

ÖZET

İÇECEKLERİN MİNERAL TAKVİYESİ

Mevcut buluş, içeceklerin metal takviyesine yöneliktir. Daha öncelikli olarak, negatif yüklü bir şelatlaştırıcı ajan, düşük molekül ağırlıklı, doğal gıdada kullanılabilir polimerik kation ve su içeren bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel yöneliktir. Ayrıca, söz konusu metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin üretilmesi prosesi ve içeceklere yüksek biyoyararlanıma sahip bir metal takviyesi yapmak amacıyla söz konusu metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin kullanımına yöneliktir. Ayrıca, söz konusu metal içeren kompleks koaservat çekirdek miseli ihtiva eden bir içecek ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel olup, özelliği aşağıdaki unsurları içermesidir
 5 ağırlıkça %80 ila 99 negatif yüklü şelatlaştırıcı ajan,
 ağırlıkça %0,2 ila 10 düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyon,
 Ağırlıkça %0,5 ila 10 metal katyon ve su, burada ağırlıkça %, kompleks koaservat çekirdek miselin toplam ağırlığına bağlı olarak kuru ağırlık yüzdesi anlamına gelir ve burada dinamik ışık saçılımı ile ölçülen ortalama parçacık boyutu 10 ila 150 nm arasındadır ve burada metal, Fe^{2+} formunda demirdir.
 10
2. İstem 1'e göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel olup, özelliği negatif yüklü şelatlaştırıcı ajanın, sodyum heksametafosfat olmasıdır.
 15
3. İstemler 1 ila 2'nin herhangi birine göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel olup, özelliği düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyonun, 5 ila 100 arasında polimerizasyon derecesine sahip kitosan olmasıdır.
 20
4. İstemler 1 ila 2'nin herhangi birine göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel olup, özelliği düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyonun, 10 ila 20 arasında polimerizasyon derecesine sahip kitosan olmasıdır.
 25
5. İstemler 1 ila 4'ün herhangi birine göre metal içeren kompleks koaservat misel olup, özelliği ayrıca suda çözünen gıda tatlandırıcı ajan ve/veya vitamini veya miselin kabuğunda yağda çözünebilen bir tatlandırıcı ajan ve/veya vitamini içermesidir.
 30
6. İstem 1'e göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel olup, özelliği ağırlıkça %85 ila 99 sodyum heksametafosfat,
 10 ila 20 polimerizasyon derecesine sahip, ağırlıkça %0,4 ila 8 kitosan,
 ağırlıkça %0,6 ila 6 Fe^{2+} ,

- ağırlıkça % 0 ila 10 suda veya yağda çözünebilen tatlandırıcı ajan ve/veya vitamin,
ve su içermesidir, burada sodyum heametafosfat, 5 ila 350 mg / ml aralığındaki bir yoğunluktadır, burada ağırlıkça %, kompleks koaservat çekirdek miselin toplam ağırlığına bağlı olarak kuru ağırlık yüzdesi anlamına gelir ve burada dinamik ışık saçılımı ile ölçülen ortalama parçacık boyutu 10 ila 150 nm arasındadır.
- 5
7. İstemler 1 ila 6'nın herhangi birine göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel olup, özelliği ortalama parçacık boyutunun, 50 ila 100 nm arasında olmasıdır.
- 10
8. İstemler 1 ila 7'nin herhangi birine göre bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin üretim prosesi olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:
- 15
- i) negatif yüklü bir şelatlaştırıcı ajanın A) bir aköz solüsyonunun hazırlanması,
ii) bir metal tuzunun B) bir aköz solüsyonunun hazırlanması,
iii) ortaya çıkan şelatlaştırılmış metal solüsyonunu C) üretmek amacıyla, eşmolar yoğunlukta 100 parça A)'nın 20 parça B) ile karıştırılması ve ortaya çıkan karışımın oda sıcaklığında inkübe edilmesi,
- 20
- iv) 4 ila 6 arasında pH'ye sahip bir sitrik asit tampon solüsyonunda düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyonun aköz bir solüsyonunun hazırlanması, D),
v) şelatlaştırılmış metal solüsyonunun D) karıştırılarak 880 parça solüsyona C) damla damla eklenmesi.
- 25
9. İstem 8'e göre proses olup, özelliği solüsyon A)'nın, 1 ila 500 mM arasındaki bir yoğunlukta olması, solüsyon B)'nin 1 ila 500 mM arasındaki bir yoğunlukta olması, adım iii) inkübasyonunun, 5 dakika ila 5 gün boyunca gerçekleştirilmesi ve solüsyon D)'nin, 0,1 ila 1 mg/ml arasındaki bir yoğunlukta olmasıdır.
- 30
10. İstem 8 veya 9'a göre proses olup, özelliği negatif yüklü şelatlaştırıcı ajanın, sodyum heksametafosfat olması, metal tuzunun FeSO_4 olması ve düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyonun, 10 ila 20 arasında polimerizasyon derecesine sahip kitosan olmasıdır.
- 35

11. İstem 10'a göre proses olup, özelliği i) ve ii) adımlarının sodyum heksametafosfat ve FeSO₄ solüsyonlarının her birinin, 100 mM yoğunluğunda olması ve iv) adımındaki kitosanın, 0,6 mg/ml yoğunluğunda olmasıdır.
- 5 12. İstemler 1 ila 7'nin herhangi birine göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin kullanımı olup, özelliği 1 ila 60 mg metal/litre içeren bir içeceğe takviye yapılmasına yönelik olmasıdır.
- 10 13. İstem 12'ye göre kullanım olup, özelliği içeceğin, öz suyu, gazsız alkolsüz içecekler, süt ve meyve suyundan seçilmesidir.
14. Bir içecek olup, özelliği istemler 1 ila 7'nin herhangi birine göre bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek miseli içermesidir.

TARİFNAME

İÇECEKLERİN MİNERAL TAKVİYESİ

Mevcut buluş, içeceklerin metal takviyesi sahası ile ilgilidir. Daha özellikle, negatif yüklü bir şelatlaştırıcı ajan, düşük molekül ağırlıklı, doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyon ve su içeren kompleks koaservat çekirdek misel ihtiva eden bir metale yöneliktir. Ayrıca, söz konusu metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin üretilmesi prosesi ve içeceklere yüksek biyoyararlanıma sahip bir metal takviyesi yapmak amacıyla söz konusu metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin kullanımına yöneliktir. Ayrıca, söz konusu metal içeren kompleks koaservat çekirdek miseli ihtiva eden bir içecek ile ilgilidir.

Metal eksiklikleri arasında, demir eksikliği anemisi, dünyada 3 milyardan fazla insanı etkileyen, beslenme ile ilgili ciddi bir sağlık sorunudur. Demir eksikliği aneminin doğrudan nedenlerinden biriyken, aynı zamanda bu, enerji eksikliği, büyüme ve gelişme geriliği gibi diğer çeşitli fizyolojik bozuklukların bir nedenidir. Yiyecek takviye programları, genellikle demir (Fe) eksikliğini yenmek için en maliyetsiz ve sürdürülebilir yaklaşım olarak düşünülmektedir. Ancak bir demir takviye programının başarısı, büyük oranda yiyecek matrisinin ve Fe bileşiğinin dikkatli bir şekilde seçilmesine bağlıdır.

