklığında (4°C) canlılığını kaybetmeden ve ekstra bir işleme veya koruyucuya gerek duymadan, uzun süre depolanabileceği gösterilmiştir. Bu sayede depolama sırasında enerjiden tasarruf sağlanmış olacaktır.

Hem 4°C hem de 20°C'de kuru formda yapılan iki aylık depolama analizleri sonucunda elde edilen canlılık sonuçları incelendiğinde PVA/PVA-EcN ve PVA/CA-EcN fiberlerinin sekiz hafta sonundaki canlılıkları (log, kob/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır (Şekil 4.17.). Üretilen hibrit fiberlerde depolama sırasında CA ekstra bir koruyuculuk sağlamamıştır. Ancak yapılan çalışmada CA kullanımının asıl amacı probiyotik mikroorganizmalarla kullanılmak üzere, sindirim sistemi koşullarına daha dirençli enkapsülasyon materyallerinin geliştirilmesini sağlamaktır. Sindirim simülasyonu sonuçları değerlendirildiğinde bu amaca ulaşıldığı görülmektedir. Ayrıca elektroğirme yönteminde probiyotik enkapsülasyonu amacıyla en çok kullanılan materyallerden biri olan PVA'nın depolama sırasındaki koruyuculuğuna, üretilen PVA/CA fiberleri ile denk bir koruyuculuk sağlanması, geliştirilen bu hibrit fiberlerin de

elektroğırme yönteminde probiyotik enkapsülasyonu amacıyla kullanılabilirliğini göstermiştir.



Şekil 4.17. Kuru formda depolanan örneklerin zamana bağlı olarak canlılıklarında meydana gelen değişim, A) 20°C; B) 4°C. Hata çubukları ortalamanın standart sapmasını temsil etmektedir (n = 2), farklı harfler, farklı hibrit fiberlerden elde edilen değerlerin arasındaki anlamlı farkı göstermektedir ($p \leq 0.05$)

5. YORUM

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı için önemli olduğu uzun yıllardır bilinen bir konudur. Ancak çeşitli faktörlere karşı duyarlılıklarının olması, bu mikroorganizmalardan sağlanan yararı azaltabilmektedir. Bu nedenle enkapsülasyon yöntemleriyle probiyotiklerin stabilitelelerinin korunması yaygın bir yöntemdir. Diğer enkapsülasyon yöntemlerine göre çeşitli avantajları bulunan elektroğirme yöntemi de probiyotiklerin enkapsülasyonunda kullanılan yöntemlerden biridir.

Tez kapsamında, probiyotik mikroorganizma modeli olarak kullanılan EcN'nin açılı elektroğirme yöntemiyle üretilen PVA/CA fiberlerine enkapsülasyonu amaçlanmıştır. Biyosensör yüzeylerinin oluşturulması, filtreleme ve biyoaktif maddenin taşınması gibi amaçlarla PVA/CA fiberlerinin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır [62, 63, 94]. Bu yayınlarda üretilen yeni hibrit fiberin PVA ya da CA fiberlerine göre çeşitli alanlarda avantajlı olduğu vurgulanmaktadır. Ancak bu çalışmalarda PVA/CA fiberleri mikroorganizma enkapsülasyonu amacıyla kullanılmamıştır. Yapılan literatür taramasında PVA/CA fiberlerinin mikroorganizma enkapsülasyonu için kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

PVA'nın elektroğirme yönteminde mikroorganizma enkapsülasyonu için kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Lopez-Rubio ve ark. [31]'nin yaptığı çalışmada PVA *B. Animalis* Bb 12 suşunun enkapsülasyonu yapılmış ve depolama koşullarına karşı mikroorganizma direnci arttırılmıştır. Ancak bu çalışmada sindirim sistemi analizi bulunmamaktadır. PVA ile birlikte tarımsal atıkların kullanıldığı başka elektroğirme çalışmasında da, probiyotik enkapsülasyonunda sindirim simülasyonu yer almamıştır [56]. PVA dışında suda çözünebilen farklı polimerlerin kullanıldığı yayınlarda bulunmaktadır [77, 78]. Bu çalışmalarda probiyotiklerin depolama ve sindirim sistemi koşullarına karşı direnci arttırmıştır. Ancak bu çalışmalardaki polimerler, suda çözünen polimerlerin probiyotik enkapsülasyonundaki kısıtlamalarına sahiptir.