Yiyeceklerle ve içeceklere mineral takviyelerinin eklenmesi ile ilgili iyi bilinen sorunlar mevcuttur. Örneğin bu tür çoğu takviyenin, çözünmeme eğilimi gösterir ve dolayısıyla içeceklerde fazla kullanışlı değildir veya kötü bir tat (metalik tat) veya ağızda istenmeyen his eğilimi gösterir. Bununla birlikte demir takviyeleri, yiyeceklerin rengini değiştirme veya organoleptik açıdan uygun olmama eğilimi gösterir. Ayrıca, özellikle demir bileşiklerinin solüsyon içindeki çözünmeyen demir hidroksit polimerleri oluşturma eğiliminde olması ve diğer mineraller ve diğer materyaller ile etkileşime girmesine bağlı olarak demir takviyesi içeren içeceklerin formüle edilmesi zordur. Bu etkileşim, içeceklerin organoleptik ve estetik özelliklerini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda demir takviyelerinin besinsel biyoyararlanımını istenmeyen şekilde etkiler.

WO 2011/159665, suda çözünmeyen kitosan-stearik asit kompleksi ile kapsüllenen, kapsüllü besleyici tuz parçacıklarını açıklar. Ancak bu kapsülleme, bir yağ fazını gerektiren mikroemülsiyona bağlıdır ve bir içekte uzun vadeli saklamada stabil değildir.

WO 2009/029407, kapsüllü suda çözünmeyen aroma vericilerin alınması ve kontrollü salınımını açıklar. Elektrostatik etkileşime bağlı olan bir kompleks oluşturmak üzere polisakkarit ve peynir altı suyu proteini içeren kompleks koaservata dayanır. Ancak

5 parçacık boyutlarının hepsi 500 nm'nin üzerindedir, bu durum, solüsyonda kullanıldığında bulanıklık ile sonuçlanır.

WO 2010/116379, %99,5 ila 99,88 çay, %0,1 ila 0,3 demir tuzu ve %0,02 ila 0,2 nişasta bazı içeren kuru formda, demir takviyeli çayı açıklar. Bu takviyeli çay, demir

10 solüsyonunun kurutulmuş çay üzerine spreyleneceği yoluyla üretilir. Ancak bu teknoloji, demir tuzunun çökmesi nedeniyle, demir takviyeli sıvı içeceklerin üretilmesine izin vermez.

US 2006/240151, geliştirilmiş renge sahip demir takviyeli, süt bazlı, tatlandırılmış

15 içecekleri açıklar, burada içecekler (A) yağ; (B) ağırlıkça yaklaşık yüzde 10 ila yüzde 100 toplam proteini temsil eden süt proteini; (C) (i) içeceğin ağırlığınca yaklaşık yüzde 0,1 ila yaklaşık yüzde 10 süzkroz, trehaloz veya bunların kombinasyonu, (ii) besin sıvısının ağırlığınca yaklaşık yüzde 0,1 ila yaklaşık yüzde 20 maltodekstrin, maltodekstrin yaklaşık 1 ila yaklaşık 10 DE değerine sahiptir ve (iii) (i) ile (ii)'nin

20 kombinasyonlarından en az birini ağırlıkça yaklaşık yüzde 75 ila yaklaşık yüzde 100 içeren karbonhidrat; (D) demir içeren bir materyali ve (E) bir aroma vericiyi içerir.

US 2009/124572, bir besin takviyesini ve özellikle, bir ferrik pirofosfat şelat içeren bir demir zenginleştirmesini ihtiva eden bir oral besin takviyesini açıklar. Besin takviyesi,

25 ayrıca vitaminler, demir dışı mineraller ve diğer içerik maddelerini içerebilir.

WO 2008/028264, aktif maddelerin kontrollü salımına yönelik manyetik nanoparçacıklara sahip mikro kapsüllerin bir üretim prosesi, aynı zamanda bu proses ile ilgili ürünler ve salınımlı bir manyetik alanın uygulanması yoluyla aktif maddelerin

30 kontrollü salımına yönelik yöntemleri açıklar.

Mevcut başvurunun buluşçuları, burada şaşırtıcı bir biçimde içeceklerin metal zenginleştirmesi için kullanışlı olan yeni bir bileşim bulmuştur. Bu bileşim uygun maliyetlidir, homopolimer karışımı kullanır, küresel bazda tamamı gıdaya uygun olarak

35 kabul edilen ürünlerden hazırlanır, zaman içinde ve içeceklerle karıştırıldığında

stabildir, pastörizasyon sırasında bozunmaz, polifenoller ile reakte olmaz, kusursuz metal biyoyararlanımı sağlar, takviye edilen içeceğin rengini değiştirmez ve metalik tat bırakmaz. Bununla birlikte aköz çözünebilir bileşenlere dayanan bu bileşim, kendi kendine parçacıklar halinde birleşir. Buna ek olarak gıdada kullanılabilen bu kompleks

5 koaservat parçacıkları, solüsyonu stabil ve saydam tutarken, aköz solüsyon içinde çok yüksek yoğunluktaki metalin (örneğin demir) kullanılmasına olanak sağlar.

Bu nedenle mevcut buluş, ağırlıkça %80 ila 99 negatif yüklü şelatlaştırıcı ajan, ağırlıkça %0,2 ila 10 düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyon, ağırlıkça

10 %0,5 ila 10 metal katyon ve su içeren kompleks koaservat çekirdek misel ihtiva eden bir metali sağlar, burada ağırlıkça %, kompleks koaservat çekirdek miselin toplam ağırlığına bağlı olarak kuru ağırlık yüzdesi anlamına gelir ve burada dinamik ışık saçılımı yoluyla ölçülen ortalama parçacık boyutu, 10 ila 150 nm arasındadır, burada metal, Fe^{2+} formundaki demirdir.

15 Aksi belirtilmedikçe mevcut başvurudaki bütün yüzdeler, kompleks koaservat çekirdek miselin toplam ağırlığına bağlı kuru ağırlık yüzdesi olarak ifade edilir.

Bir kompleks koaservat, çevresel bir sıvıdan hidrofobik kuvvetler yoluyla bir arada

20 tutulan muhtelif organik moleküllerin küçük küresel bir damlacığıdır. Koaservasyon, iki zıt yüklü polielektrolitler bir aköz solüsyonda karıştırıldığında meydana gelen bir spontan faz ayırma prosesidir. Mikromoleküllerin iki türü arasındaki elektrostatik etkileşim, üst fazdan (düşük polimer fazı) bir koaservatın (yüksek polimer fazı) ayrılması ile sonuçlanır. Bu olay, nanoküreleri oluşturmak ve çeşitli bileşiklerini

25 kapsüllemek için kullanılabilir. Kapsülleme prosesi, bütün olarak aköz solüsyonda ve enerji sağlanmaksızın düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir.

Tanımlamak üzere nanoküreler veya ultra ince parçacıklar, 1 ila 150 nanometre arasındaki boyuttadır. Nanokürelerin avantajı, parçacık yüzeyinin solvent ile

30 etkileşiminin, yoğunluk farklarının üstesinden gelecek kadar kuvvetli olması nedeniyle berrak süspansiyonların mümkün olmasıdır, bu ise aksi halde, bir sıvıda batan veya bunun üzerinde yüzen bir materyal ile sonuçlanır.

Bir misel, bir sıvı kolloid içinde dağılan sürfaktan moleküllerinin bir topağıdır. Aköz

35 solüsyondaki tipik bir misel, misel merkezindeki hidrofobik tek bir arka bölgesi ayrılarak,

çevresel solvent ile temas halindeki hidrofil “baş” bölgeleri ile bir topak oluşturur. Kompleks koaservat çekirdek miseller, ham materyaller (polimerik katyon ve şelatlaştırıcı ajan) belirli bir şekilde ve belirli bir oranda karıştırıldığında kendi kendine birleşme özelliğine sahiptir.

5

Şelatlaşma, bir polidentat (çoklu bağlanmış) ligant ile tek bir merkez atomu arasında iki veya daha fazla ayrı kordinat bağının oluşması veya varlığıdır. Genellikle bu ligantlar, organik bileşiklerdir ve şelatlaştırıcılar, şelatörler, şelatlaştırıcı ajanlar veya ayırma ajanları olarak adlandırılır. Mevcut buluşa yönelik olarak, yaygın organik bileşiklerden seçilen herhangi bir negatif yüklü ajan kullanılabilir. Daha fazla tercih edildiği üzere şelatlaştırıcı ajan, halka benzeri (halka şekline sahip) bir yapıya sahiptir ve daha fazla tercih edildiği üzere sodyum heksametafosfattır.

10

Sodyum heksametafosfat (SHMP), $(\text{NaPO}_3)_6$ bileşiminin bir heksameridir. Piyasadaki sodyum heksametafosfat, tipik olarak polimerik metafosfatların bir karışımıdır, heksamer bunlardan biridir ve genellikle bu isimle ifade edilen bileşiktir. Daha doğru olarak sodyum polimetafosfat olarak terimlendirilir. Monosodyum ortofosfatın eritilmesi, ardından hızlı soğutma yoluyla hazırlanır.

15

Düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilen polimerik katyon, Amerika Gıda ve İlaç Kurumu tarafından yiyecek ve içecek ürünlerinde kullanımı güvenli olduğu kabul edilen herhangi bir polimerik materyal olarak tanımlanır. Mevcut buluş için uygun doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyon, bunlarla sınırlı olmaksızın, peynir altı suyu proteinleri dahil olmak üzere süt proteinleri ve kazeinler, jelatin, yumurta albümini, sebze proteinleri, mikrobiyal proteinler, baklagil proteinleri ve kitosanı içerir. Mevcut buluşa göre tercih edilen düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyon, 5 ile 100 arasında polimerizasyon derecesine sahip, daha fazla tercih edildiği üzere 10 ile 50 arasında polimerizasyon derecesine sahip, daha fazla tercih edildiği üzere 10 ile 20 arasında polimerizasyon derecesine sahip kitosandır. Kitosan, rastgele dağıtılmış β -(1-4)-bağlı D-glukozamin (deasetillenmiş birim) ve N-asetil-D-glukozaminden (asetillenmiş birim) oluşan doğrusal bir polisakkarittir. Kitosan, kabukluların dış kabuğundaki yapısal eleman olan kitinin deasetilasyonu yoluyla ticari olarak üretilir.

25

30

35

Bu tür kompleks koaservat çekirdek miselde kapsüllenen metal, polimerik koronanın

korunması sayesinde stabilize edilir ve antioksidan verimliliği, şelatlaştırıcı ajan varlığı sayesinde artırılır.

SHMP'nin kitosan ile kısmen etkileşime girmesi nedeniyle, metal şelatlaştırma verimliliği azalır. SHMP ve kitosanın etkileşimi, pH ve sıcaklık gibi çevresel koşullar ve bu iki molekülün yoğunluğu ile belirlenir. Bu, SHMP ve demirin etkileşimi veya şelatlaşma potansiyelinin SHMP ve kitosanın etkileşimi etkilenecek, teknikte uzman kişi tarafından ayarlanabildiği anlamına gelir. Sonuç olarak demirin biyoyararlanımı kontrol edilebilir. Ayrıca bu kendi kendine birleşen misel parçacıkları oyuk nesnelerdir ve bunlar, örneğin aroma verici moleküller, vitaminler gibi diğer yiyecek içerik maddelerini kapsülleyebilir.

Diğer bir düzenlemede mevcut buluş, yukarıda açıklandığı şekilde buluşa göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek miseli ile ilgilidir ve ayrıca aköz fazda suda çözünen gıda tatlandırıcı ajan ve/veya vitamini veya miselin kabuğunda yağda çözünebilir bir tatlandırıcı ajan ve/veya vitamini içerir. Tercihen bu, kompleks koaservat çekirdek miselinin toplam ağırlığına bağlı olarak ağırlıkça %0 ile 10 su veya yağda çözünebilir tatlandırıcı ajan ve/veya vitamini içerir.

Yaygın dilde "tatlandırıcı" veya "aroma verici" terimleri, bir arada kimyasal olarak tat ve koku hislerini ifade eder, aynı terimler, koku duyusu ile gıdanın ve gıda ürününün tadını değiştiren yenilebilir kimyasallar ve ekstraktları ifade etmek üzere, koku ve tatlandırıcı endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Doğal aroma ekstraktlarının yüksek maliyeti veya bulunamaması nedeniyle, çoğu ticari aroma verici, *doğala özdeştir*, bu ise bunların doğal aroma vericilerin kimyasal eşdeğerleri olduğu, ancak kaynak materyallerden özütlenmek yerine kimyasal olarak sentezlendiği anlamına gelir. Herhangi bir yaygın gıdada kullanılabilir tatlandırıcı ajan, mevcut buluşa göre bileşimde kullanılabilir. Tercih edilen tatlandırıcılar, badem, amaretto, anisette, brendi, kapuçino, nane, tarçın, tarçın badem, nane likörü, Grand Mariner, nane çubuğu, fıstık, mürver, elma, papatya, tarçın baharatı, krema, nane likörü, vanilya, French vanilla, Irish creme, Kahlua, nane, naneşekeri, limon, macadamia cevizi, portakal, portakal kabuğu, şeftali, çilek, üzüm, ahududu, vişne, kahve, çikolata, kakao, moka ve benzerleri ve bunların herhangi bir karışımı; ayrıca asetaldehit diasetil, izoamilasetat, benzaldehid, sinamik aldehit, etil propiyonat, metil antranilat, limonen, etil-2,4-dekadienoat, alilheksanoat, etil maltol,

etilvanilin, metilsalisilat veya bunların karışımları gibi tatlandırıcılar/aroma artırıcılar, bitkiler, baharatlar, ayrıca bunların karışımlarından seçilir.

- 5 Mevcut buluşa göre suda çözünebilir vitaminler, B1 vitamini (tiyamin), B2 vitamini (riboflavin), B6 vitamini (piridoksin), niasin (nikotinik asit), B12 vitamini, folik asit, pantotenik asit, biyotin ve C vitamininden seçilir.

Mevcut buluşa göre yağda çözünen vitaminler, A, D, E ve K vitaminlerinden seçilir.