Suda çözünen polimerlerin dışında suda çözünmeyen polimerlerin elektroegirme yönteminde, probiyotik enkapsülasyonu için kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Pluronik F127 dimetakrilat polimerinin kullanıldığı bir elektroegirme çalışmasında suda çözünmeyen polimerlerin de probiyotik enkapsülasyonu amacıyla kullanılabileceği gösterilmiştir [80]. Ancak bu çalışmada sadece 4°C'deki depolamanın etkisi incelenmiş, oda sıcaklığındaki canlılık analiz edilmemiştir. Ayrıca bu çalışmada sindirim sistemi simülasyonu bulunmamaktadır. Başka bir çalışmada EcN, suda çözünmeyen bir polimer olan poli (etilen glikol) – polilaktit polimerine koaksiyel elektroegirme tekniği kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Bu çalışmada mikroorganizmaların salınımı polimer çözeltilisine eklenen NaCl sayesinde, fiber yüzeyinde porların oluşturulmasıyla gerçekleşmiştir. Çalışma sonucunda koaksiyel elektroegirme yöntemi ve seçilen polimerle başarılı şekilde probiyotik enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir [81]. Ancak bu çalışmada sindirim sisteminin ya da depolama koşullarının etkisi incelenmemiştir.

Ayrıca bu tez kapsamında ilk defa CA mikroorganizma enkapsülasyonu amacıyla kullanılmıştır. Yapılan çalışmada CA kullanımının nedeni suda çözünmeyen bu polimerin ortamın pH değerine duyarlı salınım özelliklerine sahip olmasıdır. Bu özelliğinden yararlanılarak sindirim sistemine dirençli enkapsülasyon materyallerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Literatürde CA nanofiberlerinin *L. plantarum* biyofilmi için immobilizasyon membranı olarak kullanıldığı bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmayla planktonik hücreye kıyasla, sindirim sistemi koşullarına daha dirençli yapılar elde edilmiştir [95]. Ancak sindirim sistemi koşullarına karşı sağlanan direnç CA nedeniyle değil biyofilm yapısı sayesinde olmuştur. Bu çalışmada enkapsülasyon olmadığı için CA'nın koruyuculuğundan yararlanılamamıştır. Tez kapsamında yapılan enkapsülasyon çalışmasıyla CA ilk kez probiyotik enkapsülasyonu amacıyla kullanılmıştır.

CA çözeltilisinin hazırlanması sırasında kullanılan ve mikroorganizmalar üzerinde toksik etkileri olabilen solventlerin etkisi açılı çift nozul elektroegirme sistemi ile azaltılmıştır. Bu sistemde CA ve EcN'nin inoküle edildiği polimer (PVA), sisteme ayrı nozullardan basılmış ve elektroegirme prosesi sırasında oluşan fiber jetlerinin çakışması ile hibrit fiberler üretilmiştir. EcN inokülasyonunda PVA kullanımıyla, bu polimerin sulu ortamda

jelleşme özelliği sayesinde literatüre uygun olarak [63] mikroorganizma salınımı geciktirilmiştir.

Çalışma kapsamında ilk olarak kullanılacak polimerlerin optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla farklı solventler ya da konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanıp, farklı akış hızlarında elektroğirme sistemine beslenen çözeltilere ait viskozite ve kondaktivite dataları ile elde edilen görüntüler ve fiberlerin ortalama çapları değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda damla kusuru olmayan ve tek düze fiber üretimine imkan veren %20 (a/h)'lik CA (asetik asit: etanol (8:2, h/h)) ve %10 (a/h)'luk PVA (%1 Triton X-100 (a/a) içeren 1 mM PBS (pH 7.4))'nın kullanılmasına karar verilmiştir.

Açılı çift nozul elektroğirme yöntemiyle EcN enkapsülasyonuna geçilmeden önce PVA/PVA, CA/CA ve PVA/CA fiberleri üretilmiştir. Elde edilen fiber görüntülerinin ESEM ile incelenmesi sonucu hibrit bölgeleri tespit edilmiş ve başarılı hibrit fiberlerin kurulan elektroğirme sistemi ile üretilebileceği gösterilmiştir. Bu fiberlerin ortalama çaplarının hibrit olamayanlara göre daha büyük olduğu görülmüştür. Hibrit bölgelerinden kaynaklı bu fark literatürden elde edilen bilgilere benzerdir [90]. Bu hibritlerle yapılan termal analiz sonucunda üretilen PVA/CA fiberlerinin, yapısındaki PVA ve CA'nın termal karakterine benzer bir sonuç verdiği görülmüştür. Sonuç olarak hibrit fiber üretme prosesinin termal stabiliteyi etkilemediği anlaşılmıştır. Ancak hibrit fiber üretiminin ana amacının termal stabiliteyi arttırmak değil sindirim sistemi koşullarına dayanıklı enkapsülasyon materyali üretmek olması nedeniyle, bu sonuç çalışmayı olumsuz etkilememektedir.