- 10 Tercih edilen bir düzenlemede mevcut buluş, aşağıdakileri içeren bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel ile ilgilidir:
ağırlıkça %85 ila 99 sodyum heksametafosfat,
10 ile 20 polimerizasyon derecesine sahip, ağırlıkça %0,4 ila 8 kitosan,
ağırlıkça %0,6 ila 6 Fe^{2+} ,
- 15 ağırlıkça % 0 ila 10 suda veya yağda çözünebilir tatlandırıcı ajan ve/veya vitamin, ve su, burada ağırlıkça %, kompleks koaservat çekirdek miselin toplam ağırlığına bağlı olarak kuru ağırlık yüzdesi anlamına gelir ve burada dinamik ışık saçılımı ile ölçülen ortalama parçacık boyutu 10 ile 150 nm arasındadır.
- 20 Daha fazla tercih edilen bir düzenlemede mevcut buluş, aşağıdakileri içeren bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel ile ilgilidir:
ağırlıkça %85 ila 99 sodyum heksametafosfat,
10 ile 20 polimerizasyon derecesine sahip, ağırlıkça %0,4 ila 8 kitosan,
ağırlıkça %0,6 ila 6 Fe^{2+} ,
- 25 ağırlıkça % 0 ila 10 suda veya yağda çözünebilir tatlandırıcı ajan ve/veya vitamin, ve su, burada sodyum heametafosfat, 5 ile 350 mg / ml aralığındaki bir yoğunluktur, burada ağırlıkça %, kompleks koaservat çekirdek miselin toplam ağırlığına bağlı olarak kuru ağırlık yüzdesi anlamına gelir ve burada dinamik ışık saçılımı ile ölçülen ortalama parçacık boyutu 10 ile 150 nm arasındadır.

30

Mevcut buluşa göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek misel, 10 ile 150 nm arasında ortalama parçacık boyutuna, daha fazla tercih edildiği üzere 50 ile 100 nm arasında ortalama parçacık boyutuna sahiptir. Parçacık boyutu, doğal yiyeceğin molekül ağırlığı ile ayarlanabilir. örneğin: 10 ile 150 nm arasındaki parçacık boyutu,

15'ten az polimerizasyon derecesine sahip kitosan kullanılarak elde edilebilir. Parçacık boyutu, bir ALV ışık saçılımı aparatı üzerinde dinamik ışık saçılımı yoluyla ölçülür.

Diğer bir düzenlemede mevcut buluş, aşağıdaki adımlardan oluşan yukarıda açıklandığı gibi bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin üretim yöntemini sağlar:

- i) negatif yüklü bir şelatlaştırıcı ajanın A) bir aköz solüsyonunun hazırlanması,
- ii) bir metal tuzunun B) bir aköz solüsyonunun hazırlanması,
- iii) ortaya çıkan şelatlaştırılmış metal solüsyonunu üretmek amacıyla, eşmolar yoğunlukta 100 parça A)'nın 20 parça B) ile karıştırılması ve ortaya çıkan karışımın oda sıcaklığında inkübe edilmesi,
- iv) 4 ile 6 arasında pH'ye sahip bir sitrik asit tampon solüsyonunda düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyonun aköz bir solüsyonunun hazırlanması, D),
- v) şelatlaştırılmış metal solüsyonunun D) karıştırılarak 880 parça solüsyona damla damla eklenmesi.

Tercihen mevcut buluş, aşağıdaki adımlardan oluşan yukarıda açıklandığı gibi bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin üretim yöntemini sağlar:

- i) 1 ila 500 mM'de negatif yüklü bir şelatlaştırıcı ajanın A) bir aköz solüsyonunun hazırlanması,
- ii) 1 ila 500 mM'de bir metal tuzunun B) bir aköz solüsyonunun hazırlanması,
- iii) ortaya çıkan şelatlaştırılmış metal solüsyonunu üretmek amacıyla, eşmolar yoğunlukta 100 parça A)'nın 20 parça B) ile karıştırılması ve ortaya çıkan karışımın oda sıcaklığında 5 dakika ila 5 gün arasında inkübe edilmesi,
- iv) 4 ile 6 arasında pH'ye sahip bir sitrik asit tampon solüsyonunda 0,1 ila 1 mg/ml yoğunluğunda düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyonun aköz bir solüsyonunun hazırlanması, D),
- v) şelatlaştırılmış metal solüsyonunun D) karıştırılarak 880 parça solüsyona damla damla eklenmesi.

Daha fazla tercih edildiği üzere iii) adımının inkübasyon süresi, en az 20 dakikadır, tercihen en az 50 dakikadır, daha fazla tercih edildiği üzere en az 90 dakikadır ve 5 günden fazla değildir, tercihen 24 saatten fazla değildir, daha fazla tercih edildiği üzere 8 saatten fazla değildir ve daha fazla tercih edildiği üzere 5 saatten fazla değildir.

Daha fazla tercih edildiği üzere mevcut buluşa göre proseste negatif yüklü şelatlaştırıcı ajan, sodyum heksametafosfattır, metal tuzu FeSO_4 'tür ve düşük molekül ağırlıklı doğal gıdada kullanılabilir polimerik katyon, 10 ile 20 arasında polimerizasyon derecesine sahip kitosandır. Daha fazla tercih edildiği üzere i) ve ii) adımlarının sodyum heksametafosfat ve FeSO_4 solüsyonlarının her biri, 50 ile 150 mM arasındaki yoğunluktadır ve iv) adımındaki kitosan, 0,4 ila 0,8 mg/ml arasındaki bir yoğunluktadır. Daha fazla tercih edildiği üzere sodyum heksametafosfat ve FeSO_4 solüsyonlarının her biri, 100 mM yoğunluğundadır ve kitosan, 0,6 mg/ml yoğunluğundadır.

Mevcut buluşun v) adımı, D) solüsyonunun damlatılarak C) solüsyonuna eklenmesi kritiktir. Bu diğer türlü gerçekleştirildiğinde yüzey yükü ve stabilizasyon mekanizması, tamamen farklı olacaktır ve mevcut buluşta olduğu gibi iyi çözünen ve stabil nanoparçacıklar yerine mikrometre boyutlu çökeltiler ile sonuçlanacaktır.

Diğer bir düzenlemede mevcut buluş, 1 ila 60 mg metal/litre ile bir içeceğe takviye yapılması için, mevcut buluşa göre metal içeren kompleks koaservat çekirdek miselin kullanımını sağlar. Mevcut buluşta içecek, insan tüketimi için spesifik olarak hazırlanan bir sıvıdır. Mevcut buluşun amacına göre, içecek, içmeye hazır içecekler, içecek konsantreleri, şuruplar, uzun raf ömrüne sahip içecekler, soğutulmuş içecekler, dondurulmuş içecekler ve benzerleridir ve aynı zamanda su ve aromalı suyu da içerir. Tercih edilen bir düzenlemede içecekler, öz suyu, gazsız alkolsüz içecekler, süt ve meyve suyundan seçilir. İçecek ürünleri, ultra yüksek sıcaklık uygulaması (UHT) ve/veya yüksek sıcaklık-düşük süre uygulaması (HTST) kullanılarak pastörize edilebilir.

Mevcut buluş, ayrıca mevcut buluşun herhangi birine göre bir metal içeren kompleks koaservat çekirdek miseli ihtiva eden bir içeceğe yöneliktir.

Şekillerin kısa açıklaması:

Şekil 1: Bir zaman fonksiyonu olarak parçacık stabilitesinin DLS ölçümü (a) üçgeni, kümülant uyuma göre ölçülen ortalama parçacık yarıçapına aittir ve kare, ortalama saçılmış ışık şiddetine aittir. (b) contin analizine göre bir inkübasyon süresi (1, 10 ve 24) fonksiyonu olarak parçacık boyutu dağılımı.

Şekil 2: Bir sıcaklık fonksiyonu olarak parçacık stabilitesinin DLS ölçümü (a) üçgeni, kümülan uyuma göre ölçülen ortalama parçacık yarıçapına aittir ve kare, (b) contin analizine göre inkübasyon sıcaklığı (5, 25 ve 50 Selsiyus derece) fonksiyonu olarak, ortalama saçılmış ışık şiddeti parçacık boyutu dağılımına aittir.