EcN enkapsülasyonu için üretilen PVA/PVA-EcN ve PVA/CA-EcN fiberlerinin ESEM görüntüleri incelendiğinde probiyotik mikroorganizmanın hibrit fiberlerle başarılı bir şekilde enkapsüle edilebildiği görülmüştür.

Bu aşamadan sonra ilk olarak yüksek voltajda çalıştırılan elektroğirme sisteminin mikroorganizma canlılığına etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde her iki hibrit sistemin de elektroğirme işlemi sonrası kabul edilebilir sayıda mikroorganizma içerdiği

görülmüştür. Fakat PVA/CA-EcN fiberlerindeki canlılık diğer hibrit fiber olan PVA/PVA-EcN fiberlerinden daha düşük saptanmıştır. Bunun nedeninin elektroğirme sırasında meydana gelen solvent evaporasyonu olduğu düşünülmektedir. Ancak canlılıktaki bu düşüğe rağmen elektroğirme sonrası $\sim 9 \log$ (kob/mL) mikroorganizmanın canlılığını sürdürüyor olması birçok çalışma için kabul edilebilir bir sonuç olarak görülmüştür [56, 91, 92].

Bir sonraki aşamada diğer bir önemli parametre olan EcN'nin hibrit fiberlerdeki %EV hesaplamıştır. Bu analizde hibrit fiberlerdeki toplam bakteri sayısı ve fiberlerin yıkanması sonucu elde edilen enkapsüle olmamış EcN sayısı karşılaştırılarak sonuç verilmiştir. Analiz edilen iki farklı hibrit fiberde de %90'nın üzerinde, yüksek bir enkapsülasyon verimi elde edilmiştir. PVA/PVA-EcN ve PVA/CA-EcN fiberlerine ait sonuçları incelendiğinde CA kullanılan hibrit fiberdeki %EV'nin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu duruma PVA/CA fiberlerinde oransal olarak daha düşük miktarda suda çözünen polimer bulunması ve hibrit bölgeleri sayesinde CA'nın PVA'yı kaplayarak fiber içine enkapsüle olmamış EcN'nin de salınma izin vermemesinin neden olabileceği düşünülmektedir.

Kurulan elektroğirme sistemi ile üretilen hibrit fiberlerin sindirim sistemindeki koşullara karşı direncinin artırılıp arttırılmadığının anlaşılması için sindirim sistemi simülasyonu yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda hazırlanan simülasyon ortamlarında serbest EcN'nin canlılığını mide simülasyonunun 100. dakikasında tamamen kaybettiği görülmüştür. Enkapsüle edilmiş formdaki EcN ise sindirim sistemi simülasyonu sonunda halen canlılığını sürdürmektedir. Bu durum elektroğirme yöntemi ile üretilen fiberlerin probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda kullanılmasıyla canlıların sindirim sistemi koşullarına direncinin arttırılabileceğini göstermektedir. PVA/PVA ve PVA/CA fiberleri kullanılarak yapılan probiyotik enkapsülasyonlarının simülasyon sonuçları değerlendirilerek CA'nın etkinliği araştırılmıştır. Simülasyon sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde hem mide simülasyonu sonunda hem de daha sonrasında sindirim simülasyonunun tamamlanmasının ardından alınan canlılık sonuçlarına göre PVA/CA-EcN fiberlerinin, PVA/PVA-EcN fiberlerinden üstün olduğu gözlemlenmiştir. Probiyotik enkapsülasyonu amacıyla PVA/CA fiberlerinin kullanılması bu

mikroorganizmaların sindirim sistemi koşullarına karşı olan direncini arttırmıştır. CA'nın genel olarak PVA'ya kıyasla daha yavaş bir salınım hızına sahip olduğu bilinmektedir [63]. Ayrıca CA'nın düşük pH değerlerinde daha yavaş bir salınım hızına sahip olması, enkapsüle edilen materyali mide koşullarına karşı korumaktadır. Hücrelerin salınımının daha yavaş olması sayesinde mikroorganizmaların sindirim sistemi koşullarından, özellikle midedeki koşullardan, daha iyi korunduğu ve canlılıklarının daha az etkilendiği düşünülmektedir. Sonuç olarak çalışma kapsamında geliştirilen PVA/CA fiberleri ile sindirim sistemi koşullarına dirençli, mikroorganizma enkapsülasyonu amacıyla kullanılabilen enkapsülasyon materyali üretilmiştir.