5 **Şekil 3:** pH fonksiyonu olarak parçacık stabilitesinin titrasyon ölçümü (a) halkası, kümülan uyuma göre ölçülen ortalama parçacık yarıçapına aittir ve kare, pH fonksiyonu olarak ortalama saçılmış ışık şiddetine (b) ζ - aittir.

Şekil 4: pH fonksiyonu olarak parçacık stabilitesinin titrasyon ölçümü (a) halkası, kümülan uyuma göre ölçülen ortalama parçacık yarıçapına aittir ve kare, pH
10 fonksiyonu olarak ortalama saçılmış ışık şiddetine (b) ζ - aittir.

Şekil 5: Polifenol ve demir içeren karışımların UV spektrumları.

Şekil 6: Parçacığın SLS Zimm grafiği

Buluş ayrıca aşağıdaki örnekler aracılığıyla açıklanır.

15

Örnekler

Örnek 1: Demir içeren kompleks koaservat çekirdek miselin hazırlanışı

20 **Numune Hazırlanışı:**

Demir (II) sülfat ve düşük molekül ağırlıklı kitosan (polimerizasyon derecesi, $n < 15$), Sigma-Aldrich'ten alınmıştır. Sodyum heksametafosfat (SHMP), J.T. Baker'dan alınmıştır. Üç adet stok solüsyonu, aşağıdaki yoğunluklarda aköz solüsyon içinde
25 hazırlanmıştır: pH<3 ile (A)100 mM SHMP, (B) 100 mM FeSO_4 ve (C) 20 mg/ml kitosan. pH 5'te 0,5 M asetik asit tamponu tekrar seyreltilmiştir ve numuneyi hazırlamak üzere tampon solüsyonu olarak kullanılmıştır. Başlangıçta 100 μl A, 20 μl B'ye eklenmiştir ve A ile B arasındaki reaksiyon süresi, demir ve şelatlaştırma ajanı SHMP'nin bağlama verimliliği ile ilişkilidir. Bu reaksiyon süresi, dakikalar ile günler
30 arasında değişebilir. Mevcut örneklerde, inkübasyon süresi 1 saat olmuştur. Reaksiyon süresi uzadıkça, demir, SHMP'ye daha güçlü bağlanacaktır. Bu sırada 25 μl C, 755 μl miliQ su ile 100 μl asetik asit tamponu varlığında seyreltilmiştir. Her iki karışım hazır olduğunda, demir ve SHMP solüsyonu, seyreltilmiş kitosan solüsyonuna, karıştırılarak damla damla eklenmiştir. Son karışımın ağırlık yüzdesi aşağıdadır: 6mg/ml SHMP, 0,4
35 mg/ml Fe^{2+} , 0,5 mg/ml kitosan. Bu ağırlık yüzdeleri aşağıdaki değerlere artırılabilir:

kendi kendine birleşen stabil parçacıklar oluşturmak amacıyla, 325mg/ml SHMP, 2.6mg/mlFe²⁺ ve 1,3 mg/ml kitosan.

Kompleks koaservat çekirdek miselin karakterizasyonu:

5

Dinamik ışık saçılımı (DLS), bir ALV ışık saçılımı aparatı (ALV, Langen, Almanya) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bütün deneyler, 90° saçılım açısında gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık, bir Haake C35 termostat kullanılarak kontrol edilmiştir. Hidrodinamik yarıçap, bir CONTIN çok üslü uyum veya kümülant uyumlara göre hesaplanmıştır. Bağlı yoğunluk, tolüen ve numunelerin yoğunluk oranına göre elde edilmiştir. Statik ışık saçılım (SLS) ölçümü, aynı ALV aparatı üzerinde gerçekleştirilmiştir ve detektör açısı, 24°'den 140°'ye değişir. Titrasyon ölçümü ve ζ -potansiyel ölçümleri, Zetasizer (Malvern, İngiltere) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Titrasyon numunelerine yönelik saçılan ışık şiddeti de Zetasizer üzerinde yapılan ölçümlerden alınmıştır.

10

15

Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ölçümleri, 100 kV'de çalışan bir JEOL 1200 EX elektron mikroskobu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Görüntüler, 1k CCD kamera ile kaydedilmiştir. Numune, ölçüm öncesinde gece boyu bakır ızgara üzerinde kurutulmuştur.

20

UV spektrum ölçümü, referans olarak 0.05 M asetik asit ile UV-2450 (Shimadzu) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan polifenol olan tannik asidin yoğunluğu, 0.15 mg/ml'dir.

Nispeten düşük yoğunlukta hazırlanan numuneler (6 mg/ml SHMP, 0,4 mg/ml Fe²⁺, 0,5 mg/ml kitosan), on kez seyreltilmiştir ve 24 saat boyunca 20°C'de DLS ile ölçülmüştür.

25

Hem Şekil 1a'da gösterildiği gibi ortalama parçacık boyutu yaklaşık 70 nm olan saçılmış ışık şiddeti hem de Şekil 1b'de gösterilen parçacık boyutu dağılımı, gösterilen ölçüm süresinde büyük oranda değişmez. Bu durum, parçacıkların 20°C sabit sıcaklıkta çok stabil kaldığını gösterir.

30

Parçacık stabilitesinin sıcaklığa hassas olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, farklı sıcaklıklarda DLS ölçümü gerçekleştirilmiştir. Stabilité çalışmaları için kullanılan aynı numuneler hazırlanmıştır ve 5°C ila 50°C arasında DLS ile her 5°C'de ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 2'de gösterilmektedir. Ortalama parçacık boyutu, saçılmış ışık şiddeti, Şekil 2a ve parçacık boyutu dağılımı Şekil 2b, sıcaklığın artışı üzerine hafifçe

azalmıştır. 5°C ila 50°C arasındaki fark daha küçüktür. Bu durum, parçacık boyutu ve şeklinin 5 ila 50°C sıcaklık aralığında nispeten sabit kaldığını gösterir.

Bu parçacıklar, zaman içerisinde stabildir ve 5°C ila 50°C arasındaki sıcaklıkta makul ölçüde sabittir. Bu parçacıkların pH hassaslığının daha iyi anlaşılması ve bunların bileşimi hakkında derin bir bilgiye sahip olmak amacıyla, Zeta ayırıcı ile pH titrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu sırada bir pH fonksiyonu olarak ζ -potansiyeli değişimi izlenmiştir. Nispeten düşük yoğunlukta hazırlanan numuneler (6 mg/ml SHMP, 0,4 mg/ml Fe^{2+} , 0,5 mg/ml kitosan), on kez seyreltilmiştir ve 0.1M NaOH ile titre edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3'da gösterilir. Saçılan ışık şiddetinin yanı sıra parçacık boyutu, pH'nin artması üzerine artar, Şekil 3a. Ancak parçacığın ζ -potansiyeli, 3-8 pH aralığında, -40 mV, kabaca sabit kalmıştır.

Parçacıkların negatif ζ -potansiyeli, SHMP'nin parçacığın dışında stabilize edici fonksiyonel grup olduğunu ve SHMP gruplarının, (kısmen) parçacığın yüzeyi üzerine yerleştirildiğini gösterir. Bu gözlemi doğrulamak ve SHMP ve kitosanın, demir ilavesi olmaksızın stabil parçacıklar halinde bir araya gelip gelemediğini tanımlamak amacıyla, aşağıdaki numune hazırlanmıştır ve ardından titrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 6 mg/ml SHMP ve 0,5 mg/ml kitosan içeren numuneler hazırlanmıştır, sonunda ise 0,4 mg/ml yoğunluğuna ulaşmak amacıyla Fe^{2+} damlatılarak eklenmiştir. Bu numune on kez seyreltilmiştir ve seyreltilen örnekleyici üzerindeki titrasyon ölçümü, zeta-ayırıcı ile gerçekleştirilmiştir. Önceki titrasyon ölçümü ile kıyaslandığında, her iki parçacık boyutu, saçılan ışık şiddetinin yanı sıra büyük ölçüde artar: pH 5'te D_h , 63 nm'den 90 nm'ye artar, bu sırada saçılan ışık şiddeti de 700 kHz'den 2000 kHz'ye artarak neredeyse üç katına çıkar (Şekil 3a ve Şekil 4a'nın karşılaştırılması). Bu değişim, kendi kendine bir araya gelen parçacıkların morfolojisini ve/veya bileşimini etkileyerek karışıma demir eklenmesi derecesini gösterir. Bununla birlikte numunenin ζ -potansiyeli, Şekil 4b'de gösterildiği üzere -40 mV'ye titrasyonun başlangıcında -20 mV'den kademeli olarak azalır. ζ -potansiyelinin başlangıç dalgalanması, numunenin titrasyon ölçümü yapılması öncesinde bir saatten fazla dengede tutulması durumunda engellenebilir, ardından ölçülen ζ -potansiyeli -40 mV'de kabaca sabit kalacaktır. Bu durum, demir eklenmesinin ardından dengeye ulaşmak amacıyla kompleksin yeniden düzenlenmesine olanak sağlanmasının gerekli olması ile açıklanabilir.

Bu sonuçlar, SHMP ve kitosan karışımına demir eklenmesinin ardından, SHMP ve

kitosanın ikinci katmanının en yüksek ihtimalle parçacığa bağlı olacağını gösterir. Bu durum, demir eklenmesi üzerine artan saçılmış ışığın yanı sıra parçacık boyutunun artmasını açıklar. Demirin, kitosan kompleksi ve SHMP'nin ekstra katmanı ile parçacığın "çekirdeğine" bağlanmak üzere bir katyonik köprü olarak kullanıldığı görülmektedir.

Parçacıkların stabilitesi ve pH hassasiyetinin yanı sıra, bu şekilde kapsüllenen demir, çok daha az renk değiştirme sorunu gösterecektir ve demirin ve SHMP şelatlaştırıcı ajanın bağlama gücü, kinetik olarak kontrol edilebilir. Pratikte bu durum, kitosan eklenmesi öncesinde demir ile SHMP'nin inkübasyon süresinin artırılmasının, bağlama verimliliğini güçlendireceği anlamına gelir.

Renk değişimi, genellikle polifenol ile demirin reaksiyonu ile ilgilidir. Yaygın olarak demirin, polifenol ile bir kompleks oluşturduğu ve kompleksin çoğu yiyecek uygulamasında koyu mavi problemler olarak görüldüğü varsayılır (Perron et al. 2010, Dalton Trans 39, 9982). Demir, SHMP'ye güçlü bir şekilde bağlandığında, polifenol ile bir kompleks oluşması olasılığı düşüktür. Bu nedenle renk değişimi, ciddi ölçüde engellenir. Demir polifenol kompleksinin oluşumu derinlemesine incelemek ve referans numuneler ile UV absorpsiyon spektrumunu kıyaslamak üzere UV spektrofotometrisi kullanılır, sonuçlar Şekil 5'te gösterilir. Demir ve polifenol tannik asit, hızlı bir şekilde kompleks oluşturur ve demir polifenol kompleksinin karakteristik UV absorpsiyon pikinin yaklaşık 550 nm olduğu görülür. Maksimum UV absorpsiyonunun sabit durumunun, mevcut deneysel koşullar altında numunenin hazırlanmasından 10 saatten fazla süre sonra ulaşılabilirdi bilinmelidir. Kinetik etkinin, açıkça demir polifenol kompleksinin oluşumu ile ilgili olduğu fark edilmiştir. Demir ve tannik asit karışımının aksine, öncelikle demir SHMP'ye bağlandığında ve ardından tannik asit ile kombine edildiğinde, oluşturulan herhangi bir demir polifenol kompleksi mevcut değildir, bu ise 550 nm'de saptanan UV absorpsiyonu olmaması ile gösterilir (Şekil 5). Tannik asit ile 0,6 mg/ml SHMP, 0.04 mg/ml Fe^{2+} ve 0.05 mg/ml kitosan içeren numune karışımı, yalnızca demir, SHMP ve tannik asitten oluşan referans numune ile karşılaştırıldığında bir miktar daha fazla UV absorpsiyonu sağlar. Bu fark, demirin bağlama gücünü açıklar ve SHMP, kitosan varlığından etkilenir. Bağlama gücü, burada SHMP ve demir karışımına kitosan eklenmesi momentleri ile kontrol edilebilen, demirin biyoyararlanımı ile ilgilidir. Bu açıdan, parçacıkların pH ve sıcaklık hassasiyeti gösterilmiştir. Ayrıca dikkatli bir şekilde numune hazırlama prosedürünün tasarlanması ile demir biyoyararlanımının

manipüle edilmesi potansiyeli gösterilmiştir. ζ -potansiyeli ölçümlerine göre, SHMP'nin parçacık yüzeyinde mevcut olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu parçacıkların iç morfolojisi hakkında herhangi bir resim mevcut değildir. Bu parçacıkları karakterize etmek üzere, 0,6 mg/ml SHMP, 0.04 mg/ml Fe^{2+} ve 0.05 mg/ml kitosan içeren bir numune üzerinde

5 SLS çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çeşitli saçılım açıları ve parçacık yoğunluklarına yönelik ölçülen saçılmış şiddeti sonuçları, Şekil 6'da gösterilir. Ortaya çıkan jirasyon yarıçapı ve hidrodinamik yarıçapı belirlenmiştir ve bunların oranı 0,97'dir, bu durum kabarcıklı bir yapının oluşturulduğunu gösterir. Ayrıca parçacığın ortalama molekül

10 120 kitosan molekülünden oluşan her bir parçacığı açıklar.

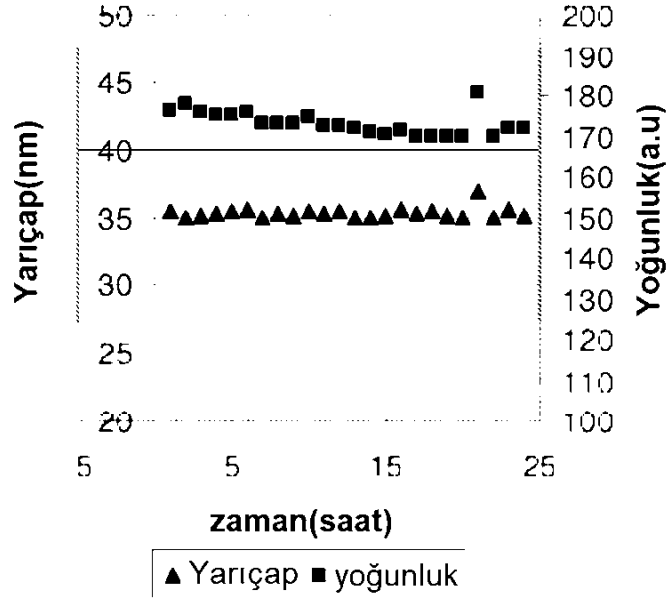
TEM çalışmaları, ayrıca bu parçacıkların morfolojisi üzerinde doğrudan bir görüşe sahip olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Parçacıkların oyuk bir çekirdek ile birlikte küresel olduğu görülmektedir (Resimler gösterilmemiştir). Bu durum, bu parçaların