Son olarak hibrit fiberlere enkapsüle edilen probiyotik mikroorganizmanın depolama koşullarındaki canlılığı araştırılmıştır. Bu amaçla tampon içinde ve kuru fiber formunda, 4°C ve 20°C'de iki ay boyunca örnekler depolanmıştır. Tampon içerisinde depolamada beklendiği üzere iki ay sonunda 4°C'deki canlılık sonuçları 20°C'ye göre daha yüksektir. Ancak tampon içerisinde depolanan örneklerde canlılık sonuçları incelendiğinde, serbest EcN ve enkapsüle EcN arasında önemli bir canlılık farkı oluşmadığı gözlemlenmiştir. Uzun depolama süreleri boyunca hibrit fiber içinde enkapsüle halde bulunan mikroorganizmaların tamamen salındığı ve serbest forma geçtiği, bu nedenle enkapsülasyonun ve fiberlerin koruyucu etkisinden yararlanılamadığı düşünülmektedir. Kuru formda yapılan analizlerde ise iki aylık süre boyunca probiyotikler çok daha stabil kalmış ve canlılıklarını korumuştur. Bu formda 20°C'de yapılan depolamada yaklaşık bir ay süresince enkapsüle hücrelerde önemli bir canlılık kaybı yaşanmamıştır. Bu durum da bir aylık depolamalarda buzdolabı sıcaklığına (4°C) dahi gerek duyulmayabileceğini göstermektedir. 4°C'de yapılan depolamada ise beklendiği gibi daha yüksek sıcaklıktaki depolamaya kıyasla, mikroorganizma canlılığının daha uzun süre değişmeden korunduğu gözlemlenmiştir. Bu sıcaklıkta kuru fiber formundaki iki aylık süreç sonunda enkapsüle hücrelerin canlılığında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuç üretilen fiberlerle daha düşük sıcaklıklara gerek duyulmadan probiyotik mikroorganizmaların depolanabileceğini göstermektedir. Ancak PVA/PVA-EcN ve PVA/CA-EcN fiberlerinden elde edilen veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Bu sonuç değerlendirildiğinde CA'nın depolama koşullarına karşı PVA'ya kıyasla ekstra bir avantajının olmadığı anlaşılmıştır. Ancak yapılan çalışmada asıl kullanım amacı sindirim sistemine dirençli enkapsülasyon materyali üretmek olan

PVA/CA fiberlerinin, elektroğirme sisteminde mikroorganizma enkapsülasyonu amacıyla en çok kullanılan polimerlerden olan PVA'ya denk bir sonuç vermesi de önemlidir. Ayrıca sonuç olarak üretilen PVA/CA fiberleri ile EcN'nin depolama koşullarına karşı olan direnci arttırılmıştır.

Tez çalışmasının sonucunda açılı çift nozul elektroğirme sistemi kullanılarak PVA/CA fiberleri üretilmiştir. Kullanılan sistem sayesinde CA'nın toksik etkilere sahip olan solventinin canlılık üzerindeki olumsuz etkileri engellenerek, bu polimerin sahip olduğu avantajlardan yararlanılmıştır. Sonuç olarak yüksek enkapsülasyon verimine sahip ve depolama koşullarına karşı mikroorganizmayı koruyabilen ve en önemlisi sindirim sistemi koşullarına karşı dayanıklı bir probiyotik enkapsülasyon materyali üretilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, probiyotik enkapsüle edilen hibrit fiberlerin fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılabileceğini göstermektedir. Geliştirilen fiberler salınım özelliklerinden dolayı sıvı gıdalarda kullanıma uygun olmasa da, hibrit fiberdeki CA oranına bağlı olarak salınım hızının değiştirilebileceği ve bu türdeki gıdalarda kullanıma uygun hale getirilebileceği düşünülmektedir. Sindirim sistemindeki direncinden dolayı, PVA/CA hibriti ile yapılan enkapsülasyon sonucu düşük pH seviyelerine sahip gıdalarda da mikroorganizma canlılığı uzun süre stabil tutulabilecektir. Tez kapsamında geliştirilen ürün özellikle düşük nem içeriğine sahip hububat ürünleri ve kuru meyveler gibi gıdalarda kullanıma uygundur. Bu sayede raf ömrü boyunca mikroorganizma canlılığı stabil olan ve sindirim sistemi koşullarına dirençli fonksiyonel gıdalar geliştirilebilir. Bağırsağa daha fazla probiyotik mikroorganizma ulaştırılmasıyla biyoyararlanımı daha yüksek ürünler üretilabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- [1] M.R. Gismondo, L. Drago, A. Lombardi, Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12 (1999) 287-292.
- [2] R. Nagpal, H. Yadav, M. Kumar, S. Jain, Y. Yamashiro, F. Marotta, Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: An Introduction. Probiotics and prebiotics in Food, Nutrition and Health, S. Ötleş (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 1-24, Chapter 1, 2013.
- [3] Y.K. Lee, A. Margolles, B. Mayo, P. Ruas-Madiedo, M. Gueimonde, C. De los Reyes-Gavilán, T.A. Chapman, J.J.C. Chin, R. Crittenden, D. Donohue, W. Tien Hung Chang, Probiotic Microorganisms. Handbook of Probiotics and Prebiotics, Y.K. Lee, S. Salminen (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 1-176, Chapter 1, 2009.
- [4] FAO, Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation, FAO Food and Nutrition Paper, 85, Rome, 2006.
- [5] W. Holzapfel, Introduction to Prebiotics and Probiotics. Probiotics in Food Safety and Human Health, I. Goktepe, V.K. Juneja, M. Ahmedna (Eds.), Taylor & Francis, Boca Raton, 1-25, 2005.
- [6] M. Olier, *Escherichia coli* – More than a Pathogen?. Probiotics and Prebiotics Current Research and Future Trends, K. Venema, A. Carmo (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk, 135-152, Chapter 9, 2015.
- [7] U. Sonnenborn, *Escherichia coli* strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties, *FEMS Microbiology Letters*, 363 (2016) 1-6.
- [8] J. Henker, M. Laass, B.M. Blokhin, Y.K. Bolbot, V.G. Maydannik, M. Elze, C. Wolff, J. Schulze, The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers, *European Journal of Pediatrics*, 166 (2007) 311-318.
- [9] M. Schultz, Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease, *Inflammatory Bowel Diseases*, 14 (2008) 1012-1018.
- [10] Y. Chen, L. Zhang, G. Hong, C. Huang, W. Qian, T. Bai, J. Song, Y. Song, X. Hou, Probiotic mixtures with aerobic constituent promoted the recovery of multi-barriers in DSS-induced chronic colitis, *Life Sciences*, 240 (2020) 117089.
- [11] P. Marteau, P. Seksik, R. Jian, Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective, *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1 (2002) 51-57.
- [12] A.S. Naidu, W.R. Bidlack, R.A. Clemens, Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39 (1999) 13-126.
- [13] A. Wold, Immune effects of probiotics, *Näringsforskning*, 45 (2001) 76-85.

- [14] S. Salminen, C. Bouley, M.C. Boutron-Ruault, J.H. Cummings, A. Franck, G.R. Gibson, E. Isolauri, M.C. Moreau, M. Roberfroid, I. Rowland, Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *The British Journal of Nutrition*, 80 Suppl 1 (1998) 147-171.
- [15] J. Rafter, Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective, *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1 (2002) 89-94.
- [16] M. Kumar, V. Verma, R. Nagpal, A. Kumar, P.V. Behare, B. Singh, P.K. Aggarwal, Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B(1)-induced liver carcinogenesis in rats, *The British Journal of Nutrition*, 107 (2012) 1006-1016.
- [17] L.J. Fooks, G.R. Gibson, Probiotics as modulators of the gut flora, *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1 (2002) 39-49.
- [18] M. de Vrese, J. Schrezenmeir, Probiotics and non-intestinal infectious conditions, *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1 (2002) 59-66.
- [19] E. Mangiapane, R. Mazzoli, A. Pessione, B. Svensson, K. Riedel, E. Pessione, Ten years of subproteome investigations in lactic acid bacteria: A key for food starter and probiotic typing, *Journal of Proteomics*, 127 (2015) 332-339.
- [20] M. Kumar, D. Mohania, D. Poddar, P. Behare, R. Nagpal, A. Kumar, P.K. Aggarwal, A probiotic fermented milk prepared by mixed culture reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in rats challenged with pathogens, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 4 (2009) 211-217.
- [21] D. Di Gioia, B. Biavati, *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, Springer International Publishing, 2018.
- [22] R. Nagpal, P.V. Behare, M. Kumar, D. Mohania, M. Yadav, S. Jain, S. Menon, O. Parkash, F. Marotta, E. Minelli, C.J. Henry, H. Yadav, Milk, milk products, and disease free health: an updated overview, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (2012) 321-333.
- [23] R.D. Rolfe, The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health, *The Journal of Nutrition*, 130 (2000) 396s-402s.
- [24] I. Castagliuolo, M.F. Riegler, L. Valenick, J.T. LaMont, C. Pothoulakis, *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa, *Infection and Immunity*, 67 (1999) 302-307.
- [25] L. Cassani, A. Gomez-Zavaglia, J. Simal-Gandara, Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract, *Food Research International*, 129 (2020) 108852.
- [26] Y. Sanz, Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains, *International Dairy Journal*, 17 (2007) 1284-1289.

- [27] M. Saarela, G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, T. Mattila-Sandholm, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, 84 (2000) 197-215.
- [28] A.C. Ouwehand, A review of dose-responses of probiotics in human studies, *Beneficial Microbes*, 8 (2016) 143-151.
- [29] B.C. Johnston, A.L. Supina, S. Vohra, Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials, *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, 175 (2006) 377-383.
- [30] L.V. McFarland, Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease, *The American Journal of Gastroenterology*, 101 (2006) 812-822.
- [31] A. López-Rubio, E. Sanchez, Y. Sanz, J.M. Lagaron, Encapsulation of Living *Bifidobacteria* in Ultrathin PVOH Electrospun Fibers, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 2823-2829.
- [32] R. Gazete, Türk gıda kodeksi gıda maddelerinin genel etiketleme ve beslenme yönünden etiketleme kuralları tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2006/07/20060707-14.htm> (Erişim tarihi: **12 Kasım 2019**).
- [33] P. Muthukumarasamy, P. Allan-Wojtas, R.A. Holley, Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules, *Journal of Food Science*, 71 (2006) M20-M24.
- [34] A. Etchepare, G. Nunes, B. Nicoloso, J. Barin, M. Flores, O. Mello, R. Menezes, Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins, *LWT - Food Science and Technology*, 117 (2020) 108601.
- [35] M.J. Martin, F. Lara-Villoslada, M.A. Ruiz, M.E. Morales, Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27 (2015) 15-25.
- [36] C.C. Coghetto, G.B. Brinques, M.A. Ayub, Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67 (2016) 929-943.
- [37] M.K. Tripathi, S.K. Giri, Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*, 9 (2014) 225-241.
- [38] S. Mandal, A.K. Puniya, K. Singh, Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298, *International Dairy Journal*, 16 (2006) 1190-1195.
- [39] V. Nedovic, A. Kalusevic, V. Manojlovic, S. Levic, B. Bugarski, An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Science*, 1 (2011) 1806-1815.

- [40] K.-N. Chen, M.-J. Chen, C.-W. Lin, Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1), *Journal of Food Engineering*, 76 (2006) 313-320.
- [41] A. Mawad, Y.A. Helmy, A.G. Shalkami, D. Kathayat, G. Rajashekara, *E. coli* Nissle microencapsulation in alginate-chitosan nanoparticles and its effect on *Campylobacter jejuni* in vitro, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (2018) 10675-10690.
- [42] H. Liu, S.W. Cui, M. Chen, Y. li, R. Liang, F. Xu, F. Zhong, Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (2019) 2863-2878.
- [43] R. Rajam, P. Karthik, S. Parthasarathi, G.S. Joseph, C. Anandharamakrishnan, Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, *Journal of Functional Foods*, 4 (2012) 891-898.
- [44] Web of Science,
http://wcs.webofknowledge.com/RA/analyze.do?product=WOS&SID=D1cAFveIBdkkTTi6pgI&field=PY_PublicationYear_PublicationYear_en&yearSort=true (Erişim tarihi: **29 Kasım 2019**).
- [45] G.R. Mitchell, *Electrospinning: Principles, Practice and Possibilities*, Royal Society of Chemistry, **2015**.
- [46] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. Teo, T. Lim, Z. Ma, *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific, **2005**.
- [47] M. Noruzi, Electrospun nanofibres in agriculture and the food industry: a review, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 96 (2016) 4663-4678.
- [48] R. Sridhar, R. Lakshminarayanan, K. Madhaiyan, V. Amutha Barathi, K.H.C. Lim, S. Ramakrishna, Electrospayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals, *Chemical Society Reviews*, 44 (2015) 790-814.
- [49] R. Leidy, Q.-C. Maria Ximena, Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations, *Trends in Food Science & Technology*, 85 (2019) 92-106.
- [50] J. Anu Bhushani, C. Anandharamakrishnan, Electrospinning and electrospaying techniques: Potential food based applications, *Trends in Food Science & Technology*, 38 (2014) 21-33.
- [51] Z. Li, C. Wang, *Effects of Working Parameters on Electrospinning. One-Dimensional nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*, Springer, 15-28, Chapter 2, **2013**.

- [52] B. Ghorani, N. Tucker, Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology, *Food Hydrocolloids*, 51 (2015) 227-240.
- [53] J.J. Xue, T. Wu, Y.Q. Dai, Y.N. Xia, Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications, *Chemical Reviews*, 119 (2019) 5298-5415.
- [54] Z. Akbar, T. Zahoor, N. Huma, A. Jamil, H. Ayesha, J.M. Kumar Irudayaraj, Electrospun probiotics: an alternative for encapsulation, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 32 (2018) 1551-1556.
- [55] A. Koski, K. Yim, S. Shivkumar, Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning, *Materials Letters*, 58 (2004) 493-497.
- [56] W.Y. Fung, K.H. Yuen, M.T. Liong, Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: fabrication and characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 8140-8147.
- [57] O.F. Sarioglu, N.O.S. Keskin, A. Celebioglu, T. Tekinay, T. Uyar, Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152 (2017) 245-251.
- [58] M. Nieuwland, P. Geerdink, P. Brier, P. van den Eijnden, J.T.M.M. Henket, M.L.P. Langelaan, N. Stroeks, H.C. van Deventer, A.H. Martin, Food-grade electrospinning of proteins, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20 (2013) 269-275.
- [59] J.D. Schiffman, C.L. Schauer, A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications, *Polymer Reviews*, 48 (2008) 317-352.
- [60] M. Fathi, Á. Martín, D.J. McClements, Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems, *Trends in Food Science & Technology*, 39 (2014) 18-39.
- [61] M.W. Frey, Electrospinning Cellulose and Cellulose Derivatives, *Polymer Reviews*, 48 (2008) 378-391.
- [62] Z. Khatri, K. Wei, B.-S. Kim, I.-S. Kim, Effect of deacetylation on wicking behavior of co-electrospun cellulose acetate/poly(vinyl alcohol) nanofibers blend, *Carbohydrate Polymers*, 87 (2012) 2183-2188.
- [63] H. Souriyani-Reyhani pour, R. Khajavi, M.E. Yazdanshenas, P. Zahedi, M. Mirjalili, Cellulose acetate/poly(vinyl alcohol) hybrid fibrous mat containing tetracycline hydrochloride and phenytoin sodium: Morphology, drug release, antibacterial, and cell culture studies, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33 (2018) 597-611.
- [64] W. Yang, A.M.M. Sousa, X. Fan, T. Jin, X. Li, P.M. Tomasula, L. Liu, Electrospun ultra-fine cellulose acetate fibrous mats containing tannic acid-Fe³⁺ complexes, *Carbohydrate Polymers*, 157 (2017) 1173-1179.
- [65] O. Suwantong, P. Opanasopit, U. Ruktanonchai, P. Supaphol, Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance, *Polymer*, 48 (2007) 7546-7557.

- [66] E.M. Canga, F.C. Dudak, Characterization of cellulose acetate/gum Arabic fibers loaded with extract of *Viburnum opulus* L. fruit, *LWT - Food Science and Technology*, 110 (2019) 247-254.
- [67] A.W. Jatoi, H. Ogasawara, I.S. Kim, Q.Q. Ni, Dopa-based facile procedure to synthesize AgNP/cellulose nanofiber composite for antibacterial applications, *Applied Nanoscience*, 9 (2019) 1661-1670.
- [68] T. Kiatyongchai, S. Wongsasulak, T. Yoovidhya, Coaxial electrospinning and release characteristics of cellulose acetate–gelatin blend encapsulating a model drug, *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 40167 (2014).
- [69] M.M. Castillo-Ortega, A. Nájera-Luna, D.E. Rodríguez-Félix, J.C. Encinas, F. Rodríguez-Félix, J. Romero, P.J. Herrera-Franco, Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes, *Materials Science and Engineering: C*, 31 (2011) 1772-1778.
- [70] S. H.N, S. Sarasija, B.G. Desai, Design and evaluation of controlled onset extended release multiparticulate systems for chronotherapeutic delivery of ketoprofen, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68 (2006) 76-82.
- [71] S. Sukigara, M. Gandhi, J. Ayutsede, M. Micklus, F. Ko, Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties, *Polymer*, 44 (2003) 5721-5727.
- [72] Q. Yang, Z. Li, Y. Hong, Y. Zhao, S. Qiu, C. Wang, Y. Wei, Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 42 (2004) 3721-3726.
- [73] B. Niu, P. Shao, Y. Luo, P. Sun, Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application, *Food Hydrocolloids*, 99 (2020) 105376.
- [74] D. Rodoplu, M. Mutlu, Effects of electrospinning setup and process parameters on nanofiber morphology intended for the modification of quartz crystal microbalance surfaces, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7 (2012) 118-123.
- [75] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B.S. Hsiao, B. Chu, Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer*, 43 (2002) 4403-4412.
- [76] X. Yuan, Y. Zhang, C. Dong, J. Sheng, Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning, *Polymer International*, 53 (2004) 1704-1710.
- [77] C.C. Coghetto, G.B. Brinques, N.M. Siqueira, J. Pletsch, R.M.D. Soares, M.A.Z. Ayub, Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids, *Journal of Functional Foods*, 24 (2016) 316-326.

- [78] L.G. Gomez-Mascaraque, R.C. Morfin, R. Pérez-Masiá, G. Sanchez, A. Lopez-Rubio, 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 (2016) 438-446.
- [79] J. Han, C. Liang, Y. Cui, L. Xiong, G. Xiaocui, X. Yuan, D. Yang, Encapsulating Microorganisms inside Electrospun Microfibers as a Living Material Enables Room-Temperature Storage of Microorganisms, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10 (2018) 38799-38806.
- [80] Y. Liu, M.H. Rafailovich, R. Malal, D. Cohn, D. Chidambaram, Engineering of bio-hybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009) 14201.
- [81] S. Xie, S. Tai, H. Song, X. Luo, H. Zhang, X. Li, Genetically engineering of *Escherichia coli* and immobilization on electrospun fibers for drug delivery purposes, *Journal of Materials Chemistry B*, 4 (2016) 6820-6829.
- [82] N. Liao, M.K. Joshi, A.P. Tiwari, C.H. Park, C.S. Kim, Fabrication, characterization and biomedical application of two-nozzle electrospun polycaprolactone/zein-calcium lactate composite nonwoven mat, *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 60 (2016) 312-323.
- [83] C.H. Park, C.-H. Kim, H.R. Pant, L.D. Tijing, M.H. Yu, Y. Kim, C.S. Kim, An angled robotic dual-nozzle electrospinning set-up for preparing PU/PA6 composite fibers, *Textile Research Journal*, 83 (2012) 311-320.
- [84] M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D.J. McClements, O. Menard, I. Recio, C.N. Santos, R.P. Singh, G.E. Vegarud, M.S. Wickham, W. Weitschies, A. Brodkorb, A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus, *Food & function*, 5 (2014) 1113-1124.
- [85] N.T. Annan, A.D. Borza, L.T. Hansen, Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions, *Food Research International*, 41 (2008) 184-193.
- [86] L. Yao, T.W. Haas, A. Guiseppi-Elie, G.L. Bowlin, D.G. Simpson, G.E. Wnek, Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly(vinyl alcohol) fibers, *Chemistry of Materials*, 15 (2003) 1860-1864.
- [87] L.D. Tijing, W. Choi, Z. Jiang, A. Amarjargal, C.-H. Park, H.R. Pant, I.-T. Im, C.S. Kim, Two-nozzle electrospinning of (MWNT/PU)/PU nanofibrous composite mat with improved mechanical and thermal properties, *Current Applied Physics*, 13 (2013) 1247-1255.
- [88] S. Um-i-Zahra, X.X. Shen, H. Li, L. Zhu, Study of sustained release drug-loaded nanofibers of cellulose acetate and ethyl cellulose polymer blends prepared by

electrospinning and their in-vitro drug release profiles, *Journal of Polymer Research*, 21 (2014) 602.

[89] B. Oktay, N. Kayaman-Apohan, S. Erdem-Kuruca, Iop, Fabrication of nanofiber mats from electrospinning of functionalized polymers. 2nd International Conference on Structural Nano Composites, Iop Publishing Ltd, Bristol, 2014.

[90] A. Hashash, Polyvinyl alcohol-cellulose acetate composite reverses osmosis membranes: I. synthesis and characterization, *Journal of Waste Water Treatment & Analysis*, 03 (2012) 601-661.

[91] N.O. San Keskin, A. Celebioglu, O.F. Sarioglu, T. Uyar, T. Tekinay, Encapsulation of living bacteria in electrospun cyclodextrin ultrathin fibers for bioremediation of heavy metals and reactive dye from wastewater, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 161 (2018) 169-176.

[92] K. Škrlec, Š. Zupančič, S. Prpar Mihevc, P. Kocbek, J. Kristl, A. Berlec, Development of electrospun nanofibers that enable high loading and long-term viability of probiotics, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 136 (2019) 108-119.

[93] L. Gómez-Mascaraque, J. Ambrosio-Martín, R. Perez-Masia, A. López-Rubio, Impact of Acetic Acid on the Survival of *L. plantarum* upon Microencapsulation by Coaxial Electrospinning, *Journal of Healthcare Engineering*, 2017 (2017) 1-6.

[94] B. Ding, E. Kimura, T. Sato, S. Fujita, S. Shiratori, Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning, *Polymer*, 45 (2004) 1895-1902.

[95] M.-X. Hu, J.-N. Li, Q. Guo, Y.-Q. Zhu, H.-M. Niu, Probiotics Biofilm-Integrated Electrospun Nanofiber Membranes: A New Starter Culture for Fermented Milk Production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (2019) 3198-3208.