15 kabarcıklı yapılar olmasına dair SLS çalışmalarının göstergesi ile aynı doğrultudadır. TEM numuneler, bakır ızgara üzerinde kurutulmuştur ve demir iyonları yoğunlaştırılmıştır ve kurutma sırasında parçacıklar çevresine bağlanmıştır, ancak parçacık içindeki demir yoğunluğu, kurumanın ardından değişmez (bunlar kabarcık çift katmanı ile korunur). Sonuç olarak, bu parçacıkların "çekirdeğinin", çevreye

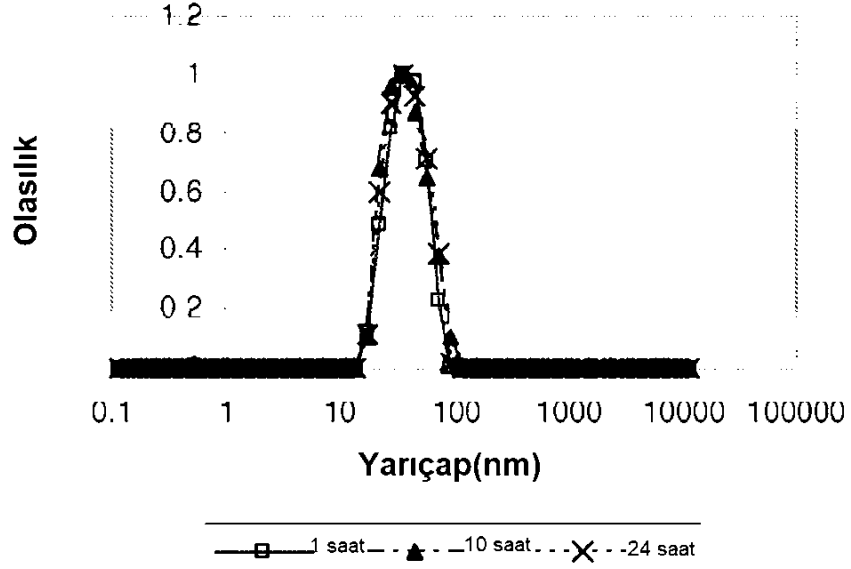
20 nazaran daha düşük yoğunluğa sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 1:

(a)

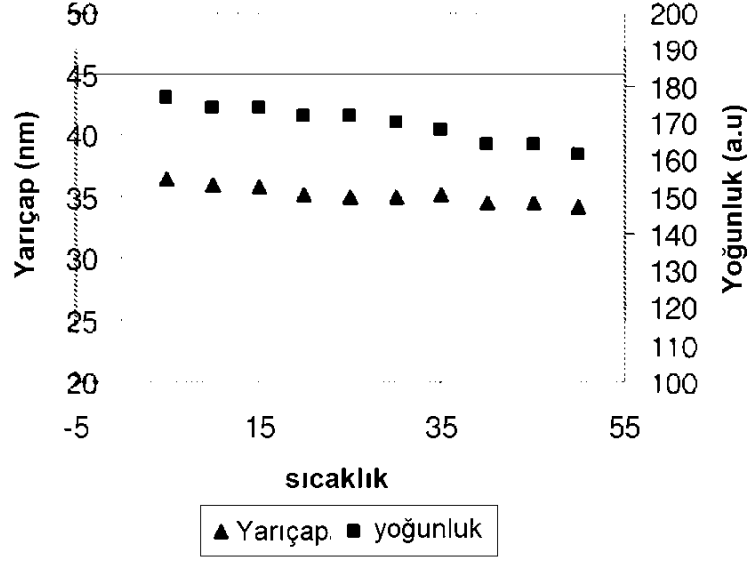


(b)

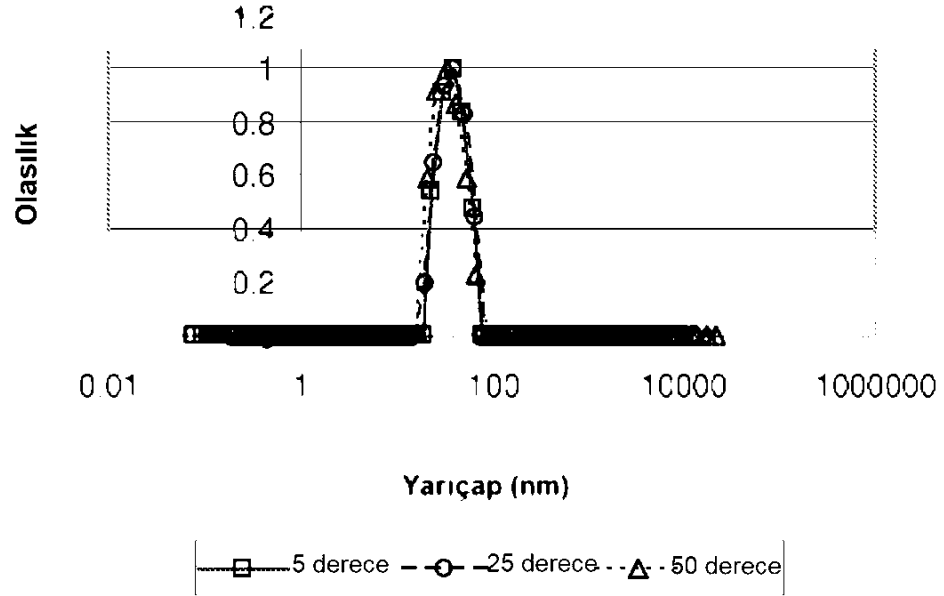


Şekil 2:

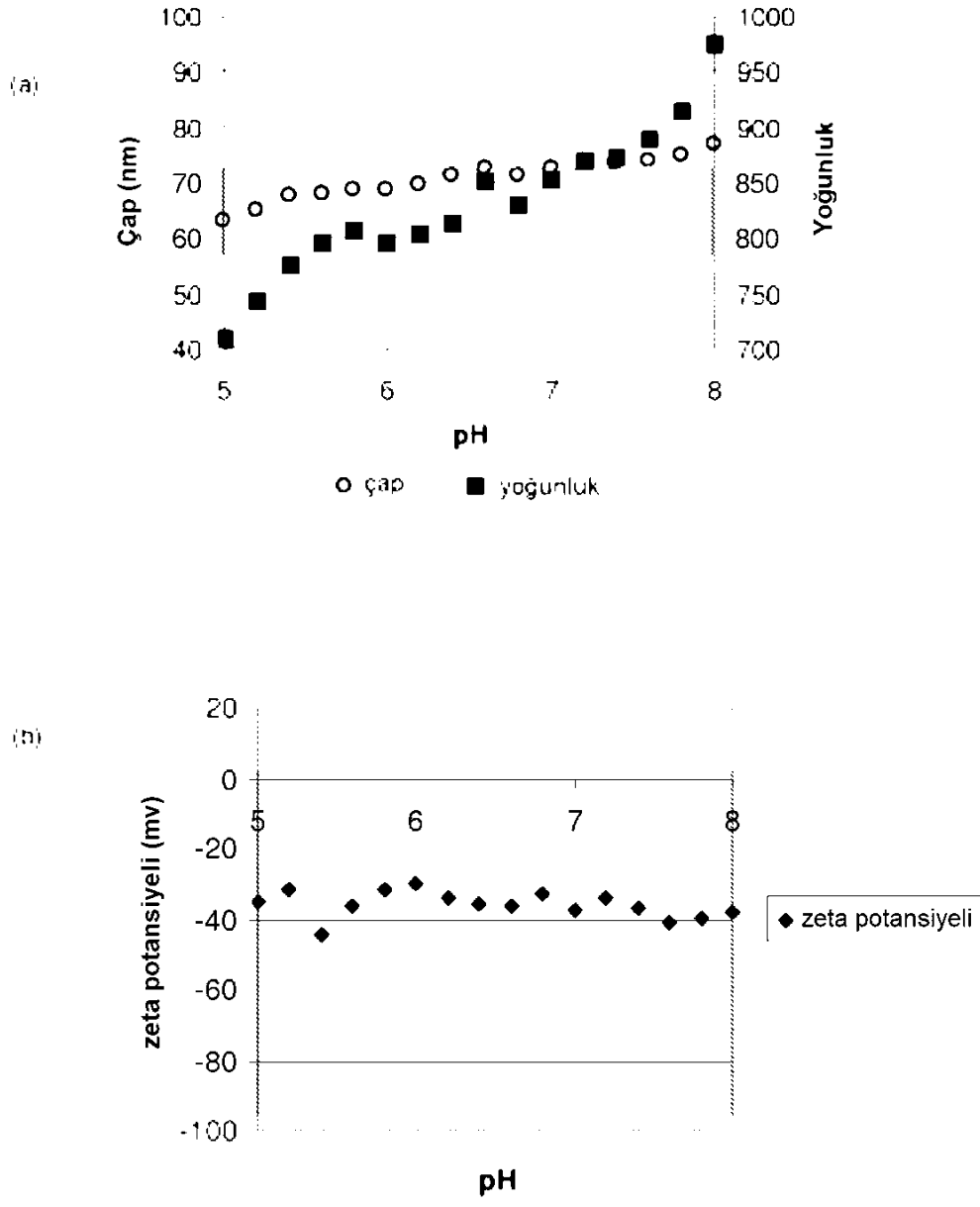
İa)



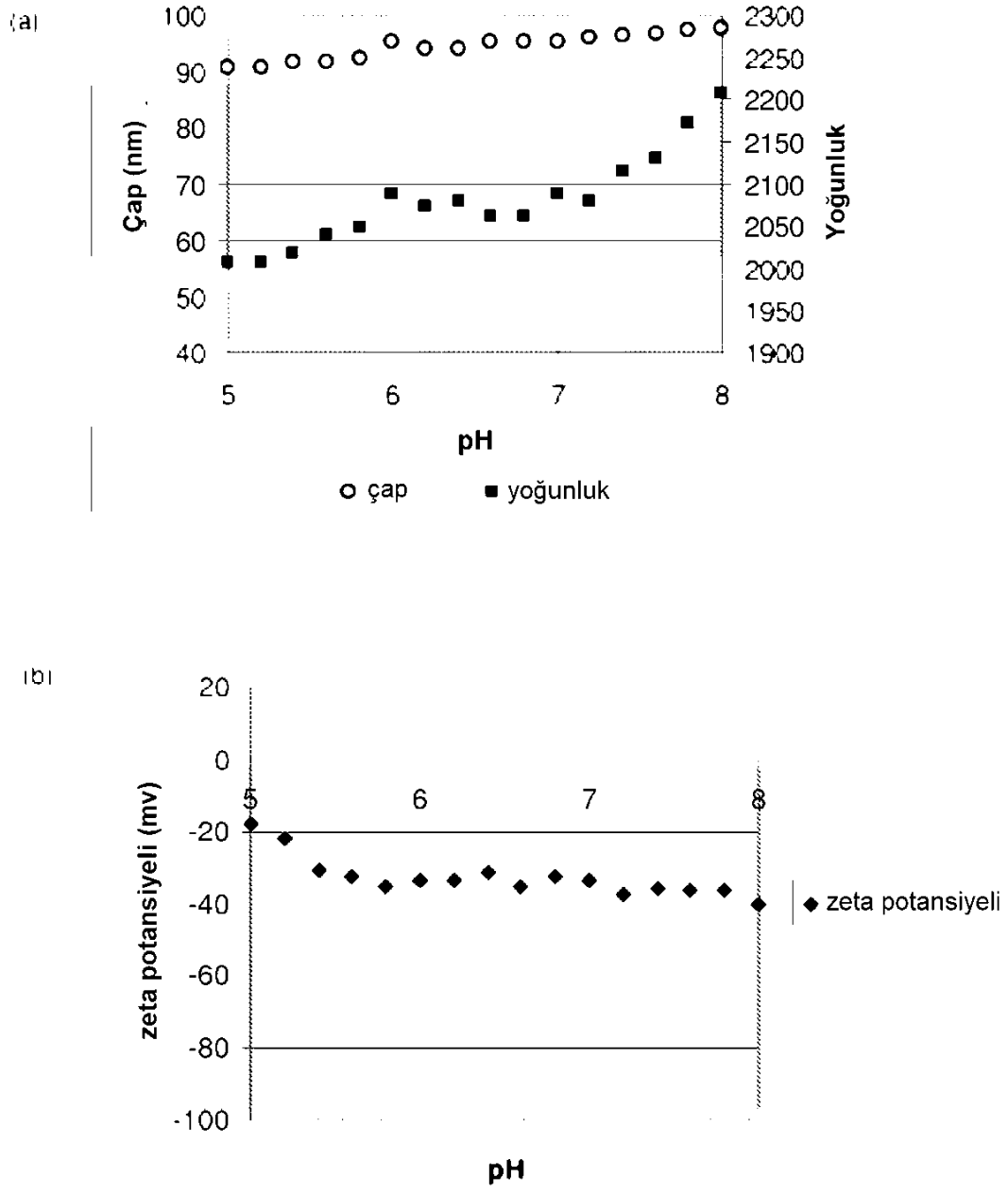
İb)



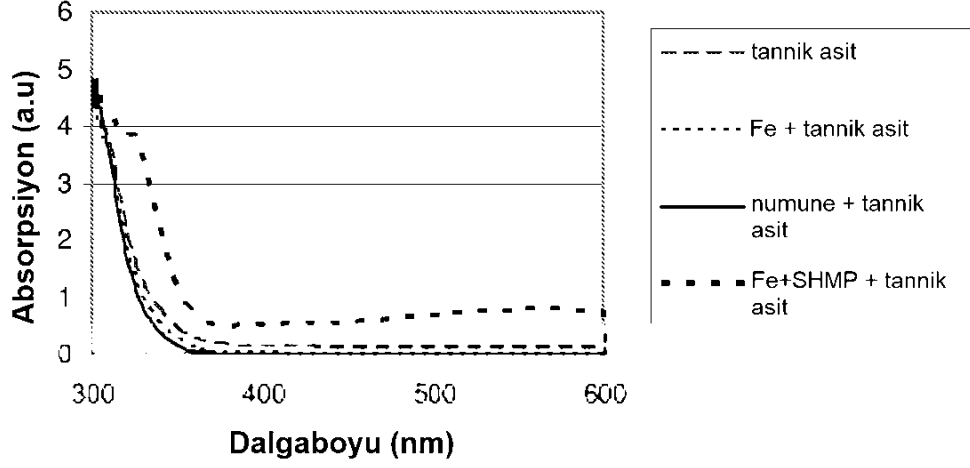
Şekil 3



Şekil 4:



Sekil 5:



Sekil 6:

