

TC
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANOJEL YAPISINDA LİPİT TAŞIYICI PARTİKÜL SİSTEMLERİN
ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

KÜBRA ŞİŞLİOĞLU

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

MART 2019

Tezin Başlığı: ORGANOJEL YAPISINDA LİPİT TAŞIYICI PARTİKÜL SİSTEMLERİN ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan: Arş.Grv. Kübra ŞİŞLİOĞLU

Sınav Tarihi: 07 Mart 2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. İhsan KARABULUT**
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Gökhan DURMAZ
İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Mustafa ÇAM
Erciyes Üniversitesi

Doç. Dr. Murat YILMAZTEKİN
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim ADIGÜZEL
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Organojel Yapısında Lipit Taşıyıcı Partikül Sistemlerin Üretimi ve Fonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmamın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Kübra ŞİŞLİOğLU

ÖZET

Doktora Tezi

ORGANOJEL YAPISINDA LİPİT TAŞIYICI PARTİKÜL SİSTEMLERİN ÜRETİMİ VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kübra Şişlioğlu

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

139 Sayfa + xiv

2019

Danışman: Prof.Dr. İhsan KARABULUT

Sindirilebilir lipitler ince bağırsakta oluşan misel miktarını artırarak yağda çözünen biyoaktif ajanların biyoyararlanımlarını artırır. Bu sebeple biyoaktif maddelerin biyoyararlanımları artırmak amacıyla nano-emülsiyonlar, katı lipit nanopartiküller ve nanoyapılandırılmış lipit taşıyıcılar gibi lipit esaslı salınım sistemleri kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında jelatör ve sıvı yağ içeren nano lipit partiküller oluşturularak organojel yapılı nanoyapılandırılmış emülsiyon sistemler geliştirilmiştir.

Nano-emülsiyonları hazırlamak için üç boyutlu kristal ağlar oluşturularak organojel meydana getirebilen Kandelilla vaks jelatör olarak kullanılmıştır. Yağ fazlarında Kandelilla vaks, mısırözü yağı ve bunların karışımlarıyla sırasıyla Katı Lipit Nanotaşıyıcı (SLN) sistem, Sıvı Lipit Nanotaşıyıcı (LLN) sistem ve Nano-yapılandırılmış Organojel Lipit taşıyıcı (NLC) sistem örnekleri simüle edilmiş *in vitro* salınım ortamlarında gastrointestinal sistem (GIT) koşullarında incelenmiş, bileşimlerindeki farklılıkların partiküllerinin fiziksel özellikleri ve gastrointestinal akıbetleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Ağız, mide ve bağırsak koşullarına maruz bırakıldıktan sonra, örneklerin partikül boyutu, partikül yükü ve mikroyapılarındaki değişimler ölçülmüştür. Örnekler simüle edilmiş GIT koşullarında partikül özellikleri bakımından benzer davranış gösterebilir de SLN örneğinin lipaz aktivitesiyle sindirilemediği, LLN ve NLC örneklerinin trigliserit bileşenlerinin ise tamamen sindirilerek Kandelilla vaksın NLC örneğinde lipaz aktivitesinde inhibisyona neden olmadığı gözlemlenmiştir.

Kendiliğinden birleşimle nano boyutlu fibril ağlar meydana getirerek organojel oluşturabilen γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı, organojel yapılı nano-emülsiyon oluşturmak amacıyla yağ fazında pirinç kepeği yağını yapılandırmak için kullanılmıştır. Antioksidan özelliğe sahip jelatör bileşeninin enkapsüle edilen β -karotenin kimyasal stabilitesi üzerine etkisi hızlandırılmış test koşullarında depolanan örneklerde analiz edilmiş, organojel nano-emülsiyon sistem ile enkapsüle edilen β -karotenin stabilitesinin arttığı elde edilen sonuçlarla gösterilmiştir. Ayrıca yağ fazında %15 ve %30 jelatör karışımı içeren NLC örnekleri ve LLN örneğinin *in vitro* GIT koşullarında partikül boyutu, partikül yükü ve mikroyapılarındaki değişimler ölçülmüştür. Yağ fazında %15 jelatör karışımı içeren organojel nano-emülsiyon örneğinin ağız fazından ince bağırsak fazına kadar stabilitesini koruyarak ulaşabildiği, NLC-%30 ve LLN örneklerinde partikül stabilitesinin korunamadığı tespit edilmiştir. En yüksek β -karotenin biyoerişilebilirlik oranı NLC-%15 örneğinde ölçülmüş, biyoerişilebilirlik üzerine *in vitro* GIT koşullarında partikül stabilitesinin etkisinin önemli olduğu gözlemlenmiştir.

β -sitosterol ve γ -orizanol organojel nano-emülsiyon sistemin, keten tohumu yağının oksidatif stabilitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla; MCT (orta zincir uzunluklu trigliserit karışımı), β -sitosterol ve γ -orizanol ile hazırlanan nano-emülsiyonlar keten tohumu yağı ile hazırlanan nano-emülsiyonlarla 1:1 oranda karıştırılmıştır. Hızlandırılmış oksidasyon koşullarında depolama süresince örneklerin fiziksel stabilitesi partikül boyutu ve partikül yükü analizleri ve mikroskop görüntüleri ile oksidatif stabiliteleri ise PV (Peroksit sayısı) ve TBARS (Tiyobarbütirik asit sayısı) analizleri ile belirlenmiştir. Depolama sonunda γ -orizanol ve β -sitosterol kompleksi ile hazırlanan organojel nano-emülsiyon örneği fiziksel olarak diğer örneklere kıyasla daha stabil bulunurken, organojelatör bileşenlerinin partiküller arası transferinde meydana gelen farklılıklar sonucunda oksidatif stabilite en yüksek γ -orizanol ve β -sitosterol nano-emülsiyonlarının ayrı ayrı hazırlanıp sonradan karıştırıldığı örnekte tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Organojel nano-emülsiyon, Nano yapılandırılmış Lipit Taşıyıcılar, Kandelilla vaks, β -karoten enkapsülasyonu, β -sitosterol, γ -orizanol

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PRODUCTION AND INVESTIGATION OF SOME FUNCTIONAL PROPERTIES OF LIPID CARRIER SYSTEMS BASED ON ORGANOGELEATION

Kübra Şişlioğlu

Inonu University

Graduate School of Naturel ve Applied Sciences

Department of Food Engineering

139 pages + xiv

2019

Supervisor: Prof.Dr. İhsan KARABULUT

Digestible lipids increase in the number of mixed micels formed in the small intestine and promote the bioavailability of oil-soluble bioactive agents. Lipid-based delivery systems such as nano-emulsions, solid lipid nanoparticles and nano-structured lipid carriers are therefore being designed to enhance the bioavailability of bioactive components. In this study, organogel based nano-structured emulsion systems were developed by forming nano lipid particles containing a mixture of gelator and liquid oil as their oil phase.

Candelilla wax, which is capable of an organogel transition via three-dimensional crystal network, was used in the composition of oil phase of nano-emulsions as gelator. The Solid Lipid Nanoparticle (SLN), Liquid Lipid Nanoparticle (LLN) and Nanostructured Lipid Carrier (NLC) systems, which were formed with the oil phases of Candelilla wax, corn oil and their mixtures respectively, the impact of lipid phase alteration on the physical properties and gastrointestinal fates of the particles were investigated using a simulated gastrointestinal tract (GIT) model. After exposure to mouth, gastric and intestinal conditions, changes in particle size, particle charge and microstructures of samples were analysed. Although the samples exhibit similar behavior in the simulated GIT in terms of their particle properties, it was observed that SLN samples could not be digested by lipase activity, and the triglyceride composition of LLN and NLC samples were completely digested, the lipase activity in the NLC sample was not inhibited in the presence of Candelilla wax.

The complex mixture of γ -oryzanol and β -sitosterol, which can form organogels via self-assembled nano-sized fibril networks, was used as gelator in order to structure rice bran oil phase of organogel based nano-emulsions. The effect of the gelator component, known that have antioxidant properties, on the chemical stability of β -carotene was analyzed under accelerated test conditions and it was shown that encapsulation of β -carotene with organogel based nano-emulsion system improves the stability comparing to LLN system. In addition, NLC samples containing 15% and 30% gelator mixture in the oil phase and the LLN sample were investigated at the *in vitro* GIT conditions in terms of particle size, particle charge and microstructural changes. It was determined that the organogel nano-emulsion sample containing a mixture of 15% gelator in the oil phase was found to be able to reach from the mouth phase up to the small intestine phase invariably while the particle stability in NLC-30% and LLN samples could not being maintained. The highest β -carotene bioaccessibility was measured on NLC-15% sample indicating that particle stability of samples in the human GIT conditions is significantly important for high bioaccessibility.

In order to investigate the effect of γ -oryzanol and β -sitosterol on the oxidative stability of flaxseed oil; the nano-emulsions prepared with the oil phases of MCT (medium chain triglycerides), γ -oryzanol and β -sitosterol were mixed in a 1:1 ratio with the nano-emulsions prepared with only flaxseed oil. The physical stability of the samples during the storage under accelerated oxidation conditions was determined by particle size and charge analysis and microscope images besides oxidative stability by PV (peroxide value) and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) analysis. At the end of storage, organogel nano-emulsion sample prepared with γ -oryzanol and β -sitosterol complex was found to be physically more stable than other samples. The most effective oxidative stability due to the differences in the transfer of organogelator components between different type of nano-emulsion droplets was determined in the sample which the γ -oryzanol and β -sitosterol nano-emulsions were prepared separately and mixed afterwards with flaxseed nanoemulsion.

KEYWORDS: Organogel nano-emulsions, Nano-structured Lipid Carriers, Candelilla wax, β -carotene encapsulation, γ -oryzanol, β -sitosterol

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca yardım öneri ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İhsan Karabulut hocama,

Misafir araştırmacı olarak bulunduğum Amerika Birleşik Devletleri'nde, maddi olarak beni destekleyen Türkiye Teknolojik ve Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2214-A Doktora Sırası Yurtdışı Araştırma Programı'na

Bu çalışmayı gerçekleştirebilmem için beni laboratuvarına misafir araştırmacı olarak kabul eden ve araştırma boyunca mükemmel önerileriyle ve ilgisiyle beni yönlendiren Sayın Prof. Dr. David Julian McClements'e ve laboratuvarında bulunan başta Jean Alamed olmak üzere, Cansu Gümüş, Ruojie ve Zpei Zhang, Bingjing Zheng, Cheryl Chung, Charmaine Coo ve ismini saymadığım çok değerli bütün ekibine ve geçmişte aynı ekipte misafir araştırmacı olarak yer alması dolayısıyla tecrübelerini ve bilgisini esirgemedi benimle paylaşarak, destek olan Sayın Doç.Dr. Sibel Uluata hocama,

Doktora eğitimim sürecinde yardımları ve Amerika'da araştırma yapmak konusunda beni yüreklendiği için, tez izleme komitesinde bulunan Sayın hocam Prof. Dr. Gökhan Durmaz'a ve önerileri için diğer tez izleme komitesi üyelerinden Sayın hocam Doç.Dr. Murat Yılmaztekin'e ve tez savunma sürecinde sağladıkları katkılar ve öneriler için değerli jüri üyelerine; Sayın hocalarım Prof. Dr. Dilek Sivri Özay ve Doç. Dr. Mustafa Çam'a,

Akademik hayatım boyunca benden yardım ve desteğini esirgemeyen koruyucu meleklerim, ailem; Annem Melahat Şişlioğlu'na ve ablam Lütfiye Seda Şişlioğlu'na sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. Emülsiyonlar	6
2.2. Nano-emülsiyonlar	7
2.2.1. Nano-emülsiyonların Stabilitesi.....	9
2.2.2. Nano-emülsiyonların Formülasyonları.....	11
2.2.3. Yağ Fazı.....	12
2.2.4. Su Fazı	13
2.2.5. Stabilizatörler	13
2.2.6. Nano-Emülsiyon Üretim Teknikleri.....	15
2.2.7. Nano-Emülsiyon Partiküllerinin Fizikokimyasal Özellikleri	19
2.3. Lipit Taşıyıcı Nano-emülsiyon Salınım Sistemleri.....	21
2.3.1. Nano-emülsiyonlar, SLN'ler ve NLC'ler	22
2.4. Organojelin Tanımı	25
2.4.1. Organojelatörler ve Sınıflandırılması	27
2.4.2. Tez Kapsamında Kullanılan Organojelatörler	32
2.5. Simüle Edilmiş Sindirim Koşullarında Nano-emülsiyonların Davranışları ve Biyoyararlanımları.....	36
2.5.1. Ağız Fazı.....	37
2.5.2. Mide Fazı	38
2.5.3. İnce Bağırsak Fazı	40
2.5.4. Kolon Fazı.....	42
2.5.5. Biyoyararlanım.....	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	48
3.1. Materyal.....	48
3.2. Yöntemler	49

3.2.1.	Kandelilla Vaks Kullanılarak Organojel Oluşturma	49
3.2.2.	Kandelilla Vaks Kullanılarak Nano-Emülsiyon Üretimi.....	49
3.2.3.	Kandelilla Vaks Kullanılarak Hazırlanan Organojel ve Organojel Nano-emülsiyonların Termal Davranışlarının DSC ile Belirlenmesi	50
3.2.4.	Kandelilla Vaks Organojel Nano-emülsiyonlarının Partikül Boyutu Ölçümü	50
3.2.5.	Kandelilla Vaks Organojel Nano-emülsiyonlarının Zeta Potansiyel (ζ) Ölçümü	50
3.2.6.	Gastrointestinal Sindirim Sistemi Koşullarında Kandelilla Vaks ile Hazırlanan Örneklerin Analizi	51
3.2.7.	γ - Orizanol ve β -sitosterol ile Organojel Oluşturma.....	53
3.2.8.	γ -Orizanol ve β -sitosterol Organojel Nano-emülsiyon Üretimi	54
3.2.9.	Emülsiyon Stabilitesinin Ölçülmesi	54
3.2.10.	Partikül Boyutlarının ve Partikül Yüklerinin Belirlenmesi	55
3.2.11.	β -Karoten Miktarında Meydana Gelen Değişimin Belirlenmesi.....	55
3.2.12.	GIT Koşullarında γ -Orizanol ve β -Sitosterol ile Hazırlanan NLC ve LLN'lerin Analizi.....	56
3.2.13.	Keten Tohumu Yağı Nano-Emülsiyonu ve γ -Orizanol ve β -Sitosterol Karışımı ile Yapılandırılmış Organojel Nano-Emülsiyonların Üretimi..	58
3.2.14.	Emülsiyonların Oksidatif ve Fiziksel Stabilitelerinin Ölçülmesi.....	59
3.2.15.	İstatistik Analizi	60
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	62
4.1.	Kandelilla Vaksın Jelatör Olarak Kullanıldığı Örneklerle Ait Sonuçlar ..	62
4.1.1.	Kandelilla Vaks Organojellerin Oluşumunun Gözlemlenmesi.....	62
4.1.2.	Kandelilla Vaks Organojellerinin ve Kandelilla Vaks Kullanılarak Üretilen Nano-Emülsiyonların Termal Davranışları.....	63
4.1.3.	Yağ Fazında Artan Kandelilla Vaks Konsantrasyonunun Nano-Emülsiyonların Partikül Boyutu ve ζ -Potansiyeli Üzerine Etkileri.....	65
4.1.4.	Kandelilla Vaks ile Hazırlanmış SLN, NLC ve LLN Örneklerinin In Vitro Sindirim Koşullarında Elde Edilen Sonuçları.....	68
4.1.5.	SLN, NLC ve LLN'lerin Serbest Yağ Asidi Salınım Profillerinin Değerlendirilmesi	73
4.2.	γ -Orizanol ve β -Sitosterol Karışımı ile Yapılandırılmış Organojel Nano-Emülsiyon Üretiminin Gerçekleştirilmesi.....	75
4.2.1.	γ -Orizanol ve β -Sitosterol Organojellerin Oluşumunda Jelatör Konsantrasyonuna Karar Verilmesi	75
4.2.2.	γ -Orizanol ve β -Sitosterol Yapılı Organojel Nano-Emülsiyonların Üretimi.....	77

4.2.3.	γ -Orizanol ve β -Sitosterol Karışımları ile Hazırlanan Organojellerin Termal Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	79
4.2.4.	Nano-Emülsiyonların Üretimi ve Fiziksel Stabiliteleri.....	81
4.2.5.	β -Karotenin Kimyasal Stabilitesi Üzerine Sıcaklık ve pH Değerlerinin Etkisi.....	86
4.2.6.	In Vitro Sindirim Koşullarında γ -Orizanol ve β -Sitosterol ile Yapılandırılmış Nano-Emülsiyonlar	90
4.2.7.	Yağ Asidi Kompozisyonuna γ -Orizanol ve β -Sitosterol İlavesinin Lipit Sindirimi Üzerine Etkisi	97
4.2.8.	γ -Orizanol ve β -Sitosterol İlavesinin β -Karotenin Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi.....	99
4.3.	Keten Tohumu Yağı Nano-Emülsiyonu ve γ -Orizanol- β -Sitosterol ile Yapılandırılmış Nano-Emülsiyonların Karışımı.....	102
4.3.1.	Nano-emülsiyonların Üretimi ve Oksidatif Stabilitesi.....	102
4.3.2.	Nano emülsiyon Karışımlarının Oksidatif Stabilitesi.....	103
4.3.3.	Fiziksel Stabilitesi.....	106
5.	SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	114
6.	KAYNAKLAR	118
7.	EKLER	134

SİMGELER VE KISALTMALAR

μm	Mikrometre
nm	Nanometre
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
ψ	Elektriksel Yüzey Potansiyeli
σ	Yüzey Yük Yoğunluğu
ζ	Zeta Potansiyeli
β	Beta
γ	Gama
w/w	Kütlesel derişim
Dk	Dakika
Sn	Saniye
kHz	Kilohertz
mV	MiliVolt
BaCl ₂	Baryum klorür
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir sülfat
TCA	Trikloroasetik asit
TBA	Tiyobarbitürik asit
TEP	1,1,3,3 Tetrahidroksipropan
O/W	Oil in water; Su içinde yağ
W/O	Water in oil; Yağ içinde su
pH	Potential of Hydrogen; Hidrojen Gücü
pI	Isoelectric Point; İzoelektrik Nokta
BHT	Bütülenmiş hidroksi tolüen
DSC	Differential Scanning Calorimeter; Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
FDA	Food ve Drug Administration; Gıda ve İlaç Dairesi
FFA	Free Fatty Acid; Serbest Yağ Asidi
GIT	Gastro Intestinal Tract; Gastrointestinal Sistem
GRAS	Generally Recognized As Safe; Genel Olarak Kullanımı Güvenli Kabul Edilen
KTY	Keten Tohumu Yağı
LLN	Liquid Lipid Nano-emulsions; Sıvı Lipit Nano-emülsiyonlar

MCT	Medium Chain Triglycerides; Orta Zincir Uzunluklu Trigliserit Karışımı
NLC	Nanostructured Lipid Carriers; Nano Yapılandırılmış Lipit Taşıyıcılar
PV	Peroxide Value; Peroksit Sayısı
SGSSS	Simüle edilmiş gastrik sıvısı stok solüsyonu
SGS	Simüle gastrik sıvısı
SLN	Solid Lipid Nano-emulsions; Katı Lipit Nano-emülsiyonlar
SYS	Simüle edilmiş yapay salya solüsyonu
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances; Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
YBVH	Yüksek Basınç Valf Homojenizatörleri
YSÇS	Yapay salya çalışma solüsyonu

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Nano-emülsiyon partiküllerinin merkez kabuk yapılarının şematik olarak gösterimi 8
- Şekil 2.2.** Nano-emülsiyonlarda emülsiyon stabilitesinin bozulmasına neden olan çeşitli fizikokimyasal mekanizmalar 9
- Şekil 2.3.** İki aşamalı nano-emülsiyon üretim yönteminin şematik gösterimi 16
- Şekil 2.4.** Yüksek basınç valf homojenizatörü iç dizaynının şematik gösterimi 16
- Şekil 2.5.** Tekli ve çift girişli mikrosıvılaştırıcıların iç dizaynlarının şematik gösterimi 17
- Şekil 2.6.** **A)** Ultrasonik prob sonifikatör ve **B)** Ultrasonik jet homojenizatörlerin (b) çalışma dizaynlarının şematik gösterimi 18
- Şekil 2.7.** SLN sistemlerde depolama sırasında aktif maddenin nano-emülsiyon damlacıklarından dışarı çıkmasının şematik gösterimi 24
- Şekil 2.8.** Jel oluşturma mekanizmaları bakımından organojelatör türleri; **A)** kristal partikül oluşturanlar, **B)** kendiliğinden birleşim kuranlar 27
- Şekil 2.9.** γ -orizanol ve β -sitosterol karışımının paketlenerek sarmal yapılı nanofibrilleri meydana getirmelerinin şematik gösterimi (kırmızı uçlu molekül γ -orizanolü, yeşil uçlu β -sitosterolü temsil etmektedir) 33
- Şekil 2.10.** Orizanolün dört majör bileşeninin kimyasal yapıları 34
- Şekil 2.11.** İnsan GIT sisteminin farklı bölgelerindeki fizikokimyasal koşulların şematik gösterimi 41
- Şekil 2.12.** Karışım misellerin içine girerek mukus tabakasından geçen ve sonrasında epitelyum hücreleri tarafından çeşitli mekanizmalarla absorbe olan bileşikler: Serbest yağ asitleri, monogliseritler ve lipofilik aktif bileşikler 42
- Şekil 2.13.** Simüle edilmiş ince bağırsak fazının santrifüjleme sonrasında elde edilen yağ fazı, misel fazı ve pelletin şematik görüntüsü 44
- Şekil 3.1.** Tez çalışması kapsamında kurgulanan deneysel dizaynların şematik olarak gösterimi 61
- Şekil 4.1.** Mısır özü yağında farklı oranlarda seyreltilerek elde edilen Kandelilla vaks organojellerinin oda koşullarında elde edilen görüntüsü 62
- Şekil 4.2.** Sade Kandelilla vaks ve yağ fazı olarak sadece Kandelilla vaks kullanılarak üretilen nano-emülsiyonun termogramlarının karşılaştırılması 64
- Şekil 4.3.** Mısırözü yağında %3 Kandelilla vaks içeren organojelin ve yağ fazı olarak mısırözü yağında %60 Kandelilla vaks kullanılarak üretilen nano-emülsiyonun DSC termogramlarının karşılaştırılması 65
- Şekil 4.4.** SLN (Kandelilla vaksı), NLC (Kandelilla vaksı ve mısır yağı karışımı) ve LLN (mısır yağı nano-emülsiyonu) partikül büyüklüğü dağılımı 67

Şekil 4.5.	Gastrointestinal evrelerinin , SLN (Kandelilla vakası), NLC (Kandelilla vakası ve mısır özüyağı karışımı; 60:40) ve LLN (mısırözü yağı) sistemlerinin A) Partikül büyüklükleri B) Zeta potansiyelleri üzerindeki etkisi	70
Şekil 4.6.	Gastrointestinal aşamaların SLN, NLC ve LLN örneklerinin mikroyapıları üzerine etkisi	72
Şekil 4.7.	Simüle edilmiş ince bağırsak koşullarında bekletilen SLN, NLC ve LLN örneklerine ait NaOH tüketiminin ve sindirilebilir yağlarına ait serbest yağ asidi salınımının zamana karşı değişimi.....	74
Şekil 4.8.	Pirinç kepeği yağında hazırlanan farklı γ -orizanol ve β -sitosterol jelatör karışımı ile oluşturulan organojel görselleri	76
Şekil 4.9.	Pirinç kepeği yağında 60:40 γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı ile farklı toplam jelatör konsantrasyonlarında elde edilen organojellerin elde edilen görüntüleri	77
Şekil 4.10.	Pirinç kepeği yağında %30 γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı içeren organojelin ve nanoemülsüfiye edilmiş örneğinin DSC termogramları..	81
Şekil 4.11.	β -karotenle enkapsüle edilmiş nano-emülsiyonların partikül boyutu dağılımları.....	83
Şekil 4.12.	A) β- karoten enkapsüle edilmiş ve B) Boş olan LLN ve NLC nano-emülsiyonların depolama süresince partikül boyutlarında ki değişim....	85
Şekil 4.13.	LLN ve NLC nano-emülsiyonların depolama süresince partikül yüklerinde ki değişim	86
Şekil 4.14.	β -karotenin enkapsüle edildiği yağ fazında %15 γ -orizanol ve β -sitosterol organojelatör karışımı içeren NLC ve sadece pirinç kepeği yağı içeren LLN nano-emülsiyonlarının depolama süresince β -karoten konsantrasyonlarındaki değişim.....	87
Şekil 4.15.	β -karotenli (A-B) ve β -karotensiz (C-D) NLC ve LLN nano-emülsiyonlarının farklı pH değerlerinde 55°C de depolama öncesinde (A-C) sonunda (B-D) görüntülerinde ki değişim.....	88
Şekil 4.16.	β -karotenin enkapsüle edildiği yağ fazında %15 organojelatör karışımları içeren nano-emülsiyonların depolama süresince renk değerleri A) L* değeri (parlaklık), B) a* değeri (kırmızı-yeşil), C) b* değeri (sarı-mavi), D) ΔE^* değeri.....	89
Şekil 4.17.	Gastrointestinal evrelerin, yağ fazında γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı (60:40) içeren NLC-%15 ve NLC-%30 ve pirinç kepeği yağı içeren LLN örneklerinin partikül boyutu ve partikül yükü değerleri üzerine etkisi	92
Şekil 4.18.	Gastrointestinal aşamaların LLN, NLC-%15 ve NLC- %30 örneklerinin mikroyapıları üzerine etkisi (konfokal mikroskop).....	93
Şekil 4.19.	Gastrointestinal aşamaların LLN, NLC-%15 ve NLC- %30 örneklerinin optik mikroskopla görüntüleri üzerine etkisi.....	94

Şekil 4.20. Simüle edilmiş ince bağırsak koşullarında bekletildikten sonra LLN, NLC-%15 ve NLC-%30 örneklerine ait NaOH tüketiminin zamana karşı değişimi	98
Şekil 4.21. Simüle edilmiş ince bağırsak koşullarında bekletildikten sonra NLC-%15, NLC-%30 ve LLN örneklerinin sindirilebilir yağlarına ait serbest yağ asidi salınımının zamana karşı değişimi	99
Şekil 4.22. β -karoten enkapsüle edilmiş NLC-%15, NLC-%30 ve LLN örneklerinin ince bağırsak koşullarında FFA salınımı (%) ve biyoerişilebilirlik oranları	101
Şekil 4.23. Farklı üretim tekniklerinin keten tohumu yağı nano-emülsiyonlarının oksidatif stabilitesi üzerine etkisi	103
Şekil 4.24. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarının oksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitleri üzerine γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano-emülsiyonlarının etkisi	105
Şekil 4.25. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarının oksidasyonu sonucu oluşan TBARS değerleri üzerine γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano-emülsiyonlarının etkisi	106
Şekil 4.26. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarının depolama sonucu Partikül Boyutu ve Partikül yükü değişimleri üzerine γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano-emülsiyonlarının etkisi	108
Şekil 4.27. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarına γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano-emülsiyonların ilavesinin depolama sonrası görüntüleri üzerine etkisi	110
Şekil 4.28. MCT'nin γ -orizanol ve β -sitosterol ile yapılandırılmasıyla hazırlanan organojel nano-emülsiyon ile keten tohumu yağı (KTY) nano-emülsiyonlarının karışımı sonrası farklı nano-emülsiyonlar arası etkileşimi gösteren TEM görüntüsü	111
Şekil 4.29. Orta zincirli trigliseritin γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırıldığı nano-emülsiyonlarının keten tohumu yağı nano-emülsiyonları ile karışımlarının depolama sonrasında optik mikroskop görüntülerindeki değişim	112
Şekil 4.30. Orta zincirli trigliseritin γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırıldığı nano-emülsiyonlarının keten tohumu yağı nano-emülsiyonları ile karışımlarının depolama sonrasında konfokal mikroskop görüntülerindeki değişim	113

ÇİZELGELER LİSTESİ

Tablo 2.1. Partikül çaplarına göre emülsiyonlar	7
Tablo 2.2. Oluşum mekanizmasına göre bazı organojelatörler.....	29
Tablo 4.1. Kandelilla vaks kullanılarak elde edilen organojel ve nano-emülsiyon örneklerinin termal özellikleri	64
Tablo 4.2. Farklı oranlarda Kandelilla vaks içeren nano-emülsiyon örneklerinin partikül boyutları ve zeta potansiyelleri	66
Tablo 4.3. γ -Orizanol ve β -sitosterol karışımı kullanılarak elde edilen organojel örneklerinin termal özellikleri	80
Tablo 4.4. β -karotenle enkapsüle edilmiş nano-emülsiyonların depolama süresince partikül yükleri ve boyutlarında ki değişim.....	82
Tablo 4.5. 1:1 oranda karıştırılmak üzere hazırlanan Nano-emülsiyon 1 ve Nano-emülsiyon 2 örneklerinin yağ fazı formülasyonları	104

1. GİRİŞ

Nano teknoloji; materyallerin, araçların ya da sistemlerin şekil ve boyutlarının nanometre skalasında üretimi, karakterizasyonu, yararlanılması ve kullanılabilir hale getirilmesine olanak veren bir bilim dalıdır. Partikül boyutunun nano skala aralığına indirilmesi maddenin yüzey alanının hacmine oranını artırarak, mekanik, optik ve elektrokimyasal özelliklerini değiştirmekte ve reaktivitesini artırmaktadır. Nanoteknolojinin gıda alanında uygulanmasıyla gıdaların makro skalada ölçülen özelliklerinden tekstür, tat ve diğer duyuşsal özelliklerinde, renklendirme özelliğinde, işlenebilirliğinde ve raf ömrü süresince stabilizasyonun sağlanmasında iyileşmelerin meydana gelmesiyle yeni ürün olanakları artmıştır. Bunun yanında bu teknolojiyle biyoaktif bileşenlerin suda çözünürlüğü, termal stabiliteleri ve biyo-yarayışlılıkları gelişmektedir. Nanoenkapsülasyon ise; nano boyutlu merkez materyallerin, özellikle hassas biyoaktif bileşenlerin, kabuk materyalle kaplanarak uygun olmayan çevresel koşullardan korunmasına, uyuşmazlıkların uzaklaştırılmasına, çözünür hale getirilmesine ya da istenmeyen tat ve kokuların maskelenmesine olanak veren bir teknolojidir (Ezhilarasi *et al.*, 2013; Simoes *et al.*, 2017).

1990'lı yılların başlarında enkapsülasyon teknolojisinde hidrofobik bileşiklerin enkapsülasyonu için taşıyıcı kısmın lipit olduğu, mevcut sistemlere alternatif bir sistem olarak "Katı Lipit Nanotaşıyıcılar" (SLN) geliştirilmiştir. Bu sistemin klasik nano-emülsiyonlardan temel farkı taşıyıcılığı sağlayan lipit kısmın oda sıcaklığında katı formda bulunabilen erime noktası yüksek olan yağlar olmasıdır. Bu sistemlerdeki partiküller yüksek sıcaklıklarda sıvı karışımlarken oda sıcaklığında katı hale dönüşümlerinden yararlanılarak üretim imkânları oluşmuştur. SLN üretimi için gereken lipit yapının kısmen yüksek erime noktasına sahip olması gerekir. Genel olarak SLN formülasyonu katı lipit, sürfaktan ve sudan oluşmakla beraber bazı uygulamalarda yardımcı sürfaktan maddeler de kullanılmaktadır. Yağ bileşiminde yaygın olarak; erime noktası yüksek yağ asitleri, trigliseritler ya da bunların karışımı kullanılmaktadır. Sürfaktan lipit partiküllerini su içerisinde dağıtarak stabilize etmek için kullanılır. Biyoaktif bileşenin hareketi, SLN'nin lipit matriksinin fiziksel durumunun kontrolüyle sağlanmaktadır. Bu partiküllerin submikron boyutlarda

üretimi için yüksek devirde karıştırmak yetersiz olabildiğinden yüksek basınç homojenizasyonu, mikrosivılaştırıcılarla ya da ultrasonifikatörler kullanılmaktadır. SLN'ler yüksek biyo-uyumluluk, organik solvent içermemesi, farklı üretim yöntemleri kullanılsa dahi; yeniden üretilebilirlik imkanının yüksek olması ve kolaylıkla üretim miktarının artırılabilmesi gibi avantajlarından dolayı enkapsülasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bütün bu olumlu özelliklere rağmen, bazı sınırlamalar da mevcuttur. Bileşimindeki lipit matriksin benzer moleküllerden oluşması neticesinde oluşan kristal yapıların mükemmel şekilde dizilimi biyoaktif bileşenlerin tutunması için gereken alanı azaltır ve dolayısıyla bileşik yükleme kapasitelerinin düşük olmasına neden olur. Bunun yanı sıra depolama esnasında lipitlerin polimorfizimi; α ve β' formun β forma dönüşmesiyle oluşan mükemmel yapıdaki kristaller SLN partikülünün patlamasına ve biyoaktif maddenin ortama dağılmasına neden olur. 1990'lı yılların sonlarında bu sınırlamaların üstesinden gelmek amacıyla Nano yapılandırılmış lipit taşıyıcı (NLC) sistemler geliştirilmiştir. Bu yaklaşımla yükleme kapasitesini, diğer bir deyişle enkapsülasyon etkinliğini artırmak amacıyla hidrofobik taşıyıcı bölge daha kompleks lipit karışımlarından oluşturulmuştur. Lipit bileşimi katı yağlarla sağlanan SLN'lerden farklı olarak NLC'lerde; lipit matriksinde katı yağın yanısıra bir kısım sıvı yağda kullanılarak mükemmel dizilimli kristal oluşumu önlenmiş ve bu sayede hem daha fazla bileşik yüklenmiş hem de depolama sırasında partiküllerin patlaması önlenmiştir (Fathi *et al.*, 2012; Tamjidi *et al.*, 2013).

Fathi *et al.*, (2013), gıdaları zenginleştirmek amacıyla hesperetin yüklenen SLN ve NLC taşıyıcı sistemleri süt örneklerine katarak duyu analize tabi tutmuş; hesperetin yüklenmiş nano taşıyıcıların eklendiği örnekle, sade süt örneği arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda NLC sistemle enkapsüle edilen hesperetin hem çözünürlüğünün artırıldığını hem de acımsı tadının oldukça iyi maskelendiğini ifade etmişlerdir.

Zhang *et al.*, (2013) tarafından yapılan NLC ve nano emülsiyon sisteme β -karotenin immobilize edildiği ve 90 gün oda sıcaklığında depolama süresi boyunca stabilitesinin takip edildiği bir çalışmada, β -Karotenin parçalanma hızının soya yağı ile hazırlanan nano emülsiyonla enkapsüle edilen örneğe kıyasla, NLC örneğinde daha yavaş olduğu tespit edilmiştir.

Zheng *et al.*, (2013) tarafından yapılan bir başka çalışmada konjuge linoleik asidin merkezde yer aldığı farklı taşıyıcı lipitlerle enkapsüle edildiği ve NLC formülasyonunun iyi kontrol edilebilen bir salınım profili olduğu bildirilmiştir.

Kısmi hidrojenasyonla katı yağ üretiminde yan ürün olarak oluşan *trans* yağların, doymuş yağlara kıyasla; kardiovasküler kalp rahatsızlıkları üzerine daha olumsuz etkisinin olduğu keşfedildiğinden beri, gıda endüstrisinde bütün ürünlerden *trans* yağların çıkarılması için ciddi bir baskı oluşmuştur. Birçok üretici bu sorunu *trans* yağların yerine doymuş yağları getirerek çözmeye çalışmıştır. Ancak halk sağlığına tehdit oluşturan bu durum yeniden düzenlemeye alınarak “1 porsiyon 0,2 g dan fazla *trans* yağ içermemeli ve 2 g dan fazla da doymuş yağ içermemeli” kriteri uygulamaya konulmuştur (Martins *et al.*, 2018). Bu düzenlemeler gıda endüstrisini, fonksiyonel ve besinsel açıdan kabul edilebilir hem *trans* hem de doymuş yağların yerine geçebilecek alternatif araştırmaya yöneltmiştir (Rogers *et al.*, 2009b; Siraj *et al.*, 2015).

Yağların yapılandırılmasında bitkisel yağları katı yağa dönüştürmek için son yıllarda öne çıkan ve literatürde gittikçe artan araştırmalara neden olan yöntemlerden biri de organojelasyondur. Organojelasyon ile; üç boyutlu ağ yapı oluşturabilen organojelatörlerin içerisine, organik yapılı oda sıcaklığında sıvı olan lipitler immobilize edilerek yarı katı ve yumuşak materyaller elde edilir. Organojelatörler, non-kovalent etkileşimlerle (hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri, kolombik etkileşimler, π - π bağlanması gibi) kendiliğinden filamentler şeklinde birleşerek (self-assemble) jel oluşturur (George and Weiss, 2006; Co and Marangoni, 2012; Martins *et al.*, 2018).

Genel olarak bir bileşiğin organojelatör işlevi görebilmesi için; yağlara afinitesi olan lipofilik kısım ve supramoleküler birleşmenin olması için bağlantı kısmı (uygun fonksiyonel gruplar) olmak üzere iki karakteristik bölüme sahip olması gerekir. Gıdalarda kullanılabilmesi için, organojel oluşturmada kullanılacak jelatörün yenilebilir olması gerekmektedir. Polimer yapılı yüksek molekül ağırlıklı organojelatörlerin çoğu toksik bileşiklerdir ve gıda uygulamalarına uygun değildir. Ancak yenilebilir polimer jelatör türleride olup, gıda saflığında jelatör araştırmaları halen devam etmektedir (Hughes *et al.*, 2009). Bu yenilebilir jelatör sınıfı içerisinde lipit yapılı olanlar: trigliseritler, digliseritler, monogliseritler, yağ asitleri ve/veya yağ alkolleri, sorbitan tristearat ve/veya lesitin, sorbitan monostearat, fitosterol ve orizanol,

vaksalar, vaks esterleri gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikleridir (Co and Marangoni, 2012; Patel and Dewettinck, 2016; Martins *et al.*, 2018).

Kirilov *et al.*, (2008) tarafından farmakolojik uygulamalara yenilik getirmek amacıyla mevcut lipit taşıyıcı sistemler henüz araştırılmakta iken organojelasyon yöntemiyle; jelatör olarak hidroksi-stearik asitle yarı katı hale getirilen dikapril eter, aynı anda hazırlanan stabilizör içeren suyla 75°C de karıştırılarak pre-emülsiyon elde edilmiş, daha sonra ultrasonifikasyonla nano partiküllere dönüştürülerek model bir sistem üretilmiştir. İlaç ve kozmetik endüstrisi için önerilen bu çalışma sonrasında elde edilen nanopartiküller SLN ve NLC sistemlerle karşılaştırılmamış, başka jelatörlerle oluşum araştırılmamış, özellikle de gıda uygulamalarına uygun formülasyonlarla incelenmemiştir.

Biyoaktif bileşenlerin çoğu (yağ asitleri, karotenoidler, tokoferoller, flavonoidler, polifenoller, fitosteroller, yağda çözünen vitaminler, aromalar ve koruyucular) lipofilik yapıdadırlar. Bu lipofilik bileşiklerin enkapsülasyonu için genellikle sulu ortamlara uygun kolloid dağılımlar gereklidir. Önemli bir diğer hususta, ince bağırsakta sindirilebilir lipitlerin varlığı ile bu lipofilik biyoaktif bileşenlerin absorpsiyonunu kolaylaştırarak biyoyararlanımlarını artırmaktadır. Sindirim sırasında lipitler hidrofobik bileşenleri çözündürüp transfer eden misellerin miktarını artırır. Bu sebeplerle lipit taşıyıcılara olan ilgi gün geçtikçe artmıştır (Fathi *et al.*, 2012).

Bitkilerde yaygın olarak bulunan doğal pigmentlerden karotenoitler, ısı ışık ve sıcaklığa karşı duyarlılıkları yüksek bileşiklerdir. Karotenoid bileşikler arasında provitamin A aktivitesi ve yüksek antioksidan kapasitesi bakımından besinsel açıdan en aktif olan β -karotendir. β -karoten oldukça hidrofobik olduğundan dolayı, suda çözünmez, oda sıcaklığındaki yağda az miktarda çözünür. Bu özelliklerinden dolayı gıda formülasyonlarına eklenmesi oldukça zorlaşmaktadır. Diğer taraftan, kristal formunda biyo-yarayışlılıkları zayıf olduğundan, bu bileşiğin nano boyutta enkapsülasyonu ile stabilitesi, işlenebilirliği ve biyoyarayışlılığı artırılabilir (Hentschel *et al.*, 2008; Mun *et al.*, 2015).

Bu çalışma kapsamında SLN ve NLC'lere alternatif olarak aynı yöntemle ancak farklı formülasyonla üretilen nano yapılandırılmış organojel partiküller önerilmektedir. SLN ve NLC sistemlerde partiküllerin stabil yapısı katı yağ ile

sağlanırken; bu yeni sistemde yapı, sıvı yağın jelatörle immobilize edilmesiyle oluşturulan jel ile sağlanarak *in vitro* sindirim koşullarında yapısal stabilite araştırılmış, biyoaktif bir bileşenin (β -karoten) organojel partiküller içine immobilizasyonunun kimyasal ve fiziksel stabilitesi üzerine etkisi ve antioksidan etkiye sahip olduğu bilinen bir jelatörün organojel partikül sistemin oksidatif stabilitesi üzerine etkisi incelenmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Emülsiyonlar

Emülsiyonlar birbirine karışmayan iki sıvıdan birinin diğerinin içerisinde küçük damlacıklar halinde dağılmış halde bulunduğu çoğunlukla su ve yağdan oluşan sistemlerdir. Emülsiyonlar, her iki fazın başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olarak, daha açık bir ifadeyle yağ ve su fazlarının birbiri içinde nispi dağılımına göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Yağ damlacıklarının su fazı içerisinde dağıldığı emülsiyonlara; su içerisinde yağ emülsiyonları (O/W; oil in water) denir. Bu tür emülsiyonlara örnek olarak süt, krema, soslar, mayonez, çorbalar ve bazı içecekler verilebilir. Su damlacıklarının yağ fazı içerisinde dağıldığı sistemlere de yağ içinde su emülsiyonları (W/O; water in oil) denir ve gıda endüstrisinde kullanılan en önemli örnekleri margarin ve tereyağıdır. Emülsiyon sistemlerde damlacıklar halinde bulunan faz genel olarak dağılan, devam etmeyen faz ve iç faz gibi terimlerle ifade edilirken; damlacıkları çevreleyen kısım ise devamlı faz ve dış faz gibi terimlerle ifade edilir. Birbirine karışmayan iki fazın emülsiyona dönüşmesini sağlayan işleme homojenizasyon denilmektedir. Gıda endüstrisinde homojenizasyon işlemi yüksek enerjili (yüksek hızlı karıştırıcılar, yüksek basınç homojenizatörleri, mikrosivılaştırıcılar, sonifikatörler gibi) ve düşük enerjili (spontane emülsifikasyon gibi) çeşitli yöntemler mevcuttur (Tadros, 2013; McClements, 2015; Roohinejad *et al.*, 2018).

Yağ ve su fazlarının homojenizasyonu ile emülsiyon üretmek mümkündür, ancak yoğunluk farklılığından dolayı bu iki sistem hızla birbirinden ayrılarak yağ fazı üst kısımda toplanma eğilimindedir. Su ve yağ molekülleri birbirine etkileşimi olmayan polaritede olduklarından, termodinamik olarak stabil değildirler. Amaçlanan belli bir zaman diliminde kinetik olarak stabil emülsiyonların üretimi ancak stabilizatör olarak adlandırılan bileşiklerin kullanımıyla mümkündür (Boon *et al.*, 2008).

2.2. Nano-emülsiyonlar

Emülsiyonları partikül boyutlarına göre makroemülsiyonlar, nano-emülsiyonlar ve mikro emülsiyonlar olmak üzere üç temel kategoride sınıflandırmak mümkündür. Ancak nano-emülsiyonların literatürde net şekilde ifade edilmiş bir partikül aralığı mevcut değildir (Roohinejad *et al.*, 2018). Çeşitli kaynaklara göre tanımlanmaya çalışılan nano-emülsiyon partikül özellikleri hakkında derlenmiş literatür verilerine ait tablo aşağıda verilmiştir (Tablo 2.1).

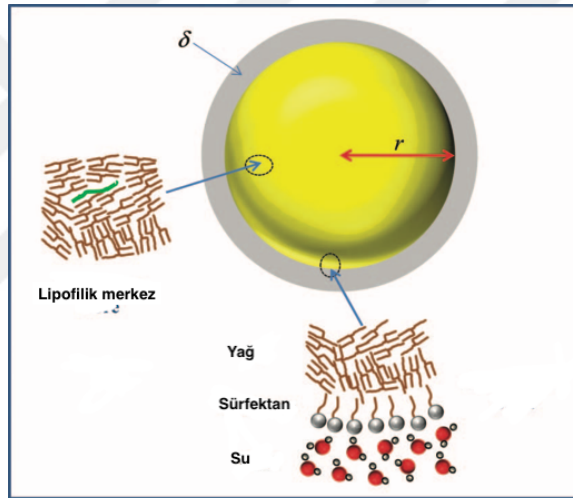
Tablo 2.1. Partikül çaplarına göre emülsiyonlar (Roohinejad *et al.*, 2018)

Makro-emülsiyon	Nano-emülsiyon	Mikro-emülsiyon	Referanslar
-	20-200 nm	-	(Solans <i>et al.</i> , 2005)
-	50-1000 nm	-	(Sanguansri and Augustin, 2006)
0.2-10 µm	20-200 nm	5-100 nm	(Flanagan and Singh, 2006)
-	<500 nm	-	(Anton <i>et al.</i> , 2008)
-	20-200 nm	-	(Gutierrez <i>et al.</i> , 2008)
1-100 µm	50-200 nm	<100 nm	(Huang, 2010)
20-200 µm	20-200 nm	4-100 nm	(McClements, 2011; McClements and Xiao, 2012)
> 200 µm	<200 nm	<100 nm	(Komaiko and McClements, 2016)
1-100 µm	20-500 nm	10-100 nm	(Gupta <i>et al.</i> , 2016)

Makroemülsiyonlar büyük boyutlu emülsiyon damlacıklarından oluşurlar, genel olarak mekanik kuvvet uygulanarak üretilen damlacıkların ortalama yarıçapları 100 nm ile 1000 µm arasındadır ve klasik emülsiyon veya konvensiyonel emülsiyonlar olarak da adlandırılırlar. Bu tür emülsiyonlar termodinamik olarak stabil değildirler ve zamanla emülsiyon kırılması gerçekleşerek iki faz birbirinden ayrılır. Nano-emülsiyonlar ise makro-emülsiyonlara kıyasla daha küçük emülsiyon damlacıklarından oluşan, mini emülsiyonlar olarak da tabir edilen yarı çapı yaklaşık 10 nm ile 100 nm arasında olan emülsiyonlardır. Literatürde “ultrafine emülsiyonlar” (Yang *et al.*, 2012) ve “submikron emülsiyonlar” (Solans *et al.*, 2005; Kaltsa *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018b) gibi tanımlamalar da mevcuttur. Nano emülsiyonların partikül boyutları klasik emülsiyonlara göre daha küçük olması onların kinetik olarak daha stabil olmasını sağlamaktadır ancak, hala termodinamik olarak stabil değildirler ve faz ayırımına meyillidirler. Mikroemülsiyonlar partikül yarı çapları 2-50 nm arasındadır ve mikroemülsiyonlarda birleştirmeyi sağlayacak serbest enerji, hazırlandığı fazları oluşturan bileşiklerinkinden daha düşük olduğu için yalnızca karıştırma ile kendiliğinden oluşurlar; bu sebeple termodinamik olarak stabildirler (McClements, 2012b; McClements, 2015; Roohinejad *et al.*, 2018).

Nano-emülsiyonlar ayrıca, partikül boyutlarının görünür ışığın dalgaboyundan (400-700 nm) küçük olması sonucunda ışığı hiç yansıtma ya da zayıf yansıtma etkileri dolayısıyla çoğunlukla saydam (transparan) ya da yarı saydam olarak tanımlanırlar. Ancak emülsiyonların bulanık görüntüleri, çaplarının boyutları 80 nm nin altına düştüğü zaman transparana döndüğü ve saydam görünümünün belirgin olması için partikül boyutu dağılımlarının da tamamen 80 nm nin altındaki boyutlara sahip olması gerektiği bildirilmiştir (Wooster *et al.*, 2008).

Gıda sistemlerinde kullanılan nano emülsiyonların çoğunluğunun çapı 100 nm ile 100 μm arasında değişmekteyken, son yıllarda özgün fizikokimyasal özellikleri dolayısıyla 100 nm altında çapa sahip emülsiyonlardan yararlanmak üzerine de ilgi oldukça artmıştır (McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018; Roohinejad *et al.*, 2018).

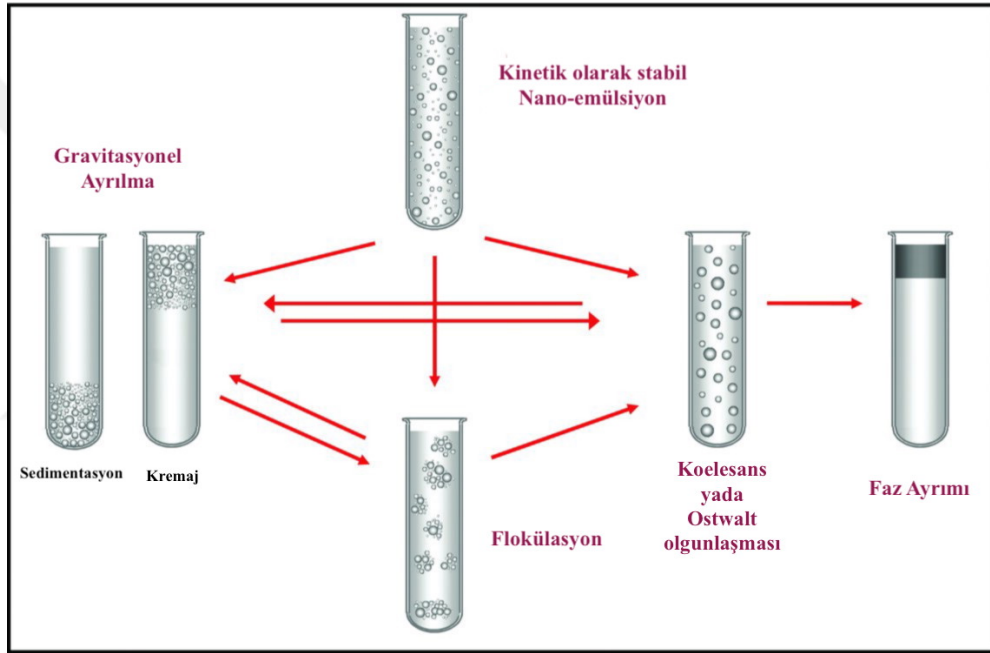


Şekil 2.1. Nano-emülsiyon partiküllerinin merkez kabuk yapılarının şematik olarak gösterimi (McClements and Rao 2011)

Nano-emülsiyonların gıda endüstrisinde uygulamaları açısından en önemli avantajı vitaminler, aromalar, renk maddeleri, antioksidantlar, koruyucular ve nutrasötikler gibi lipofilik fonksiyonel bileşiklerin enkapsüle edilmesine olanak sağlamalarıdır. Lipofilik bileşikler genellikle emülsiyon üretimi öncesinde yağ fazı ile karıştırılırlar, böylece nano-emülsiyon üretildiği zaman bu bileşikler yağ fazı içerisinde hapsedilmiş olur. Su içinde yağ (O/W) nano-emülsiyonlarının Şekil 2.1’de gösterildiği üzere lipofilik merkez materyal ve yüzey aktif maddeden (sümfektan) oluşan kabuk kısmı olmak üzere merkez kabuk tipi yapıya sahip olduğu düşünülebilir.

2.2.1. Nano-emülsiyonların Stabilitesi

Nano-emülsiyonların klasik emülsiyonlara göre fizikokimyasal özellikleri bakımından önemli diğer bir farkı partikül boyutlarının daha küçük olması neticesinde zamana karşı daha stabil olmalarıdır. Stabilitate kavramı nano-emülsiyonlarda partikül boyutundaki değişimle ifade edilebilir ve stabil olmayan nano-emülsiyonlar; gravitasyonel ayrılma, flokülasyon, koelesans ve Ostwalt olgunlaşması (Oswalt ripening) olarak adlandırılan çeşitli fiziksel olayların gelişmesine eğilim gösterirler (McClements, 2015; Karthik *et al.*, 2017; Rai *et al.*, 2018). Bu fizikokimyasal olayların şematik gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2. Nano-emülsiyonlarda emülsiyon stabilitesinin bozulmasına neden olan çeşitli fizikokimyasal mekanizmalar (McClements and Rao, 2011)

Gravitasyonel ayrılma gıda emülsiyon sistemlerinde gözlemlenen en yaygın emülsiyon kırılması formlarından biridir. Emülsiyon damlacıklarıyla onları çevreleyen sıvı fazın farklı yoğunluklara sahip olması neticesinde damlacıklara etki eden gelen net bir gravitasyonel güç, damlacıkları harekete geçirir. Yemeklik yağların çoğunluğunun sıvı formlarında yoğunluğu sudan daha düşük olduğundan su içinde yağ emülsiyonlarında emülsiyon damlacıkları yukarı doğru hareket etme eğilimindedirler ve bu olaya kremaj denilmektedir. Yağ içinde su emülsiyonlarında ise su damlacıkları yoğunluk farkından dolayı aşağı yöne hareket eder bu olay da sedimentasyon olarak adlandırılır (McClements, 2015).

Flokülasyon ise iki ya da daha fazla emülsiyon damlacığının birbirine bağlandığı ancak bireysel bütünlüklerinin korunduğu durumda gerçekleşen olaya verilen isimdir. Damlacık yoğunluğunun (sayısının) az olduğu seyreltik emülsiyonlarda flokülasyon, emülsiyonların raf ömrünün azalmasına sebep olan gravitasyonel ayrımı hızlandırmaktadır. Flokülasyon, emülsiyon viskozitesinde artışa sebep olurken damlacık konsantrasyonunun yeteri kadar yüksek olduğu emülsiyonlarda jel oluşumu da gözlenebilir. Flokülasyon bu sebeple düşük viskoziteye sahip olması istenen ürünlerde istenmeyen kalite kayıplarına sebep olabilirken; kontrol edilebilir düzeyde gerçekleşen flokülasyon arzu edilen tekstürel yapının oluşmasına neden olması sebebiyle avantajlı olabilmektedir (Boon *et al.*, 2008; McClements, 2015).

Emülsiyonların fiziksel stabilitelerinin bozulmasına neden olan bir diğer proses ise koelesansdır. Koelesans; iki ya da daha fazla emülsiyon damlacığının biraraya gelerek daha büyük bir emülsiyon damlacığına dönüşmesiyle sonuçlanan olaya verilen isimdir. Partüküllerin boyutları büyüdükçe her iki faz arasındaki temas alanı azaldığından termodinamik olarak stabiliteleri artmaktadır. Bu bakımdan koelesans ile nano-emülsiyonların kinetik olarak stabiliteleri azalırken, termodinamik olarak stabiliteleri artmaktadır. Koelesans sonucunda partiküllerde kremaj ve sedimentasyon olayları hızlanırken en nihayetinde faz ayrımı gerçekleşmektedir. Koelesansa neden olan unsurların kontrol edilmesi daha uzun raf ömrüne sahip ürün elde etmek açısından önem arzeder (Adams *et al.*, 2007; Dexter, 2011; McClements, 2015).

Kısmi koelesans olarak adlandırılan olayda ise emülsiyon damlacığının birinde bulunan bir katı yağ kristali başka bir damlacıktaki sıvı yağla penetre olur. Normal koşullarda dışarı çıkan katı yağ kristali su ile çevrelenecekken, diğer bir yağ damlacığının içine geçtiği zaman sıvı yağ ile çevrelenir. Bu şekilde damlacıklar topaklanmış olur, çünkü yağ damlacığının su yerine yağ molekülleri ile çevrelenmesi iç enerjilerinin indirgenmesi nedeniyle termodinamik olarak daha elverişlidir. Zamanla partiküller kısmi olarak birleşme eğilimi gösterirler, çünkü birleşme emülsiyon içerisindeki yağın suya maruz kalan temas alanını azaltmaktadır (Adams *et al.*, 2007; McClements, 2015).

Ostwald olgunlaşma ise; çoklu dağılımlı bir emülsiyonda küçük damlacıklardan büyük damlacıklara doğru, arada bulunan devamlı fazı geçerek gerçekleşen kütle transferiyle büyük emülsiyon damlacıklarının büyümesi olayına verilen isimdir.

Oswalt olgunlaşmanın gerçekleşmesini sağlayan itici kuvvet; emülsiyon damlacıklarının boyutu azaltıkça, devamlı fazın çevrelediği damlacığın içerisinde bulunan maddenin (yani yağın) çözünürlüğünün artmasıdır (Kabalnov, 2001; Adams *et al.*, 2007). Oswalt olgunlaşma normal koşullarda uzun zincirli trigliseritler içeren emülsiyonlarda su ve trigliserit fazın karşılıklı çözünürlüklerinin düşük olması nedeniyle yoksayılabılır düzeyde gerçekleşirken kısa zincirli trigliseritleri, aromatik yağları ve esansiyel yağları içeren emülsiyonlarda önem arzeder. Yağ fazı uzun zincirli trigliseritlerden oluşsada eğer, su fazında alkol bulunuyorsa yağın çözünürlüğünü artıracığından Oswalt olgunlaşma meydana gelebilir (Taylor, 1998; Kabalnov, 2001; Adams *et al.*, 2007; Dexter, 2011; Tadros, 2013; McClements, 2015).

2.2.2. Nano-emülsiyonların Formülasyonları

Gıda saflığında nano-emülsiyonların üretimleri için gereken majör bileşenler yağ, su ve stabilizatörler olarak sıralanabilir. Bu bileşenlerin doğru oranda hazırlanan karışımları emülsiyonların özelliklerini ve stabilitesini belirlemektedir. Yağ fazının bileşiminde kullanılan yağlar; bitkilerden, hayvanlardan, balıklardan ve kabuklu yemişlerden oluşan çeşitli kaynaktan elde edilebilmektedir ve emülsiyon üretiminde kullanılacak yağ seçiminde yağın; besinsel profili, aroma profili, kristalizasyon özelliği, oksidatif stabilitesi ve kalitesi dikkate alınan genel özelliklerdir. Kullanılan yağların bazılarının fazla miktarda tüketilmesiyle sağlık üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği; diyabet, obezite ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli hastalıklara neden olabileceği de dikkate alınması gereken bir diğer unsurdur (Tadros, 2013).

Su fazını oluşturmak için kullanılan su bileşiminde önemli miktarlarda organik ve inorganik kontaminantlar içermektedir. Asitler, bazlar, mineraller, mikroorganizmalar ve kötü kokular gibi suyun fizikokimyasal ve duyuşsal özelliklerini bozan bu tür kontaminantlar emülsiyonların kalitesini kötü etkileyeceği için kullanılmadan önce çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılırlar (McClements, 2015).

Emülsüfiyer sürfaktanlar, yağ damlacıkları ve su fazı arasında bir ara yüzey film tabakası oluşturarak nano-emülsiyonların stabilitesini sağlarlar. FDA tarafından onaylanmış, gıda endüstrisinde kullanıma uygun, tek bir çeşitten ziyade çok çeşitli sürfaktanlar mevcut olup, üründe arzu edilen etkiyi oluşturmak amacıyla üretim basamaklarında uygulanabilecek mekanik işlemlere karşı depolama esnasında

meydana gelebilecek flokülasyondan ve/veya koelesanstan korumak üzere farklı sürfaktan seçimleri yapılabilmektedir (Tadros, 2013).

2.2.3. Yağ Fazı

Nano-emülsiyonların önemli bileşeni olan yağ fazı çok çeşitli apolar bileşiklerden oluşturulabilir. Bu bileşikler başta trigliseritler olmak üzere; monoaçilgliseroller, diaçilgliseroller, serbest yağ asitleri, aromatik yağlar, esansiyel yağlar, mineral yağlar, yağ ikame maddeleri, vakslar, yağda çözünen vitaminler ve karotenoidler, kurkumin, fitosteroller, Koenzim Q gibi çeşitli besinsel değeri olan bileşiklerdir (McClements and Rao, 2011). Lipit esaslı taşıyıcı sistemler, “Sıvı lipit emülsiyon sistemler (LLN)”, “Katı Lipit Nanopartiküller” ve “Nano-yapılandırılmış Lipit Taşıyıcılar” olmak üzere genel olarak üç kategoriye ayrılırlar. Bu üç sistemi birbirinden farklı kılan bileşimlerinde kullanılan yağların fiziksel özellikleri olup; Lipit emülsiyonlarda kullanılan yağlar oda sıcaklığında sıvı formda bulunurken, Katı lipit nanopartiküllerin yağ fazında kullanılan yağlar hem oda sıcaklığında hemde vücut sıcaklığında katı formda olan yağlardan oluşturulmaktadır (Muller *et al.*, 2008). Nano-yapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemlerde ise katı formda ve sıvı formda olan yağların karışımları kullanılmaktadır (Iqbal *et al.*, 2012).

Nano emülsiyonların oluşumları stabilite ve çeşitli fiziksel özellikleri çoğu zaman yağ fazının polarite, suda çözünürlük, arayüzey gerilimi, refraktif indeks, viskozite, yoğunluk, faz davranışı ve kimyasal stabilite gibi özelliklerine bağlıdır. Bazı durumlarda nano-emülsiyonların yağ fazının fizikokimyasal özellikleri üretimlerinde kullanılan homojenizasyon metodunu sınırlandırabilmektedir. Nano-emülsiyon üretiminde, düşük maliyetli olmaları, elde etme kolaylığı, fonksiyonel ve besinsel değerleri sebebiyle mısır yağı, ayçiçek yağı, zeytinyağı, balık yağları gibi trigliserit formundaki yağlar daha çok tercih edilmektedirler. Bu yağların trigliserit formlarında karbon zincir uzunluğu arttıkça viskoziteleri, apolariteleri ve yüzey gerilimleri arttığından nano-emülsiyon üretimlerinde kullanımları zorlaşmaktadır. Ancak üretim metodları gereken modifikasyonlarla geliştirildiğinde uzun karbon zincirine sahip yağlardan oldukça stabil nano-emülsiyonlar elde edilebilmektedir. Bu durumun aksine aromatik ve esansiyel yağlar kısmen daha yüksek polariteye, düşük yüzey gerilimine ve düşük viskoziteye sahip olduklarından nano boyutta emülsiyon üretimine elverişli olmalarına rağmen, boyutlarını uzun süre stabil olarak koruyamaz koelesanla ya da

Oswalt olgunlaşmayla deforme olmaya eğilimlidirler (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018).

Lipit taşıyıcı sistemlerin yağ fazında kullanılacak yağların seçiminde en yaygın olarak dikkate alınan seçim kriterlerinden biri de enkapsüle edilmek istenen biyoaktif bileşiğin o yağ bileşeninde ki çözünürlüğüdür. Gıda biyoaktif bileşenlerinin lipit fazındaki çözünürlüğü aynı şekilde yükleme kapasitelerini ve nihayetinde de lipit nanopartiküllerin taşıyıcı olarak kullanıldıklarında fizyolojik özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Hu *et al.*, 2004; Joshi and Patravale, 2008; Kasongo *et al.*, 2011). Aktif bileşenlerin çözünürlükleri genellikle UV- spektroskopi ve kromatografik yöntemlerle (HP-LC ve LC-MS gibi) tayin edilebilmektedir. Aktif bileşenler lipit matrikste farklı dağılıma katsayısına ve farklı çözünürlüğe sahip olabilirler ve bunun sonucunda aynı aktif bileşen farklı yağ materyallerinde farklı yükleme kapasitelerine sahip olabilmektedir. Yağ fazında kullanılacak lipit materyalin seçiminde her ne kadar çözünürlük yaklaşımı yararlı olsa da, kompleks olması tahmini bir model geliştirilmesini güçleştirmektedir (Roohinejad *et al.*, 2018).

2.2.4. Su Fazı

Nano-emülsiyonların üretiminde kullanılan su fazını oluşturan birincil bileşen su olmakla birlikte suyun içerisinde çeşitli polar bileşikler bulunabilmektedir. Su dışındaki bu bileşikler çoğunlukla yardımcı solventler, karbonhidratlar, proteinler, mineraller, asitler ve bazlardır. Bu bileşiklerin türü ve konsantrasyonları su fazının polaritesini, yüzey gerilimini, refraktif indeksini, reolojisini, yoğunluğunu, faz davranışını, pH değerini ve iyonik gücünü etkiler ve dolayısıyla üretilen nano-emülsiyonların oluşumu, stabilitesi ve fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli etkileri olur. Su fazının bileşiminin iyi kontrol edilmesi, nano-emülsiyonların optimize edilmesinde ve stabilizasyonlarının geliştirilmesinde önemli rol oynar (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018).

2.2.5. Stabilizatörler

Stabilizatör kullanmadan, yalnızca su ve yağ fazı homojenize edildiğinde normal olarak hazırlanan emülsiyonun stabil olması genel olarak mümkün olmadığı için nano-emülsiyon üretiminde uzun süre stabiliteyi korumak amacıyla stabilizatörlerin kullanımı elzemdir. Emülsüfyerler emülsiyon damlacıklarının yüzeyine adsorbe olan,

damlacıkların oluşumunu kolaylaştıran ve damlacıkları agregasyona karşı koruyan yüzey aktif moleküllerdir. Emülsüfyerler homojenizatör içerisinde yüzey gerilimini azaltarak emülsiyon damlacıklarının parçalanmasını kolaylaştırıp daha küçük parçacıklara dönüşmesini destekler. Nano-emülsiyonların pH, iyonik güç, ısıtma, soğutma ya da uzun süre depolama gibi çevresel streslere karşı stabilitesi ağırlıklı olarak kullanılan emülsüfyer türüne bağlıdır. Gıda endüstrisinde kullanılan emülsüfyerlerin çoğunluğu, küçük molekülü sürfaktanlar, fosfolipitler, proteinler ve polisakkaritlerdir. Emülsiyon oluşturmak için hangi yolla homojenizasyon yapılacağına karar vermede kullanılan emülsüfyerin büyük etkisi vardır. Küçük molekülü sürfaktanlar genellikle yüksek enerjili ve düşük enerjili homojenizasyon tekniklerinin her ikisinde uygunken; proteinler ve polisakkaritler düşük enerji ile homojenizasyon yöntemlerine uygun olmamakla birlikte, yüksek enerji ile homojenizasyon tekniklerinde küçük molekülü sürfaktanlar kadar etkili değildir. Ancak proteinler ve polisakkaritler doğal bileşenler olmaları dolayısıyla nano-emülsiyon üretiminde kullanımları cazip gelmektedir (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018).

Sürfaktanları genel olarak iyonik, non-iyonik ve zwitteriyonik sürfaktanlar olmak üzere elektriksel karakterlerine göre sınıflandırmak mümkündür.

İyonik sürfaktanlar

Gıdalarda kullanıma uygun iyonik sürfaktanların çoğu negatif yüklüdür (örneğin monogliseritlerin sitrik asit esterleri, monoglisertlerin diasetil tartarik esterleri, sterol laktilat tuzları) ancak, laurik aljinat gibi özel uygulamalarda kullanılan pozitif yüklü iyonik sürfaktanlar da mevcuttur. Nano-emülsiyon üretimi için yüksek enerji ve düşük enerji kullanılarak yapılan homojenizasyon tekniklerinde iyonik sürfaktanların kullanılmaktadır ancak, yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıkları zaman tahrişe sebep olabilirler (McClements, 2015; Ozturk and McClements, 2016).

İyonik olmayan sürfaktanlar

İyonik olmayan sürfaktanlar, düşük toksisiteleri, tahrişe sebep olmamaları ve hem yüksek enerjili hemde düşük enerjili homojenizasyon tekniklerinde kullanıma uygunlukları sebebiyle nano-emülsiyon üretimlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İyonik olmayan sürfaktanlara; şeker esterleri sürfaktanları (sorbitan monooleat, sukroz

monopalmitat), polioksietilen eter sürfaktanları (Brij 97) ve etoksile sorbitan esterler (Tweenler ve Spanlar) örnek olarak verilebilir (McClements, 2015; Ozturk and McClements, 2016).

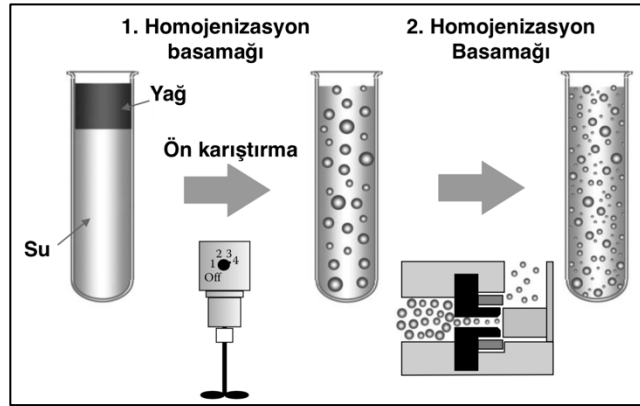
Zwitteriyonik sürfaktanlar

Zwitteriyonik sürfaktanlar aynı molekül üzerinde iki ya da daha fazla karşıt yüklü iyonize olmuş grup içeren sürfaktanlardır. Bundan dolayı çözeltinin pH değerine göre negatif, pozitif ya da nötr yüklü olarak çözelti ortamında bulunabilirler. Fosfolipitler GRAS listesinde olan gıdalarda kullanımına izin verilmiş, yaygın olarak kullanılan zwitteriyonik özellikteki emülsüfyerlerdir. Ancak nano-emülsiyon üretimlerinde fosfolipitlerin yardımcı sürfaktanlarla birlikte kullanılmalarında oluşum ve stabilizasyon bakımından daha etkili sonuçlar alınmaktadır (McClements, 2015; Ozturk and McClements, 2016).

2.2.6. Nano-Emülsiyon Üretim Teknikleri

Emülsiyon üretiminde kullanılan çeşitli teknikler bulunmaktadır ve bunlar yüksek enerji uygulanarak homojenizasyon ve düşük enerji uygulanarak homojenizasyon olmak üzere ikiye ayrılır. Yüksek enerji uygulanan tekniklerde kullanılan cihazlar yüksek enerjiyle etkili bir parçalayıcı güç uygulayarak su ve yağ fazlarını küçük emülsiyon damlacıklarına dönüştürürler. Parçalayıcı enerjinin seviyesi damlaları birarada tutarak eski haline getiren kuvvetleri geçmelidir ve homojenizasyon prosesinin süresi homojenizasyon alanındaki damlaların daha küçük damlalara bölünmesine yetecek düzeyde olmalıdır. Nano emülsiyon üretiminde yaygın olarak kullanılan cihazlar; yüksek basınç homojenizatörleri, mikrosivılaştırıcılar ve ultrasonik homojenizatörlerdir. Yüksek enerji uygulanan yöntemlerde genel olarak iki basamaklı nano-emülsiyon üretim yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemin birinci basamağında doğrudan iki ayrı fazın birbiriyle karışımı sağlanırken, ikinci basamağında oluşmuş olan mevcut emülsiyonun partikül boyutunun düşürülmesi hedeflenir. Birinci basamakta su ve yağ fazları yüksek hızlı karıştırıcılar kullanılarak kaba bir emülsiyona dönüştürülür, ikinci basamakta ise yüksek basınç homojenizatörü gibi daha güçlü bir homojenizatör çeşiti kullanılarak nano-emülsiyon üretmek mümkün olur. İki basamaklı boyut küçültme yönteminin şematik gösterimi Şekil 2.3

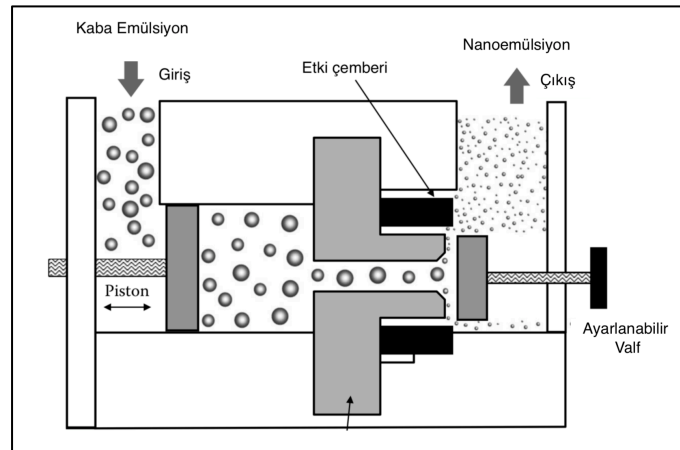
de verilmiştir (Anton *et al.*, 2008; Ezhilarasi *et al.*, 2013; McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018).



Şekil 2.3. İki aşamalı nano-emülsiyon üretim yönteminin şematik gösterimi (McClements and Rao, 2011)

2.2.6.1. Yüksek basınç homojenizatörleri

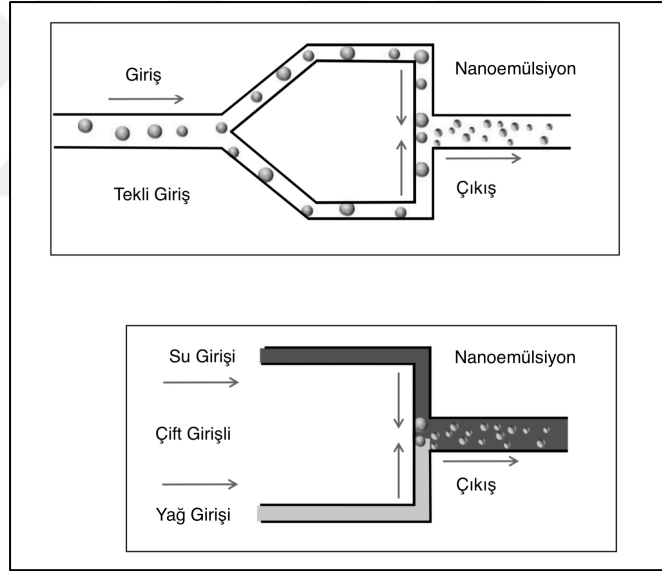
Yüksek basınç valf homojenizatörleri (YBVH); kısmen düşük viskoziteli emülsiyonların homojenizasyonunda kullanılırlar ve gıda endüstrisinde en yaygın olarak kullanılan homojenizasyon tekniğidir (Şekil 2.4). Genellikle YBVH kullanılmadan önce kaba bir emülsiyonun üretilmesi gerekir. YBVH ile homojenizasyon işlemlerinde elde edilen partikül boyutları öncelikli olarak homojenizasyondan geçiş sayısına ve uygulanan basınca bağlıdır. Geçirme sayısı ve basınç arttıkça partikül boyutu azalır. Ayrıca YBVH ile homojenizasyon işlemi sırasında ortamda partiküllerin etrafına hızlıca adsorbe olarak emülsüfiye edecek sürfaktan maddenin bulunması gerekmektedir (McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018).



Şekil 2.4. Yüksek basınç valf homojenizatörü iç dizaynının şematik gösterimi (McClements, 2015)

2.2.6.2. Mikrosivılaştırıcılar

Mikrosivılaştırıcılar dizayn olarak YBVH'ne benzerler ancak onlara kıyasla daha etkili kesme kuvveti oluşturabilirler. Mikrosivılaştırıcılardan elde edilen partiküller boyutları bakımından daha homojen dağılımlıdır. Mikrosivılaştırıcılar ve YBVH'nde emülsiyonların geçtiği kanalların iç dizaynları birbirinden farklıdır. Temel olarak mikrosivılaştırıcılarda kaba emülsiyon iki akıma ayrılır ve daha sonra etkileşim çemberinin içerisinde etkili bir parçalanma kuvveti yaratmak amacıyla bu iki akım birbiriyle çarpıştırılır. YBVH'ne benzer şekilde mikrosivılaştırıcılarda da homojenizasyon basıncı, geçirme sayısı, emülsüfier türü ve konsantrasyonu, dağılan ve devamlı fazların viskozitelerinin oranı partikül boyutuna etki eden etmenleri oluşturur (McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018). Mikrosivılaştırıcıların emülsiyon fazlarının ayrı ayrı beslendiği çift girişten oluşan ya da tek girişle beslendikten sonra iki kanala ayrılan farklı dizaynları mevcuttur (Şekil 2.5).



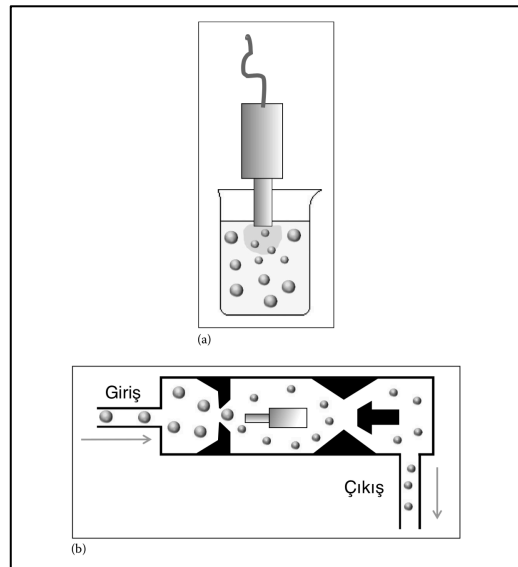
Şekil 2.5. Tekli ve çift girişli mikrosivılaştırıcıların iç dizaynlarının şematik gösterimi (McClements, 2015)

2.2.6.3. Sonifikasyon

Sonifikasyon tekniği yüksek etkili ultrasonik dalgalar kullanarak (frekans > 20kHz) oldukça düşük partikül boyutuna sahip emülsiyonlar üretmeye imkân sağlar (Şekil 2.6). Ultrasonikle çalışan mekanik titreşimler sayesinde sonifikasyonda minik emülsiyon damlacıkları oluşur ve bu da kavitasyon kabarcığının kolapse olmasına ve enerji salınımına neden olur. Ultrasonik güçteki artış dağılan

fazda daha küçük damlacıkların olması ile sonuçlanır. Sonifikasyonla nano-emülsiyon üretim tekniğinde proses süresi çok önemlidir. Oldukça küçük partikül boyutlarının elde edilmesi kavitasyonun olduğu bölgede yeteri kadar süre emülsiyonun sonifikasyona maruz bırakılmasıyla sağlanır. Yine homojenizasyonun etkinliği ortamda bulunan emülsiyonun türü ve miktarına, su ve yağ fazlarının viskozitelerine bağlı olmakla birlikte ultrasonik dalgaların etkinliğinede bağlıdır (McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018).

Nano-emülsiyonları ayrıca düşük enerji kullanarak çalışan tekniklerle de üretmek mümkündür. Düşük enerji metotları genellikle sürfaktan-yağ-su sistemlerinde meydana gelen faz geçişine dayanarak nano-emülsiyonların üretildiği yöntemlerdir. Sabit bir sıcaklıkta emülsiyon kompozisyonunun değiştirilmesi ya da sabit tutulan bir emülsiyon kompozisyonunda sıcaklığın değiştirilmesiyle nano-emülsiyonların üretimini sağlayan faz geçişini gerçekleştirmek mümkündür. Düşük enerji ile nano emülsiyon üretiminde kullanılan yöntemlerinden en çok kullanılanları spontane emülsifikasyon, faz geçişine dayanan metotlar ve emülsiyon inversiyon noktası yöntemleridir. Bu yöntemlerde yüksek sürfaktan kullanılması, uzun zincirli trigliseritlerin kullanımına uygun olmamaları ve sınırlı çeşitte uygun taşıyıcı yağ seçeneği olması dikkate alınması gereken ve endüstriyel uygulamalarda önem arzedecek önemli hususlardır (McClements, 2015; Rai *et al.*, 2018).



Şekil 2.6. A) Ultrasonik prob sonifikatör ve B) Ultrasonik jet homojenizatörlerin çalışma dizaynlarının şematik gösterimi (McClements, 2015)

2.2.7. Nano-Emülsiyon Partiküllerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Nano-emülsiyon üretim yöntemleri dizayn edilirken birçok fonksiyonel özellikleri dikkate alınarak tasarlama yapılır. Örneğin; optik özellikleri, reolojik özellikleri, partikül özellikleri ve salınım profilleri amaçlanan nihai ürünün üretiminin nasıl olacağını şekillendirir. Partiküllerin karakteristik özellikleri nano-emülsiyonların fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerinin her ikisi üzerinede önemli ölçüde etkilidir (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015). Partikül özelliklerinin bazıları aşağıda açıklanmıştır.

2.2.7.1. Partikül kompozisyonu

Çok sayıda bileşen kullanılarak nano-emülsiyon üretimi gerçekleştirmek mümkündür. Emülsiyonlarda fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerin değişimi kuvvetli olarak partikül boyutlarındaki farklılığa bağlıdır. Bu özellikler emülsiyonlar ve nano-emülsiyonlar arasında büyük farklılık gösterirken, belli bir partikül boyutunun altındaki emülsiyon salınım sistemlerinde önemli farklılıklar gözlenmesi beklenmez. Partikül boyutundaki farklılıklara göre sınıflandırılan emülsiyon, nano-emülsiyon ve mikroemülsiyonlar arasında optik özellikler, reoloji, stabilite ve biyoaktivite bakımından daha kademeli bir değişim vardır (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015).

Yağ damlacıklarının etrafını kaplayan emülsüfyer tabakasının kalınlığı kullanılan emülsüfyerin doğasına bağlıdır. Kullanılan emülsüfyerlerde ara yüzey tabakasının kalınlığı, polisakkaritler> proteinler>sümfaktanlar şeklinde sıralanmakla birlikte bu değişim genel olarak 2-20 nm arasında bir kalınlık farkı seyreder. Yine partiküllerin elektriksel yük özellikleri de partikül kompozisyonu ile kontrol edilebilen bir durumdur. Seçilen emülsüfyerin özelliklerine göre partikül yükü; pozitif, negatif, nötr ya da dağıldığı solüsyonun pH değerine ya da kompozisyonuna göre değişen özellikte olabilir (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015).

2.2.7.2. Partikül konsantrasyonu

Nano-emülsiyonlarda partikül konsantrasyonu genellikle dağılan fazın hacimsel ya da kütleli yüzdesi ile ifade edilir ve emülsiyon damlacıklarının miktarının emülsiyonun toplam miktarına bölünmesi ile bulunur. Gerçekte emülsiyon

damlacıkları homojen küreler değildir, emülsüfyer molekülleri ile dağılan fazın çevrelendiği bir merkez yapıdan oluşurlar. Emülsüfyerle merkez arasında etkileşimin olduğu ara yüzeyin kalınlığı damlacık çapına oranla kayda değer kalınlığa sahip olursa emülsüfyerle kaplanmış damlacıkların hacmi dağılan fazın hacminden daha büyük olur. Bu durum nano-emülsiyonların stabilitesi ve reolojik özellikleri için önemli sonuçlar meydana getirebilir. Bu durumdan nano-emülsiyonlarda daha az yağ içeriği ile yüksek viskozitede ürün elde edilmek istendiğinde yararlanılabilir (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015).

2.2.7.3. Partikül boyutu

Nano-emülsiyonlarda partikül boyutu optik özellikler, reolojik stabilite ve salınım özellikleri üzerine etkili olduğu için oldukça önemlidir. Partikül boyutlarını düşürmek için homojenizasyon işleminin etkinliğini ve süresini uzatmak, kullanılan emülsüfyerin konsantrasyonunu artırmak ya da fazlar arasındaki viskozite oranını kontrol etmek gibi çok çeşitli stratejileri izlemek mümkündür. Kabuk tabakası da partikül çapının artması üzerine önemli katkıda bulunabilmektedir. Kullanılan emülsüfyerlere göre farklı arayüzey tabaka kalınlıkları oluşabilmektedir. Sıralama yapılacak olursa; küçük moleküllü sürfaktanlar (Tweenler ve Spanlar) < globuler proteinler (yumurta, peynir altı suyu ve soya proteinleri) < esnek proteinler (kazein ve jelatinler) < polisakkaritler (gam arabik ve modifiye nişastalar), artan ara yüzey tabakalarına sahiptir (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015).

2.2.7.4. Partikül yükü

Nano-emülsiyon damlacıklarında meydana gelen elektrik yük iyonize olmuş emülsüfyerlerin, mineral iyonlarının ya da biyopolimerlerin dağılan fazın yüzeyine adsorbe olmasından kaynaklanmaktadır. Nano-emülsiyonların elektriksel karakterini belirli emülsüfyer türlerinin seçimi ile kontrol etmek mümkündür. Non-iyonik emülsüfyerlerle stabilize edilen nano-emülsiyonların teorik olarak partikül yüklerinin olmaması beklenir ancak çoğunlukla dağılan fazda bulunan serbest yağ asitlerinden ya da safsızlıklardan kaynaklı olarak negatif yük taşırlar. İyonik emülsüfyerlerden anyonik sürfaktanlarla (örneğin lesitin) stabilize edilen nano-emülsiyonlar negatif yükü yüklenirken, katyonik emülsüfyerlerle stabilize edilen nano-emülsiyonlar (örneğin laurik aljinat) pozitif yükü yüklenir. Hidrofilik fonksiyonel gruplar içeren

sümfaktanlar nötr, pozitif yüklü ya da negatif yüklü olabilirler. Proteinler buldukları çözeltilerin pH değerinin izoelektrik noktalarına (pI) olan etkisine bağı olarak nötr, pozitif yüklü ve negating yüklü olmaları mümkün olabilmektedir. Ortam pH <pI olduğunda pozitif yükle yüklenirler, pH=pI olduğunda net olarak bir yükleri olmazken, pH>pI olduğunda ise negatif yükle yüklenirler. Yüzey aktif polisakkaritler yine iskeletlerinde bulunan fonksiyonel grupların türüne göre bir elektrik yüke sahip olurlar. Mineral iyonlar ve polielektrolitler gibi yüklü hidrofilik bileşikler de emülsüfyerle kaplanmış nano-emülsiyonların yüzeylerine adsorbe oldukları zaman yüklerinde değışikliğe sebep olabilirler. Gam arabik ve modifiye nişastalar gibi ticari olan bir çok polisakkarit emülsüfyerler sülfat ve karboksil gruplarının varlığından kaynaklı olarak negatif yükle yüklü olma eğilimindedirler (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015).

Nano-emülsiyonların partikül yükleri yüzey yük yoğunluğu (σ), elektriksel yüzey potansiyeli (ψ) ve zeta potansiyeli (ζ) ile karakterize edilebilir. Yüzey yük yoğunluğu, birim yüzey alanı başına elektrik yükü miktarı iken, yüzey potansiyeli; sıfırdan σ 'ya kadar yüzey yük yoğunluğunu arttırmak için gereken serbest enerjidir. Zeta-potansiyeli ise bir ortam içinde askıda kalan bir partikülün etkili yüzey potansiyeli olup, çevreleyen ortamdaki yüklü türlerin damlacık yüzeyine adsorbe olabileceğini ve net yükünü değıştirebileceğini hesaba alan bir ölçüm yöntemidir. Nano-emülsiyon damlacıklarının yükü etrafında bulunan yüklü bileşiklerle nasıl etkileşim içine girebileceği hakkında bilgi vermesi bakımından önemlidir. Zıt yüklü iyonlar birbirini çekerken, aynı yüklü iyonlar birbirlerini iteceklerdir. Nano-emülsiyon damlacıklarının net yükleri yeteri kadar büyük olduğunda birbirleri arasındaki elektrostatik itme gücü onların topaklanmalarını önler. Su fazının pH değeri ayarlandığında ya da ortama iyonik dengeyi bozacak miktarda tuz eklendiğinde nano-emülsiyonlarda agregasyon meydana gelir (McClements and Rao, 2011; McClements, 2015).

2.3. Lipit Taşıyıcı Nano-emülsiyon Salınım Sistemleri

Gıdalara uygulanabilir olan nanotaşıyıcı sistemler; karbonhidratlar, protein ve lipit bazlı sistemler olabilir. Karbonhidrat ve protein temmelli nanotaşıyıcıların birçok avantajlı yanı bulunmasına ragmen, farklı kompleks kimyasal ve ısıl işlemlerin uygulanmaları durumlarında tamamen kontrol edilememelerinden ötürü her zaman

uygun olamayabilmektedirler. Diğer yandan, lipit kaynaklı taşıyıcı sistemler endüstriyel olarak üretim, daha fazla enkapsülasyon etkinliği ve düşük toksisite gibi kuvvetli avantajlara sahiptirler (Fathi *et al.*, 2012).

Nano-emülsiyonların en yaygın olarak yararlanıldığı fonksiyonel özellikleri vitaminler, aromalar, antioksidanlar ve koruyucular gibi birçok lipofilik bileşiğin enkapsülasyonuna olanak vermeleridir. Enkapsülasyonla bu bileşiklerin elde edilmeleri ve yararlanımları kolaylaşır, biyoyararlanılabilirlikleri artar ve kimyasal parçalanmaya karşı korunmuş olurlar. Küçük boyutlu lipit taşıyıcılarla enkapsüle edildikleri zaman lipofilik bileşiklerin biyoyararlanılabilirliklerinin arttığını gösteren birçok çalışma mevcuttur. Bu artışa neden olan çok sayıda sebep bulunmaktadır. Küçük damlacıkların daha büyük yüzey alanına sahip olmaları sebebiyle sindirim enzimleriyle daha hızlı şekilde sindirilebilirler ve damlacık boyutu küçüldüğünde lipofilik bileşiklerin suda çözünürlükleri arttığı için absorbe olmaları iyileşir. Küçük emülsiyon damlacıkları ince bağırsaktaki epitelyum hücrelerini kaplayan mukus tabakasından geçebilirler ve böylece emilim bölgesinde kalma süreleri artar ve absorpsiyon alanına daha yakın olurlar. Oldukça küçük olan damlacıklar epitelyum hücre tabakasından paraselüler ya da transselüler mekanizmayla doğrudan da taşınabilirler (McClements and Rao, 2011).

2.3.1. Nano-emülsiyonlar, SLN'ler ve NLC'ler

Nano-emülsiyonlar normalde sıvı formdaki yağlardan üretilseler de son uygulama sıcaklığında tamamen ya da kısmen kristalize olabilen yağ fazlarının kullanımı da mümkündür. Bu durumlarda nano-emülsiyonların oluşum aşamasında yağ fazının sıcaklığının, yağ fazının erime noktasının üzerinde tutulması gerekmektedir. Oluşturulan nano-emülsiyon damlacıklarının kristalize olması sıcaklığın uygun şekilde yağ fazının erime noktasının altına düşürülmesiyle sağlanır. Katı lipit nanopartiküller (SLN) ve Nanoyapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemler nano-emülsiyonların bu yaklaşımla modifiye edilmiş formlarıdır. SLN'lerde nano-emülsiyon yağ damlacıkları katı yağ ile formüle edilip mükemmel dizilimli kristallerden oluşturulurken, nanoyapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemlerde yağ fazı sıvı ve katı yağ karışımı ile formüle edilip nano-emülsiyona dönüştürüldükten sonra yağ damlacıklarının kısmen kristalizasyonu sağlanarak daha düzensiz kristallere ya da amorf bir katı yapıya dönüştürülmesi amaçlanır. Nano-emülsiyonlarda emülsüfiye

edilmiş yağın kristalizasyon sıcaklığı aynı yağın yığın haline göre super soğutma etkisi olarak adlandırılan olayın sonucu olarak daha düşük bulunur. Bununla birlikte nano-emülsiyonların dağılan yağ fazında oluşan kristallerin yapısı yığın haldeki yağa göre eğilme etkisinden (curvature effect) dolayı farklılık gösterebilir, partiküllerin üç boyutlu şekillerinin küre şeklinde olması kristallerin gelişmesi için gereken alanı kısıtlar. SLN ve NLC sistemlerinin önemli bir avantajı, lipit fazından molekülerin difüzyon hızının azaltılabilir olmasıdır. Bu durum kimyasal degradasyon reaksiyonlarını yavaşlatarak kapsüllenmiş lipofilik bileşenlerin stabilitesini arttırabilir (Fathi *et al.*, 2013).

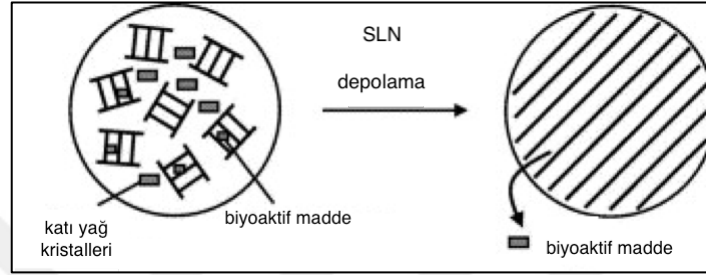
2.3.1.1. Nano-emülsiyon sistemlerin uygulamaları

Nano-emülsiyonlar toksikolojik açıdan güvenlidir, yüksek miktarda lipit içerirler ve büyük çapta üretime uygundur. Klasik emülsiyonlara göre faz ayırımına karşı stabildirler ancak yine de termodinamik olarak stabil olmamaları, kinetik olarak uygun koşullarda stabil olmaları sebebiyle; depolama sırasında Oswald olgunlaşması, flokülasyon, partikül agregasyonu vb. olaylar gerçekleşebilmektedir. Nano-emülsiyonlar asidik ortamlarda stabil değillerdir ve taşıyıcı fazın sıvı olmasından dolayı biyoaktif maddelerin kontrollü salınımı için çok uygun değillerdir. Nano-emülsiyonların asidik ortamlara karşı stabilitesinin kitosan vb. polimer uygulamalarıyla artırılarak lipaz aktivitesiyle parçalanmalarının kontrolünün sağlandığı çalışmalar mevcuttur (Klinkesorn and McClements, 2009).

2.3.1.2. SLN Sistemlerin Uygulamaları

1990'lı yılların başında SLN sistemler diğer taşıyıcı sistemlerden polimer partiküllerin, lipozomların ve emülsiyonların dezavantajlarına karşı alternatif bir taşıyıcı sistem olarak önerilmiştir (Radomska-Soukharev and Muller, 2006; Weiss *et al.*, 2008). SLN sistemler bir ya da daha fazla katı lipit kullanılarak üretilmektedir. Biyoaktif bileşenin partikül içerisindeki lokasyonunun kontrolünü SLN'lerin lipit matriksinin fiziksel halini kontrolüyle sağlamak mümkün olmaktadır. SLN sistemlerde difüzyon hızı yavaş olduğundan nano-emülsiyonlara kıyasla lipit fazın katı olmasıyla daha uzatılmış bir salınım profili elde edilebilmektedir. Birçok avantajına rağmen SLN sistemlerin hala yetersiz olduğu hususlar mevcuttur. En önemli dezavantajı depolama sırasında düşük miktarda biyoaktif bileşen yüklenmesi ve katı lipit fazda meydana

gelen polimorfik değişimin (α form \rightarrow β' form \rightarrow β form) sonucu olarak partikülün patlayarak biyoaktif bileşenin ortama dağılması stabilitenin kaybolmasıdır (Şekil 2.7). Partiküllerin aynı tür kristallerler içermesinden dolayı kristal yaprakları çok düzgün dizilimli kristal çekirdeklenmeleri oluşturduğundan aktif maddenin yüklenebilmesi için sınırlı alan kalmaktadır. Bu dezavantajlar salınım sistemlerinde SLN sistemlerin kullanımını sınırlandırmaktadır (Fathi *et al.*, 2012; Tamjidi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Yalcinoz and Ercelebi, 2018).



Şekil 2.7. SLN sistemlerde depolama sırasında aktif maddenin nano-emülsiyon damlacıklarından dışarı çıkmasının şematik gösterimi (Weiss *et al.*, 2008)

2.3.1.3. NLC Sistemlerin Uygulamaları

NLC sistemler SLN sistemlerin dezavantajlarını gidermek amacıyla 1990 lı yıllarda SLN lerin modifikasyonu ile geliştirilmiştir. NLC partikülleri kısmen kristalize olmuştur ve sıvı ve katı yağ karışımından oluştuklarından daha az düzenli kristallenmeler meydana gelir. NLC sistemlerde amaçlanan sıvı formdaki yağın kristallenmesi katı yağ içerisinde biyoaktif maddelerin enkapsüle olabileceği kompartmanlar meydana getirmesini sağlayarak SLN'lere göre daha fazla aktif bileşenin partiküller içerisinde stabilizasyonunu sağlamaktır. NLC sistemlerin yağ fazını oluşturan lipit karışımı daha yavaş polimorfik form geçişine uğrar ve kristallenme indeksleri daha azdır. Böylece SLN sistemlerdeki daha az aktif madde yüklenmesi, partiküllerin parçalanması sonucu aktif bileşenin ortama dağılıp kimyasal parçalanmaya maruz kalmaya müsait hale gelmesi, stabilitenin kaybolması, biyoyararlanımın ve kontrollü salınımın iyileştirilememesi gibi sorunlarına NLC sistemleri ile çözüm üretilmiş olmuştur. Ancak NLC sistemler üretilirken dikkate alınması gereken bazı noktalar vardır. Katı ve sıvı yağdan oluşan yağ fazının emülsüfiye edilmeden önce sıvı forma getirilmesi biyoaktif bileşenin katı ve sıvı yağda tamamen çözündüğünden emin olunması gerekir. Ayrıca çözündürme işlemi sırasında aktif maddenin ışıktan etkilenmemesi ve oksidasyonla kimyasal parçalanmaya

uğramaması için gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Yine üretim öncesinde yağ fazının hazırlanması sırasında uygulanan ısıl işleme karşı lipit fazın oksidatif stabilitesinin sağlanması gerekmektedir. Yağ fazında kullanılmak üzere seçilen yağların toksikolojik profillerinin kabul edilebilir olması gıdalarda ve farmakolojik uygulamalarda kullanımları bakımından önem arzeder. Bu bağlamda nanoyapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemlerin formulasyonlarında orta zincir uzunluklu trigliseritler (MCT), oleik asit ve oleik asitçe zengin yenilebilir yağlar, mısırözü yağı, soya çekirdeği yağı ve ayçiçek yağı gibi yağlar tercih edilebilmektedir. Kısmi olarak kristalizasyonla nano-emülsiyon damlacıklarının stabilizasyonunu sağlamak amacıyla çok çeşitli katı formdaki yağların kullanımı söz konusudur. Gliseril behenat, gliseril monosterat, setilpalmitat ve stearik asit en yaygın olarak kullanılanlara örnektir. Oda koşullarında katı olan bu yağlardan setil palmitat dışındakiler GRAS onaylı olup ticari olarak elde edilmeleri mümkündür. Ayrıca bu katı yağlar kısmen yüzey aktif özellik taşımakta, aktif bileşenin içinde bulunacağı kafes bölgelerin oluşumunu sağlamaktadır. Stearik asit, uzun zincirli bir doymuş yağ asididir ve hayvansal ve bitkisel kaynaklarından elde edilebilen lipitlerin birincil bileşeni olup, sentetik olarak üretilenlere kıyasla daha iyi biyouyumluluk ve daha düşük toksisiteye sahiptir. Ancak stearik asitin vücut sıcaklığının çok üzerinde (69.6°C) erime noktasına sahip olması dikkate alınması gereken önemli bir husustur. Nanoyapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemlerde SLN'lere kıyasla kullanılan yağ fazı içeriğinde katı fiziksel formu sağlayarak partikül oluşturmak amacıyla daha az olsa da hala belirli oranda katı yağ kullanılmaktadır. Doymuş yağ içeriği yüksek olan katı yağların sağlık üzerine olumsuz etkisi özellikle kardiovasküler rahatsızlıklara neden olması bilimsel olarak kanıtlanmış bir gerçektir (Fathi *et al.*, 2012; Tamjidi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Yalcinoz and Ercelebi, 2018).

2.4. Organojelin Tanımı

Jel tanımlanması zor bir kavram olmakla beraber yapılan ilk tanımlar bu zorluğu yansıtır şekilde olmuş “tanımlanması farkedilmesinden daha zor olan kolloidal bir durum” ve “eğer jöle gibi görünüyorsa jeldir” şeklinde tanımlamalar yapılmıştır (Lloyd, 1926; Ferry, 1980; Almdal *et al.*, 1993). Bu tanımlamaların yanı sıra ortak varılan kanılar; jelin sıvı bileşen ve katı jelatör bileşen olmak üzere en az iki bileşenden oluştuğu ve jelin katı mekanik özelliklere sahip olduğu, her iki bileşeninde tüm jel

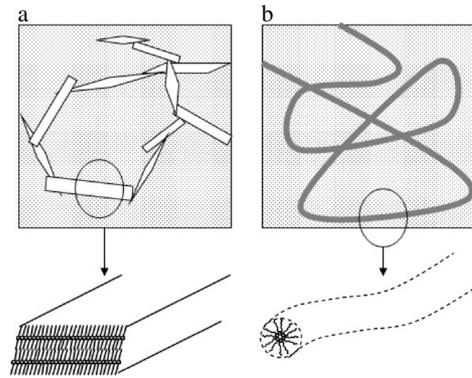
sisteminde devam eden sürekli bir yapı oluşturduğu yönünde olmuştur. Jelin ayrıntılı tanımı Flory (1953) tarafından yapılmış, “analitik bir deneyin zaman ölçeğinde kalıcı olan makroskopik boyutlara sahip sıvı bir sürekli fazdan oluşan ve reolojik olarak katı benzeri özellik gösteren yapılar” olarak tanımlanmıştır. Jeller likit fazın doğal yapısına bağlı olarak hidrojeller ve organojeller olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadırlar. Hidrojeller immobilize edilen bileşenin su olduğu; organojeller ise immobilize sıvının organik solventler ya da yağ gibi hidrofobik bir bileşen olduğu jel türleridir (Co and Marangoni, 2012). Organojelin daha ayrıntılı tanımında ise; sıcaklıkla geri dönüşümlü üç boyutlu jel ağlar içine organik sıvıların hapsedildiği jel yapılar olarak tanımlanmıştır (Rogers *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2009; Bot *et al.*, 2009b; Co and Marangoni, 2012; Rehman and Zulfakar, 2014). Yağların ya da organik çözücülerin (hegzan, benzen gibi) jelasyonu ile elde edilen organojellerin kimya, çevre, farmakoloji, kozmetik gibi birçok alanda uygulamaları olmakla birlikte gıda alanındaki yenilebilir uygulamaları, genel olarak tanımlanan organojellerden ayırmak amacıyla bir çok çalışmada “oleojel” terimi ile ifade edilmektedir (Dassanayake *et al.*, 2011; Ogutcu and Yilmaz, 2015; Davidovich-Pinhas *et al.*, 2015; Mert and Demirkesen, 2016b; Wang *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017; Ghosh *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2017; John *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2018; Moghtadaei *et al.*, 2018; Giacomozzi *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018a).

Oleojel teknolojisinin gıda alanında önemli olmasının en önemli sebebi mevcut trigiliserit yapılandırma yöntemlerine alternatif bir yöntem olmasıdır. Yağların fiziksel yapıları ve fonksiyonel özellikleri yapılarında ihtiva ettikleri yüksek erime noktasına sahip yağlara bağlıdır. Genel olarak katı yağlar oksidatif stabilite ve gıdalarda istenen fonksiyonel yapıların oluşumu ve kullanım şekli bakımından sıvı yağlara kıyasla daha arzu edilen özelliklere sahiptir. Nihai ürünün tekstürel yapısı, sürülebilirliği, gevrekliği, raf ömrü ve aroması bahsedilen bu fonksiyonel özelliklerdendir. Doymuş yağ ve *trans* yağ içeriği yüksek olan shortening ve margarinlerin market raflarında yer alan birçok ürünün formülasyonlarının vazgeçilmez bir parçası olması yine bu fonksiyonel özellikleri sunacak alternatif yapılandırma yöntemlerinin olmaması sebebiyledir. Ancak *trans* ve doymuş yağların tüketiminin kardiyovasküler problemlere neden olduğu, *trans* yağların hem kötü kolesterol olarak bilinen LDL değerini yükselttiği hem de iyi kolesterol olarak tabir edilen HDL değerini düşürdüğü, doymuş yağların tüketiminin ise iyi kolesterole etki etmezken yine kötü kolesterol

değerini yükselttiği keşfedilmiştir (Mensink and Katan, 1990; Judd *et al.*, 1994; Nestel, 1999). Yüksek oranda *trans* ve doymuş yağ tüketiminin sağlık üzerine olan olumsuz etkilerinin bilimsel camiada birçok çalışma ile ispatlanması ile katı yağ üretim endüstrisi üzerinde oluşan yoğun baskı sonucu sağlıksız yağların yerini sağlıklı yağlarla yer değiştirerek, doymuş yağ miktarını azaltmaya ve *trans* yağ içeriğini elimine etmeye olanak sağlayabilecek organojelasyon tekniği keşfedilmiştir. Halihazırda kullanılan katı yağların fonksiyonelliğini verebilecek olan bu teknik, sıvı yağların içerisine jelatör görevi gören alışılmadık bileşenlerin eklenmesi sonucu katı özellikte oleojellerin oluşturulması ile sağlanmaktadır. %0,5 gibi çok düşük oranlarda dahi kullanıldıklarında kendiliğinden birleşim sağlayan bu jelatör bileşiklerin büyük çoğunluğu düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir (Dassanayake *et al.*, 2011; Co and Marangoni, 2012; Singh *et al.*, 2017).

2.4.1. Organojelatörler ve Sınıflandırılması

Çok bilinen hidrojel sistemlere kıyasla organojellerin çok farklı karakteristik özelliklere sahip oldukları görülmektedir. Bu farklılıklardan en önemlileri protein, nişasta, aljinat ve kazein jellere kıyasla polimerik jelatörlerden oluşmak yerine daha düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerden meydana gelmektedirler. Organojelatör olarak adlandırılan bu bileşikler düşük moleküler ağırlığa sahip olmalarına rağmen jelatör etkiyi göstermeleri için çok düşük konsantrasyonların yeterli olması büyük bir paradokstur. Bu sıradışı durum organojelatörlerin non-kovalent interaksiyonlarla bağlanmalarını sağlayan supramoleküler özellikleriyle açıklanmaktadır. Jelasyonu sağlayan bu etkileşimler hidrojen bağları, π - π etkileşimleri, elektrostatik ve van der Waals interaksiyonlarıdır (Okesola *et al.*, 2015).



Şekil 2.8. Jel oluşturma mekanizmaları bakımından organojelatör türleri; a) kristal partikül oluşturanlar, b) kendiliğinden birleşim kuranlar (Dassanayake *et al.*, 2011)

Organojelatörlerin önemli diğeri bir karakteristik özellikleri de faz davranışlarıdır. Organojel oluşumunu belirleyen unsurlardan biri de jelleştirilecek sıvı yağın türüdür. Organojelatörün bir sıvı solventi jelle dönüştürme yeteneği solventte çözünürlük ve çözünmezliğin dengesiyle alakalıdır. Bu durumu açıklamak gerekirse; jelatörün jelleştirilecek yağda kristalize olması ya da kendiliğinden birleşim kurması için kısmen çözünmemesi gerekir. Aynı zamanda kısmen çözünmeside gerekir ki, sıvı solvent ile etkileşim gösterebilsin. Tersine durumda eğer jelatör solventte çok iyi çözünürse jel yapı yerine çözelti meydana gelir. Ya da hiç çözünmezse bu kez de jel yerine çökelti meydana gelir (Co and Marangoni, 2012). Bu bağlamda jelleştirilecek sıvı yağın polaritesi ya da apolaritesi jelasyon için gereken jelatör konsantrasyonunda etkili rol oynamaktadır (Wright and Marangoni, 2006). Günümüze kadar ki bütün jelatörlerin keşfi genel olarak ya deneme yanılma yoluyla ya da tesadüfen gerçekleşmiştir.

Oleojelatörler genel olarak jel oluşturma mekanizmaları bakımından, kendiliğinden birleşim kuran sistemler ve kristal partikül oluşturan sistemler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Yağ fazında moleküler düzeyde kendiliğinden organizasyon ile organojel meydana getirenler kendiliğinden birleşim kuran sistemleri oluştururken; kristal partiküllerin yağ fazında çekirdek oluşumu ve devamında kristal büyümesi yoluyla organojel oluşturan organojelatörler de kristal partikül oluşturan sistemleri meydana getirmektedir (Şekil 2.8). Oluşum mekanizmalarına göre polimer yapılı organojelatörleri de dikkate alınarak yapılan daha genel bir sınıflandırmada jelasyon işlemi sırasında kimyasal etkileşimin olup olmaması durumuna göre fiziksel ve kimyasal organojeller şeklinde de yapılabilmektedir. Jelatör molekülleri arasında meydana gelen etkileşim bağ yapılarında meydana gelen kalıcı bir değişimi içeriyorsa kimyasal jel; daha zayıf olan hidrojen bağları, van der Waals ya da π - π etkileşimini içeren fiziksel etkileşimlere sahipse fiziksel jelleri meydana getirdikleri şeklinde sınıflandırmalar mevcuttur (Bohidar, 2001). Bu açıdan meydana gelen fiziksel ve kimyasal jeller arasındaki en önemli farklılık; fiziksel jellerin çoğunlukla sıcaklıkla geri dönüşümlü olmaları, kritik sıcaklığın altında jel yapıda, üstünde ise sol özellikte olmalarıdır (Sagiri *et al.*, 2014; Davidovich-Pinhas *et al.*, 2016).

Tablo 2.2. Oluşum mekanizmasına göre bazı organojelatörler

Düşük Molekül Ağırlıklı Jelatörler		
Jelasyon mekanizması	Referanslar	
Kendiliğinden bileşim kuran fibril sistemler	Fitosterol + Orizanol	(Sawalha <i>et al.</i> , 2013; Bot and Agterof, 2006; Bin Sintang <i>et al.</i> , 2017)
	Sorbitan Mono, di, tri-stearat	(Murdan <i>et al.</i> , 1999; Jibry <i>et al.</i> , 2006; Almeida and Bahia, 2006; Sagiri <i>et al.</i> , 2016)
	Monoaçilgliseroller	(Sein <i>et al.</i> , 2002; Yaghmur <i>et al.</i> , 2006; Aguirre-Mandujano <i>et al.</i> , 2009; Da Pieve <i>et al.</i> , 2010)
	Seramidler	(Rogers <i>et al.</i> , 2009b)
	Şeker yapılı jelatörler	(Vibhute <i>et al.</i> , 2016; Rajkamal <i>et al.</i> , 2017; Soundarajan <i>et al.</i> , 2018)
Kristal partikül sistemler	Vaks esterleri	(Daniel and Rajasekharan, 2003)
	Yağ asitleri, Yağ alkolleri ve karışımları	(Daniel and Rajasekharan, 2003; Gandolfo <i>et al.</i> , 2004; Schaink <i>et al.</i> , 2007)
	Yağ asidi türevleri	(Wright and Marangoni, 2006; Rogers <i>et al.</i> , 2009a; Mallia <i>et al.</i> , 2009)
	Dikarboksilik Asitler	(Cornwell <i>et al.</i> , 2013)
	Triaçilgliseroller	(Higaki <i>et al.</i> , 2003)
	Lesitin + Sorbitan Mono-di-tristearat	(Kumar and Katare, 2005; Perneti <i>et al.</i> , 2007a; Avramiotis <i>et al.</i> , 2007)
Bitkisel vakslar: Kandelilla vaks, Karnouba vaks, Piriç Kepeği vaksı, Ayçekirdeği vaksı, balmumu, meyve vaksı	(Toro-Vazquez <i>et al.</i> , 2007; Dassanayake <i>et al.</i> , 2009; Hwang <i>et al.</i> , 2012; Patel <i>et al.</i> , 2015a; Doan <i>et al.</i> , 2015; Ogutcu <i>et al.</i> , 2018; Soleimanian <i>et al.</i> , 2018)	
Polimer Jelatörler		
Jelasyon mekanizması	Referanslar	
Fiziksel bağlar	Polisakkaritler; Etilselüloz	(Laredo <i>et al.</i> , 2011; Co and Marangoni, 2012)
Çapraz bağlanma	Proteinler; whey proteini, β -laktoglobulin	(Romoscanu and Mezzenga, 2006; Sarkar <i>et al.</i> , 2016)

Organojelatör özellik taşıyan çok sayıda polimer yapılı jelatör olmasına rağmen şu ana kadar mevcut olanlardan etil selüloz ve bazı proteinlerin gıdalarda kullanımı uygundur (Co and Marangoni, 2012). Protein ve polisakkarit yapılı bu jelatörlerin diğer jelatörlerden en önemli farkı doğrudan yapılandırılacak olan yağda dağılımlarını sağlanmasının zor olması sebebiyle, yürütülen çalışmalarda bu bileşiklerle elde edilen yumuşak yapılı jelleşmiş yağ önce yağın bu bileşiklerle emülsüfiye edilip sonra

yapıdan suyun çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılmasıyla sağlanmaktadır (Romoscanu and Mezzenga, 2006; Patel *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2015b).

Oleojelatörleri tanımlamada kullanılan başka bir sınıflandırma ise kullanılan jelatör komponenti sayısına göre tekli bileşenli ya da karışımli bileşenli organojelatörler şeklindedir. Karışım olarak kullanıldığında jelatör fonksiyonuna sahip olduğu bilinen üç grup jelatör karışımı vardır, bunlar; yağ asitleri ve yağ alkolleri, lesitin ve sorbitan tristearat ve γ -orizanol ve β -sitosterol karışımlarıdır. Birden fazla bileşen kullanılarak jelatör etki gösterip bitkisel yağların yapılandırıldığı sistemlerde; karışımı oluşturan bileşenlerin minimum jelatör konsantrasyonunda jelatör işlevi kazandığı uygun oranların belirlenmesi gerekmektedir (Bot *et al.*, 2009b).

2.4.1.1. Lipit taşıyıcı sistemlerde en yeni yaklaşım: Organojel nano-emülsiyonlar

Yağ fazının organojel oluşumuna uygun tasarlandığı ancak katı lipit nanopartiül olarak adlandırıldığı çalışmalar literatürde mevcut olup, organojelasyon tekniğinin popülerite kazanması ile birlikte son yıllarda yayınlanan çalışmaların başlığında organojel yapıli lipit taşıyıcı sistemler yer almaya başlamıştır.

İlk olarak farmakoloji alanında nano boyutlu jelleştirilmiş yağ partikül ifadesine yer verilmiş olup, dikaprilil eterin 12-hidroksi sterik asitle yapılandırılarak setiltrimetil amonyum bromid ve hidrolize provinil alkolle emülsüfiye edilerek, 20 kHz 600W enerji koşullarında toplam 10 dk sonikasyonla submikron boyutlara düşürülmüş, yağ fazının jelleştirilmesi sonucunda nonopartikül dağılmış sistemin stabilitesinin iyileştiği ifade edilmiştir (Kirilov *et al.*, 2008).

Gıda alanında organojel teknolojisinin yaygınlaşmasıyla tasarlanan organojel emülsiyon sistemlerinde aktif bileşenlerin immobilizasyonu denemiş ve Yu ve Huang (2012) tarafından yayınlanan çalışmada Tween 20 ile emülsüfiye edilen lipit fazında kurkuminin taşındığı nano-emülsiyon sisteminde yürütülen deneylerde *in vitro* sindirim sistemi koşullarında organojel partikülde sindirimle salınımın daha kontrollü olduğu ve yine *in vivo* farmokinetik çalışmayla farelerde ölçülen biyoyararlanım düzeyinin yapılandırılmamış partiküllere kıyasla yaklaşık 9 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

D-limonenin organojel lipit taşıyıcı sistemde yüksek basınçli homojenizatörüyle üretildiği bir çalışmada (Zahi *et al.*, 2014), farklı homojenizasyon koşullarının ve emülsüfiyerlerin denenmiş olup en düşük partikül boyutunun Tween 80 ile elde edildiği (112 nm) ve homojenizasyon koşullarının partikül boyutu üzerinde anahtar role sahip olduğu bulgularla belirtilmiştir. İki hafta boyunca farklı sıcaklıklarda stabilitenin takip edildiği örneklerde D-limonenin organojel içerisine homojenizasyon öncesi ilavesinin stabiliteyi artırdığı ifade edilmiştir. Devamında yayınlanan çalışmada ise D-limonen içeren organojel nano-emülsiyon sistemin antimikrobiyal etkisi serbest formdaki D-limonen ile kıyaslanmış ve organojel yapılı nano-emülsiyon sistemi ile D-limonenin antimikrobiyal aktivitesinin daha iyileştirilmiş olduğu ve nano-emülsiyon formun mikroorganizmaların membranları üzerinde hasar verici etkisinin olduğu bildirilmiştir.

Yine D-limonen içeren organojel nano-emülsiyon sisteminde bir çalışmada (Bei *et al.*, 2015) yağ fazına nizin ilavesinin antimikrobiyal etkisi minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC), bakteri gelişim eğrileri, SEM görüntüleri ve hücre yapılarının salınımının analizi ile doğrulanmış, sonrasında gıda koruyucusu olarak süt örneği üzerinde test edilmiştir. Nizin içeren organojel nano-emülsiyonun gıda formülasyonlarında koruyucu olarak etkili bir antimikrobiyal olabileceği önerilmiştir.

Gıda saflığında nano-emülsiyon sistemin tasarlandığı bir başka çalışmada (Lu *et al.*, 2016) orta zincir uzunluklu trigliserit organojelatör olarak sukroz stearatla yapılandırılarak, acı biberin majör aktif bileşiği olan kapsaisin bileşiği yüklenmiş, sonikasyon işlemiyle Tween 80 varlığında emülsüfiye edilen organojel fazın partikül boyutu 168 nm'ye kadar düşürülmüştür. Biyoyararlanım oranının iyileştirildiğinin ifade edildiği çalışmada ayrıca kapsaisinin neden olduğu gastrik mukoza iritasyonunun azaltıldığı vurgulanmıştır.

Güncel bir çalışmada (Fan *et al.*, 2017) mısır özü yağı, hindistan cevizi yağı ve orta zincir uzunluklu trigliseritin jelatör olarak monostearinle yapılandırılmasıyla hazırlanan organojeller, kendi formülasyonlarının emülsüfiye edilmiş formlarıyla kıyaslanmıştır. En yüksek biyoyararlanım oranı ve en uzun lipoliz süresi mısırözü yağı organojelinin Tween 20 ile emülsüfiye edildiği Organojel Nano-emülsiyon örneklerinde ölçülmüş, emülsüfiye edilmemiş formuna göre biyoyararlanım oranı fareler üzerinde *in vivo* koşullarda yürütölen farmakokinetik analiz sonucunda 11,5 kat

daha yüksek bulunduğu ifade edilmiş, benzer sonuç *in vitro* koşullarda hücresel alım testi ile de doğrulanmıştır.

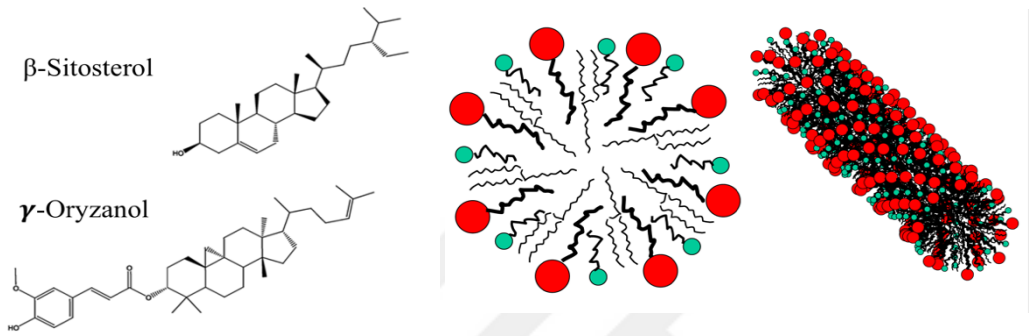
2.4.2. Tez Kapsamında Kullanılan Organojelatörler

γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı:

γ -orizanol en çok pirinç kepeği yağında doğal olarak bulunan ve β -sitosterol ise birçok bitkisel yağın bileşiminde bulunan fitosterollerdir. Doğrudan yenilebilir bir kaynaktan elde edilmeleri dolayısıyla gıda formülasyonlarında rahatlıkla kullanılabilir olmaları bu jelatör karışımını diğer jelatörlerden ayıran önemli farklılıklardan biridir (Bot and Agterof, 2006; Perneti *et al.*, 2007b). Bu iki bileşenin karışımının ayçiçeği yağında yapılandırma ajanı olarak kullanıldıklarında transparan görünümlü ve uzun süre dayanıklı jel yapı oluşturabilmelerinin Heike *et al.*, (1997) tarafından keşfiyle bu bileşenler üzerine araştırmalar giderek artmıştır. Organojelatör karışımında bulunan β -sitosterol ile organojel oluşumunda benzer işleve sahip olabilecek dihidrokolesterol, kolesterol, stigmasterol gibi birçok fitosterol vardır (Bot and Agterof, 2006; Bot *et al.*, 2009a). Ancak γ -orizanol yerine geçebilecek başka bir fitosterol henüz keşfedilememiş olsa da mümkündür (Leeson and Floter, 2002).

γ -orizanol ve β -sitosterol karışımının bitkisel yağlarda sıcaklıkla dağıtılıp soğutulmasıyla elde edilen jel yapının transparan olması jel yapıyı oluşturan blokların görünür ışığın dalga boyundan daha küçük olmasıyla açıklanabilmektedir. Moleküler düzeyde γ -orizanol ve β -sitosterol birbirine çok iyi şekilde paketlenmektedir, her iki bileşiğin tepesindeki sterol kısımları birbirine kenetlenerek γ -orizanolün ferulik asit kısmı çıkıntı yapmaktadır (Şekil 2.9). γ -orizanol ve β -sitosterol bileşikleri arasında hidrojen bağlarının varlığı neticesinde bir ucun daha kalın diğer ucun daha ince olduğu takoz şeklini andıran paketlenmiş yapı oluşumu, sarmal supramoleküler yapı oluşumuna zemin oluşturmuş ve bunun sonucu olarak çok ince fibril yapıtaşları meydana gelerek oluşan oleojel transparan görünüm kazanmıştır. γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı ile ayçiçek yağının yapılandırıldığı oleojellerde fitosterol karışımının $7,2 \pm 0,1$ nm çapında içi boşluklu borular şeklinde fibriller oluşturduğu bulunmuştur (Bot *et al.*, 2008). Yine ayçiçek yağında hazırlanan γ -orizanol ve farklı sterollerle oluşturulan oleojellerde iki molekülün kendiliğinden sarmal şeritler halinde kıvrılarak oluşturduğu fibril boruların çaplarının 6,7-8 nm aralığında olduğu boruların

duvar kalınlıklarının ise 0,8-1,2 nm aralığında olduğu ölçülmüştür (Bot *et al.*, 2009a). Ayrıca yapılan çalışmalarda organojel ağını oluşturan bu ince boruların çapının iki molekülün karakteri ile ilişkili olduğu, hapsedilen yağla, fitosterol/orizanol oranıyla ya da bu jelatör karışımının konsantrasyonuyla değışmediği bildirilmiştir (Calligaris *et al.*, 2014). Bu karışımın jelatör olarak kullanıldığında oluşan organojel, immobilizasyonu sağlayan ağın nano boyutta olması sebebiyle transparan görünmektedir (O'Sullivan *et al.*, 2016).

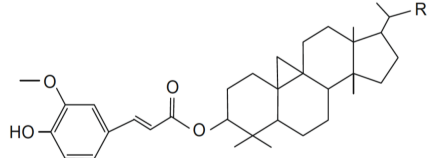


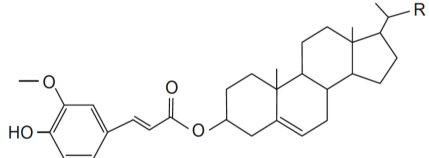




Şekil 2.9. γ -orizanol ve β -sitosterol karışımının paketlenerek sarmal yapılı nanofibrilleri meydana getirmelerinin şematik gösterimi (kırmızı uçlu molekül γ -orizanolü, yeşil uçlu β -sitosterolü temsil etmektedir) (Duffy *et al.*, 2009)

γ -orizanol ilk olarak pirinç kepeği yağından ekstrakte edildiğinde tek bir bileşik olduğu düşünölmüştür ancak, sonrasında yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilerek steril ferulatların karışımı olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bileşimine göre en az 10 fitosteril ferulattan oluşmakta ve 24-metilen siklo artenil ferulat, sikloartenil ferulat, β -sitosteril ferulat ve kampesteril ferulatin γ -orizanolün majör bileşenleri olduğu (Şekil 2-10) ve bileşiminin yaklaşık %80 ini bu bileşenlerin oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu bileşenlere ek olarak kafeik asit, *cis*-ferulik asit esterleri ve de çok az miktarlarda *trans* ferulik asidin stigmasterolle, D7-kampesteroller, D7 stigmasterolle, sitostenolkampestenol ve D7-sitostenol de γ -orizanolün bileşiminde bulunmuştur (Xu and Godber, 1999; Lloyd *et al.*, 2000; Akihisa *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2003; Lerma-Garcia *et al.*, 2009; Minatel *et al.*, 2016).

γ -orizanol ve β -sitosterol le kompleks oluşturarak yemeklik yağlarda organojel oluşturabilme fonksiyonunun yanı sıra antioksidan etkisi, kolesterol düşürücü etkisi ve anti-enflametuar etkisi amacıyla da farmakoloji, kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılan çok işlevli bir bileşiktir. Pirinç kepeği yağının sabunlaşmayan maddelerinin bileşiminde çoğunlukla bulunan biyoaktif bileşikleri; γ -orizanol, tokotrienoller ve

tokoferoller oluşturmaktadır. Bu yağın bileşimindeki γ -orizanol miktarı %0,9-2,9 aralığında ve tokollerin miktarı %0,1-0,14 aralığında değişkenlik göstermektedir (Lloyd *et al.*, 2000). Pirinç kepeği yağının sabunlaşmayan maddelerinin antioksidan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada majör bileşiklerinden γ -orizanolün diğer majör bileşenlerden tokollere kıyasla daha yüksek oranlarda yağların ve kolesterolün oksidasyonunu inhibe edici özellik gösterdiği bildirilmiştir (Rong *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2001; Xu and Godber, 2001). Yine bir başka çalışmada γ -orizanol BHA, BHT gibi sentetik antioksidan bileşiklerle kıyaslanmış ve çoklu doymamış yağ asidi bileşimi dolayısıyla oksidasyona eğilimli yağlar üzerinde lipit peroksidasyonunu inhibe ederek belli bir konsantrasyonun üstünde, dozajına bağlı olarak indüksiyon periyodunu uzattığı, 50-100 μ M konsantrasyon aralığında yağlarda çözünen organik radikalleri inhibe ettiği bulunmuştur (Juliano *et al.*, 2005). Fitosteroller serum kolesterollerinden LDL değerini düşürücü etkiye sahiptirler. Bitkisel kaynaklı olan bu bileşikler hayvansal sterollere yapısal benzerlikleri dolayısıyla bağırsaklarda emilim sırasında kolesterolün yerine geçerek kolesterol absorpsiyonunu inhibe etmekte ve salınımlarını artırarak metabolizmadan atılımlarını artırmaktadırlar. Pirinç kepeği yağı, γ -orizanol ve *trans* ferulik asitle beslenen farelerde 10 hafta sonunda ölçülen serum kolesterol değerlerinde en düşük LDL kolesterol düzeyinin γ -orizanol grubunda tespit edildiği yine HDL kolesterol değerlerini de yükselterek normal kan lipit profilinin oluşumunu sağladığı bildirilmiştir (Wilson *et al.*, 2007). Benzer sonuçlar başka çalışmalarla da elde edilmiştir (Sasaki *et al.*, 1990; Cicero and Gaddi, 2001; Tsuji *et al.*, 2003; Ausman *et al.*, 2005; Berger *et al.*, 2005).

Moleküler Yapı	R	Bileşik
		24-Metilsikloartanilferulat
		Sikloartenilferulat
		β -sitosterilferulat
		Kampesterilferulat

Şekil 2.10. Orizanolün dört majör bileşeninin kimyasal yapıları (Lerma-Garcia *et al.*, 2009)

Kandelilla Vaks

Vakslar fonksiyonel grup içerebilen uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşan yağsı yapılardır. Vaksların yapısında bulunabilen fonksiyonel gruplar alkoller, esterler, ketonlar ve aldehitlerdir. Elde edildikleri kaynaklar; bitkiler, böcekler, deniz canlıları ve petrol kaynaklı olabilmektedir. Kozmetik, boya, yüzey kaplama, mürekkep ve gıda endüstrisinde çeşitli vakslar halihazırda kullanılmaktadır. Petrol kaynaklardan elde edilenler yerine gıda, farmakoloji ve kozmetik sanayinde kullanılmak üzere biyolojik kaynaklı olanlar tercih edilmekte ise de bitkisel kaynaklardan elde edilenler bu amaca en uygun olan vaksları sağlamaktadır. Bilinen en yaygın bitkisel vakslar Kandelilla vaks ve Karnauba vaks olup, pirinç kepeği vaksı, ayçekirdeği vaksı ve çeşitli meyvelerden elde edilen vakslarda mevcuttur (Dassanayake *et al.*, 2011).

Yemelik yağların organojelasyonla yapılandırılmasında kullanılan şimdiye kadar keşfedilen organojelatörler arasında doğal kaynaklı vakslar; oldukça iyi yağ tutma özellikleri, oldukça düşük oranlarda jelasyon sağlamalarıyla ilişkili olarak ekonomik avantajları ve insanlarda tüketimlerine uygunluklarının onaylanmış olduğu birçok vaksın mevcut olması bakımından kullanımları en çok gelecek vaat eden jelatörlerdir. Vakslar kullanılarak üretilen organojellerin sıcaklıkla geri dönüşümlü olma ve emülsiyon stabilize edebilme gibi özellikleri onları daha da ilginç kılmaktadır (Hwang *et al.*, 2013; Blake *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2015a). Bitkisel kaynaklı vakslar arasında Karnauba vaks, Kandelilla vaks ve pirinç kepeği vaksı FDA tarafından gıda katkısı olarak kullanımlarının uygunluğu onaylanmış vakslardandır (O'Sullivan *et al.*, 2016).

Kandelilla vaks Kuzey Meksika ve Güneybatı Amerika Birleşik Devletleri bölgelerinde yetişen *Euphorbiaceae* ailesine mensup *Euphorbia cerifera* ve *Euphorbia antisiphilitica* bodur çalı türlerinin yapraklarından elde edilmektedir (Hare, 1910; Co and Marangoni, 2012). Kandelilla vaks FDA'nın 21CFR, 175.105, 175.320 ve 176.180 düzenlemelerine göre global olarak kabul edilmiş bir gıda katkısıdır. Kandelilla vaksının bilinen bileşimi %49-50 oranında 29 ile 33 karbon sayısı aralığındaki n-alkanlardan, %20-29 oranında 28 ile 34 aralığında çift sayılı karbonlu alkol ve asitlerin esterlerinden, %12-14 oranlarında alkollerden ve sterollerden ve %7-9 oranlarında serbest asitlerden oluşmaktadır (Toro-Vazquez *et al.*, 2007). Kandelilla vaksın n-alkan bileşimini büyük çoğunlukla hentriokontan ($C_{31}H_{64}$: %78,9)

oluşturmakla birlikte minör olarak nonacosane ($C_{29}H_{60}$: %4,2) ve tritriacontane ($C_{33}H_{68}$: %8) de bulunmaktadır. n-alkan yüzde bileşimi Kandelilla vaksın saflığına göre değişmektedir. Saflaştırılmamış Kandelilla vaksında n-alkan bileşimindeki oranları ($C_{31}H_{64}$: %33,2; $C_{29}H_{60}$: %2,5; $C_{33}H_{68}$: %4,5) saflaştırılmış olana kıyasla daha düşüktür. Bileşiminde çoğunlukla bulunan n-alkanlar karbon sayılarına bakıldığında genel olarak tek sayılı olup, iz miktarda çift sayılı olan triakontan ($C_{30}H_{62}$: %0,8) ve dotriakontan ($C_{32}H_{66}$: %0,4) da bulunmaktadır (Co and Marangoni, 2012). Kandelilla vaksın yemeklik yağlarda organojelasyonla yapılandırılmalarını sağlama kabiliyeti bileşimindeki n-alkanlar sayesinde gerçekleşmektedir. Her ne kadar bileşimindeki majör n-alkan hentrikontan olsa da çalışmalar iz miktarda bulunan çift sayılı karbonlu dotriakontanın Kandelilla vakstan elde edilen organojellerin fiziksel özellikleri üzerinde tahmin edilenden oldukça fazla etkisinin olduğunu göstermiştir (Morales-Rueda *et al.*, 2009a; Morales-Rueda *et al.*, 2009b). n-alkan çeşitlerinin organik sıvılarda ve daha az karbonlu diğer alkanlarda sıcaklıkla geri dönüşümlü organojeller oluşturabilme özellikleri çalışmalarla daha öncelerinde bildirilmiş olmakla birlikte (Abdallah *et al.*, 1999; Abdallah *et al.*, 2000), 24-36 karbon sayısı aralığındaki n-alkanlarda oluşturulan organojel örneklerinde karbon sayısı arttıkça organojellerin stabilitelerinin arttığı ifade edilmiştir (Abdallah and Weiss, 2000). Kandelilla vaksın çeşitli yemeklik yağlarda ve emülsiyonlarda organojel oluşumu termal ve fiziksel özellikleri bakımından araştırılmış (Toro-Vazquez *et al.*, 2007; Chopin-Doroteo *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2013; Toro-Vazquez *et al.*, 2013), shortening yerine kullanılabilir katı yağ alternatifi olarak çeşitli gıda formülasyonlarına katıldığında yapısal değişimler üzerine etkileri de ortaya konmuştur (Hwang *et al.*, 2013; Mert and Demirkesen, 2016a; Hwang *et al.*, 2016).

2.5. Simüle Edilmiş Sindirim Koşullarında Nano-emülsiyonların Davranışları ve Biyoyararlanımları

Ağızdan alındıktan itibaren ağız, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak koşullarını temsil eden gastrointestinal bölgelerden (GIT) (Şekil 2.11) geçişi sırasında nano-emülsiyonlar bir dizi kompleks fizikokimyasal ve fizyolojik olaylara maruz kalmaktadır. Nano-emülsiyon sistemlerin dizaynında bu GIT’da gerçekleşen olayların anlaşılması büyük rol oynamaktadır (McClements, 2015).

Gastrointestinal sistemde lipitlerin sindirimi hakkında bilgi sahibi olunması insan sağlığı üzerine etkilerinin araştırılması açısından önemlidir ve insan kan lipit profilinin takip edilmesinde, her bir makrobesinin sindirim üzerine etkisinin doygunluk ve doyma hissi ile ilişkisinin anlaşılmasında, sindirilemeyen ya da kısmen sindirilebilen yağların kullanımıyla kalori yoğunluğunun ayarlanması gibi unsurların araştırılmasında temel oluşturmaktadır (Marciani *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009).

Nano-emülsiyon salınım sistemlerinin ve içeriğine enkapsüle edilen biyoaktif bileşenlerin biyolojik akıbetleri hakkında bilgi sahibi olunması, bu bileşiklerin enkapsülasyon koşullarının optimize edilebilmesi ve tüketime uygunluklarına karar verilebilmesi bakımından önem arzeder. Partiküllerin boyutlarının nano skalaya indirgenmesi aktif bileşenlerin biyolojik özelliklerinde önemli değişikliklere neden olabilmektedir. Aktif bileşenlerin nano boyuta indirilerek biyoyararlanım miktarının artırılmasıyla yüksek dozda alımının toksikolojik etkiye sebebiyeti sorusu ve çözümleri araştırılmaları devam etmektedir (Hagens *et al.*, 2007; Bouwmeester *et al.*, 2009). Nano-emülsiyonların kompozisyonları, boyutları, yapıları, elektriksel yükleri ve ara yüzey karakteristikleri insan vücuduna alındıktan sonraki GIT akıbetlerini etkileyen bilinen önemli unsurlardır (McClements and Rao, 2011; McClements and Xiao, 2012; McClements, 2013).

Simüle edilmiş ortamların hazırlandığı testlerle *in vitro* koşullarda nano-emülsiyonların yapılarında meydana gelen değişimler, sindirilebilirlikleri ve aktif bileşiklerin salınım mekanizmaları yaygın olarak araştırılmaktadır. İnsan ya da hayvan sindirim sistemlerinin oldukça kompleks fizikokimyasal ve fizyolojik olaylar barındırması dolayısıyla birebir olarak simülasyonlarının zor olması sebebiyle her ne kadar *in vitro* sindirim sistemi modelleri ile *in vivo* modellerden elde edilen sonuçlar farklılık gösterebilir *in vitro* deneylerle nano-emülsiyonların biyolojik özellikleri üzerine araştırmalar yürütölmektedir (Hur *et al.*, 2011).

2.5.1. Ağız Fazı

Nano-emülsiyonların sindirim sırasında ağıza alımlarından itibaren maruz kaldıkları ilk bölge ağız boşluğudur. Ağız boşluğunda ilk olarak müsin polimeri, amilaz enzimi, sodyum ve kalsiyum tuzları içeren ve nötral pH ya sahip olan ağız salyası ile karışırlar. Salya ile karışmanın beraberinde sıcaklık değişimi, seyrelme,

kompleks akış ve zorlama etkilerine maruz kalırlar. Ağız salyası içeriğinde bulunan moleküller nano-emülsiyonların ihtiva ettiği yağ damlacıklarında ya da diğer kolloidal partiküllerde salya ortamındaki moleküllerin lipit damlacıklarını birbirine yaklaşması yönünde zorlamasının etkisiyle deplesyon ya da köprü kurma olarak adlandırılan flokülasyonun meydana gelmesine sebep olabilirler (McClements, 2015). Labaratuvar ortamında sindirim sistemi koşulları simüle edilirken ağız fazında dil ve ağız kavitesinin birebir taklit edilmesinin zor olması sebebiyle bu aşamada simüle edilmiş salya sıvısı ile karıştırarak çalkalama sıcaklık ve süre gibi koşullar uygulanmaktadır (McClements and Li, 2010).

Salya içeriğinde bulunan amilaz enzimi nano-emülsiyon formülasyonunda varsa eğer nişasta moleküllerini hidrolize ederek vizkozitelerinde farkedilir bir düşüğe sebebiyet verirler. Ayrıca ağız içerisinde damak, dil ve dişlerden oluşan ağız boşluğunun iç yüzeyi ile temas ederek duyuşal olarak algılanmasında önem arzeden ağız hissi meydana getirirler. Ağız fazında nano-emülsiyonların yapılarında meydana gelen emülsüfilyerlerin yer değiştirmesi, ya da salyadan gelen musin tarafından kaplanması gibi değişimler devamında takip eden GIT sırasında değişimler meydana getirerek sindirim hızı ve süresini etkileyebilirler. Ağız fazında salya ile karşılaşp ağız ortam koşullarındaki evresini tamamlayan sıvı materyal “bolus” ismi ile refere edilmektedir (McClements and Xiao, 2012; McClements, 2015)

2.5.2. Mide Fazı

Ağız fazındaki evresini tamamlayan bolus sıvısı yutulduktan sonra yemek borusundan (özefagus) geçerek gastrik sıvısı ile karıştığı mide fazına ulaşır, ince bağırsağa ulaşmadan önce burada önemli olayların cereyan etmesi sonucu birçok değişime uğrarlar. Mide gastrik sıvısı sindirim sırasında yüksek asitli içeriği sayesinde mikroorganizmaları deaktive ederek enfeksiyona karşı koruma sağlar ayrıca gıda matrikslerinin parçalanmasını kolaylaştırarak besinlerin daha kolay absorbe olmasına da yardımcı olur. Ağızdan herhangi bir şey alınmadan açlık durumunda mide öz sıvısı genellikle oldukça asidiktir ve pH değeri 1-3 aralığındadır. Ancak yemek yedikten sonra yenilen yemeğin miktarına ve türüne bağlı olarak pH değeri belirgin şekilde artış gösterir. Gastrik sıvı salgılanarak zamanla pH değeri tekrar asidik olana kadar devamlı olarak azalır. Mide gastrik ortamı aynı zamanda kalsiyum, sodyum ve potasyum tuzları gibi çok çeşitli iyonlar ihtiva ettiğinden oldukça yüksek (yaklaşık 150 mM) iyonik

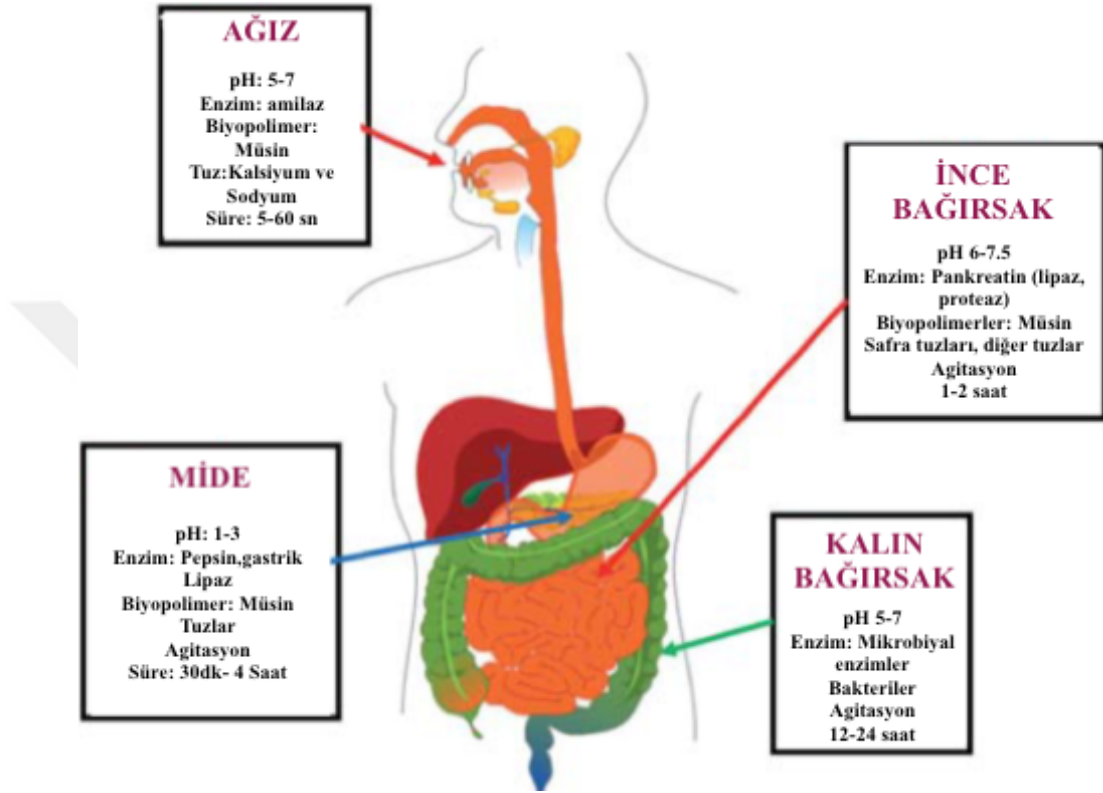
güce sahiptir. Mide ortamındaki değişen pH değeri ve iyonik güce bağlı olarak nano-emülsiyonların elektrostatik etkileşimler neticesinde stabiliteleri değişebilir. pH değeri proteinlerde, polisakkaritlerde, yağ damlacıklarında, minerallerde ve diğer gıda bileşenlerinde elektriksel yükü belirleyen en önemli unsurdur. Nano-emülsiyonlarda pH ve iyonik gücün değişiminin etkisi onları stabilize eden emülsüfiyerin doğasıyla oldukça ilişkilidir. Mide fazının yüksek asidik ortam koşulu karotenoidler gibi bazı aktif gıda bileşenlerinin kimyasal parçalanmasına neden olabilmekte, stabilizatörlerin parçalanmasına neden oldukları zaman ise nano-emülsiyonların stabiliteleri doğrudan değişmektedir. Mide öz sıvısı içerisinde bulunan proteaz ve lipaz gibi enzimlerde yine nano-emülsiyonların akıbetini etkileyen önemli parametrelerdir. Proteinlerin emülsüfiyer olarak kullanıldığı sistemlerde proteazların adsorbe olmuş proteinleri sindirmeleri sonucunda lipit damlacıkları agregasyona karşı artık koruma altında olmayacak ve stabilitelerini kaybedeceklerdir. Bu bağlamda proteinlerin yapısında etkili olmakta kazein gibi esnek proteinler β -laktoglobülin gibi globüler proteinlere göre daha hızlı sindirilmektedirler. Gastrik sıvı içerisinde vücut tarafından salgılanan, alınan gıdalarla birlikte gelen ya da sindirim prosesi sırasında oluşan fosfolipitler, proteinler ve bazı safra tuzları gibi yüzey aktif bileşikler de bulunmaktadır. Bu yüzey aktif maddeleri de nano-emülsiyon damlacıkları etrafında adsorbe olup, ara yüzey kompozisyonunu değiştirerek biyolojik özelliklerinde değişikliğe sebep olabilirler. Ek olarak, mide gastrik sıvısı içerisindeki yine vücut tarafından salgılanan ya da ağızdan alınan polimerlerden müsin, dirençli nişastalar ve besinsel liflerde deplesyon ya da köprü kurma flokülasyonuna sebep olabilirler. Mide ortamında midenin hareketinden kaynaklanan çok kompleks bir akış ve güç paterni meydana gelmekte bu sayede alınan gıdalar karıştırılıp, parçalanıp nakledilmektedir. Mide fazından geçerken nano-emülsiyonlarda; kompozisyon, yapı, boyut, yük ve fiziksel durum özelliklerinde birçok değişiklik meydana gelebilmekte ve bu değişikliklerin çoğu nano-emülsiyonun başlangıç koşullarındaki özellikleriyle doğrudan ilişkili olmaktadır. Nano-emülsiyonların gastrik koşullardaki stabilitesi önemli olup, biyolojik olarak doygunluk hissinin algılanması üzerinde de etkisinin olduğu bildirilmiştir. Stabil nano-emülsiyonlar midenin heryerine eşit olarak dağılarak mideden geç boşalır ve stabil olmayanlara kıyasla daha fazla tokluk hissi yaratır (Boon *et al.*, 2008; McClements, 2015).

In vitro sindirim koşullarında mide fazının simülasyonu genellikle örneğin pH değerini oldukça asidik koşullara ayarladıktan sonra, belirli bir süre vücut sıcaklığında karışması sağlanarak gerçekleştirilmektedir. Mide ortamındaki kompleks akış profilini, dinamik salgılamaları ve mekanik güçleri birebir simüle eden çalışma grupları da mevcut olup, genellikle kendine has özellikleri olan mide yüzeyinin partiküllerle etkileşiminin etkisi ihmal edilmektedir. Lipit damlacıklarının mide duvarı yüzeyine yapışması üzerine dizayn edilen sistemler için birebir simülasyon önemli olabilmektedir (McClements and Li, 2010).

2.5.3. İnce Bağırsak Fazı

Mide gastrik ortamını terkeden kısmi olarak sindirilmiş gıdaları içeren “kimüs (chyme)” olarak adlandırılan sıvı, kontrollü bir şekilde azar azar ince bağırsağa pilorik sfinkter adı verilen valf kası aracılığıyla fişkırtılarak gönderilir. İnce bağırsak mide ile bağlandığı noktadan itibaren sırasıyla duodenum, jejunum ve ileum adı verilen üç bölüme ayrılır. Duodenum bölümüne ulaşan kimüs, safra tuzlarının, fosfolipitlerin, sindirim enzimlerinin, bikarbonatın ve diğer tuzların bulunduğu alkali ince bağırsak sıvısı ile karışır. Bu bölümde pH değeri bikoarbonat ile kontrol edilerek nötr olana dek artış gösterir. Mide fazında kısmi olarak sindirilen sıvının geri kalan sindirilmemiş kısmı da ince bağırsak fazında salgılanan bu karışım tarafından sindirime uğrar. Proteinler ve peptitler proteaz enzimleri tarafından kısa peptitlere, trigliseritler ve digliseritler lipaz enzimleri tarafından serbest yağ asitlerine ve monogliseritlere, nişastalar ve oligosakkaritler amilaz enzimleri tarafından daha kısa oligosakkaritlere ve glukoza parçalanırlar. İnce bağırsakta meydana gelen bu kimyasal ve fiziksel değişimler neticesinde karma miseller olarak atfedilen, lipofilik mikronutrientlerin ve sindirilmiş makronutrientlerin absorpsiyonunu iyileştiren kolloidal yapılar oluşmaktadır. Karma miseller genel olarak miselleri, kesecikleri ve safra tuzlarından, fosfolipitlerden, serbest yağ asitlerinden ve monoaçilgliserollerden ve diğer yağda çözünen vitaminler ve nutrasötikler gibi minör lipofilik bileşiklerden oluşan likit kristalleri içermektedirler (Şekil 2.12). Karma miseller lipofilik bileşenleri lümen adı verilen bağırsak boşluğundan transfer ederek, mukus tabakasından geçirip absorbe edildikleri yer olan epitelyum hücrelerinin yüzeyine ulaştırırlar. Mukus tabakası yaklaşık 400 nm çaplı gözenekler bulunduran polimerik jel bir ağı yapıdadır. Mukus tabakası bir elek misali görev yaparak büyük partiküllerin geçişini engelleyerek küçük

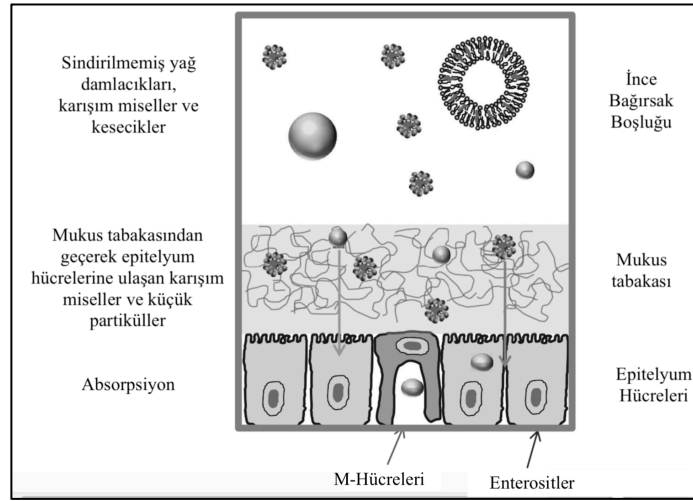
partiküllerin emilimini sağlar. Epitelyum hücreleri ince bağırsak boşluğuna kıyasla daha asidik koşullara sahip olmasının etkisiyle özellikle serbest yağ asitlerinin emilimi sırasında önemli rol oynar, serbest yağ asitlerinin karboksil gruplarının protonasyonunu sağlarlar, polaritelerinde düşüş meydana getirerek absorpsiyonlarını kolaylaştırırlar (McClements, 2015).



Şekil 2.11. İnsan GIT sisteminin farklı bölgelerindeki fizikokimyasal koşulların şematik gösterimi (McClements ve Li, 2010)

In vitro sindirim testinin ince bağırsak basamağında pH değeri ayarlanarak, enzim aktiviteleri gerçekleştirilerek ve safta tuzu ve fosfolipitleri içeren biyolojik sürfaktanlar ve mineraller eklenerek ortam koşulları simüle edilmektedir. Simüle ince bağırsak sıvısı içeriğinde *in vivo* koşullara mümkün olan aslına en yakın formulasyon; tamponlar, tuzlar, organik moleküller, proteinler, enzimler, yardımcı enzimler, safra tuzları ve fosfolipitlerle hazırlanmaktadır (Kalantzi *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2018).

İnce bağırsak fazını tamamlayan örnek genel olarak “digest” olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.12. Karışım misellerin içine girerek mukus tabakasından geçen ve sonrasında epitelyum hücreleri tarafından çeşitli mekanizmalarla absorbe olan bileşikler: Serbest yağ asitleri, monogliseritler ve lipofilik aktif bileşikler (McClements, 2015)

2.5.4. Kolon Fazı

Emülsiyonlar mide ve ince bağırsak fazını tamamladıktan sonra genel anlamda tamamen sindirimleri gerçekleşmiş ve absorbe edilmiş olurlar ancak ihmal edilemeyecek önemli miktarda fraksiyonları kalın bağırsağa geçebilirler. Trigliseritler, proteinler ve nişasta gibi bileşikler formülasyonlarında içeren nano-emülsiyonlar ince bağırsak fazına ulaştıktan sonra tamamıyla sindirimlerini tamamlayabilirken, mineral yağlar ve besinsel lifler gibi sindirilmeyen bileşikler kullanılarak nano-emülsiyon meydana getirilmişse tam olarak sindirim ve absorpsiyon gerçekleşmeden kalın bağırsağa ulaşmaları da mümkündür. Kalın bağırsak çeşitli bileşikler parçalayıp onlardan yararlanan çok çeşitli ve farklı mikroorganizmaları bulundurmaktadır. Bu mikroorganizmalar sayesinde salgıladıkları enzimlerle besinsel liflerde sindirilerek insan sağlığına faydalı olabilecek kısa zincirli yağ asitlerine ve diğer ürünlere dönüştürülürler. Bu olaydan kalın bağırsak ortamına salınması istenen aktif bileşiklerin gönderilmesinde ve o bölgede salınmasında yararlanılabilmektedir (McClements, 2015).

Kalın bağırsak koşulları *in vitro* testlerde simüle etmesi en zor olan aşamadır. Genel olarak insan kalın bağırsağındaki bakteri popülasyonlarını yansıtacak şekilde bir ya da daha fazla simüle edilmiş ortamda örnekler inkübe edilerek kolon koşulları statik olarak simüle edilmektedir. Kolon koşullarını gerçeğe en yakın içerikle hazırlamak genel anlamda bakteri popülasyonunun her bireyde farklılıklar göstermesi

sebebiyle pek mümkün değildir. Bakteri simülasyonuna nazaran bakterilerin salgıladıkları enzimlerle ortam koşullarını oluşturan çalışmalar olmakla birlikte, doğrudan hayvan modelleri üzerinde *in vivo* koşullarda araştırma yapmak daha kolay olabilmektedir. Bütün bunların yanısıra, eğer örneklerin ince bağırsak koşullarında tamamen sindirilip absorbe olduğu biliniyorsa bu basamak ihmal edilebilmektedir (McClements and Li, 2010).

2.5.5. Biyoyararlanım

Nano-emülsiyonlar, ω -3 yağ asitleri, karotenoidler, fitosteroller ve yağda çözünen vitaminler gibi birçok lipofilik bileşiklerin; enkapsülasyon, koruma ve salınım sistemlerinde kullanımları bakımından oldukça uygun sistemlerdir. Bu bileşiklerin çoğu doğrudan saf formlarında gıdaların içerisine katmak için uygun olmayabilmektedirler. Çeşitli biyoaktif bileşiklerin genel olarak enkapsüle edilme sebepleri, fiziksel, kimyasal ya da enzimatik parçalanmalara karşı korumak, istenmeyen kötü kokularını maskeleyerek tüketici beğenisini artırmak, diğer bileşiklerle etkileşime girerek onların biyolojik aktivitelerinde düşüşe ya da stabilitelerinin bozulmasına sebep olmalarını önlemek, biyoyararlanım miktarları düşük olan bileşiklerin biyoyararlanım oranlarını artırmak, hedeflenen GIT'da salınımlarını sağlamak gibi esaslara dayanmaktadır (McClements, 2015).

Biyo-yararlanılabilirlik terimi GIT koşullarında sindirilmiş bileşiklerin en son ince bağırsakta emilerek sistemde sirkülasyona katılan fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Biyoyararlanılabilirliğin hesaplanmasında genel olarak üç faktör dikkate alınmaktadır.

$$BY = BE * T * A \quad (2-1)$$

Biyoyararlanılabilirliğin hesaplanmasında kullanılan terimlerden BE; biyoerişilebilirlik, T; transfere karşı stabilite. A; Absorpsiyon miktarını ifade etmektedir. Biyoyararlanılabilirliğin hesaplanabilmesi için bu terimlerin doğru anlaşılması ve hesaplanması gerekmektedir.

Biyoerişilebilirlik nano-emülsiyon tarafından ince bağırsakta salınan bileşiklerin erişilebilir olan fraksiyonunu ifade eder.

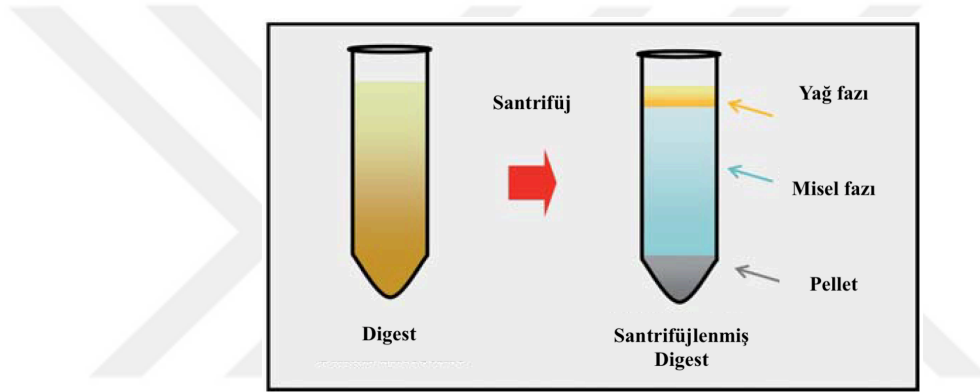
$$BE (\%) = \frac{m_{misel}}{m_{digest}} \times 100 \quad (2-2)$$

Transfer (T); ağızdan alınan nano-emülsiyon örneklerinin ince bağırsak fazına ulaşabilen miktarını ifade eder.

$$T (\%) = \frac{m_{digest}}{m_{nanoemülsiyon}} \times 100 \quad (2-3)$$

Absorpsiyon (A); ince bağırsak fazında salınan aktif bileşenlerin epitelyum hücreleri tarafından absorbe edilen miktarını ifade eder.

$$A (\%) = \frac{m_{absorbe\ edilen}}{m_{digest}} \times 100 \quad (2-4)$$



Şekil 2.13. Simüle edilmiş ince bağırsak fazının santrifüjleme sonrasında elde edilen yağ fazı, misel fazı ve pelletin şematik görüntüsü (McClements and Li, 2010)

Enkapsüle edilen lipofilik bileşenlerin nasıl salındığının anlaşılması yapılacak analizlerle mümkün olabilmektedir. Bu anlamda en çok kullanılan metot GIT sindirim aşamalarında ince bağırsak fazını tamamlayan digest örneğinin santrifüjlenmesi neticesinde; yağ fazı, misel fazı ve pellet olmak üzere üç fazın birbirinden ayrılmasıdır (Şekil 2.13). Santrifüj tüpünün en alt kısmında bulunan pellet genellikle yoğun bileşiklerden oluşmakla birlikte sindirilmemiş proteinler, besinsel lifler, safta tuzu serbest yağ asitlerinin çözünmeyen kalsiyum sabunları ve mineral içermektedir. Orta kısımda bulunan sulu faz genellikle safra tuzları, fosfolipitler ve yağ sindirim yan ürünleri olan serbest yağ asitleri ve monogliseritleri ihtiva eden miselleri ve kesecikleri bulundurulur. Misel ve keseciklerle ayrıca enkapsüle edilen lipofilik bileşiklerde yine misel fazında bulunurlar. Üst kısımda bulunan krem tabakasında ise sindirilmeyen yağlar ya da yağ damlacıkları olarak bulunabilirler. Santrifüj sonrasında elde edilen her bir tabaka birbirinden ayrılarak spektrofotometrik, kromatografik ya da

elektroforetik yöntemlerle analiz edilebilir. Bu teknik bilgilerden yola çıkarak sindirim sonrasında yağ damlacıklarından salınan enkapsüle edilmiş lipofilik aktif bileşenlerin miktarlarından yararlanılarak biyoyararlanım miktarlarını hesaplanabilmektedir (Ye *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2018).

2.5.5.1. Partikül kompozisyonunun etkisi

Nano-emülsiyonlarda partikül kompozisyonları genel olarak merkez kısmında lipitlerin ve lipofilik materyallerin bulunduğu ve adsorbe edilen emülsüfyerlerin kabuk kısmını oluşturarak merkez kısmı çevrelediği bir yapıdan oluşmaktadır. Lipofilik kısım; trigliseritlerden, digliseritlerden, monogliseritlerden, aromatik yağlardan, esansiyel yağlardan, mineral yağlardan, yağ ikamelerinden, kıvam artırıcılardan, yağda çözünen vitaminlerden ve nutrasötik bileşiklerden oluşabilmektedir. Merkezi oluşturabilen bu lipofilik içeriklerin bir kısmı insan GIT koşullarında sindirilebilirken, bir kısmı sindirilmeden yani vücut tarafından absorbe edilmeden dışarı atılmaktadır. Örneğin trigliseritler ve digliseritler gibi lipit yapılı bileşikler bağırsak koşullarında lipaz aktivitesi sonucunda yıkıma uğradıktan sonra absorbe edilirken, mineral yağlar ve yağ ikame maddeleri enzimler tarafından parçalanamadıkları için yapısal değişikliğe çok fazla uğramadan vücuttan uzaklaşmaktadırlar. Karotenoidler ve fitosteroller gibi biyoaktif bir kısım lipofilik bileşikler ise sindirilmeye gerek olmadan doğrudan ince bağırsaklarda absorbe edilerek metabolizma faaliyetlerinde işlev görmektedirler. Nano-emülsiyon kompozisyonlarının kabuk kısmı bir ya da birden fazla materyalden oluşabilmektedir. Sürfaktanlar, fosfolipitler, proteinler, polisakkaritler ve minerallerden oluşabilmekte ve bu bileşikler GIT koşullarında farklı hız ve sürelerde sindirilebilmektedirler. Örneğin fosfolipitler ve proteinler midede ve ince bağırsaklarda salgılanan proteazlar ve fosfolipazların aktivitesi ile sindirime uğrarken besinsel lifler kalın bağırsağa ulaşana kadar sindirilmeyebilirler. Bu bağlamda merkez ve kabuk kısımları oluşturan partikül kompozisyonu nano-emülsiyonların biyolojik akıbetlerinin anlaşılmasında önemli rol oynamaktadır (McClements, 2011).

2.5.5.2. Partikül boyutunun etkisi

Lipofilik biyoaktif bileşenlerin doğrudan tüketilmesi yerine oldukça küçük partikül boyutlarına düşürülen nano-emülsiyonların içerisine enkapsüle edildikten

sonra tüketilmeleri çeşitli potansiyel avantajları beraberinde getirmektedir. Bu avantajları maddeler halinde ifade etmek gerekirse; birinci etki biyoaktif bileşiklerin çözünürlüğünün artmasıdır. Oluşan küçük boyutlu yağ damlacıkların çevresinde büyük boyutlu olanlara kıyasla daha yüksek konsantrasyonda suda dağılmış çözünmeye hazır aktif bileşen bulunmaktadır. Partikül boyutu 200 nm' nin altına düştüğünde biyoaktif bileşenlerin çözünürlüğü önemli ölçüde artış göstermekte bu termodinamik etki sonucunda intestinal koşullarda intestinal sıvısı içerisinde çözünen aktif bileşen konsantrasyonunun artması artan çözünürlükle ilişkilendirilmektedir (McClements and Xiao, 2012). İkinci etki aktif bileşenlerin nano-emülsiyon damlacıkları içerisinde kristal formlarına kıyasla difüzyon hızlarının artmasıdır (Mauludin *et al.*, 2009). Aktif bileşenin boyutu azaldıkça miktarı sabit kalsa da etrafını çevreleyen yağ miktarı artacaktır. Aktif bileşenin boyutundaki iki kat azalma, difüzyon hızında dört kat artışa neden olmaktadır (Sun *et al.*, 2012). Nano boyutlu emülsiyonlar içerisinde enkapsüle edilmiş biyoaktif bileşenlerin alımında partikül boyutunun üçüncü etkisi sindirim hızının ve süresinin artmasıdır. Partikül boyutlarının azalmasıyla partiküllerin yüzey alanı artar ve böylece intestinal koşullarda lipaz enziminin aktivite göstereceği alan artacağından sindirim hızlanır (Borel *et al.*, 1994; Troncoso *et al.*, 2012). Lipit fazın sindirimiyle aktif bileşenler açığa çıkarak intestinal koşullarında absorbe olmak üzere misel oluşumuna katılırlar. Dördüncü olarak lipofilik biyoaktif bileşenlerin küçük nanopartiküller içerisinde yüklendiğinde biyoyararlanımlarının artmasına ince bağırsakta emilimin sağlandığı epitelyum duvarını kaplayan mukus tabakasına büyük partiküllere kıyasla daha uzun süre tutunabilmeleri ve içerisinden geçebilmeleri etki etmektedir (Acosta, 2009). Büyük boyutlu partiküller GIT'den daha hızlı geçip dissolüsyon ve absorpsiyon için daha sınırlı bir süreye sahipken, mukus tabakasından difüze olan küçük boyutlu partiküller ince bağırsakta daha uzun süre bekleyebilecek ve böylece dissolüsyon ve absorpsiyonun gerçekleşmesi için daha fazla zaman burada kalabilecektir. Hatta boyutları yeteri kadar küçük olan partiküller mukus tabakasından difüze olarak doğrudan epitelyum hücreleri tarafından absorbe olabileceklerdir (Weiss *et al.*, 2008).

2.5.5.3. Partikül fiziksel durumunun etkisi

GIT'da *in vitro* sindirim koşullarında lipaz enziminin trigliserit moleküllerindeki ester bağlarına ulaşabilmesi partikül kompozisyonuna bağlı olarak partikülün fiziksel

durumu ile ilişkili olabilmektedir. Simüle edilmiş sindirim koşullarında yürütülen bir çok çalışma katı lipit nanopartiküllerin lipit fazın sıvı formda olduğu nano-emülsiyon sistemlere kıyasla daha yavaş hızla pankreatik lipaz tarafından sindirilebildiğini göstermektedir. Bu durum GIT’da katı lipit içerisinde immobilize edilmiş aktif bileşiğin daha kontrollü salınımına olanak sağlamaktadır (Bonnaire *et al.*, 2008). Katı lipit nanopartiküllerin *in vitro* sindirim koşullarında lipolitik aktivitenin etkisinin yanısıra daha yavaş sindirilmelerine neden olan dolaylı bir başka neden ise partiküllerin kısmi koelasyona uğramaları gösterilmektedir (Lundin *et al.*, 2008). İnce bağırsak koşullarında kısmi koelasyona uğrayan partiküllerin stabil sistemlere kıyasla daha yavaş sindirime uğradığı ve bu durumun lipaz enziminin stabil olmayan katı lipit nanopartikül sistemlerinde kümelenmiş yağ damlacıklarına etki etmesinin daha zor olması ile açıklanabileceği bildirilmiştir. Katı lipit nanopartiküllerde meydana gelen bu olayın aktif bileşenlerin fiziksel ya da kimyasal parçalanmaya karşı koruyucu etki oluşturabileceği ve sindirimi yavaşlatarak kontrollü salınım sağlayabileceği önerilmektedir (McClements and Xiao, 2012). Bu bağlamda tamamen kristalize olmuş yağ damlacıklarından oluşan katı lipit nanopartikül sistemler ile kısmen kristalize olmuş nano yapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemler; enkapsüle edilen aktif bileşenin moleküler difüzyonunun hızını azaltması, kimyasal parçalanma reaksiyonlarını yavaşlatması ve stabilitelerini geliştirmesi bakımından sıvı lipit taşıyıcı sistemler olan nano-emülsiyonlara kıyasla potansiyel avantajlar ihtiva etmektedir (Weiss *et al.*, 2008; Salminen *et al.*, 2016; Pezeshki *et al.*, 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında yapılan deneylerde yağ fazı formulasyonları oluşturulurken, farklı deney dizaynlarında farklı sıvı yağlar kullanılmıştır. Kullanılan sıvı yağlardan; () mısırözü yağı (Mazola, AAK Ltd., UK), keten tohumu yağı (International collection, AAK Ltd., UK) ve pirinç Kepeği yağı (King Rice, Thailand) Amerika'da bulunan lokal bir marketten temin edilmiş, yağlara ileri bir saflaştırma uygulanmamıştır. Orta zincir uzunluklu trigliserit (MCT) Sasol North America, INC (Houston, ABD) firmasından temin edilmiştir.

β -sitosterol Bulk Supplements Henderson (Nevada, ABD) firmasından temin edilmiştir. γ -orizanol Tsuno Rice Fine Chemicals (Wakayama, Japonya) firmasından temin edilmiştir. β -karoten, Kandelilla vaks ve Tween 80 Sigma Aldrich (ABD) Firmasından temin edilmiştir. Emülsüfiyer olarak kullanılan bir diğer sürfaktanlardan Q-Naturel 200, Ingredion (Westchester, ABD) firmasından temin edilmiştir.

In vitro koşullarda simüle edilen GIT koşulların oluşturulmasında kullanılan kimyasallardan; sodyum klorit, kalsiyum klorit, amonyum nitrat, potasyum fosfat, potasyum klorit, potasyum sitrat, üre, ürik asit sodyum tuzu, laktik asit sodyum tuzu, sodyum fosfat mono ve di bazik, safra tuzu, domuz gastrik musini, pepsin ve lipaz enzimleri; Sigma Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Oksidasyon deneylerinde kullanılan kimyasallardan trikloroasetik asit (TCA), tiyobarbitürik asit (TBA), hidroklorik asit, bütülenmiş hidroksi toluen (BHT), 1,1,3,3-Tetrahidroksipropan (TEP), baryum klorür ($BaCl_2$), demir sülfat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), amonyum tiyosiyanat yine Sigma Aldrich (ABD) Firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan bütün reaktifler analitik ya da kromatografik saflıktadır. Su içerisinde yağ emülsiyonları hazırlanırken su fazında Milli-Q (ultra saf su) kullanılmıştır. Bütün çözeltilerin hazırlanmasında yine ultra saf su kullanılmıştır.

3.2.Yöntemler

3.2.1. Kandelilla Vaks Kullanılarak Organojel Oluşturma

Kandelilla vaksın organojel oluşturma etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Kandelilla vaksı içeren mısırozü yağına uygun sıcaklıkta ısıtıl işlem uygulanarak jelatörlerin erimesi sağlanmış ve ayrıca ısıtıl işlem sırasında manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak jelatörlerin homojen şekilde yığın yağda dağılması sağlanmıştır.

Kandelilla vaks organojelleri hazırlanırken; %0,5, %1, %3, %6, %10, %20, %40 ve %60 oranında Kandelilla vaks taneleri mısır özü yağında 90°C de 15 dk. boyunca 300 rpm de karıştırılarak vaks taneleri tamamen eritilmiştir. Sonrasında örnekler hemen cam kapaklı kaplara alınarak hareket ettirmeden bir gece oda sıcaklığında bekletilerek ertesi gün ters çevrilip organojel oluşumları kontrol edilmiştir.

3.2.2. Kandelilla Vaks Kullanılarak Nano-Emülsiyon Üretimi

Kandelilla vaks kullanılarak nano-emülsiyon üretiminde sonik dismembrator (½" problu, Fisher Scientific, Model 500) kullanılmıştır. Emülsiyonlardan NLC örnekleri %5 yağ fazında mısır özü yağı ve yağ fazının %0,5-60'ı vaks içerecek şekilde hazırlanmıştır ve emülsiyonların %95 lik kısmını oluşturan su fazı içerisinde %2 oranında Tween 80 çözülerek hazırlanmıştır. Toplam emülsiyon miktarının %5'ini oluşturacak şekilde sadece mısır yağı ve sadece Kandelilla vaks kullanılarak sırasıyla LLN ve SLN örnekleri de hazırlanmıştır. Yağ fazı ve su fazı ayrı ayrı, Kandelilla vaksın erime noktasına yakın olarak yaklaşık olarak 75 °C sıcaklığa önceden ısıtılmıştır. Sulu faz yağ fazına eklenmiş ve el-blender kullanılarak 2 dakika homojen hale getirilmiştir. Sıcak kaba emülsiyon 3 sn çalışma ve 3 sn durma süresi ile toplam 5 dk sonikasyon (500 W, %60 Attn, 20 kHz) işlemine tabi tutulmuştur. Sonikasyona aşamasına kadar, emülsiyon sıcaklığı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Sonikasyon işlemi emülsiyonun ısınmasına neden olduğu için, bu süre boyunca sıcaklık kontrolüne gerek kalmamış, sonikasyon işlemi sonunda emülsiyonlar hemen buz içeren bir kutuya transfer edilerek soğutulmuştur. Üretilen örneklerin parçacık boyutu, zeta potansiyeli ve optik mikroskop ölçümleri aynı gün içinde alınmıştır.

3.2.3. Kandelilla Vaks Kullanılarak Hazırlanan Organojel ve Organojel Nano-emülsiyonların Termal Davranışlarının DSC ile Belirlenmesi

Yıgın yağ fazlarının ve bunlardan hazırlanan emülsiyonların erime ve kristallenme noktaları Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC, Northampton, MA) kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 6-10 mg'lık hazırlanan numuneler, alüminyum örnek kabına tartılarak, kapaklarla hermetik olarak kapatılmıştır. Referans olarak boş olarak kapatılan panlar kullanılmıştır. Programın başında; numunelere 20 °C'den 100 °C'ye 2 °C/dk hızla artan sıcaklık uygulanmıştır. 100 °C sıcaklıkta 1 dk tutulduktan sonra, 5 °C/dk hızla tekrar 20 °C'ye soğutulmuştur.

3.2.4. Kandelilla Vaks Organojel Nano-emülsiyonlarının Partikül Boyutu Ölçümü

Nano-emülsiyon örneklerinin partikül boyutu ölçümleri statik ışık cihazı Beckman Coulter (LS 12 320, Brea, CA, ABD) ile ölçülmüştür. Örnekler analiz sırasında ultra saf su ile seyreltilerek uygun ölçüm konsantrasyon aralığına getirilmiştir. Sonuçlar yüzey ağırlıklı ortalama çap ($d_{[3,2]}$) ya da hacim ağırlıklı ortalama çap ($d_{[4,3]}$) biriminden ifade edilmiştir. Partikül boyutlarının bütün boyutların partikül dağılımlarından hesaplandığı formüller aşağıda belirtilmiştir.

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \text{ ve } d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (3-1)$$

Ölçümler en az üç tekerrür olarak üretilen her bir örnek için en az iki paralel olarak yapılmıştır.

3.2.5. Kandelilla Vaks Organojel Nano-emülsiyonlarının Zeta Potansiyel (ζ) Ölçümü

Partikül yükü ölçümleri, dinamik ışık saçılımı Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, İngiltere) kullanılarak partikülün mikro elektroforez yeteneğinin ölçümü ilkesine dayanarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümden önce 50 µl nano-emülsiyon 5 ml ultra saf suya eklenip vortekslenmiştir. Sindirim basamaklarında (ağız, mide ve ince bağırsak ortamları) dilüsyon için ultra saf su yerine uygun pH'daki fosfat tampon çözeltileri kullanılmıştır. Yine üç tekerrür olarak üretilen örnekler için her bir ölçüm en az iki kez alınmıştır.

3.2.6. Simüle Sindirim Sistemi Koşullarında Kandelilla Vaks ile Hazırlanan Örneklerin Analizi

Ağız, mide ve bağırsak koşullarını içeren simüle edilmiş *in vitro* insan GIT koşulları oluşturularak emülsiyonların biyolojik durumlarını anlamak amacıyla örnekler her bir faz için farklı koşullara maruz bırakılmıştır. Emülsiyonların geçtiği her bir biyolojik faz kendi ortam koşullarını (pH, sıcaklık, çözeltiler, hareketler ve süre gibi) en yakın biçimde yansıtacak özelliklerde aşağıda verilen başlıklarda detaylarıyla anlatıldığı üzere hazırlanmaya çalışılmıştır. Yağ fazının Kandelilla vaksyla yapılandırılarak organojele dönüştürüldüğü NLC, yağ fazı olarak sadece Kandelilla vaksın kullanıldığı SLN ve yağ fazı olarak sadece mısır özü yağının kullanıldığı LLN nano-emülsiyonları bu bağlamda hazırlanan *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Nano-emülsiyon örnekleri ön hazırlık olarak ilk olarak ultra saf su ile seyreltilerek başlangıçta %5 olan yağ oranları %2 ye düşürülmüştür. Örneklerin simüle edilen *in vitro* koşullar öncesi ve sonrası; mikroyapı, partikül boyutu ve partikül yükü ölçümleri alınmıştır.

3.2.6.1. Ağız fazı

Simüle edilmiş yapay salya solüsyonu (SYS) Li ve McClements (2010); Sarkar, Goh, ve Singh, (2009); Mao ve McClements (2012)'in çalışmalarında belirtilen yöntemle hazırlanmıştır. Salyada bulunan glikolize edilmiş protein olan Müsin (%3), 20 ml SYS ye eklenerek yapay tükürük çalışma solüsyonu (ASWS) elde edilmiştir. ASWS ve daha sonra 20 ml seyreltilmiş nano-emülsiyon ile aynı erlende birleştirilmiştir. Bu karışımın pH'sı NaOH çözeltisi ile 6,8'e ayarlandıktan sonra, 10 dk boyunca vücut sıcaklığı olan 37°C'ye ayarlanmış bir inkübatörde (Innova Incubator Shaker, Model 4080, New Brunswick Scientific, New Jersey, ABD) 100 rpm'lik hız ile sürekli olarak çalkalanmıştır. Toplam 40 ml olan çözeltinin 20 ml si mide fazında kullanılmak üzere ayrılmış, kalan 20 ml örnek ise partikül boyutu, partikül yükü ölçümlerinde ve mikroyapısal analizlerde kullanılmıştır.

3.2.6.2. Mide fazı

Gastrik ortamın oluşturulması için, ilk olarak simüle edilmiş gastrik sıvı stok çözeltisi (SGFSS) hazırlanmıştır. Son hacmi 1 L olan bu çözelti için damıtılmış su içerisinde 2 g NaCl ve 7 ml HCl çözölmüş ve bu çözelti buzdolabında saklanmıştır. 20

ml SGFSS içerisinde proteinlerin hidrolizinden sorumlu gastrik enzim olan 0,064 g pepsin tartılarak 30 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çözelti simüle gastrik sıvısı (SGF) olarak adlandırılır. Daha sonra SGF, gastrik faz başlatılmadan hemen önce sıcaklığını 37°C'ye getirmek için 10 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Mide fazı için, 20 ml ağız fazı (bolus) numunesi ile 20 ml SGF birleştirilmiş örneğin pH değeri uygun asit bazlarla 2,5'e ayarlandıktan sonra 37°C'de 100 rpm'de karıştırılarak 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Toplam 40 ml olan çözeltinin 30 ml si ince bağırsak fazında kullanılmak üzere ayrılmış, kalan 10 ml örnek ise partikül boyutu, partikül yükü ölçümlerinde ve mikroyapısal analizlerde kullanılmıştır.

3.2.6.3. İnce bağırsak fazı

Ağız ve mide fazının ardından *in vitro* koşullarda GIT'in simüle edilmesiyle gerçekleştirilen sindirim aşamalarının sonuncu aşaması olan bağırsak fazına geçilmiştir. Mide fazının 2 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla mide fazı örneğinden 30 ml alınarak başka bir behere aktarılmıştır. Bağırsak fazının oluşturulmasının gerekliliklerinden olan, tuz çözeltisi, safta tuzu çözeltisi ve enzim çözeltisi bağırsak fazı başlatılmadan önce eklemeye hazır hale getirilmiştir. Bu amaçla her bir örnek için 1,5 ml kullanılacak olan tuz çözeltisi; 0,055 g kalsium klorit ve 0,329 g sodyum kloritin ultrasaf suda tamamen çözülmesiyle, 3,5 ml kullanılacak olan safra tuzu çözeltisi; 0,1878 g safra tuzunun pH 7'ye ayarlanan fosfat tamponunda bir gece karıştırılmasıyla ve enzim çözeltisi; 0,06 g lipaz enziminin yine pH 7'ye ayarlı fosfat tamponunda ince bağırsak fazı başlatılmadan hemen önce 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. Bağırsak fazı, mide fazından alınan 30 ml örneğin, pH-Stat (835 Titrande, Metrohm USA Inc., Riverview, FL) otomatik titrasyon ünitesi yakınında bulunan 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna daldırılmasıyla başlatılmış sıcaklık dengeye ulaştığında örneğin pH değeri uygun asit ve baz çözeltileriyle 7'ye ayarlanmıştır. Tuz çözeltisi ve safra tuzu çözeltisi beher içerisine sırayla damla damla ilave edilmiş ve pH değeri yeniden 7'ye ayarlanmıştır. Lipazın eklenmesiyle pH-Stat tarafından bağırsak koşullarında salınan serbest yağ asitlerinin sebep olduğu pH düşüşünü nötrlemek için kullanılan 0,1 N NaOH çözeltisinin hacmi 2 saat boyunca kaydedilmiştir. Kandelilla vaksın moleküler ağırlığının kompleks bileşiminden dolayı hesaplanamaması nedeniyle salınan serbest yağ asitleri miktarı sindirilemeyen yağ kısmının elimine edilmesiyle hem % serbest yağ asidi hemde

harcanan NaOH miktarının zamana karşı grafiğe aktarılmasıyla ifade edilmiştir. Harcanan NaOH miktarının kontrol örneğindeki değeri emülsiyon örneği yerine sadece emülsüfyer içeren tampon çözeltisinin kullanıldığı koşullarda ölçülmüş ve bu miktar örnek için harcanan miktarlardan çıkarılmıştır. Serbest yağ asidi (FFA) salınımı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%FFA = \frac{100 \times V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times m_{Yağ}}{w_{yağ} \times 2} \quad (3-2)$$

%FFA= Serbest Yağ Asidi (%)

V_{NaOH} = Harcanan NaOH miktarı (L).

M_{NaOH} = NaOH çözeltisinin molaritesi.

$m_{yağ}$ = Kullanılan yağın Molekül ağırlığı (mısır germ yağı: 824 g/mol)

$w_{yağ}$ = sindirim sisteminde bulunan yağın ağırlığı (gram)

3.2.6.4. Optik ve konfokal mikroskop ile mikroyapının görüntülenmesi

Nano-emülsiyon karışımlarının mikro yapıları Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopu (Nikon D-Eclipse C1 80i, Melville, NY, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir. Nano-emülsiyonların yağ fazı nil kırmızısı (1 mg/1 ml etanol) ile boyanarak görünür hale getirilmiştir. Emülsiyonların micro grafikleri 60 x objektif lensi floresans modunda kaydedilmiştir. Nil red için uyarılma ve emisyon spektrumları sırasıyla 543 ve 605 nm seçilmiştir. Yağ fazı nil red ile boyandıktan sonra mikroskop görüntüsünde her bir yağ damlacığı parlak kırmızı bölgeler şeklinde görülürken su fazı koyu renkli olarak belirmiştir.

3.2.7. γ - Orizanol ve β -sitosterol ile Organojel Oluşturma

γ -orizanol ve β -sitosterol karışımları pirinç kepeği yağının organojelasyonunun sağlanması amacıyla kullanılmıştır. Farklı β -sitosterol: γ -orizanol oranlarında (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100) ve farklı toplam jelatör karışımı oranlarında (%5, %10 ve %15) pirinç kepeği yağında eritilerek yaklaşık 90°C de 15 dk boyunca 300 rpm'de homojen şekilde karışması sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan organojellerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmış, organojel oluşumları yerçekimine karşı akışın gözlemlenmesi amacıyla cam kapların ters çevrilmesi ile elde edilmiştir.

3.2.8. γ -Orizanol ve β -sitosterol Organojel Nano-emülsiyon Üretimi

Organojel o/w nano-emülsiyonları %10 yağ ve %90 su fazından oluşmak üzere iki aşamalı emülsiyon üretimi yöntemi ile hazırlanmıştır (McClements, 2015). Yağ fazı için %15 oranında organojelatör karışımı kullanılmış, taşıyıcı yağ görevi gören jelatör eklenmiş pirinç kepeği yağında %0,5 oranında β -karotenin çözünmesi sağlanmıştır. Su fazı ise %2 oranında sürfaktan maddenin (Q-Naturel) 10 mM sodyum fosfat tampon çözeltisinde (pH 7) çözülmesiyle hazırlanmıştır. Emülsüfiyer olarak kullanılan Q-Naturel, %70 oranında Saponin aktif bileşenini içerdiği için hesaplamalar aktif madde üzerinden yapılmıştır. Jelatör karışımında γ -orizanol ve β -sitosterol 1:1 molar oranında kullanılmıştır (γ -orizanol MA=602,9 g/mol, β -sitosterol MA=414,7 g/mol; yaklaşık 3:2 w/w). İki aşamalı emülsiyon üretiminin ilk aşamasında kaba emülsiyon üretilmiştir. Bu aşamada yağ fazında jelatör karışımının ve β -karotenin tamamen çözülmesi için 15 dk boyunca 90°C de 300 rpm de karıştırılmıştır. Aynı koşullarda, aynı işlem su fazına da uygulanmış ve sonrasında su fazı yağ fazı üzerine eklenmiş, 2 dk boyunca laboratuvar tipi blender (Bamix, Switzerland) ile homojenize edilerek kaba emülsiyon haline getirilmiştir. Nano-emülsiyon üretiminin ikinci aşamasında örnekleri submikron boyuta düşürmek için emülsiyonlar, 12.000 psi basınca ayarlanmış mikrosıvılaştırıcıdan (Microfluidics M110L, Newton, MA, USA) 3 kere geçirilmiştir. Kontrol örneği olarak sadece pirinç kepeği yağının lipid fazı olarak kullanıldığı emülsiyon hazırlanarak kıyaslamalar yapılmıştır.

3.2.9. Emülsiyon Stabilitesinin Ölçülmesi

Yağ fazına γ -orizanol ve β -sitosterol karışımının jelatör olarak %0, %15 oranlarında eklenerek üretilen Q-Naturel ile stabilize edilen β -karoten enkapsüle edilmiş nano emülsiyonların sıcaklık ve pH değişkenlerinde partikül boyutları, zeta potansiyelleri ve β -karoten degradasyon ölçümleri aşağıda açıklanan yöntemlerle ölçülmüştür. Yapılan ön denemelerde örnekler 37°C ve 55°C derece sıcaklıklarda bir hafta boyunca (7 gün) depolanmış, 37°C derecede önemli bir değişim gözlemlenmemesi üzerine 55°C derecede pH 3 ve pH 7 değerlerine ayarlanan emülsiyonların depolama sırasındaki stabilizasyonları takip edilmiştir.

3.2.10. Partikül Boyutlarının ve Partikül Yüklerinin Belirlenmesi

Üretilen nano-emülsiyonları partikül boyutlarının takibi statik ışık yansıtımlı Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK) ile yapılmış, her bir örneğin partikül boyutu ve dağılımları bütün dağılımın kullanılarak hesaplandığı yüzey ağırlıklı ortalama partikül çapı (d_{32}) biriminden ifade edilmiştir.

Nano-emülsiyonların zeta (ζ) potansiyellerini yansıtan yükleri dinamik ışık yansıtımlı Zetasizer (Zetasizer Nano ZS-90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) kullanılarak partiküllerin mikroeletroforezi ile belirlenmiştir. Analiz öncesinde örnekler analiz edilen örneklerle uyumlu pH ve iyonik kompozisyona sahip 10 Mm sodyum fosfat tampon çözeltilerinde (1:100) seyreltilmiştir.

3.2.11. β -Karoten Miktarında Meydana Gelen Değişimin Belirlenmesi

55°C sıcaklıkta 7 gün depolama süresi boyunca β -karotenin enkapsüle edildiği nano-emülsiyon örneklerinde β -karotenin kimyasal degradasyonu; spektrofotometrik olarak ölçülmüş, ayrıca parçalandığı zaman solma eğilimi olan β -karotenin turuncu-kırmızı karışımı rengine ait değerler (L^* , a^* , b^*) depolama günlerinde ölçülerek β -karoten miktarındaki değişim takip edilmiştir.

3.2.11.1. Spektrofotometrik yöntem ile β -karoten miktarının belirlenmesi

Bu yöntem β -karotenin nano-emülsiyonlardan solvent ekstraksiyonuyla izole edilip, sonrasında UV spektrofotometreyle (Genesys 20, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) miktarının belirlenmesi esasına dayanarak yapılmıştır. β -karotenle zenginleştirilen nano emülsiyonlara (50 μ l) metilen klorit ve metanol (2:1) karışımından (5 ml) ilave edilmiş 30 sn vorteksle karıştırılmasıyla emülsiyonun su fazı ve yağ fazı birbirinden ayrılarak β -karoten ekstrakte edilmiştir. Berrak alt kısımdaki faz cam kuvete alınarak absorbans değeri 450 nm de UV-visible spektrofotometre ile ölçülmüştür. Solvent çözeltisi metilen klorit: metanol karışımı (2:1) okumalarda kör olarak kullanılmıştır. Sonuçlar farklı β -karoten konsantrasyonlarıyla çizilen standart kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmış, sonuçlar μ g β -karoten/ml nano-emülsiyon olarak ifade edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi her bir örneğin üç paraleli için en az iki kere tekrarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi Ek 1 de verilmiştir.

3.2.11.2. Renk tayini ile β -karoten miktarının değerlendirilmesi

Bu yöntemde emülsiyonun yapısına zarar vermeden, β -karotenin kimyasal degradasyonu sırasında renk yoğunluğunun azalması sebebiyle emülsiyonların renk değişimleri ölçülmüştür. Tristumulus renk koordinatları (L^* , a^* ve b^* değerleri) Hunter Kalorimetre (Color Flez EZ, HunterLab, Reston, VA, USA) ile ölçülmüştür. L^* değeri parlaklığı (yüksek olması açık rengi ifade eder), a^* değeri kırmızı rengi (pozitif yüksek değer kırmızı renk yoğunluğunu, negatif yüksek değer yeşil renk yoğunluğunu ifade eder), b^* değeri sarı rengi (pozitif yüksek değer sarı renk, negatif yüksek renkte mavi renk yoğunluğunu ifade eder) yansıtmaktadır. Emülsiyonların renk ölçümleri 10'ar ml örneklerle tek kullanımlık transparan petri kaplarında siyah arka planda ölçülmüştür. Okumalar her bir örneğin üç paraleli için en az üç kere tekrarlanmıştır. ΔE değeri aşağıda verilen formülle hesaplanmış, 7 günlük depolama sırasında ΔE^* , L^* , a^* ve b^* değerlerindeki değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir.

$$\Delta E = \sqrt{(L_t - L_0)^2 + (a_t - a_0)^2 + (b_t - b_0)^2} \quad (3-3)$$

3.2.12. GIT Koşullarında γ -Orizanol ve β -Sitosterol ile Hazırlanan NLC ve LLN'lerin Analizi

In vitro sindirim koşullarında organojelatörle yapılandırılmış organojel nano-emülsiyon örneğinin simüle edilmiş sindirim sistemi koşullarındaki davranışlarını belirleyebilmek amacıyla %30, %15 ve %0 oranında jelatörle yapılandırılmış pirinç kepeği yağı nano-emülsiyonları mikrosivılaştırıcının dar kanallarının tukanma ihtimaline karşı uygun olmaması gerekçesiyle sonikatör kullanılmıştır. Örnekler hazırlanırken, kaba emülsiyon üretimi her bir örnek için yukarıda anlatılan şartlarla aynı koşullarda üretilmiş yalnızca nano-emülsiyonların yağ fazı bileşimi %10 yerine %5 oranında uygulanmıştır. Partikül boyutlarını nano skalaya düşürmek amacıyla 3sn çalışan 3sn duran programla toplam 5 dk süreyle sonikasyon (500 W, %70 Attn, 20 kHz) işlemi uygulanmış, uygun attn değerine farklı değerlerde denemeler sonrasında karar verilmiştir. Sonikasyon uygulanan örnekler hızlı bir şekilde buz dolu kaplara daldırılarak soğutulmuş, *in vitro* koşullarda sindirim testi yapılana kadar + 4°C'de karanlıkta depolanmıştır.

Sindirim testi öncesinde başlangıçta yağ oranı %5 olan orjinal emülsiyonlar 3:2 oranında ultra saf su ile seyreltilerek analiz öncesinde yağ oranları %2 ye düşürülmüştür. Ağız, mide ve ince bağırsak koşulları yukarıda değinilen yöntemlerle hazırlanarak her bir örnek için en az iki kere tekrarlanmış, her bir tekrar için en az üç kez pertikül boyutu, zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak, örneklere ait her bir GIT koşullarında optik ve konfokal mikroskop görüntüleri alınmıştır. Bağırsak fazında kontrol örneği olarak %2'lik Q-Naturel çözeltisi kullanılmış pH- stat otomatik titratörde pH'yı nötrlemek için harcanan NaOH miktarı test örneklerinden çıkarılarak elimine edilmiştir. Serbest yağ asidi salınımı yukarıda verilmiş olan formülle hesaplanmış, bileşimde bulunan jelatör karışımını oluşturan γ -orizanol ve β -sitosterolün molekül ağırlıkları hesaplamaya dahil edilmiştir.

3.2.12.1. Biyoerişilebilirlik oranının belirlenmesi

Emülsiyon örnekleri üç aşamadan oluşan simüle edilmiş GIT aşamalarından geçtikten sonra, ince bağırsak koşulu sonrası elde edilen digesta örneğinden 20 g tartılarak 18000 rpm de 4°C de 60 dk santrifüj (Thermo Scientific, Waltham, MA) edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen sarı renkli süpernatant β -karotenin çözündüğü misel tabakası olarak kabul edilmiş ve bu fraksiyondaki karotenoid miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Kullanılan yönteme göre; 2 ml misel, 2 ml kloroform ve 2 ml metanol test tüpüne aktarılmış ve 20 sn boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 3500 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan faz başka bir tüpe alınmış ve ekstraksiyon 3 kez tekrarlanmıştır. Aynı işlemler ince bağırsak fazında elde edilen digesta içinde uygulanmış, digestadaki toplam karotenoid miktarı da tespit edilmiştir. Uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra elde edilen ekstraktların absorbans değeri 450 nm'de UV-vis Spektrofotometrede (Cary 100 UV-vis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) kloroforma karşı okunmuştur. Karotenoid konsantrasyonu β -karotenin bilinen konsantrasyonlarında hazırlanan standartlarının absorbans değerlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır. β -karotenin biyoyararlanım oranı aşağıda verilen denklemde yerine yazılarak elde edilmiştir.

$$\text{Biyoerişilebilirlik (\%)} = \frac{m_{\text{misel}}}{m_{\text{digesta}}} \times 100 \quad (3-4)$$

m_{misel} = ince bağırsak fazının yüksek devirde santrifüjü sonrasında elde edilen misel fraksiyonundaki β -karoten miktarı

$m_{digesta}$ = ince bağırsak fazı sonunda elde edilen digestadaki β -karoten miktarı

3.2.13. Keten Tohumu Yağı Nano-Emülsiyonu ve γ -Orizanol ve β -Sitosterol Karışımı ile Yapılandırılmış Organojel Nano-Emülsiyonların Üretimi

Keten tohumu yağı nano-emülsiyonu ve organojel emülsiyonlar olmak üzere iki grup nano emülsiyon üretilmiştir. Her iki grup emülsiyonda su içinde yağ nano-emülsiyonları %5 yağ ve %95 su fazından oluşmak üzere iki aşamalı emülsiyon üretimi yöntemi ile hazırlanmıştır (McClements, 2015). Yine her iki grup emülsiyon için Q-Naturel kullanılmış, %0,5 oranında yüzey aktif madde içerecek şekilde 10 mm sodyum fosfat tampon çözeltisinde (pH 7) çözülerek su fazı hazırlanmıştır. Birinci grup emülsiyonun yağ fazı yalnızca keten tohumu yağı kullanılarak hazırlanan bir örnekten oluşurken; ikinci grup emülsiyonların yağ fazında sıvı yağ olarak oksidasyona dayanıklı MCT kullanılmış, yağ fazında %5 oranlarında γ -orizanol, β -sitosterol ve her ikisinin birlikte kullanıldığı eş molar karışımını içeren nano-emülsiyonlar hazırlanmıştır. İkinci grup nano-emülsiyonlardan sadece γ -orizanol ve sadece β -sitosterol'ün MCT'de %5 oranında çözülmesiyle hazırlanmış nano-emülsiyonlar molar oranda eşit miktarda olacak şekilde 3:2 oranında karıştırılarak yeni bir örnek daha oluşturulmuştur. İkinci grup nano-emülsiyonlarda kontrol örneği için yağ fazında sadece MCT kullanılan nano-emülsiyon örneği ile birlikte toplam 5 adet örnek elde edilmiştir.

Organojel nano emülsiyonların kaba emülsiyon üretimi aşamasında γ -orizanol ve β -sitosterol'ün homojen olarak erimeleri ve orta zincirli trigliseritte çözünmesi için 90 °C'de 10 dk 300 rpm'de karıştırılarak ön ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Aynı sıcaklıkta emülsüfyer içeren su fazı da farklı beherlerde ısıtılmış, su fazı yağ fazının üzerine aktarıldıktan sonra el blenderi ile 2 dakika boyunca karıştırılarak kaba emülsiyon haline getirilmiştir. Nano emülsiyon üretiminin ikinci aşamasında hazırlanan kaba emülsiyonlar 3 sn çalışıp 3 sn duran ayarlama ile toplam 5 dk süre boyunca sonifikasyonla (500W, %70 Attn, 20 kHz) muamele edilerek submikron boyuta düşürülmüştür. Uygulanan sıcak sonifikasyon işlemi emülsiyonun sıcaklığını

artırdığından bu aşamada sıcaklık korunmuştur. İşlem sonrasında hazırlanan organojel emülsiyonlar buz içeren kaplarda bekletilerek hızla soğutulmuştur.

Keten tohumu yağı nano emülsiyonu için ön ısıtma işlemi olmadan doğrudan su fazı ve yağ fazı kaba emülsiyon haline getirilmiştir. Aynı koşullarda sonikasyon işlemi (soğuk sonifikasyon yöntemi) keten tohumu yağı nano-emülsiyonu üretilirken de sağlanmış, farklı olarak sonifikasyon işlemi sırasında oksidasyonu kontrol etmek amacıyla sonikasyon probunun daldırıldığı beher buz içeisine yerleştirilerek sıcaklığın yükselmesi önlenmiştir.

3.2.14. Emülsiyonların Oksidatif ve Fiziksel Stabilitelerinin Ölçülmesi

Keten tohumu nano-emülsiyonlarının oksidatif stabiliteleri üzerine γ -orizanol ve β -sitositerol bileşenlerinin ayrı ayrı ve birlikte etkisini incelemek amacıyla birinci grup emülsiyon ile ikinci grubu oluşturan her bir 5 ayrı nano-emülsiyon 1:1 oranda karıştırılmıştır. Antimikrobiyal koruyucu olarak %0,02 oranında sodyum azide eklendikten sonra test her analiz günü için tüplerine 4 er ml eşit hacimlerde dağıtılmış, test tüplerinin ağzı kapatılarak buharlaşmayı önlemek amacıyla parafilmle sarılmıştır. Hazırlanan nano-emülsiyon karışımları hızlandırılmış oksidasyon koşulunda 55°C sıcaklıkta karanlık ortamda 10 gün boyunca depolanmıştır. Depolama sırasında belirli periyotlarla nano emülsiyon karışımlarının oksidatif stabiliteleri birincil ve ikincil oksidasyon ürünleri sırasıyla peroksit sayısı (PV) ve tiyobarbütirik asit sayısı (TBARS) yöntemleriyle belirlenmiş, yöntemlerin detayları aşağıda verilmiştir. Örneklerin fiziksel stabiliteleri ise yukarıda daha önce anlatılan yöntemlerden partikül boyutu, zeta potansiyeli ve optik mikroskop ölçümleriyle takip edilmiştir. Örneklerin her biri iki tekerrür olarak üretilmiş, bütün ölçümler her bir tekerrür için 3 er paralel olarak yapılmıştır.

3.2.14.1. Peroksit sayısı (PV) analizi

Hazırlanan nano emülsiyon karışımlarında depolama süresince meydana gelen lipit hidroperoksitlerinin miktarı; (Uluata *et al.*, 2015a) tarafından tarif edilen metoda göre belirlenmiştir. Analiz için hazırlanan test tüpleri inkübatörden alınarak vortekslenmiştir. Homojen emülsiyon karışımından 0,3 ml alınarak 1,5 ml izooktan/2-propanol (3:1, v/v) solüsyonu ile karıştırılıp 10'ar sn 3 kere vortekslenmiştir. Daha sonra 3400 rpm hızla 10 dk santrifüj (Centrifug centrifuge, Thermo Fisher Scientific

Inc., Fairlawn, NJ) edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte biriken organik fazdan 200 µl alınarak 2,8 ml metanol/butanol (2:1, v/v) solüsyonunun üzerine eklenmiştir. Devamında 15 µl amonyum tiyosiyanat (3,94 M) ve 15 µl Fe⁺² reaktif çözeltileri eklenmiştir. Fe⁺² reaktifi; eşit miktarda karıştırılan 0,132 M BaCl₂ (0,4 M HCl de) ile 0,144 M FeSO₄ çözeltilerinin üst fazından taze olarak hazırlanmıştır. Vortekslenen test tüpleri 20 dk karanlıkta bekletildikten sonra absorbans değerleri 510 nm de UV-vis spektrofotometrede (Genesys 20, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) okunmuştur. Hidroperoksit konsantrasyonları kümene hidroperoksitten hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış, mM lipit hidroperoksit biriminden ifade edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Ek 2 de verilmiştir.

3.2.14.2. Tiyobarbütirik asit sayısı (TBARS) analizi

Nano emülsiyon karışımlarında meydana gelen ikincil oksidasyon ürünlerinin miktarını belirlemede kullanılan TBARS analizi (Liang *et al.*, 2017) tarafından kullanılan metoda göre uygulanmıştır. Özetle 1 ml emülsiyon 2 ml tiyobarbütirik asit (TBA) çözeltilisiyle karıştırılıp, 15 dk kaynama sıcaklığındaki su banyosunda bekletilmiştir. TBA çözeltilisi 15 g trikloroasetik asit, 0,375 g TBA, 1,76 ml 12 N HCl ve 82,9 ml H₂O'nun tamamen çözünene kadar karıştırılıp 24 saat dinlendirilmesiyle hazırlanmıştır. Sonrasında test tüpleri buzlu su içeren bir kaba 10 dk daldırılarak reaksiyonun durması sağlanmış, soğuyan tüpler 15 dk 2000 rpm'de santrifüj edildikten sonra 532 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Örneklerdeki TBARS konsantrasyonu 1,1,3,3 tetraetoksipropan (TEP) standardı kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Sonuçlar µM TEP birimiyle ifade edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Ek 3 de verilmiştir.

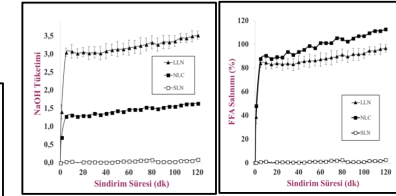
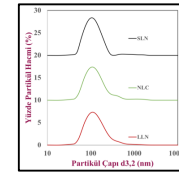
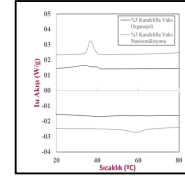
3.2.15. İstatistik Analizi

Analizlerin tamamı hazırlanan üç örnekte en az iki kere tekrarlanarak yapılmış, bu ölçümlerden elde edilen sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleriyle ifade edilmiştir. Örnekler arasında farklılıkların önemlilik düzeyini tespit etmek amacıyla ölçülen değerlerin istatistiksel analizleri SPSS software programıyla (IBM Corporation, USA) one-way ANOVA (posthoc; Duncan test) ve paired samples t-Testleri kullanılarak analiz edilmiştir. Kullanılan istatistiksel analiz yöntemlerinde istatistiksel önemlilik düzeyi $p < 0,05$ olarak seçilmiştir.



Kandelilla vaks
kullanılarak üretilen
nanoemülsiyonlar

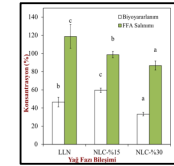
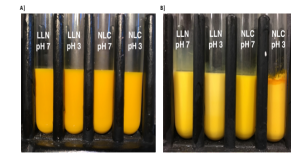
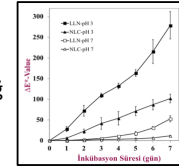
- Fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi
- *In-vitro* sindirim koşullarında serbest yağ asidi salınım profilinin belirlenmesi



ORGANOJEL YAPILI
NANO-EMULSION
SİSTEMLER

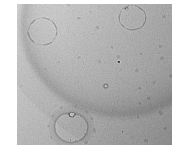
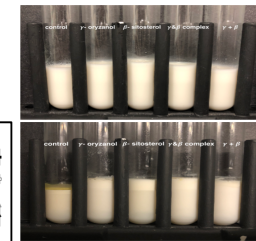
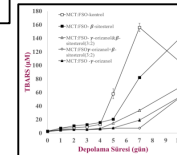
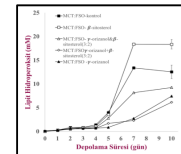
γ -Oryzanol ve β -
Sitosterol kullanılarak
üretilen Organojel
nanoemülsiyon
sisteminde
 β -Karoten
enkapsülasyonu

- β -Karotenin kimyasal stabilitesinin ölçülmesi
- *In-vitro* sindirim koşullarında serbest yağ asidi salınımı
- β -Karoten biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi



MCT, γ -oryzanol ve β -
sitosterol karışımı ile
üretilen
nanoemülsiyonların
keten tohumu yağı
nanoemülsiyonlarının
oksidatif stabilitesi
üzerine etkisi

- Hızlandırılmış oksidasyon koşullarında
- Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin belirlenmesi
- Fiziksel stabilite
- TEM görüntüsü



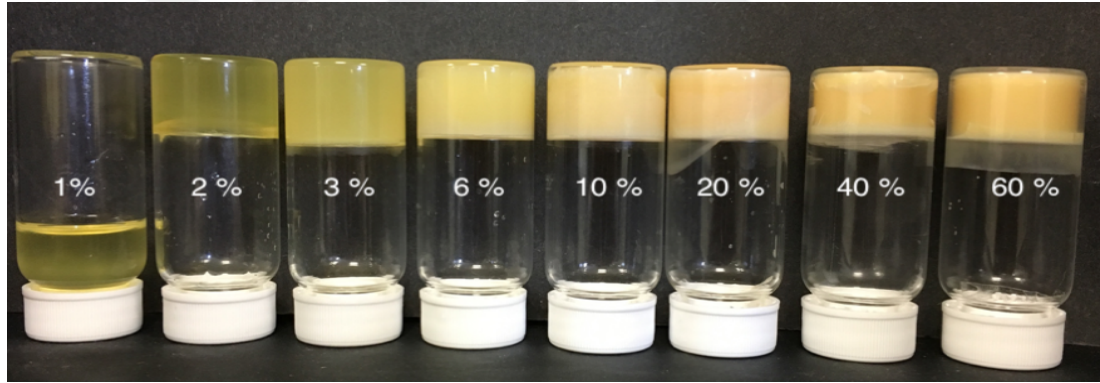
Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında kurgulanan deneysel dizaynların şematik olarak gösterimi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kandelilla Vaksın Jelatör Olarak Kullanıldığı Örneklerle Ait Sonuçlar

4.1.1. Kandelilla Vaks Organojellerin Oluşumunun Gözlemlenmesi

Vakslar genel olarak kaynaklarına göre doğal ya da sentetik olarak sınıflandırılan kompleks bileşiklerdir. Kaynaklarına bağlı olarak yağ alkollerini, yağ asitleri, vaks esterleri, steroller, yüksek erime noktasına sahip alkanlar ve diğer bileşiklerden oluşurlar (Akoh, 2017). Vakslar bitkisel yağlarla karıştırıldıklarında, vaksın yapısında bulunan n- alkanlar zamanla biraraya gelerek bitkisel yağı içerisine hapseden 3 boyutlu ağı yapı meydana getiren mikrokristal formlar oluşturular (Blake *et al.*, 2014).



Şekil 4.1. Mısır özü yağında farklı oranlarda seyreltilerek elde edilen Kandelilla vaks organojellerinin oda koşullarında elde edilen görüntüsü

Organojel oluşturmak için gereken minimum orandaki vaksın belirlenmeye çalışıldığı yapılan deneyde cam test kapları ters çevrildiklerinde akmanın gözlemlenmediği jel benzeri yapının elde edilebilmesi için en az %1 Kandelilla vaksın mısır özü yağına katılması gerektiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Bu sonuç diğer araştırmacılar tarafından bildirilen, Kandelilla vaksın %1-2 oranındaki oranlarda soya çekirdeği yağına katıldığında (Hwang *et al.* 2012) ve ayçiçek yağına %1 in üzerinde oranlarda katıldığında (Toro-Vazquez *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2012) organojel oluşturduğu çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Ancak jel oluşumunun gerçekleşmesi için gereken minimum vaks oranı üzerinde kullanılan vaksın saflığının önemli ölçüde etkili olduğu ve Kandelilla vaksın saflığının yapısında

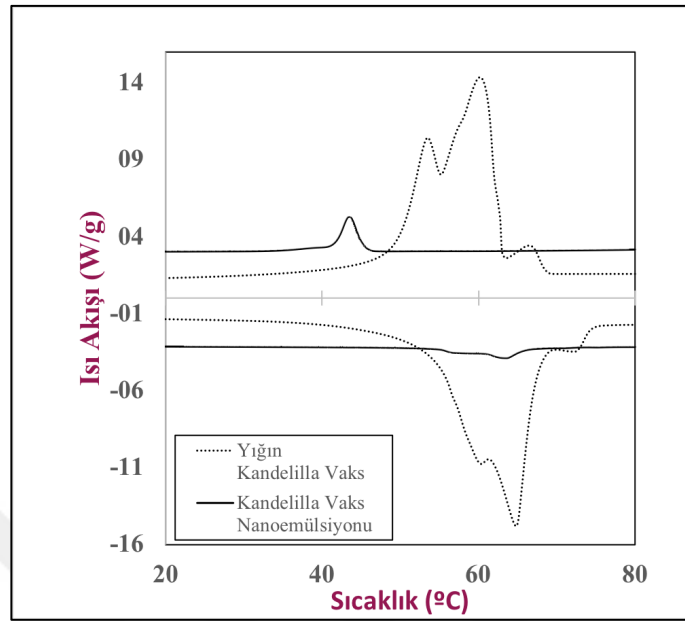
bulunan n- alkan miktarı ile doğru orantılı olduğu Toro- Vazquez tarafından yürütülen başka bir çalışmada tespit edilmiştir (Toro-Vazquez *et al.*, 2007).

4.1.2. Kandelilla Vaks Organojellerinin ve Kandelilla Vaks Kullanılarak Üretilen Nano-Emülsiyonların Termal Davranışları

Bu bölümde iki ayrı grup örneğin erime ve katılaşma noktaları gibi termal davranışları birbirleri arasında karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir, DSC kullanılarak tayin edilen erime ve kristallenme sıcaklıkları ve örneklerin eritme ve soğutma termogram eğrileri Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Tablo 4.1 de verilmiştir. Birinci grup örnekler sade Kandelilla vaks ve yağ fazı olarak sadece Kandelilla vaks kullanılarak üretilen nano-emülsiyonun termogramlarından (Şekil 4.2) oluşmaktadır.

Saf Kandelilla vaks ve Kandelilla vaks ile üretilen nano-emülsiyona ait termal eğrilerin gösterildiği Şekil 4.2'ye ve termal davranışlarını niteleyen erime noktası (T_m), erime entalpisi (ΔH_m), kristalizasyon noktası (T_c), kristalizasyon entalpisi (ΔH_c) gibi eğrilerde kristalizasyona ve erimeye bağlı olarak meydana gelen piklerin tepe noktalarının ve boyutlarının değerlendirilmesiyle hesaplanan sayısal sonuçların ifade edildiği Tablo 4.1 e göre, örnekler arasında erime sıcaklıklarında önemli bir farklılık gözlemlenmezken ($p < 0,05$), kristalizasyon sıcaklıklarında yağ fazını oluşturan Kandelilla vaksın kristallenme sıcaklığı ($60,15 \text{ }^\circ\text{C}$) emülsüfiye edilmiş haline ($43,96^\circ\text{C}$) göre belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Erime ve kristalizasyon entalpileri kıyaslandığında Kandelilla vaksın entalpi değerlerinin 20 kat daha az miktarda vaks içeren %5'lik Kandelilla vaksı nano-emülsiyonuna kıyasla kristalizasyon entalpisi 20 kattan az, erime entalpisi ise 20 kattan daha fazla yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlara göre nano-emülsiyon örneğinin saf Kandelilla vaksıya göre daha kolay eridiği ancak daha geç kristalize olduğu yorumu yapılabilir. Emülsüfiye edilen yağ fazının kristalizasyon noktasında gerçekleşen düşüş Kandelilla vaksın yapısında bulunan safsızlıklarla ya da çoklu bileşenlerden oluşmasıyla ilişkili olan süpersoğutma etkisi ile açıklanabilir (McClements, 2012a). Yığın erimiş yağlarda içerikte bulunan safsızlıklar heterojen çekirdeklenme olarak adlandırılan kristalizasyonun başlaması için destekleyici ajan görevi görürlerken; i) emülsüfiye edilmiş yağlarda her bir damlacıkta bu safsızlıkların olma olasılığı azalmaktadır, ii) safsızlıklar damlacıkların iç kısmından ara yüzeyine doğru çıkabilirler bu durum damlacıkların içinde kristalleşmenin komplikasyonuna neden olabilir ve sonuç olarak

kristalleşme homojen çekirdeklenme yoluyla meydana gelebilir (Coupland, 2002; McClements, 2012a; Gao and McClements, 2016).



Şekil 4.2. Sade Kandelilla vaks ve yağ fazı olarak sadece Kandelilla vaks kullanılarak üretilen nano-emülsiyonun termogramlarının karşılaştırılması

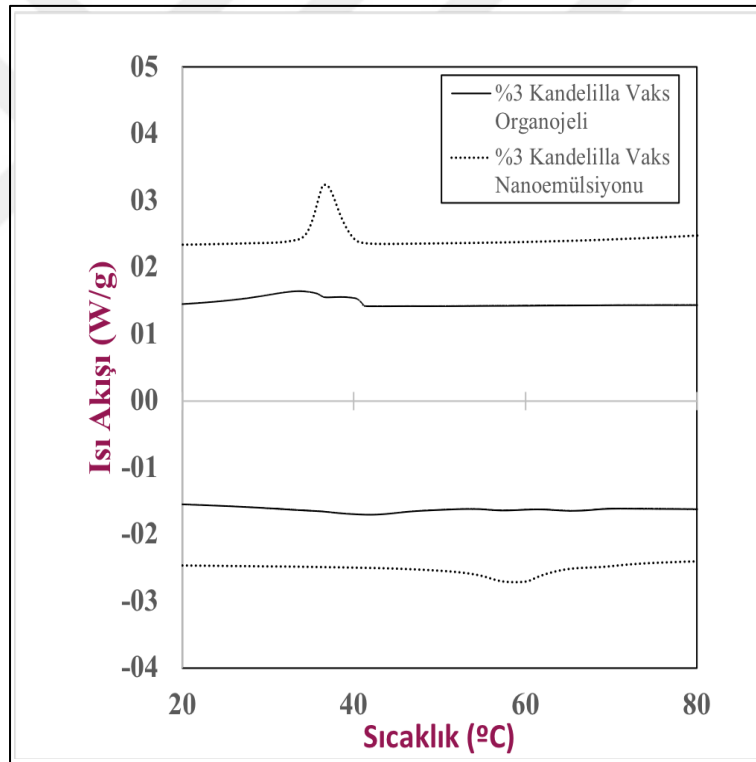
İkinci grup örnekler mısırozü yağında %3 oranında Kandelilla vaks içeren organojel ile toplam emülsiyon miktarında %3 oranında Kandelilla vaks içeren %5 yağ fazının %2 Tween 80 ile emülsüfiye edildiği nano-emülsiyon örnekleridir. Nano-emülsiyon örneğinin yağ fazı %60 Kandelilla vaks içermektedir. Kandelilla vaks organojel örneği de önce vaks tamamen eriyene kadar karıştırılarak ısıtılmış, daha sonra homojen eriyik oda sıcaklığına soğutularak organojel oluşturması sağlanmıştır. İkinci grup örneklerin termogramları Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Kandelilla vaks kullanılarak elde edilen organojel ve nano-emülsiyon örneklerinin termal özellikleri

Örnekler	T _m	ΔH _m (J/g)	T _c	ΔH _c (J/g)
Kandelilla vaks	64,91± 0,11 c	155,43±12,94 b	60,15±0,16 c	147,97±9,80 b
Kadelilla vaks emülsiyonu	63,31±0,53 c	5,95±0,46 a	43,96±0,42 b	8,29±0,23 a
%3 Kandelilla vaks organojeli	40,62±0,45 a	2,28±0,09 a	32,79±0,58 a	4,93±0,13 a
%3 Kandelilla vaks emülsiyonu	57,99±1,29 b	2,36±0,35 a	36,66±0,08 a	5,42±0,19 a

Sonuçlar üç tekerrürün ortalamasını (n=3) ± standart sapmayı (p<0,05) ifade etmektedir. %3 (w/w) Kandelilla vaks konsantrasyonu ile hazırlanan organojel ve emülsiyon örneğindeki oran ürünlerin son hacimlerindeki oranı ifade etmektedir.

İkinci grup örneklerin koşullarında eşit oranda Kandelilla vaks içerdiklerinden safsızlık konsantrasyonlarının da eşit olması sebebiyle kristalizasyon sıcaklıkları birbirine yakın bulunmuş ancak erime noktalarına bakıldığında emülsüfiye organojelin %3 Kandelilla vaks içeren yığın organojelin erime noktasından daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4-1). Erime noktalarında meydana gelen bu farklılığın altında yatan sebep yığın yağ ve nano-emülsiyon olmak üzere bu iki sistemde farklı kristalizasyon oluşum şekillerinden kaynaklanabilir. Daha öncede belirtildiği gibi yığın yağlar heterojen kristalizasyona eğilim gösterirken, küçük yağ damlacıklarının oluştuğu emülsüfiye yağlarda homojen kristalizasyon meydana gelmektedir (McClements, 2012a). İkinci grup örneklerin erime ve kristalizasyon entalpileri karşılaştırıldığında bileşimlerinde bulunan Kandelilla vaks miktarının aynı olmasının sonucu olarak istatistiksel olarak önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p < 0,05$),



Şekil 4.3. Mısırözü yağında %3 Kandelilla vaks içeren organojelin ve yağ fazı olarak mısırözü yağında %60 Kandelilla vaks kullanılarak üretilen nano-emülsiyonun DSC termogramlarının karşılaştırılması

4.1.3. Yağ Fazında Artan Kandelilla Vaks Konsantrasyonunun Nano-Emülsiyonların Partikül Boyutu ve ζ -Potansiyeli Üzerine Etkileri

Kandelilla vaks ile yağ partiküllerinin organojele dönüştürüldüğü kabul edilen artan konsantrasyonlarda Kandelilla vaks eklenerek toplam %5'lik yağ fazının

kalanının mısırözü yağından oluştuğu nano-emülsiyonlar üretilmiştir. Öncesinde ısıtılmış her iki yağ ve su fazı ön karışım yapıldıktan sonra elde edilen kaba emülsiyonlarda oluşan partikül boyutlarını submikron düzeye düşürmek amacıyla toplamda 5 dk süresince sonikasyona maruz bırakılmışlardır. Sonikasyon prosesi sırasında; örnek hacmi, prob boyutu, beher şekli, prob ucunun yerleştirildiği derinlik, ortam sıcaklığı gibi bazı parametreler sabit tutulmaya çalışılmıştır. Örnekler buz içeren kapta hızlı şekilde soğutulduktan sonra oda sıcaklığı koşullarına getirilmiş ve lazer kırınım ölçeri (Beckmann Coulter) ile partikül boyutu ve Zetasizer ile zeta potansiyeli ölçümleri alınmıştır. Üretilen farklı oranlarda Kandelilla vaks içeren nano-emülsiyon örneklerinin partikül boyutları ve zeta potansiyelleri Tablo 4-2 de verilmiş, bazı örneklerin partikül boyut dağılımları da Şekil 4.4 de kıyaslanmıştır.

Tablo 4.2. Farklı oranlarda Kandelilla vaks içeren nano-emülsiyon örneklerinin partikül boyutları ve zeta potansiyelleri

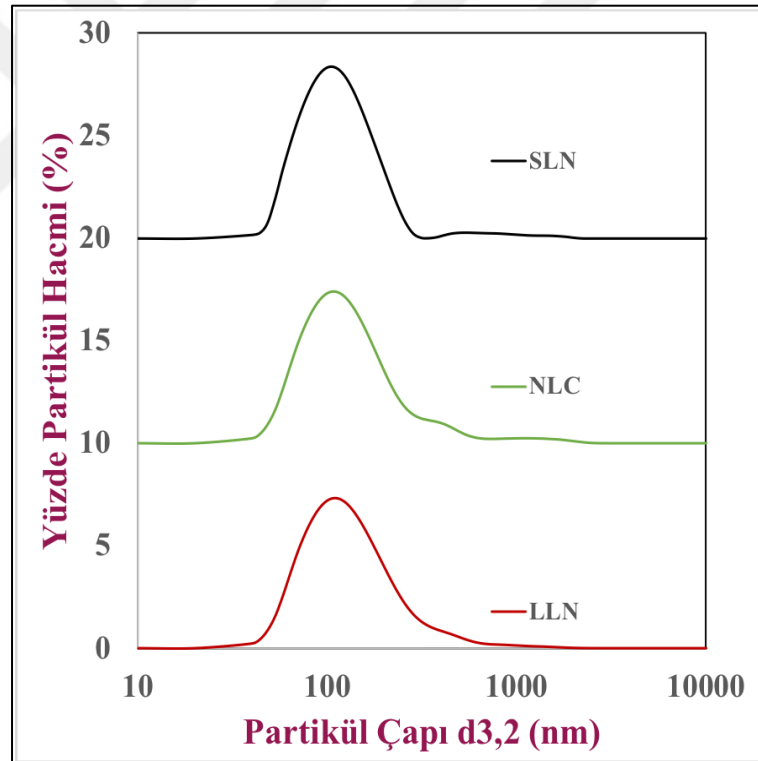
Yağ Fazı Kompozisyonu	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	ζ-Potansiyeli (mV)
%100 Mısırözü Yağı	170,7 ± 1,5 ^d	-25,5 ± 3,3 ^a
%0,5 Kandelilla vaks	160,0 ± 1,7 ^b	-33,2 ± 3,1 ^b
%1 Kandelilla vaks	171,7 ± 0,6 ^d	-34,1 ± 1,2 ^{bc}
%3 Kandelilla vaks	171,0 ± 1,0 ^d	-37,1 ± 1,9 ^{cd}
%6 Kandelilla vaks	167,3 ± 0,6 ^{cd}	-38,4 ± 2,1 ^{de}
%10 Kandelilla vaks	165,0 ± 1,0 ^{bc}	-41,2 ± 1,8 ^{efg}
%20 Kandelilla vaks	162,3 ± 2,3 ^{bc}	-40,0 ± 1,5 ^{def}
%40 Kandelilla vaks	178,7 ± 0,6 ^e	-43,0 ± 0,8 ^{fgh}
%60 Kandelilla vaks	196,7 ± 3,8 ^f	-44,3 ± 0,3 ^{gh}
%100 Kandelilla vaks	150,3 ± 7,6 ^a	-46,8 ± 0,3 ^h

Sonuçlar üç tekerrürün ortalamasını (n=3) ± standart sapmayı (p<0,05) ifade etmektedir. % (w/w) olarak ifade edilen Kandelilla vaks konsantrasyonu ile hazırlanan emülsiyon örneğindeki yağ fazında bulunan oran olup kalan kısım mısırözü yağına aittir.

Tablo 4-2’de verilen sonuçlar göstermektedir ki, artan konsantrasyonlarda Kandelilla vaks eklenerek üretilen nano-emülsiyonların partikül boyutları 150 – 179 nm aralığında değişmektedir. Formülasyona eklenen Kandelilla vaks konsantrasyonunun partikül boyutu üzerine etkisinin önemsiz düzeyde olduğu görülürken, sadece Kandelilla vaks kullanılarak üretilen katı lipit nanopartikülün partikül boyutunun diğer örneklerin partikül boyutlarına kıyasla daha küçük olduğu görülmüştür. Nano-emülsiyon üretim koşulları genel olarak ele alındığında; önemli üretim parametrelerinden, yağ yüzdesi, uygulanan basınç ve döngü ya da enerji ve

süresinin partikül boyutu değişimi üzerinde yağ fazının formülasyonunun değiştirilmesine kıyasla daha az etkisinin olduğu bilinmektedir. Nano-emülsiyonların yağ fazında bulunan sıvı yağa belli oranlarda katı lipit katılarak NLC üretiminin partikül boyutu üzerine etkisinin olup olmadığı literatürde başka çalışmalarda da incelenmiştir (Saupe *et al.*, 2005; Asumadu-Mensah *et al.*, 2013).

Üretilen nano-emülsiyonların %100 Kandelilla vaksın emülsüfiye edilmesiyle üretilen örnek SLN, %60 Kandelilla vaks ve kalanının mısırözü yağı olduğu katı ve sıvı yağ karışımı ile üretilmiş organojel nano-emülsiyon örneği NLC örnekleri olarak, sadece sıvı formdaki mısırözü yağı kullanılarak üretilen nano-emülsiyonlar ise LLN ler olarak adlandırılmıştır. SLN, NLC ve LLN örneklerinin Şekil 4.5’de verilen partikül boyutu dağılımları incelendiğinde SLN örneklerinin diğerlerinden farklı olarak daha dar bir pike sahip olduğu ve tekli dağılımının daha iyi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4. SLN (Kandelilla vaksı), NLC (Kandelilla vaksı ve mısır yağ karışımı) ve LLN (mısır yağ nano-emülsiyonu) partikül büyüklüğü dağılımı

NLC ve SLN sistemlerin partikül boyutları dağılımlarının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ayçiçek yağına %10 katı lipitin katıldığı NLC örneğinin SLN örneğine kıyasla daha iyi bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğu bildirilmiştir (Asumadu-Mensah *et al.*, 2013). Bu farklı bulgunun emülsiyon üretim tekniklerinin farklı

olmasından kaynaklanmaktadır. Jafari *et al.* (2006) tarafından yürütülen bir başka çalışmada mikrosivılaştırma ve sonikasyon teknikleri kullanılarak nano-emülsiyonların partikül boyutu dağılımları karşılaştırılmış, her iki yöntemle de submikron boyutta emülsiyonlar üretilebilmesine rağmen, mikrosivılaştırmanın sonikasyona kıyasla nano-emülsiyonlarda daha dar boyut dağılımı verdiği bildirilmiştir. Buna karşın elde edilen partikül dağılımı ve üretim kolaylığı açısından SLN üretimi için sonikasyon tekniğinin daha uygun olabileceği söylenebilir.

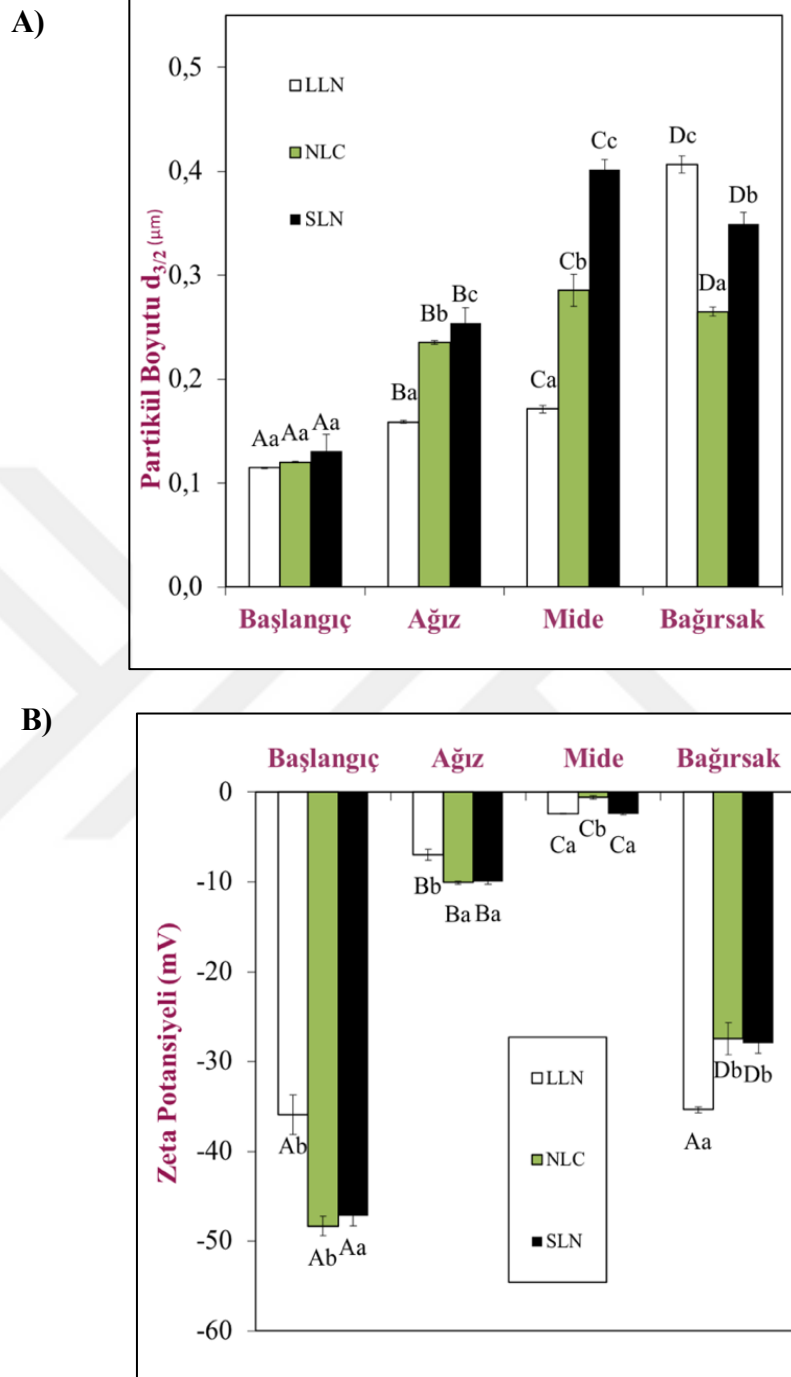
Nano-emülsiyonların elektriksel yükleri; onların diğer yüklü bileşiklerle nasıl etkileşime gireceğini ve farklı elektriksel yüklü ortamlarda stabilitesinin nasıl olacağını anlamak açısından önem arzeder. Net yükü 30 mV dan daha yüksek olan nano-emülsiyonlar birçok durumda stabil kabul edilebilirler. Örnekler arasında karşılaştırma yapmak ve agregasyona karşı stabilitelelerini ölçmek amacıyla Zeta potansiyelleri ölçümleri alınmıştır. Bu açıdan değerlendirme yapıldığında organojel oluşturmak amacıyla yağ fazına artan oranlarda Kandelilla vaksın katıldığı nano-emülsiyon örneklerinde artan Kandelilla vaks oranının Tween 80 ile stabilize edilen nano-emülsiyonların stabilitesini artırdığı gözlemlenmiştir (Tablo 4-2). Non-iyonik bir sürfaktan olan Tween 80 ile kaplanan nano-emülsiyonlar teorik olarak yüksüz olmaları gerekirken negatif yüklü oldukları ölçümlerde tespit edilmiştir (McClements, 2015). Negatif yüklü olmaları altında yatan sebep, nano-emülsiyonların lipit fazlarının kompozisyonunda bulunan serbest yağ asitleri ve diğer iyonik bileşikler olabileceği bildirilmiştir (McClements, 2011). Çalışmada kullanılan Kandelilla vaksın temin edildiği Sigma firmasından alınan bilgiye göre Kandelilla vaksın asit sayısı 11-19 mg KOH/g olup bu durum negatif yüklü nano damlacıkların oluşmasında etkili olmuş olabilir.

4.1.4. Kandelilla Vaks ile Hazırlanmış SLN, NLC ve LLN Örneklerinin *In Vitro* Sindirim Koşullarında Elde Edilen Sonuçları

SLN, NLC ve LLN olarak adlandırılan lipit fazı bileşimi üzerinde farklılıklar gösteren nano-emülsiyonlar, ağız, mide ve bağırsak fazlarından oluşan *in vitro* sindirim koşullarında davranışlarını izlemek için oluşturulan simüle insan GIT basamaklarına maruz bırakılmıştır. Partikül büyüklüğü, partikül yükü ve mikroyapısal özellikleri, başlangıç dahil olmak üzere her fazda meydana gelen değişiklikler belirlenmiş olup partikül büyüklüğü değişiklikleri Şekil 4.5.a'da ve zeta yükü değişimi

Şekil 4.5.b’de ve optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Nano-emülsiyon numuneleri arasında, SLN’nin lipit fazı bileşiminde sadece Kandelilla vaksı vardır ve LLN’de sadece mısır yağı, NLC’de ise yağ fazı bileşimi hem katı vaks hem de sıvı mısırözü yağı 60:40 oranı ile hazırlanmıştır. Bu üç nano-emülsiyon numunesi, yukarıda tartışılan artan vaks oranları ile lipit fazındaki farklılıklara göre analiz edilen nano-emülsiyonlardan farklı olarak, *in vitro* sindirim testi için taze olarak hazırlanmıştır. Bu iki dizi üretimin bazı örneklerin başlangıç özelliklerinde, daha önce belirtildiği gibi sonikasyon işlemi sırasında kontrol edilemeyen koşullardan kaynaklanan parçacık büyüklüğü ve zeta yükü arasında önemsiz derecede farklılıklar vardır. *In vitro* sindirim testi için üretilen nano-emülsiyonlar, artan jelator oranlarına göre LLN, NLC (lipit fazında %60 Kandelilla balmumu) ve SLN’nin partikül büyüklükleri sırasıyla 151 nm, 172 nm ve 130 nm iken, önceki üretimde ortalama olarak 170 nm, 196 nm ve 150 nm değerleri ölçülmüştür. Sindirim koşullarında test öncesi örnekler aynı sırayla ortalama olarak -35,9, -48,3 ve -47,2 zeta yüklerine sahip iken, daha önce bu ölçümlerin -25,5, -43,2 ve -46,8 olduğu belirtilmiştir. Sindirimin ilk adımında, numuneler ağız fazında müsün içeren simüle edilmiş tükürük sıvısına tabi tutulmuş, üç numunenin de partikül büyüklüğü ağız fazından geçtikten sonra başlangıçtaki partikül büyüklükleriyle orantılı olarak artma eğilimi göstermiştir. Parçacık büyüklüğünün artmasına neden olan bu değişiklik, “deplezyon flokülasyonu” olarak adlandırılan artan müsün konsantrasyonunun partiküllerin arasındaki boşluğu azaltarak birbiriyle etkileşmesini sağlayarak flokülasyonla boyutlarının artmasıyla açıklanabilir ve ayrıca müsünlerin spesifik bağlanma veya köprüleme davranışı da flokülasyon oluşumunda etkili olabilir (Vingerhoeds *et al.*, 2005). Benzer eğilim partikül yüklerinde de gözlenmiştir, tüm örneklerin negatif yükü başlangıç koşulundaki yükleriyle orantılı olarak azalmıştır. Zeta potansiyelinin büyüklüğünde gözlenen azalma, tükürük çözeltisinde mevcut olan tuzlar nedeniyle elektrostatik tarama etkisine bağlı olabilir, ayrıca anyonik yağ damlacıkları yüzeyine anyonik müsün moleküllerinin absorbe edilmesi de bu duruma etki etmiştir, müsünler tuz köprüleriyle örneğin Ca^{+2} iyonları tarafından veya hidrofobik etkileşimler ile emülsiyon damlacıklarının yüzeyine tutunabilmektedir (Ozturk *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Örneklerin net yükleri yani zeta potansiyelleri azaldığında partiküllerin stabilitesi de azalır ve ağız fazında flokülasyonların meydana gelmesini tetiklenir. Optik mikroskopla elde edilen ağız fazına ait görüntüler (Şekil 4.6) incelendiğinde elde

edilen görseller her üç örnekte de flokülasyon meydana geldiğini açıkça göstermektedir.

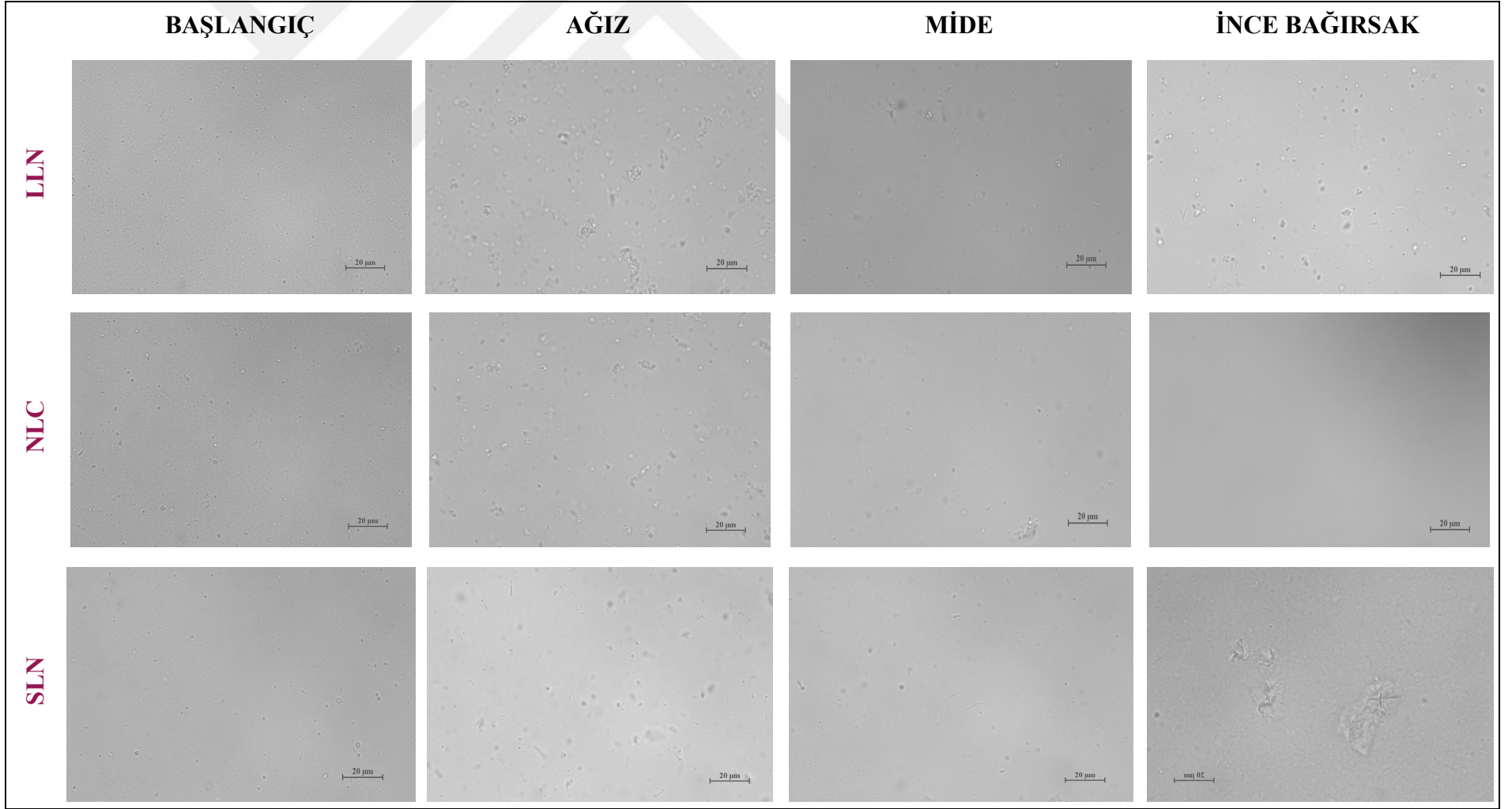


Şekil 4.5. Gastrointestinal evrelerinin , SLN (Kandelilla vakası), NLC (Kandelilla vakası ve mısır özüyağı karışımı; 60:40) ve LLN (mısırözü yağı) sistemlerinin **A)** Partikül büyüklükleri **B)** Zeta potansiyelleri üzerindeki etkisi

Küçük harfler (a, b, c d), farklı yağ fazı içerikleri ile üretilen SLN, NLC ve LLN örnekleri arasındaki farklılığı (aynı GIT aşamasında) ifade ederken, büyük harfler (A, B, C, D) farklı GIT aşamalarındaki önemli değişimleri ifade (aynı örnekte) etmektedir ($p < 0,05$); One way ANOVA, Duncan).

Mide fazında nano-emülsiyon örneklerinde gerçekleşen fizikokimyasal değişiklikler incelendiğinde, tüm örneklerde ağız fazında meydana gelen agregasyonun mide fazından sonra benzer şekilde geliştiği, tüm örneklerin partikül büyüklükleri artarken, negatif zeta potansiyel büyüklüklerinin SLN, NLC ve LLN örneklerinin gastrik faz öncesi değerleri ile orantılı olarak azaldığı görülmüştür. İyonik olmayan bir yüzey aktif madde olan Tween 80, daha yüksek pH değerleri koşullarında negatif olarak yüklenme ve 4'ten düşük pH değerleri ise pozitif olarak yüklenme eğilimindedir. Çevresel pH değerinin damlacıkların partikül yüküne etkisinin atfedilen nedenlerinden biri, OH-iyonlarının yüzey aktif maddelerin hidrofilik gruplarına adsorpsiyonudur. Bu nedenle, ağızdan mide fazına geçiş sırasında pH değerindeki değişime bağlı olarak tüm örneklerin net yükünde bir azalma beklenmiştir. Diğer taraftan, mide fazının etkisine bağlı olarak net partikül yükünde meydana gelen azalmanın bir başka nedeni simüle mide sıvısı ile gelen Na^+ gibi ilgisiz elektrolit iyonları olabilir. Bu tür iyonlar elektrostatik tarama etkisine bağlı olarak H^+ iyonlarıyla rekabet ederek damlacıkların iyonlaşma gücünü azaltır (McClements 2015). Örneklerde Kandelilla vaksından kaynaklanan serbest yağ asitleri veya yüzey aktif madde içindeki safsızlıklar da parçacıkların negatif yüklü olmasına neden olur. Zeta yükü azalmasının Kandelilla vaksının muhtevasının oranıyla ilişkisi, aynı zamanda Kandelilla vaksındaki serbest yağ asitlerinin (COO^-) gruplarıyla mide ortamında bulunan (Na^+) iyonlarının reaksiyonuna bağlı olabilir.

İnce bağırsak fazının sonunda, başlangıç koşullarına kıyasla her bir örneğin partikül boyutlarında önemli değişimler gözlemlenmiştir. Kimüs olarak adlandırılan, mide fazından ince bağırsak fazına geçen yarı sindirilmiş örneklerin partikül boyutları incelendiğinde bir önceki fazla kıyasla LLN örneklerinin partikül boyutlarında artış meydana geldiği, NLC örneklerinde önemli düzeyde bir artış meydana gelmediği, yağ fazında sadece Kandelilla vaks bulunan SLN örneklerinde ise partikül boyutlarında azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Yine bu fazda da partikül boyutu ölçümleri ile optik mikroskop ölçümleri karşılaştırıldığında sonuçların birbiriyle bağdaştığı görülmüştür. Şekil 4.8'de optik mikroskop görüntülerine yakından bakıldığında LLN örneklerinin ince bağırsak fazında diğer örneklerden farklı olarak farkedilebilir şekillerde daha büyük flokların varlığı gözlemlenmiştir. Bu floklar lipaz aktivitesi sonucu oluşan serbest yağ asitlerinin ve monoaçilgliserollerin ortamda çözünmesiyle ve safra tuzlarından oluşan veziküllerin oluşturduğu misellerdir.



Şekil 4.6. Gastrointestinal aşamaların SLN, NLC ve LLN örneklerinin mikroyapıları üzerine etkisi

SLN örneklerinin bir sonraki bölüde açıklanan Şekil 4.7’de verilen serbest yağ asidi salınım profilinden anlaşıldığı üzere, Kandelilla vaksının sindirilemediği görülmüştür ve bundan dolayı ince bağırsak fazında oluşan miseller ve veziküller yeteri kadar büyük değildir, sadece safra tuzundan oluşmaktadırlar. Nano-emülsiyon örnekleri ince bağırsak fazının nötral koşullarıyla (pH 7) karşılaştıkları zaman bütün örneklerin net yük değerleri artış göstermiş, sindirim öncesindeki orijinal yükleri gibi negatif olarak yüklenmişlerdir. Beklendiği üzere, ince bağırsak fazı sonunda LLN örnekleri anyonik sindirim bileşenlerinden özellikle safra tuzları ve lipaz aktivitesi sonucu salınan serbest yağ asitlerinin negatif olarak yüklenmeyi desteklemesi sonucu diğer örneklere kıyasla daha fazla negatif yükü yüklenmiştir.

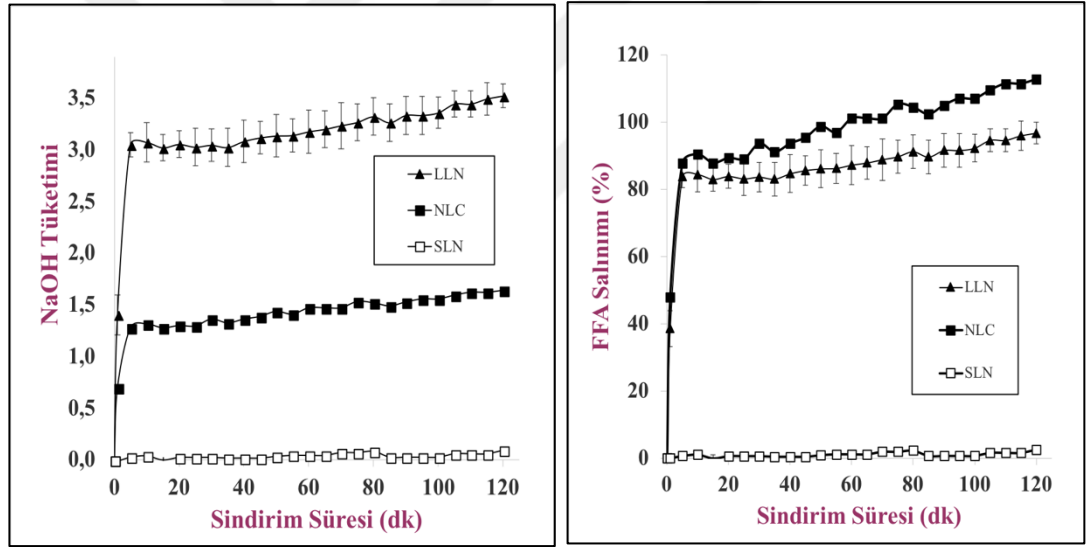
4.1.5. SLN, NLC ve LLN’lerin Serbest Yağ Asidi Salınım Profillerinin Değerlendirilmesi

Simüle bağırsak koşullarında SLN, NLC ve LLN örneklerinin sindirim hızı, zaman içinde salınan serbest yağ asitlerini nötralize etmek için tüketilen 0,1 N NaOH miktarı pH-stat yöntemi kullanılarak 2 saat boyunca izlenmiştir. Moleküler ağırlığını bildiğimiz herhangi bir yağ için, tüketilen NaOH miktarı kullanılarak salınan serbest yağ asidi yüzdesini hesaplamak mümkündür, ancak Kandelilla vaksının molekül ağırlığının hesaplanmasının, kompleks bileşiminden dolayı mümkün olmaması sebebiyle örneklerin sindirim oranları tüketilen NaOH profili ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.7’de görüldüğü üzere, lipit fazı olarak sadece Kandelilla vaksı içeren SLN, neredeyse tamamen sindirilmeyen bir profil sergilemiştir. LLN ve NLC örnekleri, partükül özellikleri bakımından simüle edilmiş GIT’de benzer şekilde davranmasına rağmen, Kandelilla vaksı varlığında lipit partüküllerinin lipaz tarafından sindirilmesi inhibe edilmemiştir.

Kandelilla vaksın *in vitro* koşullarda lipaz enzimi tarafından parçalanmamasının sonucu olarak sindirilemediğine karar verilmiş, buradan yola çıkarak zamana karşı serbest yağ asidi salınımı profili incelemesi mısır özü yağının moleküler ağırlığı dikkate alınarak hesaplanmıştır. Yine Şekil 4.7’de görülen grafikte sadece Kandelilla vaks ile hazırlanan nano-emülsiyon örneklerinde serbest yağ asidi salınımı olmamakla beraber LLN örneklerinde mısır özü yağından gelen trigliseritlerin %96,7 oranında serbest yağ asitlerine dönüştüğü, NLC örneklerinde ise bu oranın %112,6 olduğu görülmüş, mevcut trigliseritlerin tamamının sindirildiği buna ek

olarak organojel nanoemülsiyon kompozisyonuna sahip NLC örneklerinde mısır özü yağından gelen triglisertilerin yanı sıra Kandelilla vaksından kaynaklanan serbest yağ asidi salınımında gerçekleşmiş olabileceği anlaşılmıştır.

Sadece Kandelilla vaks kullanılarak hazırlanan nano-emülsiyon örneklerinde ince bağırsak *in vitro* ortam koşullarında 2 saatin sonunda Kandelilla vaksın bileşiminden gelen serbest yağ asidi salınımının NLC örneklerine kıyasla düşük olması, organojel nanopartikül formuna getirilen NLC örneğinde bu salınımın daha kolay gerçekleşmiş olabileceğini akla getirmektedir. Bu değişim biyoaktif bir bileşiğin enkapsüle edildiği NLC sistemlerle Kandelilla vaks gibi bileşiklerin lipit fazında kullanılarak doymuş yağ asidi kullanılmadan hazırlanan düşük kalorili NLC organojel sistemlerle ince bağırsak ortamında daha kontrollü salınımlarının sağlanması bakımından önem arzedebilir.



Şekil 4.7. Simüle edilmiş ince bağırsak koşullarında bekletilen SLN, NLC ve LLN örneklerine ait NaOH tüketiminin ve sindirilebilir yağlarına ait serbest yağ asidi salınımının zamana karşı değişimi

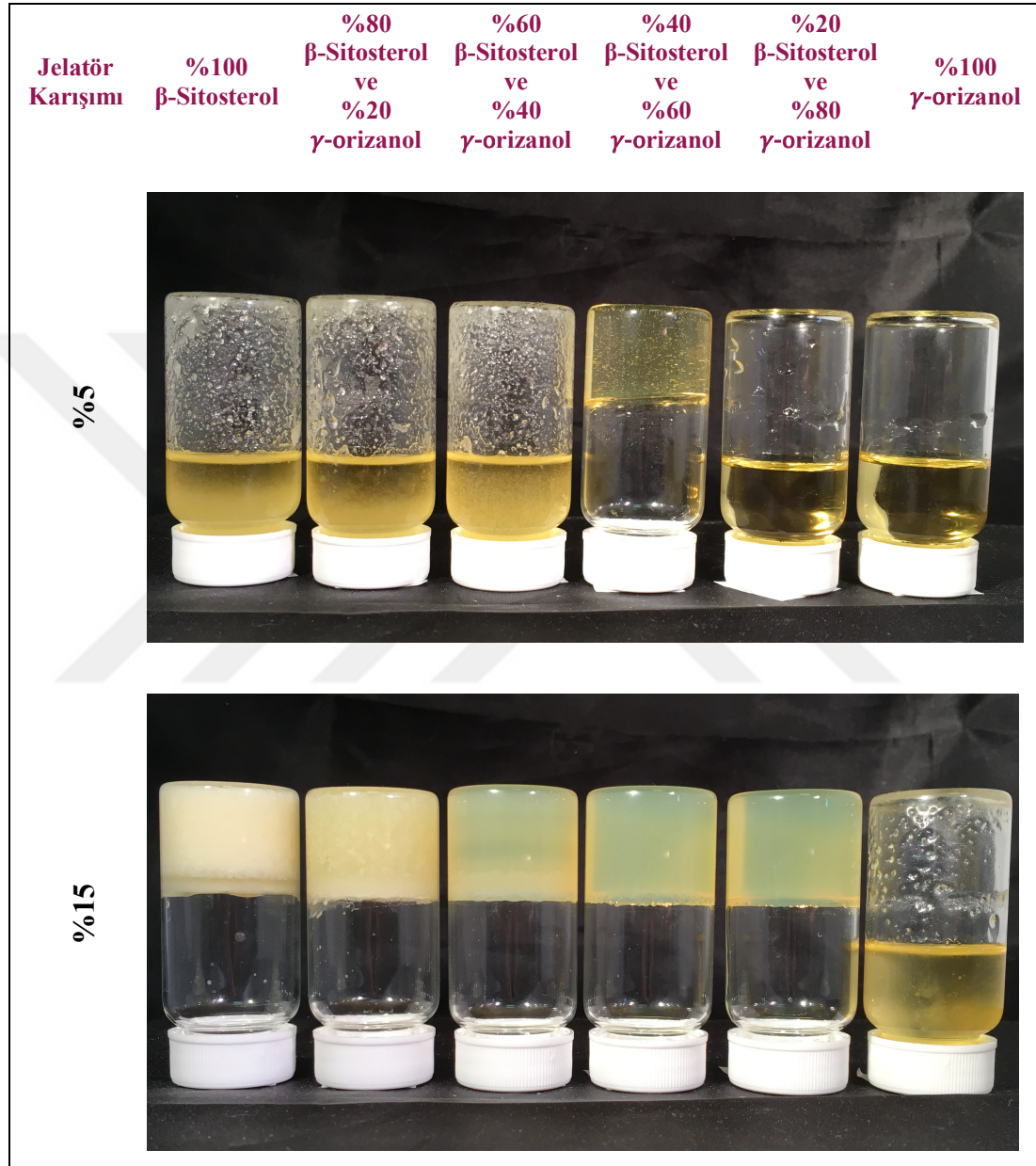
4.2. γ -Orizanol ve β -Sitosterol Karışımı ile Yapılandırılmış Organojel Nano-Emülsiyon Üretiminin Gerçekleştirilmesi

4.2.1. γ -Orizanol ve β -Sitosterol Organojellerin Oluşumunda Jelatör Konsantrasyonuna Karar Verilmesi

γ -Orizanol ve β -sitosterol, kendiliğinden birleşimle (self-assemble) organojel oluşturabilen düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Yani bu iki molekül, sıvı formdaki yağda eritilerek dağıtıldıkları zaman, birbiri ile etkileşime giren fonksiyonel gruplarının kendiliğinden bir araya geldiği fibril görünümlü ağlar oluşturarak sıvı yağı içerisine hapseden alanlar meydana getirirler. Bu karışımın jelatör olarak kullanıldığında oluşan organojel, immobilizasyonu sağlayan ağın nano boyutta olması sebebiyle transparan görünmektedir (O'Sullivan *et al.*, 2016).

Bu çalışmada ilk olarak kendiliğinden birleşimle organojel oluşturabilen iki molekülden γ -orizanol ve β -sitosterolün organojel oluşturabildikleri en uygun oran araştırılmış, bu bağlamda %100:0; %80:20; %60:40; %40:60; %20:80 ve %0:100 oranlarında β -sitosterol ve γ -orizanol karışımlarının %5 ve %15 oranında pirinç kepeği yağında eritildikten sonra oda koşullarında soğutulup bir gün bekletilen örneklerin ters çevrilip jel oluşumuna bağlı olarak akma durumunun olup olmadığı fotoğraflanarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). %5 oranında toplam jelatörün pirinç kepeği yağına katılarak hazırlanan organojel örneklerinin farklı oranda γ -orizanol ve β -sitosterol oranları incelendiğinde; %5 jelatör oranının yalnızca %40:60 β -sitosterol: γ -orizanol oranında organojel oluşturabildiği diğer oranlarda organojel oluşturma testinin olumsuz sonuç verdiği görülmüştür. Yapılan önceki çalışmalarda (Bot *et al.*, 2008; Moschakis *et al.*, 2016) benzer şekilde %40:60 β -sitosterol: γ -orizanol oranının kendiliğinden birleşim için öngörülen en uygun oran olduğu ve bu oran ile moleküllerin molekül ağırlıklarının oranı arasında (MA γ -orizanol: 602,89 g/mol; MA β -sitosterol: 414,71 g/mol) doğrusal bir ilişkinin olduğu doğrulanmıştır. %15 organojelatör karışımı içeren deney setinin görüntüsü incelendiğinde β -sitosterolün kendi başına organojel oluşturabilme eğilimi gözlenirken, γ -orizanolün bu oranda pirinç kepeği yağında yalnızca sol oluşturabildiği kendi başına jelatör etkisinin olmadığı saptanmıştır. Aynı zamanda organojel örneklerinde β -sitosterol oranı arttıkça transparan görüntünün yerini opak görüntüye bıraktığı da gözlemlenmiştir. Bu durum bire bir molar oran olan 40:60 γ -orizanol ve β -sitosterol karışımında jelatör

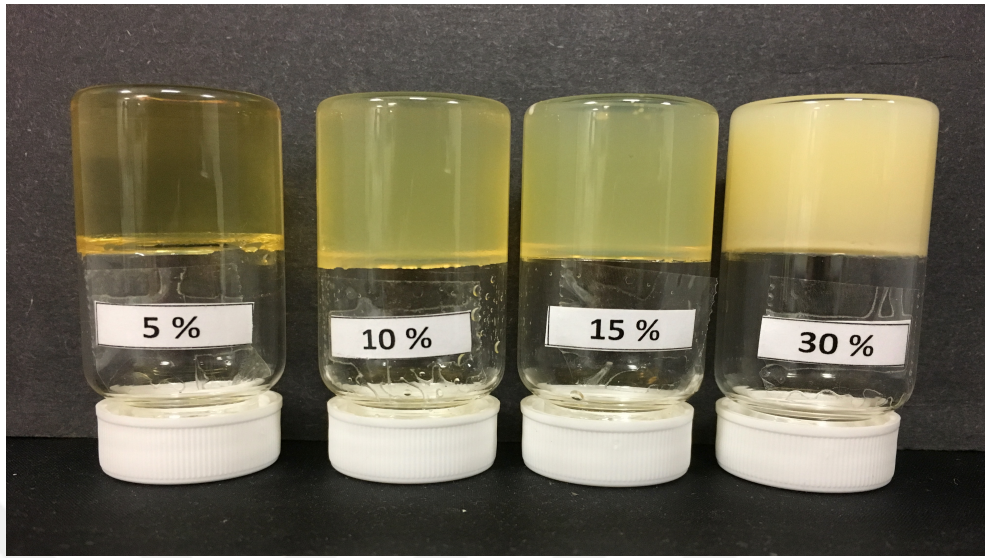
bileşenlerinin kendiliğinden birleşimle jel oluşumunda eş miktarda rol almaları sonucu transparan görünüme sebep olan oldukça ince sarmal fibriller oluşturması ve β -sitosterol oranının artmasıyla eşleşebilecekleri γ -orizanol olmaması sebebiyle kristalleşmelerin başlamasıyla açıklanmaktadır (Moschakis *et al.*, 2016).



Şekil 4.8. Pirinç kepeği yağında hazırlanan farklı γ -orizanol ve β -sitosterol jelatör karışımı ile oluşturulan organojel görselleri

Kritik jel konsantrasyonu olan yaklaşık %5 jelatör karışımı ile hazırlanan örnekler ve jelleşmenin oluşumunda γ -orizanol ve β -sitosterol oranının kritik rol oynadığını göstermektedir. %15 jelatör karışımı içeren organojel deneyi örneklerinde ise jelleşme için β -sitosterolün oranının varlığı önemli rol oynarken, sadece γ -orizanol

içeren örnekte sarmal fibril oluşumu ve kristal partikül oluşumunun her ikisinde gerçekleşmemesine bağlı olarak jel oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.9. Pirinç kepeği yağında 60:40 γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı ile farklı toplam jelatör konsantrasyonlarında elde edilen organojellerin elde edilen görüntüleri

Artan jelatör karışımı konsantrasyonunun organojel oluşumu üzerine etkisini gösteren Şekil'4.9 da ise %5, %10, %15 ve %30 miktarlarında 1:1 molar oran olan 40:60 β -sitosterol ve γ -orizanol oranında toplam jelatör miktarı arttıkça organojel örneklerinde oluşan sarmal fibrillerin yoğunluğunun artmasının sonucu olarak, rengin şeffaf görünümünden opak renge doğru döndüğü gözlemlenmiştir. Fibrillerin daha seyrek olduğu ancak organojel oluşumu için gereken minimum ağları oluşturan miktarın sağlandığı koşullarda ışığın dalga boyunun fibrillerin boyutundan daha yüksek olması ve fibriller arası immobilize edilen yağın bulunduğu alanların daha geniş olması sonucunda transparan görüntünün sağlanabildiği doğrulanmıştır (Marangoni and Garti, 2015).

4.2.2. γ -Orizanol ve β -Sitosterol Yapılı Organojel Nano-Emülsiyonların Üretimi

Su içerisinde yağ emülsiyonları %10 oranında toplam disperse edilen fazın %85'i pirinç kepeği yağı ve %15'i ise 6:4 oranında γ -orizanol ve β -sitosterol karışımından oluşturularak %2 oranında aktif saponin içerecek şekilde Q-Naturel ile 10 mM fosfat saline tamponu (pH 7) devamlı fazında mikrosıvılaştırıcıdan 3 kere geçirilerek hazırlanmıştır. Pirinç kepeği yağına eklenen γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı manyetik karıştırıcıda ısıtılarak tamamen çözünmeleri sağlandıktan sonra

toplam yağ fazının %0,5'i oranında β -karoten karanlık koşullarda eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Yağ fazının %15 oranında jelatör karışımı ile yapılandırıldığı örnekler ve yağ fazının sadece pirinç kepeği yağı ile hazırlandığı örnekler β -karotenli ve β -karotensiz olarak hazırlanmış, her grup örnek ikiye bölünerek pH değerleri asit ve baz çözeltileriyle 3 ve 7 ye ayarlanmıştır. Genel anlamda GIT'da ağız ve bağırsak koşullarının pH değerinin yaklaşık olarak 7 ve mide koşulları pH değerinin yaklaşık olarak 3 olması sebebiyle üretilen nano-emülsiyon örneklerinin bu koşullardaki stabiliteleri hakkında gözlem yapmak amacıyla 37 °C'de 7 gün depolama yapılmış örneklerin stabiliteleri arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemesi sebebiyle (elde edilen veriler gösterilmemiştir) sıcaklık 55°C'ye yükseltılarak hızlandırılmış koşullarda depolama gerçekleştirilmiştir.

%15 jelatör konsantrasyonundan daha yüksek miktarları içeren nano-emülsiyon üretim denemeleri yapılmış ancak mikrosivılaştırıcı ile üretim sırasında örneklerin yüksek basınca maruz kaldığı dar kanalda kristalizasyon sonucu tıkanmalar meydana gelmesi sebebiyle sonikasyonla farklı Attn değerleri ve sürelerde denemeler yapılarak en düşük nano-emülsiyon çapının elde edilebildiği koşullar seçilmiştir. Bu sebeple DSC termogramlarının ölçümü ve *in vitro* koşullarda sindirim testi analizlerinde kullanılmak üzere; 90 °C'de 15 dk 300 rpm de karıştırıldıktan sonra üzerine aynı sıcaklıktaki emülsüfyer çözeltisi ilave edilip blender ile sıcak pre-emülsiyon haline getirililen nano-emülsiyon örneklerinin, sonikasyonla 5 dk, 3 sn çalışma ve 3 sn durma süresi ile (500 W, %70 Attn, 20 kHz) çapları submikron boyutlara düşürülmüştür. Sonikasyon yöntemi bu bağlamda yüksek erime noktasına sahip katı yağ ya da kristallerler üretilen nano-emülsiyon sistemleri için daha uygun olabilmektedir. Ayrıca mikrosivılaştırıcıdan örnekler geçirilirken her bir çevrim sırasında meydana gelen ısı kaybı da partikül boyutunun küçültülmesi için sınırlayıcı olabilmektedir. Sonikasyonla γ -orizanol ve β -sitositerol içeren organojel yapılı nano-emülsiyon sistemlerinde de yine örnekler pre emülsiyondan sonikatöre taşınma sırasında ısı kaybına uğradığı için denemelerde en yüksek %30 oranında jelatör karışımı kullanılarak üretim gerçekleştirilmiştir.

4.2.3. γ -Orizanol ve β -Sitosterol Karışımları ile Hazırlanan Organojellerin Termal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Farklı jelatör karışımı yüzdelerinde hazırlanan 60:40 γ -orizanol ve β -sitosterol oranında hazırlanan organojel örneklerinin termal davranışlarının belirlendiği eritme ve soğutma termogramlarından elde edilen veriler Tablo 4-3’de gösterilmiştir. Ayrıca maksimum düzeyde sinyalin alındığı %30 jelatör karışımı içeren organojel örneğine ait termogram Şekil 4.8’de verilmiştir. Pirinç kepeği yağında hazırlanan organojel örneklerinden elde edilen veriler artan toplam jelatör konsantrasyonunda ölçülen erime noktası ve erime entalpisinin de bu artışa paralel olarak arttığını göstermiştir. 60:40 γ -orizanol ve β -sitosterol oranlarında %5 ve %10 organojelatör karışımı içeren örneklerde DSC soğutma eğrilerinde kristalizasyon noktalarının ve entalpilerinin belirlenmesi için yeterli sinyal alınamazken, %15 ve %30 organojelatör karışımı içeren jellerden elde edilen verilere göre artan jelatör karışımı konsantrasyonundaki artışın kristalizasyon noktası ve kristalizasyon entalpisinde paralel yönde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar makroskopik boyutlarda hazırlanan örneklerde düşük organojelatör içeriklerinde test tüpleri ters çevrildiğinde aşağıya doğru akışın gözlemlenmediği jel yapılar meydana gelsede DSC termogramlarında belirgin şekilde erime ve kristalizasyon eğrileri görüntülenemeyebilmektedir (Calligaris *et al.*, 2014).

DSC termogramları incelendiğinde azalan sıcaklık değerlerinde kuyruk oluşturan yayvan görünümlü pikler olduğu görülmüştür. Jelatör karışımı miktarı arttıkça pikler daha belirgin sinyallere dönüşmüştür (veriler gösterilmemiştir). Termogram üzerindeki erime olayına ait pikin geniş ve kuyruklu olması, eriyerek çözünmenin pikin tepe noktasına göre ölçülen erime noktasının kısmen daha düşük sıcaklıklarda başladığını göstermektedir. Kristalizasyon pikinin yine düşük sıcaklıklara doğru kuyruklu olması ise 60:40 oranında γ -orizanol ve β -sitosterol karışımından elde edilen organojellerde, fibril oluşumunun düşük sıcaklıklarda meydana gelmeye devam ettiğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar literatür bulguları ile paralellik göstermektedir (Bot *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2010; Calligaris *et al.*, 2014).

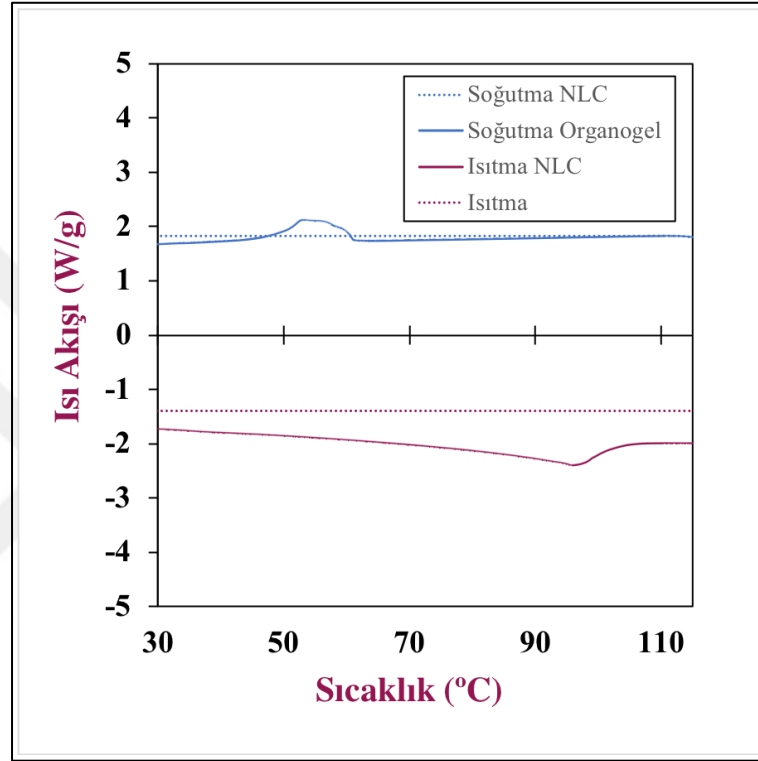
Tablo 4.3. γ -Orizanol ve β -sitosterol karışımı kullanılarak elde edilen organojel örneklerinin termal özellikleri

Örnekler	T _m	ΔH_m	T _c	ΔH_c
%5 Jelator Karışımı	44,96± 0,52 a	0,41± 0,20 a	--	--
%10 Jelator Karışımı	60,82± 1,67 b	1,41± 0,07 b	--	--
% 15 Jelator Karışımı	73,81± 1,15 c	2,69± 0,23 c	18,36± 1,33 a	0,83± 0,15 a
% 30 Jelator Karışımı	94,16± 2,54 d	8,95± 0,11 d	52,33± 0,65 b	5,51± 0,55 b

Sonuçlar üç tekerrür ve en az ikişer ölçümün ortalamasını (n=3) ± standart sapmayı (p<0,05) ifade etmektedir. % (w/w) olarak ifade edilen γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı (6:4) nun pirinç kepeği yağında hazırlanan oranlarıdır.

Mikrosivılaştırıcı ile yüksek basınçla yağ fazında %30 organojelatör içeren pirinç kepeği yağının %2 Q-Naturel ile emülsüfiye edilerek nano-emülsiyon haline getirildiği örneğin DSC termogramlarına ait eğriler de yine Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Organojel oluşumu γ -orizanol ve β -sitosterolün 40:60 oranında (eşmolar miktarda) karıştırılıp sıvı formdaki yağda eritilip soğutulması sonucunda bu iki bileşiğin kendiliğinden bileşimle nano boyutlu sarmal fibril ağlar meydana getirmesi ile elde edilmektedir. Toplam %10 yağ fazının %90 Q-Naturel ile mikrosivılaştırıcıda emülsüfiye edilmesiyle elde edilen nano-emülsiyon örneği nihai olarak %3 oranında jelatör karışımı ihtiva etmektedir ve DSC termogramında erime ve kristalizasyon noktaları net sinyallerle belirlenememiştir. Bu durum yağ fazı γ -orizanol ve β -sitosterol ile yapılandırılan organojel yapılı nano-emülsiyonların kristalizasyonla organojel formuna dönüşen organojellerdeki aksine kendiliğinden bileşimle meydana gelmesinin bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. Yağlarda kristalizasyon esnasında içerisinde bulunan safsızlıklar, kristalleşme için gereken serbest enerjiyi düşürerek destekleyici ajan olarak görev yapar. Nano emülsiyonlarda bu safsızlıkların herbir damlacıkta bulunma ihtimalinin zayıf olması sebebiyle kristal oluşumu herhangi bir partikülün destekleyici olmadığı kendiliğinden kristal oluşumu ile başlayan homojen çekirdeklenme ile meydana gelmektedir. Gerçekte safsızlıklar kristal çekirdekleri oluşumunu moleküler yapısına bağlı olarak katalize edici ya da inhibe edici özellikte olabilmektedir. Bu bağlamda kendiliğinden bileşimli kolloidal yapıların eklenmesi hidrofobik çözünenlerin yağların iç yapılarında oluşan apolar bölgeler içerisine hapsedilmesini sağlayabilir. Bunun neticesinde sıvı faz içerisinde çözünebilecek maksimum çözünen madde miktarı yükselebilir ve kristal oluşumuna itici güç oluşturan çekirdek oluşumu azalabilir (McClements, 2012a). Nano-emülsiyonlarda γ -orizanol ve β -sitosterolün kendiliğinden bileşimle oluşturması

muhtemel olan bu apolar alanlar içerisinde kristalizasyonu tetikleyecek olan, kendiliğinden bileşime katılmamış γ -orizanol ya da β -sitosterol'un fazlası, çözünmüş ve kristalizasyonu inhibe etmiş olabilir. Yine organojel örneklerinde de piklerin yayvan olması ve kristalizasyonun başladığı sıcaklık ile erimenin tamamlandığı sıcaklık arasındaki farkın az olması bu kristalizasyonun inhibisyonu etkisi ile açıklanabilir.



Şekil 4.10. Pirinç kepeği yağında %30 γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı içeren organojelin ve nanoemülsüfiye edilmiş örneğinin DSC termogramları

4.2.4. Nano-Emülsiyonların Üretimi ve Fiziksel Stabiliteleri

Pirinç kepeği yağı içerisinde %15 oranlarında γ -orizanol ve β -sitosterol jelatör karışımı kullanılarak ve β -karoten yüklemesi yapılarak ve yapılmadan üretilen nano-emülsiyonların partikül boyutları ve dağılımlarındaki değişimler incelenmiştir. Genel olarak mikrosivılaştırıcıda homojenize edilerek üretilen bütün test örneklerinde başlangıç koşulları ve pH ayarlamasından sonra monomodal partikül boyutu dağılımı gözlemlenmiş, bu dağılım 55 °C derecede 7 gün depolama sonrasında da takip edilmiştir. %15 jelatör karışımı içeren pH 3 koşullarındaki örneklerde agregasyon sonucunda multimodal dağılım gözlemlenmiştir (Şekil 4.11). Jelatör karışımı içeren ve içermeyen nano-emülsiyon gruplarında β -karoten yüklenen örneklerin tamamında

yüklenmeyen eşdeğerine kıyasla partikül boyutları aynı üretim koşullarında daha düşük elde edilmiştir. Yağ fazının viskozitesinde meydana gelen artış homojenizasyonla elde edilen nano-emülsiyonlarda partikül boyutlarının artmasına neden olmaktadır. Bu bağlamda literetürde soğuk homojenizasyonla üretim sırasında aktif bileşik ilavesinin viskozitenin yükselmesi dolayısıyla daha büyük partikül boyutları bulan sonuçların aksine, sıcak homojenizasyonla elde edilen nano-emülsiyon örneklerinde sıcaklıkla çözme işlemi sırasında β -karoten ilavesi viskozitede azalma meydana getirmiş olabilir (Davidov-Pardo *et al.*, 2016).

Tablo 4.4. β -karoten enkapsüle edilmiş nano-emülsiyonların depolama süresince partikül yükleri ve boyutlarında ki değişim

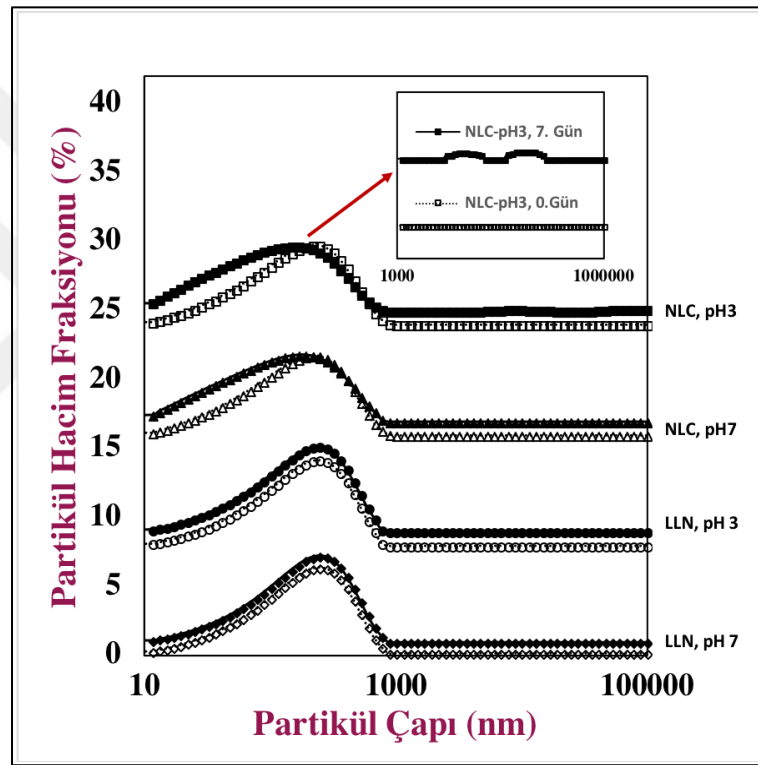
Örnekler	β -karoten pH	Partikül Boyutu (nm)		Ç-Yükü		
		0.Gün	7.Gün	0.Gün	7.Gün	
LLN	Yok	7	225,78 \pm 2,68 ^a	234,67 \pm 12,62 ^a	-60,03 \pm 0,65 ^g	-58,88 \pm 1,38 ^f
LLN	Yok	3	221,50 \pm 2,74 ^a	220,17 \pm 0,41 ^a	-38,13 \pm 0,25 ^e	-32,48 \pm 0,56 ^c
LLN	Var	7	175,33 \pm 3,04 ^a	201,11 \pm 13,03 ^a	-60,27 \pm 0,90 ^{gh}	-58,68 \pm 1,39 ^c
LLN	Var	3	176,56 \pm 2,96 ^a	188,67 \pm 5,29 ^a	-36,05 \pm 1,83 ^d	-31,58 \pm 0,81 ^b
NLC-%15	Yok	7	224,50 \pm 16,98 ^a	222,50 \pm 18,07 ^a	-61,00 \pm 1,18 ^h	-58,05 \pm 1,62 ^f
NLC-%15	Yok	3	226,67 \pm 19,87 ^a	844,67 \pm 268,19 ^b	-28,65 \pm 1,39 ^a	-28,32 \pm 1,26 ^a
NLC-%15	Var	7	178,00 \pm 5,27 ^a	178,67 \pm 5,57 ^a	-58,83 \pm 1,82 ^f	-58,68 \pm 0,48 ^f
NLC-%15	Var	3	179,22 \pm 7,10 ^a	1107,44 \pm 283,09 ^c	-27,85 \pm 0,64 ^a	-27,90 \pm 0,38 ^a

Sonuçlar üç tekrerrün ortalamasını (n=3) ve \pm standart sapmayı ($p<0,05$) ifade etmektedir. LLN örneği yağ fazında yalnızca pirinç kepeği yağı kullanılarak üretilen nano-emülsiyonu, NLC-%15 örneğinde ise pirinç kepeği yağı ve %15 oranında γ -orizanol- β -sitosterol (6:4) karışımı bulunmaktadır. Nano-emülsiyon örneklerinin toplam yağ oranı %5 tir. Küçük harfler (a, b, c) örnekler arasındaki istatistiksel farklılığı $p<0,05$ önemlilik düzeyinde (One way ANOVA, Duncan) ifade etmektedir.

Jelatör içermeyen pirinç kepeği yağında β -karotenin yüklenmeden üretilen nano-emülsiyonun (LLN) başlangıçta ve 55 °C derecede 7 gün depolama sonrasında ortalama partikül boyutu ölçülmüş bu değer pH 7 için 225,78 nm den 234,67 nm'ye yükselmiş; pH 3 için ise 221,50 nm'den 220,17'ye düşmüştür. Yine pirinç kepeği yağında %0,5 oranında β -karoten yüklenerek üretilen nano-emülsiyonun başlangıçta ortalama partikül boyutu pH 7 de 175,33 nm olarak belirlenmişken, depolama sonrası bu değer 201,11 nm'ye yükselirken pH 3 de başlangıçta partikül boyutu 176,56 nm'den 188,67 nm boyutlarına yükselmiştir. Depolama sonrasında LLN örneklerinin partikül boyutlarında meydana gelen artışlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde meydana gelen değişimlerin önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ($p>0,05$).

%15 jelatör karışımı ile hazırlanan β -karoten yüklenmeden üretilen nano-emülsiyonun partikül boyutu pH 7'de başlangıçta 224,50 nm olarak ölçülmüş depolama sonrasında partikül boyutu 222,50 nm'ye düşerken bu değer pH 3'de

başlangıçta 226,67 nm olarak ölçülmüş, depolama sonrasında 844,67 nm'ye yükselmiştir. Yine %15 jelatör karışımı eklenen %0,5 oranında β -karoten yüklenerek üretilen nano-emülsiyonun başlangıçta partikül boyutu pH 7'de 178,00 nm olarak belirlenmişken, depolama sonrası bu değer değişmemiş ve pH 3'de başlangıçta partikül boyutu 179,22 nm den 1107,44 nm boyutlarına yükselmiştir. Bu grup örneklerde pH 7 koşullarında depolama sonrasında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak önemli bulunmazken ($p>0,05$); pH 3 koşullarında depolamada LLN örneklerinin aksine partikül boyutlarında meydana gelen daha fazla artışın anlamlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p<0,05$).



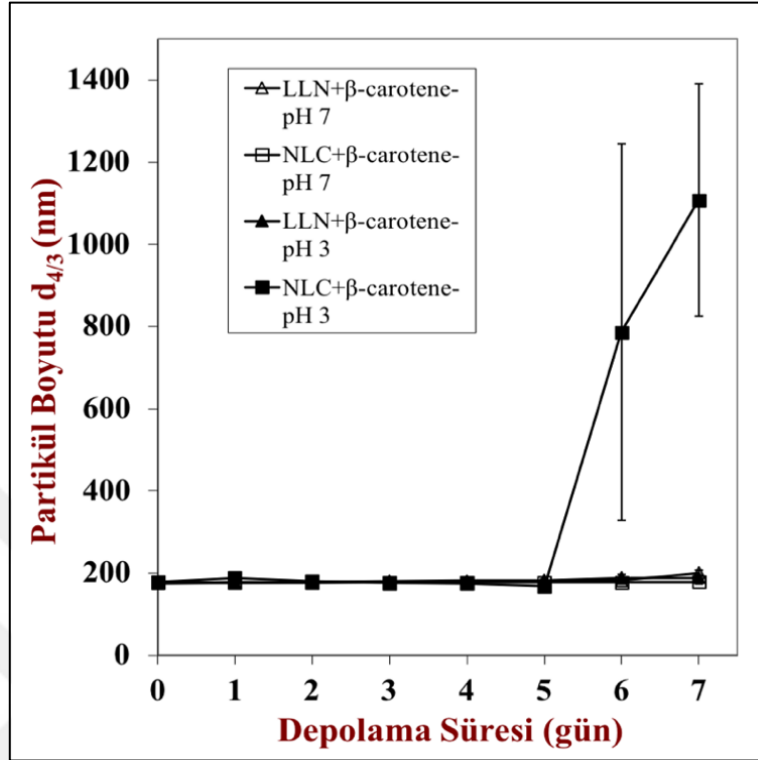
Şekil 4.11. β -karotenle enkapsüle edilmiş nano-emülsiyonların partikül boyutu dağılımları

β -karotenle zenginleştirilen ve β -karotensiz boş olarak hazırlanan LLN ve NLC örneklerinin pH 3 ve pH 7 koşullarındaki partikül boyutlarında depolama süresince meydana gelen değişimlerin gösterildiği grafikler Şekil 4.12.a ve Şekil 4.12.b'de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde LLN örneklerinin depolama süresince stabil oldukları söylenebilirken NLC örneklerinde pH 3 koşullarında örneklerin hem β -karoten ilave edilen hemde β -karotensiz üretilen örneklerin 4 ve 5. günlerden sonra stabilitelerini kaybettikleri söylenebilir. Literatürde oda sıcaklığında aynı kompozisyonla üretilen katı ve sıvı nano-emülsiyonların karşılaştırıldığı çalışmanın

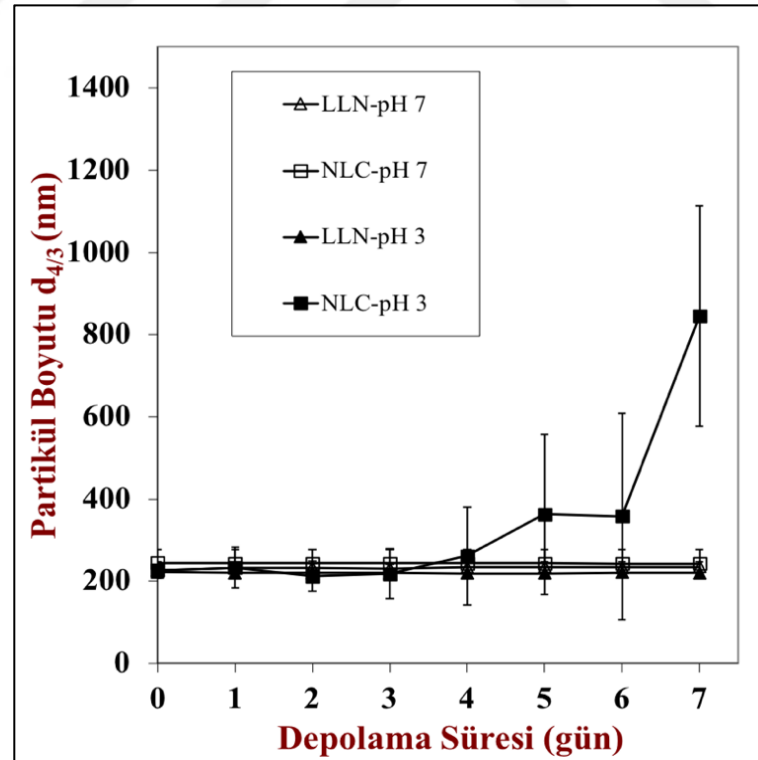
sonuçlarında katı lipit nanopartiküllerin sıvı olana kıyasla stabilitesinin daha düşük olduğu bildirilmiş aynı çalışmada β -karoten enkapsülasyonu kimyasal stabiliteleri karşılaştırıldığında ise yine katı partiküllerde β -karotenin daha hızlı parçalandığı sonuçlarla gösterilmiştir (Qian *et al.*, 2013). Benzer durum partikül stabilitelerine bakıldığında LLN ve NLC örnekleri içinde geçerli olmuştur. Sıvı partiküllerin stabilitesi organojel partiküllere kıyasla ilk 4-5 güne kadar aynı olup devamında organojel partiküllerin stabilitesi bozulmuştur. Ancak β -karotenin kimyasal stabilitesi bakımından kıyaslandığında NLC örneklerinde enkapsüle edilen β -karotenin kimyasal bakımdan LLN örneklerine kıyasla daha stabil olduğu bulunmuştur. NLC örneklerinde organojel oluşumunu sağlayan γ -orizanol β -sitosterol kompleksinin 4-5 gün stabil olması organojel formunun korunurken bu süreden sonra partikül boyutlarında artış gözlemlenmesi oluşan kompleks fibrillerin dekompoze olması sonucu meydana gelmiş olabileceğini göstermektedir. NLC örneklerinin formulasyonlarında bulunan γ -orizanol ve β -sitosterol jelatör karışımının β -karoteni kimyasal parçalanmaya karşı koruma etkisi irdelendiğinde; bu durum partikül içerisinde oluşması muhtemel kompleks fibril ağların β -karoteni dış ortamdaki pro-oksidan unsurlara karşı doğrudan maruziyetten koruması ya da mevcut jelatör karışımının içerisinde bulunan γ -orizanolün antioksidan özelliği sayesinde koruma sağlaması ihtimalleri ile açıklanabilir. β -karoten enkapsüle edilmiş NLC örneğinde partikül boyutunda artış β -karotensiz örneğe göre istatistiksel olarak fazla gerçekleşmiştir ($p < 0,05$). 55°C depolama sıcaklığında yağ fazında artan oranlarda jelatör karışımı içeren ve %0,5 oranında β -karotenin enkapsüle edildiği farklı pH değerlerine getirilmiş nano-emülsiyonların zeta potansiyellerindeki değişim izlenmiştir. Nano-emülsiyonların zeta potansiyel değişimini ifade eden çizelge Tablo 4.4' de ve grafik Şekil 4.13 de verilmiştir. Emülsüfiyer olarak %2 oranında Q-Naturel ile stabilize edilen nano-emülsiyonların tamamının pH 7 ve pH 3 değerlerinde negatif değerlere sahip olduğu görülmüştür. Partikül yüklerinin negatif olması Q-Naturel in yapısında bulunan aktif bileşik quillaja saponine bağlı kaboksil gruplarının iyonizasyonundan kaynaklanmaktadır (Ozturk *et al.*, 2014). LLN grubu örneklerin zeta potansiyellerinde 55°C'de 7 gün depolama sonucunda başlangıç miktarlarına oranla istatistiksel olarak önemli bulunan azalma meydana geldiği saptanmıştır ($p < 0,05$). NLC grubu örneklerde ise yalnızca NLC-%15 örneklerinden pH 7'de depolanan örnekte önemli bir azalma

($p < 0,05$) görülürken diğer örneklerde meydana gelen değişimin önemli olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

A)

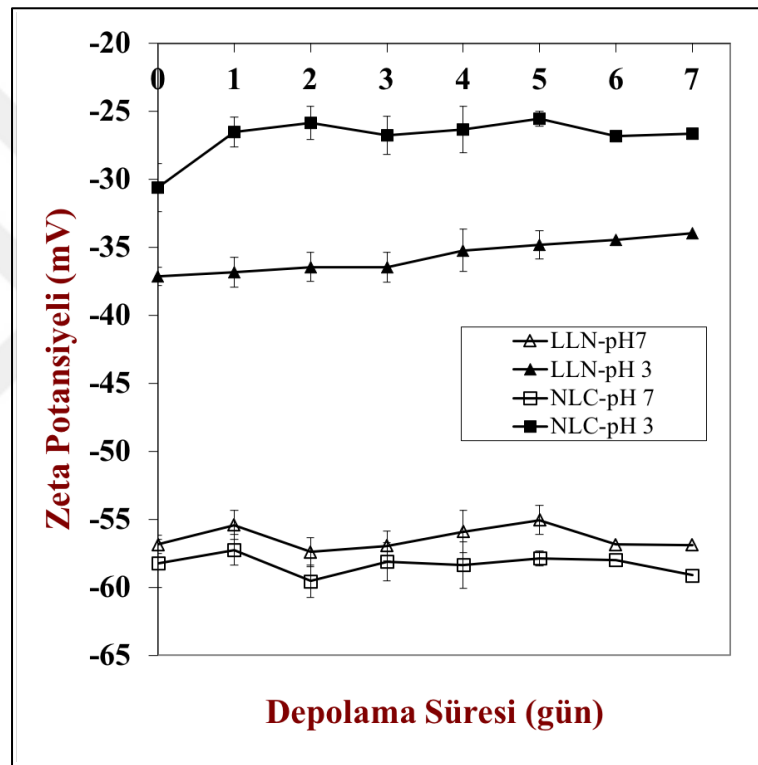


B)



Şekil 4.12. A) β - karoten enkapsüle edilmiş ve B) Boş olan LLN ve NLC nano-emülsiyonların depolama süresince partikül boyutlarında ki değişim

Partikül net yükünün >30 mV olması nano-emülsiyon partiküllerinin agregasyona karşı stabil olduklarını göstermekle birlikte pH değeri 7'ye ayarlanan nano-emülsiyonların pH 3'e kıyasla daha stabil olduklarını söylemek mümkündür. Organojelatör konsantrasyonu bakımından ele alındığında pH 7'de önemli bir farklılık gözlemlenmezken, pH 3'e ayarlanan nano-emülsiyonlarda jelatör ilavesinin nano-emülsiyonlarda net partikül yükünde azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca sıcaklıkla depolama sırasında pH 7'de kayda değer bir değişim görülmezken pH 3'de 1 gün depolama sonrasında %15 jelatör içeren örneklerde nispeten azalma görülmüş devamında stabil seyretmiştir.

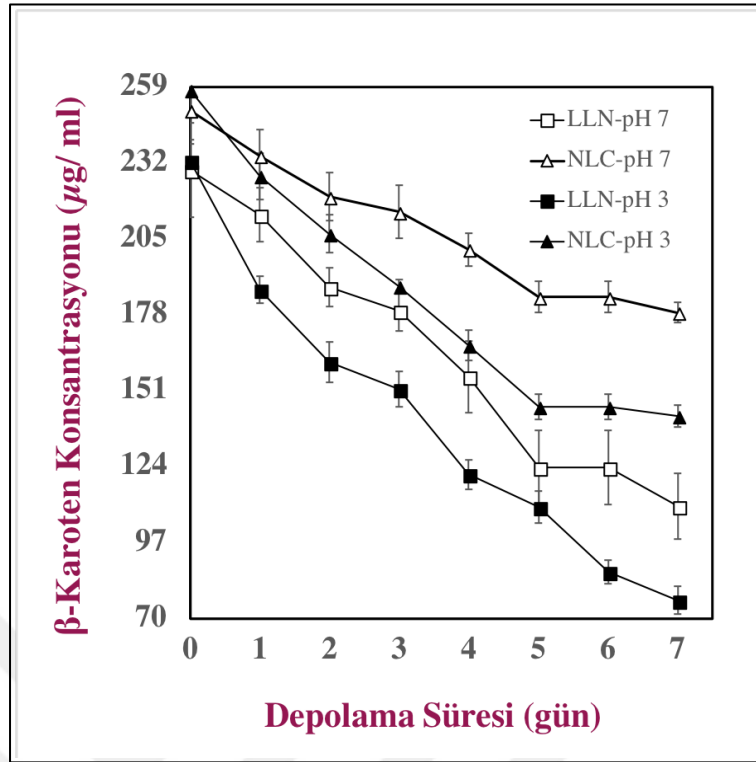


Şekil 4.13. LLN ve NLC nano-emülsiyonların depolama süresince partikül yüklerindeki değişim

4.2.5. β -Karotenin Kimyasal Stabilitesi Üzerine Sıcaklık ve pH Değerlerinin Etkisi

4.2.5.1. Solvent ekstraksiyonu

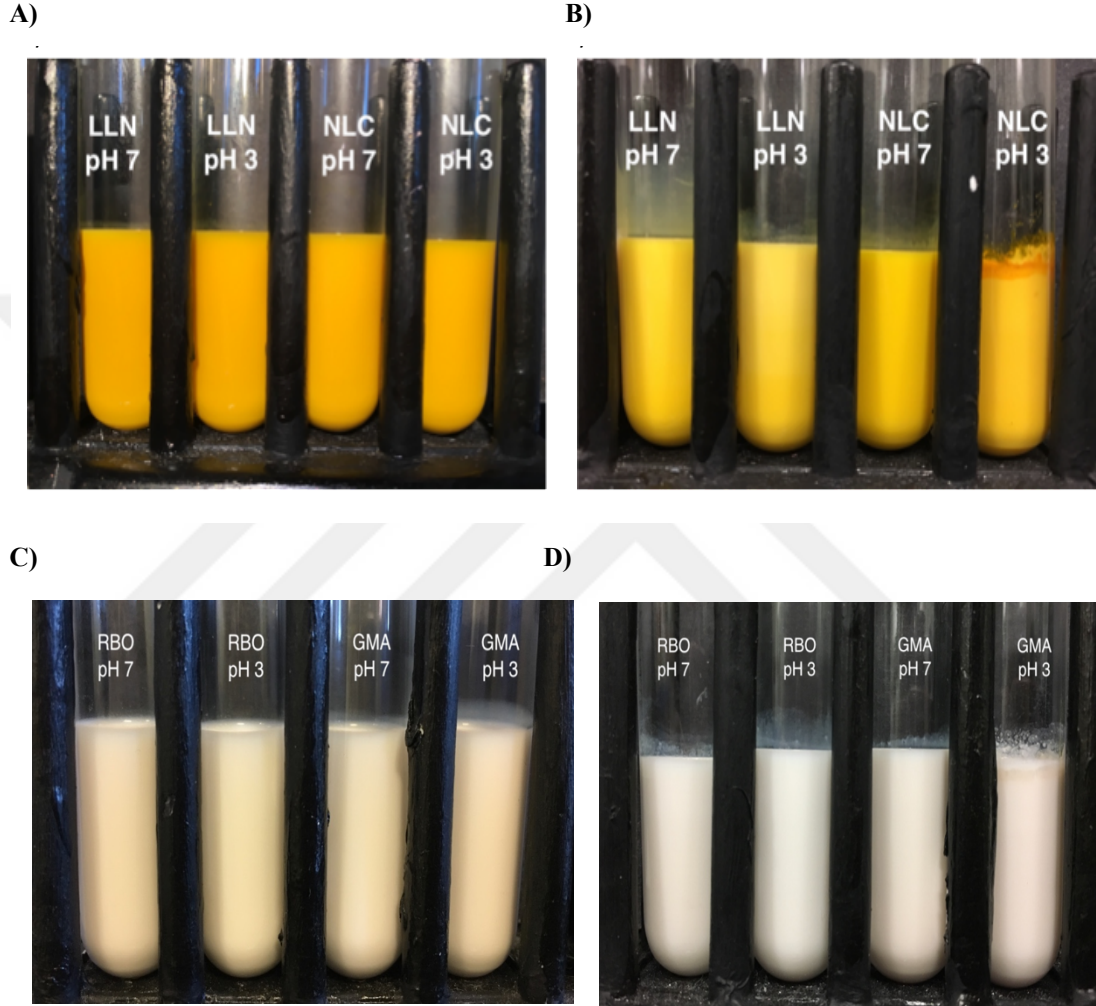
Lipit fazında farklı oranlarda organojelatör karışımı eklenerek sıcak homojenizasyonla elde edilen β -karoten enkapsüle edilmiş nano-emülsiyonların pH değerleri HCl ve NaOH çözeltileri ile pH 7 ve pH 3 değerlerine pH metre ile ayarlanmış, hazırlanan nano-emülsiyonlar 55°C de 7 gün boyunca depolanmıştır.



Şekil 4.14. β -karotenin enkapsüle edildiği yağ fazında %15 γ -orizanol ve β -sitosterol organojelator karışımı içeren NLC ve sadece pirinç kepeği yağı içeren LLN nano-emülsiyonlarının depolama süresince β -karoten konsantrasyonlarındaki değişim

Sıcaklığın etkisiyle degradasyona uğrayan β -karotenin nano emülsiyonlarda kalan miktarı metilenklorit: metanol karışımı (2:1) ile ekstrakte edilerek spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Şekil 4.14 de verilen sonuçlarda görüldüğü üzere her iki pH değeri sonuçları kıyaslandığında β -karotenin pH 3 değerinde stabilitesinin pH 7'ye kıyasla düşük olduğu yani degradasyonun pH 3'de daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır. Jelator eklenmemiş nano-emülsiyonların pH 7'de ve pH 3 koşullarının başlangıcında sırasıyla β -karoten miktarları 229,5 $\mu\text{g/ml}$ ve 232,8 $\mu\text{g/ml}$ iken depolama sonrasında bu değerler sırasıyla 110 $\mu\text{g/ml}$ ve 76,8 $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşmüştür. %15 jelator eklenen nano emülsiyonda ise 250,78 $\mu\text{g/ml}$ 'den pH 7'de depolama sonrası 178,8 $\mu\text{g/ml}$ 'ye, pH 3'de 258,12 $\mu\text{g/ml}$ 'den 142 $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşmüştür. Literatürde nano-emülsiyon sistemlerinde β -karoten enkapsülasyonunun farklı pH değerlerinde stabilitesinin ölçüldüğü çalışmalarda karotenoidlerde meydana gelen parçalanmanın düşük pH değerlerinde daha yüksek olduğu önceden ifade edilmiştir (Boon *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2012; Davidov-Pardo *et al.*, 2016). Asidik koşullarda karotenoidlerin stabil olmama durumlarının araştırıldığı çalışmalarda; karotenoidlerin yapısına proton eklenip sonrasında *cis-trans* izomerizasyonuna ve ileri

parçalanma reaksiyonlarına uğradığı bildirilmiştir (Mortensen *et al.*, 1997; Mortensen and Skibsted, 2000). β -karoten miktarının depolama süresince değişimlerindeki bulgulara göre; bu çalışmada geliştirilen γ -orizanol ve β -sitosterol jelatör karışımı (yağ fazında %15) ile üretilen organojel nano-emülsiyon sisteminin β -karotenin asidik pH koşullarına olan duyarlılığını azaltamadığı söylenebilir.

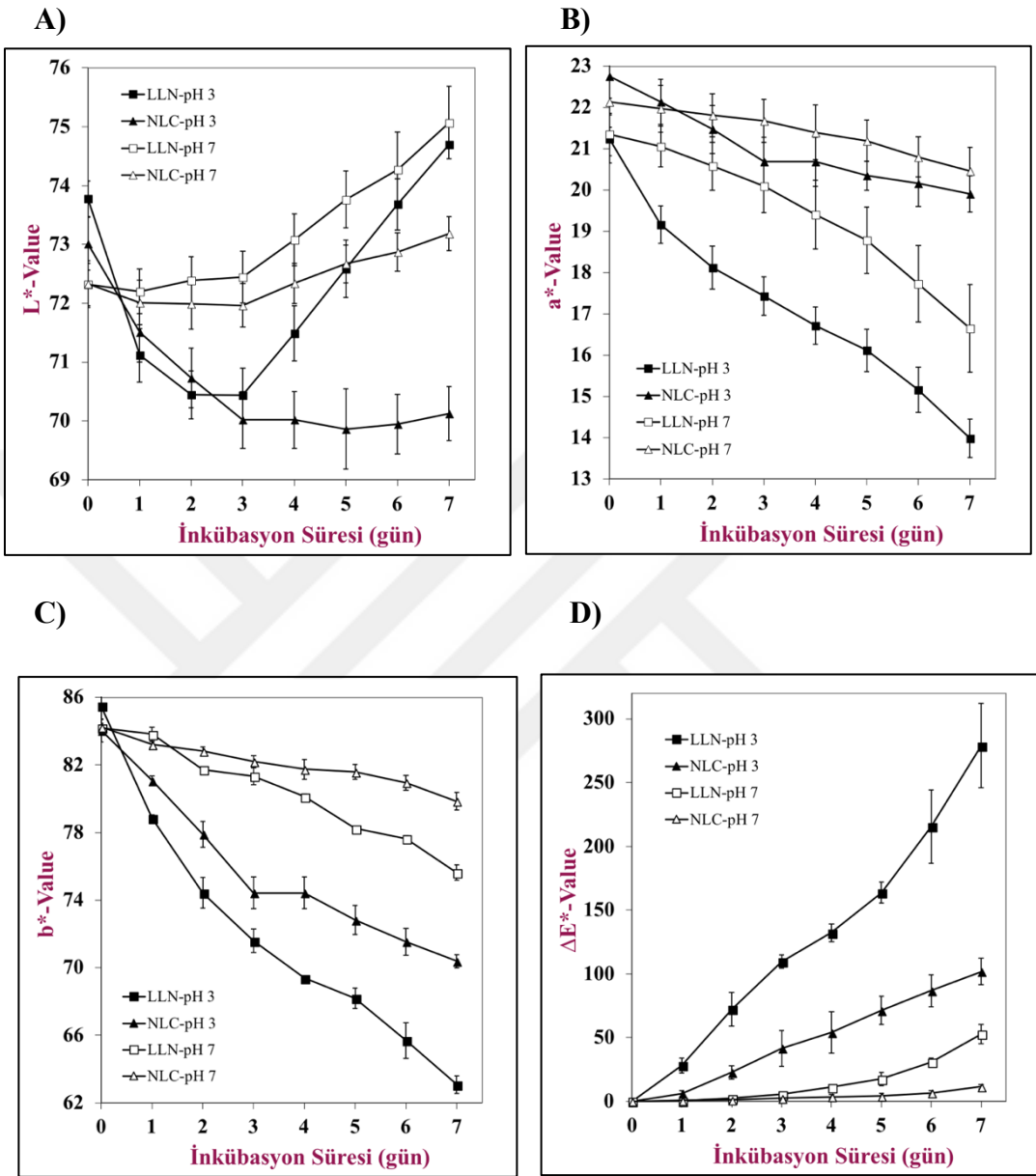


Şekil 4.15. β -karoteninli (A-B) ve β -karoteninsiz (C-D) NLC ve LLN nano-emülsiyonlarının farklı pH değerlerinde 55°C de depolama öncesinde (A-C) ve sonunda (B-D) görüntülerinde ki değişim

4.2.5.2. Renk değerlerindeki değişim

Depolama sıcaklığının farklı pH değerlerine getirilmiş nano-emülsiyonlarda enkapsüle edilen β -karotenin kimyasal stabilizasyonu üzerine etkisi Hunter kalorimetresi ile ölçülmüştür. Depolama sırasında L^* , a^* , b^* ve ΔE^* değerlerindeki pH 7 ve pH 3'e ayarlanan nano-emülsiyonların renk değişimleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekil 4.15'de gösterilen sonuçlarla uyumlu olarak, kırmızı ve sarı rengi

simgeleyen a^* ve b^* değerlerinde azalma görülürken her iki pH değerlerinde de L^* değerinin sıcaklıkta depolama koşullarında zamanla artış gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.16. β -karotenin enkapsüle edildiği yağ fazında %15 organojelatör karışımları içeren nano-emülsiyonların depolama süresince renk değerleri A) L^* değeri (parlaklık), B) a^* değeri (kırmızı-yeşil), C) b^* değeri (sarı-mavi), D) ΔE^* değeri

Toplam renk değişimini ifade eden ΔE^* değeri de her iki pH değerinde tüm örnekler için artış eğilimi göstermiştir. Her iki pH değerlerine getirilen nano-emülsiyonların 55 °C depolama sıcaklığındaki toplam renk değişimleri kümülatif değerlerine bakıldığında, jelatör karışımı eklenmeyen nano-emülsiyonda ΔE^* değeri depolamanın sonunda pH 7’de 41 ve pH 3’de 131 olarak ölçülmüştür. %5 oranda

jelatör karışımı içeren nano-emülsiyondan pH 7’de ΔE^* değeri 17 ve pH 3’de 72’dir. %15 jelatör karışımının eklendiği nano-emülsiyondan bu değer diğer iki nano-emülsiyondan farklı olarak her iki pH koşullarında da 13 olarak tespit edilmiştir.

β -karotenin sıcaklıkla kimyasal degradasyona uğramasının renkteki solmayla ilişkisini yansıtan ΔE^* değeri her iki pH değerinde de $LLN > NLC$ şeklindedir. Bu sıralama anlamlı olarak, eklenen organojelatör karışımının iki ihtimal çerçevesinde β -karotenin kimyasal yıkımını yavaşlattığı sonucunu ifade etmektedir. Bu ihtimallerden birincisi eklenen organojelatör karışımında bulunan γ - orizanolün antioksidan aktivitesi neticesinde β -karoteni oksidasyona karşı koruması yönündedir. İkinci ihtimal ise bu çalışmanın çıkış noktasını oluşturan organojelasyon tekniğinin nano-emülsiyon sistemlere uyarlanmasıyla nano boyuttaki lipit partiküllerin γ -orizanol- β -sitosterol sarmal şeritler halindeki ince borularla oluşturduğu ağın içerisine hapsedilmesiyle (bariyer etki) pirinç kepeği yağının taşıdığı β -karotenin emülsiyon ara yüzeyindeki oksidasyona karşı korunmuş olmasıdır.

4.2.6. *In Vitro* Sindirim Koşullarında γ -Orizanol ve β -Sitosterol ile Yapılandırılmış Nano-Emülsiyonlar

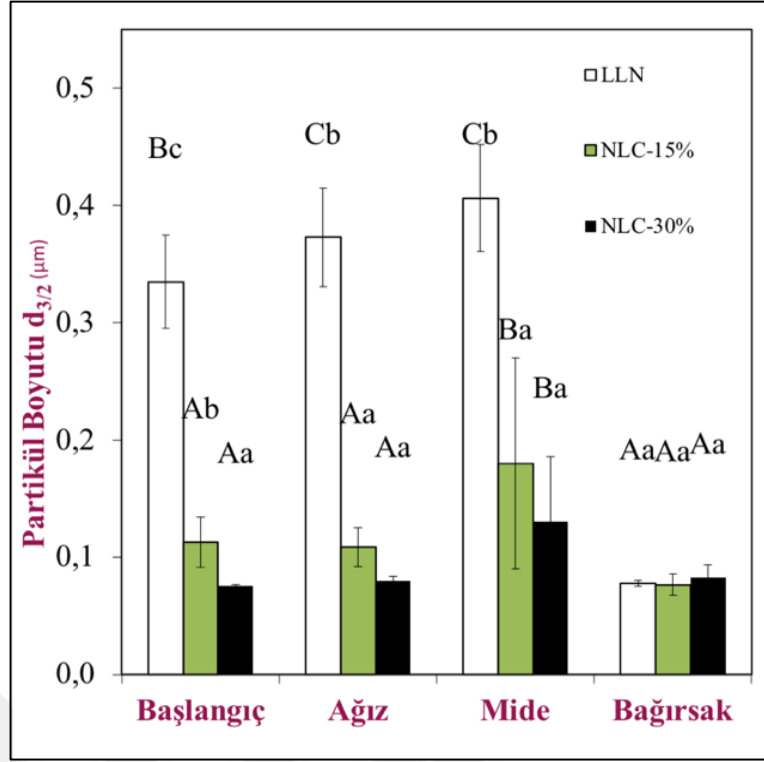
γ -orizanol ve β -sitosterol jelatör karışımı kullanılarak hazırlanan pirinç kepeği yağında %0 %15 ve %30 jelatör karışımı içeren %2 Q-Naturel ile stabil edilmiş örnekler ağız, mide ve ince bağırsak fazlarından oluşan simüle edilmiş *in vitro* sindirim sistemi koşullarına maruz bırakılmıştır. Partikül büyüklüğü, partikül yükü, mikroyapı analizleri, başlangıçta ve simüle edilmiş ağız, mide ve ince bağırsak koşullarında gerçekleştirilmiş, ince bağırsak fazının santrifüjü ile elde edilen misel örneğinde ise biyo-eldeedilebilirlik ölçümleri yapılmıştır. GIT basamaklarında nano-emülsiyon örneklerinin partikül boyutlarında ve yüklerinde meydana gelen değişim Şekil 4.17’de mikroyapılarında meydana gelen değişimin konfokal mikroskopla elde edilen görüntüsü Şekil 4.18 de optik mikroskopla elde edilen görüntüsü ise Şekil 4.19’da verilmiştir.

In vitro sindirim koşullarında yüksek miktarda organojelatörle yapılandırılmış organojel nano-emülsiyon örneğinin GIT koşullarında davranışlarını belirleyebilmek amacıyla en yüksek %30 oranında γ -orizanol ve β -sitosterol karışımının pirinç kepeği yağında çözülüp emülsüfiye edilmesi esasıyla nano-emülsiyon hazırlada

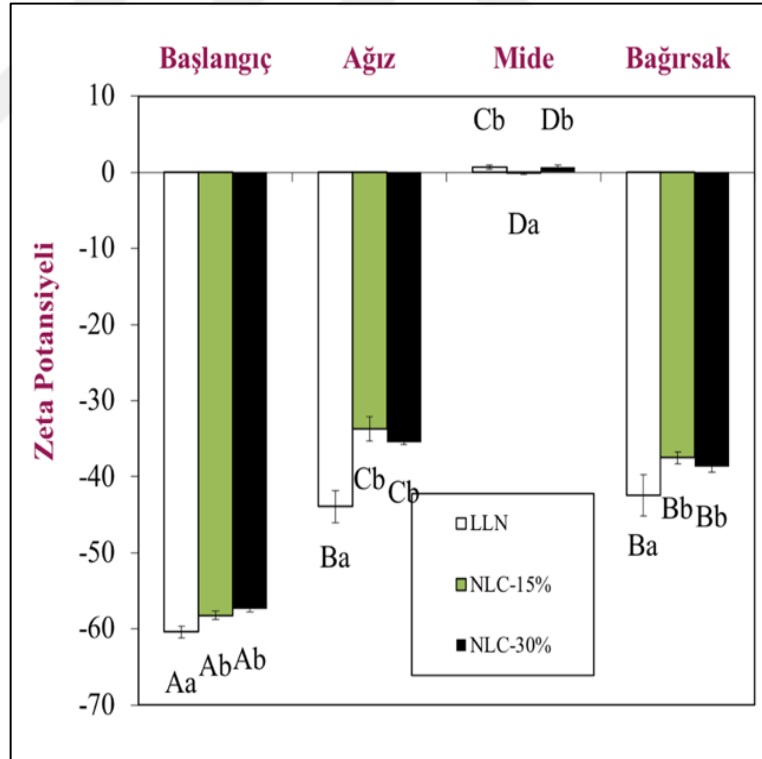
mikrosivılaştırıcının uygun olmaması gerekçesiyle sonikatör kullanılmıştır. Kıyaslama yapmak amacıyla sadece pirinç kepeği yağı (LLN) ve %15 jelatör karışımı içeren (NLC-%15) nano-emülsiyon örnekleride aynı koşullara tabi tutulmuştur.

Elde edilen nano-emülsiyon örneklerinin başlangıç koşullarındaki partikül boyutları incelendiğinde üretim yönteminin farklı olması sebebiyle daha önce üretilen örneklerden farklılık gösterdiği, LLN örneklerinin başlangıç koşullarında en yüksek partikül boyutuna sahip olduğu (335 nm) ardından NLC-%15 (113 nm) ve en düşük partikül boyutuna sahip olan örneğin ise NLC-%30 (75 nm) olduğu görülmüştür. Yağ fazına eklenen jelatör karışımının Oswald büyümeye karşı stabilite sağlamasının bir sonucu olarak partikül boyutlarına bakıldığında jelatör konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunun azaltığı görülmektedir. Buradan yola çıkarak jelatör karışımının pirinç kepeği yağı ile karıştırıldıklarında yağ damlacıklarının polaritesini azaltarak stabilitelerini artırdıkları söylenebilir. Benzer etkiler farklı polaritedeki karışım yağlarla hazırlanan nano-emülsiyon örneklerinde de gözlemlenmiş bu değişim karışım etkisinin entropisi ile Oswald büyümenin inhibisyonu olarak tanımlanmıştır (Kabalnov, 2001; Chang and McClements, 2014; McClements, 2015). Farklı kompozisyonlardan oluşan örneklerin *in vitro* sindirim testi öncesinde başlangıç koşullarında partikül yüklerini ifade eden zeta potansiyelleri LLN, NLC-%15 ve NLC-%30 örneklerinde sırayla -60,4; -58,2 ve -57,3 mV olarak ölçülmüş, örnekler arasında jelatör konsantrasyonu ile ters orantılı olarak net yüklerde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Q-Naturel glukonik asit içeren hidrofobik baş gruplara sahip yüzey aktif saponinlerin aktif bileşimini oluşturduğu iyonik bir sürfaktandır. Glikonik asitte bulunan karboksil gruplarından dolayı emülsüfiyer olarak kullanıldıklarında negatif partikül yükü yaratırlar (Yang *et al.*, 2013).

a)

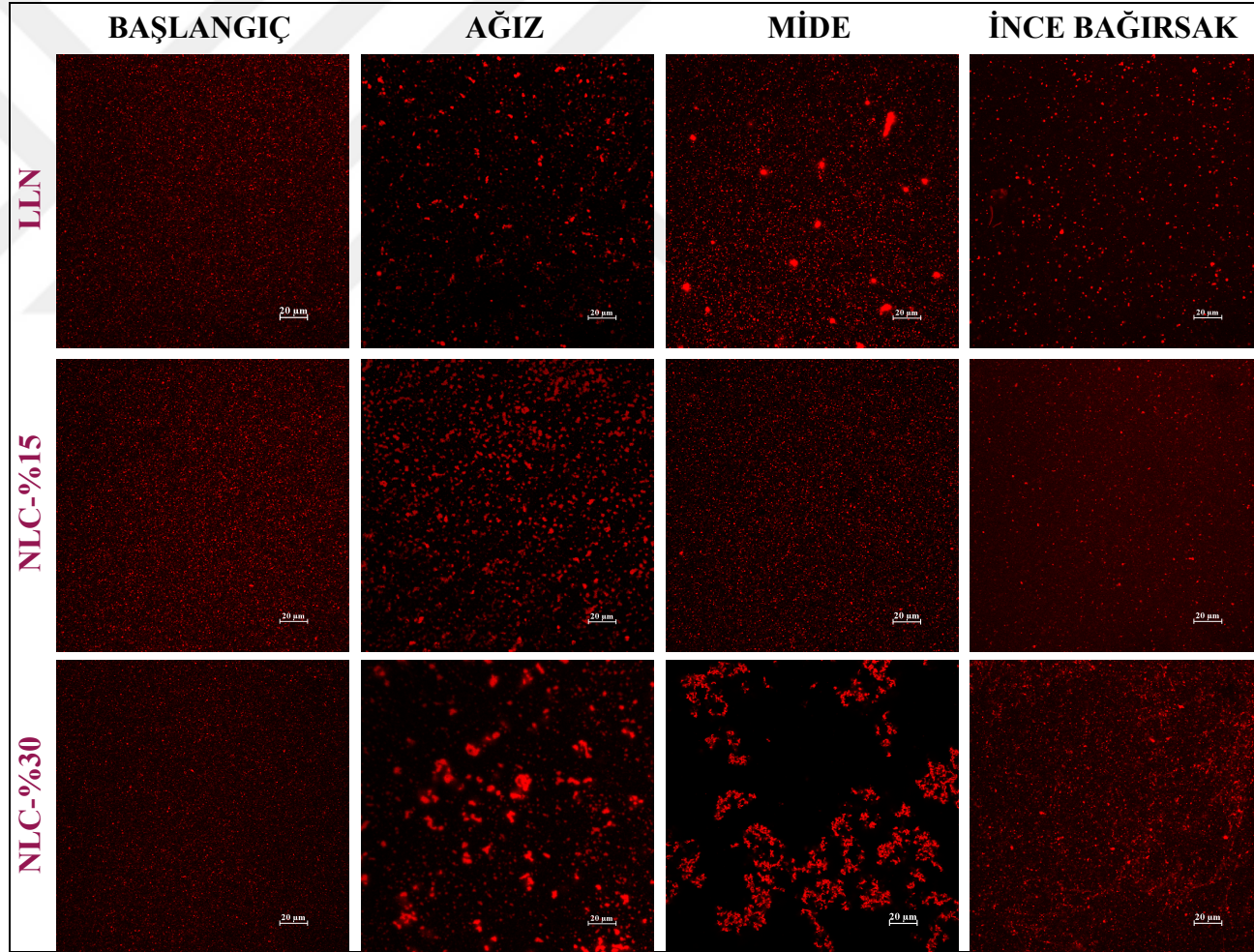


b)

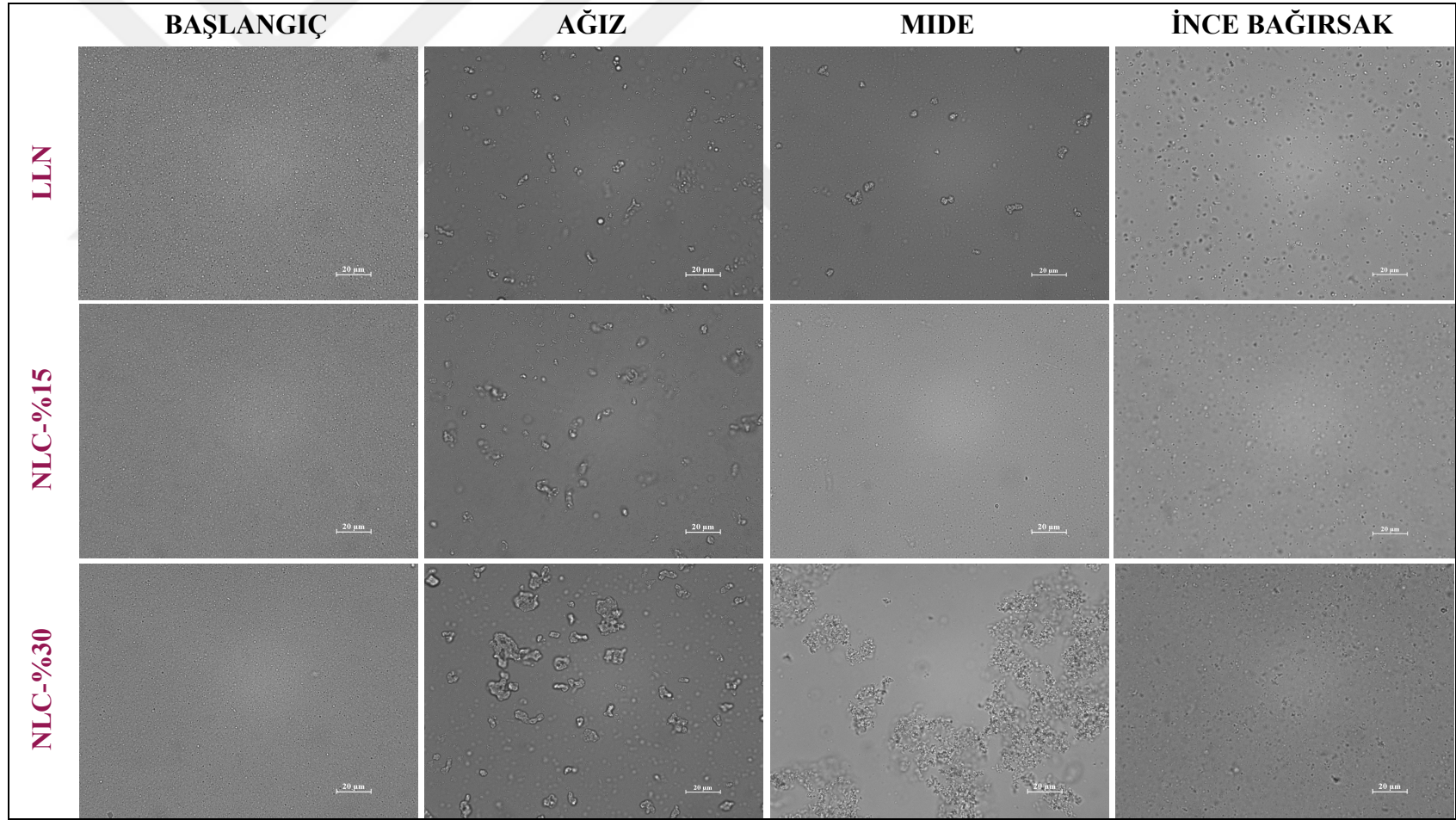


Şekil 4.17. Gastrointestinal evrelerin, yağ fazında γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı (60:40) içeren NLC-%15 ve NLC-%30 ve pirinç kepeği yağı içeren LLN örneklerinin partikül boyutu ve partikül yükü değerleri üzerine etkisi

Büyük harfler (A, B, C, D) farklı GIT aşamalarındaki önemli değişimleri ifade ederken (aynı örnekte), küçük harfler (a, b, c, d) farklı yağ fazı içerikleri ile üretilen SLN, NLC ve LLN örnekleri arasındaki farklılığı (aynı GIT aşamasında) ifade etmektedir ($p < 0,05$; One way ANOVA, Duncan).



Şekil 4.18. Gastrointestinal aşamaların LLN, NLC-%15 ve NLC- %30 örneklerinin mikroyapıları üzerine etkisi (konfokal mikroskop)



Şekil 4.19. Gastrointestinal aşamaların LLN, NLC-%15 ve NLC- %30 örneklerinin optik mikroskopla görüntüleri üzerine etkisi

Ağız fazından geçirilen örneklerin partikül boyutlarındaki değişimlere bakıldığında, LLN örneğinde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana gelirken ($p < 0,05$) jelatör içeren örneklerde meydana gelen değişim önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$). Optik ve konfokal mikroskop görüntüleriyle beraber değerlendirildiğinde, LLN örneklerindeki partikül boyutunda meydana gelen artışın koelesans ile birlikte flokülasyonla ilgili olabileceği düşünülmektedir. NLC-%15 ve NLC-%30 örneklerinde ise partikül boyutu dağılımlarında önemli bir artış görülmezken, mikroyapılarındaki değişimin flokülasyonla ilgili olduğu söylenebilir. Optik ve konfokal mikroskop görüntülerinde LLN örneğinde floküle olmuş daha iri dairesel partiküller gözlemlenirken diğer örneklerde asimetrik şekilli flokülasyonlar meydana gelmesi bu bulguyu desteklemektedir. Nitekim jelatör içeren örneklerde partikül boyutları ölçüm sırasında yapılan seyreltme sırasında gözlemlenen flokülasyonların zayıf olması dolayısıyla değişim gözlemlenmemiştir. Flokülasyona neden olan ağız fazında bulunan müsün polimerinin bu örneklerde deplesyon ya da köprü kurma flokülasyonu etkileşimi meydana getirmiş olabilir. Jelatör içeren örneklerde ağız fazında meydana gelen flokülasyonun miktarı jelatör konsantrasyonu ile orantılı olarak artmış, NLC-%30 örneğinde çok daha belirgin flokülasyon yığınları gözlemlenmiştir. Ağız ortamında bulunan müsün molekülleri hem anyonik bölgeler hem de apolar bölgeler içermektedir ve bu özelliği sonucunda anyonik yağ partikülleri ile Ca^{++} iyonları aracılığıyla tuz köprü kurarak ya da hidrofobik kuvvetlerle etkileşim sağlarlar. Hem köprü kurma yoluyla hemde negatif lipid partiküllerin yüzeylerine absorplanarak daha fazla floküllerin oluşmasına neden olurlar (Zhang *et al.*, 2016). Optik ve konfokal görüntülerinden elde edilen sonuca göre NLC-%30 örneğinde bu etkileşimlerin daha fazla olması negatif yük bakımından diğer örneklere kıyasla daha yüksek değere sahip olmasına rağmen kompozisyonunda bulunan kompleks jelatör karışımının ortamdaki iyonik tuzlarla daha fazla etkileşim sağlaması sonucunda gerçekleşmiş olabilir.

Ağız fazından sonra mide fazına geçen örneklere ait bilgiler değerlendirildiğinde, partikül boyutlarında LLN örneğinde önemli bir artış gözlemlenirken, jelatör eklenen diğer örneklerde partikül boyutlarında önemli bir artış saptanmamıştır. LLN örneğinin partikül boyutundaki artışın incelendiği mikroskop görüntüsüne bakıldığında, partiküllerin dairesel ve daha belirgin olmasından dolayı, Oswalt büyüme ile küçük partiküllerin içerisindeki yağın devamlı fazdan iri partiküllere doğru geçerek büyük partiküllerin oluşmasına neden olduğu söylenebilir.

Organojelatör içeren örneklerde her ne kadar ölçülen partikül boyutlarında benzer bir eğilim görülse de, mikroyapısal özellikleri gözünene alındığında %15 ve %30 organojelatör içeren örneklerde flokülasyon oluşumu bakımından oldukça farklı görüntüler elde edilmiştir. Mide ortamında %15 jelatör içeren örnekte herhangi bir flokülasyon yapı benzeri bir oluşum görülmezken, %30 organojelatör içeren örneklerde ağız fazında meydana gelen deplesyon ve tuz köprüleri oluşumu neticesinde meydana gelen topaklanmaların daha da belirgin hale gelip daha büyük kümeler meydana getirdiği gözlemlenmiştir. γ -orizanol ve β -sitosterol spiral tubüllerin yağda suda ve emülsiyonda oluşumlarının araştırıldığı bir çalışmada (den Adel *et al.*, 2009) su ve emülsiyon koşullarında, tekrar saf hallerine dönen geçici kristaller oluşurken yalnızca yağ içerisinde her bir komponentin bireysel yapılarından farklı olarak kendiliğinden bileşimli tubüler fibrillerin oluştuğu, bu özel fibrillerinde su varlığına karşı hassas oldukları, su varlığında farklı özellikte yapılara dönüştükleri bildirilmiştir. Buradan yola çıkarak emülsüfyer olarak kullanılan Q-Naturel'in zeta potansiyelinde meydana gelen net yükteki azalmaya bağlı olarak mide fazında emülsiyon stabilitesini sağlayamaması sonucunda %30 oranında jelatör karışımı içeren partiküllerde çevre koşullarına açık hale gelen jelatör moleküllerinin su ile etkileşimi sonucunda kristalleşmeler meydana gelmiş olabileceği söylenebilir. %15 jelatör karışımı içeren nano-emülsiyon örneklerinde stabilitenin değişmesine sebep olmaması oldukça çarpıcı bir sonuçtur.

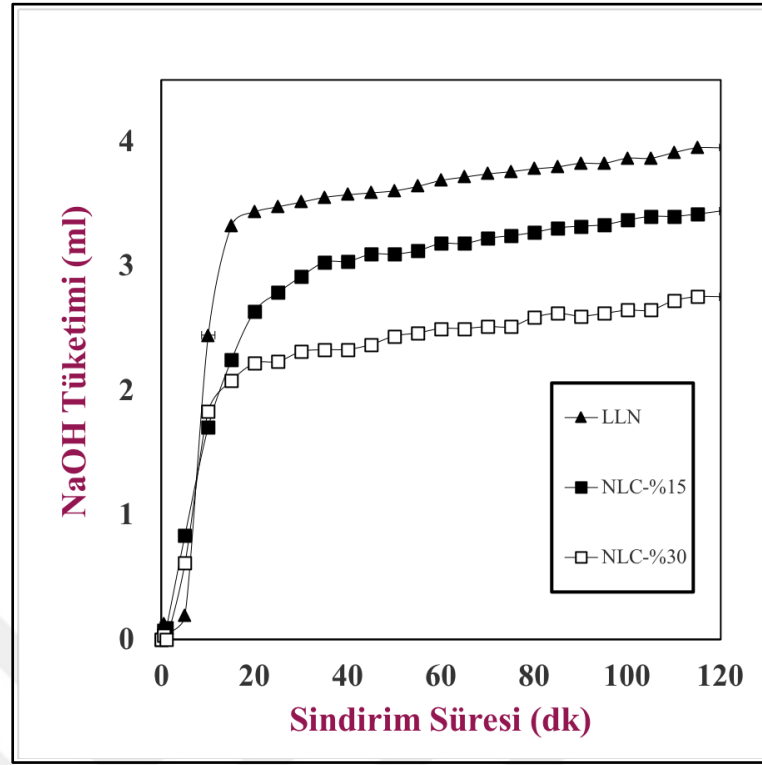
Mide ortamındaki örneklerin zeta potansiyel sonuçlarına göre bütün örneklerin net yüklerinde önemli miktarda azalma meydana gelmiş ve başlangıca kıyasla yüksek negatif değerlerden sıfır civarında değerlere ulaşmıştır ($p < 0,05$). Mide ortamının kısmen düşük pH koşullarında (pH 2,5) negatif olarak yüklenmiş bazı fonksiyonel grupların ortamdaki hidrojen iyonlarıyla etkileşimleri neticesinde negatif yüklerinin nötrlenmesine neden olduğu düşünülmektedir.

İnce bağırsak fazına maruz kalan örneklerin partikül boyutlarında mide fazı etkisine kıyasla farkedilir azalmalar meydana gelmekle beraber ölçülen partikül boyutlarının birbirine yakın değerlere sahip olduğu ve istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Bu durumu konfokal ve optik mikroskop görüntüleri de doğrulamaktadır. Mikroyapısal durumlarına bakıldığında ince bağırsak fazında safra tuzları ve misellerin oluşumuna bağlı olarak hemen hemen

yakın oran ve boyutlarda, partikül dağılımlarının mevcut olduğu görülmektedir. İnce bağırsak fazını tamamlayan örneklerin zeta potansiyel değerleri ölçülmüş, üç örneğinde net yüklerinde artış meydana geldiği belirlenmiştir. Mide ortamının asidik koşullarından ince bağırsak fazının nötral koşullarına geçiş sonrası örneklerin tekrar negatif yüklenerek net yük miktarlarında artış görülmesinin nedeni, enzimatik sindirim sonrası ortamda bulunan anyonik bileşiklerdir. Bu bileşikler çoğunlukla intestinal sıvıda bulunan safra tuzları ve fosfolipitler ve pirinç kepeği yağından gelen trigliserit formundaki yağların sindiriminden açığa çıkan serbest yağ asitleridir.

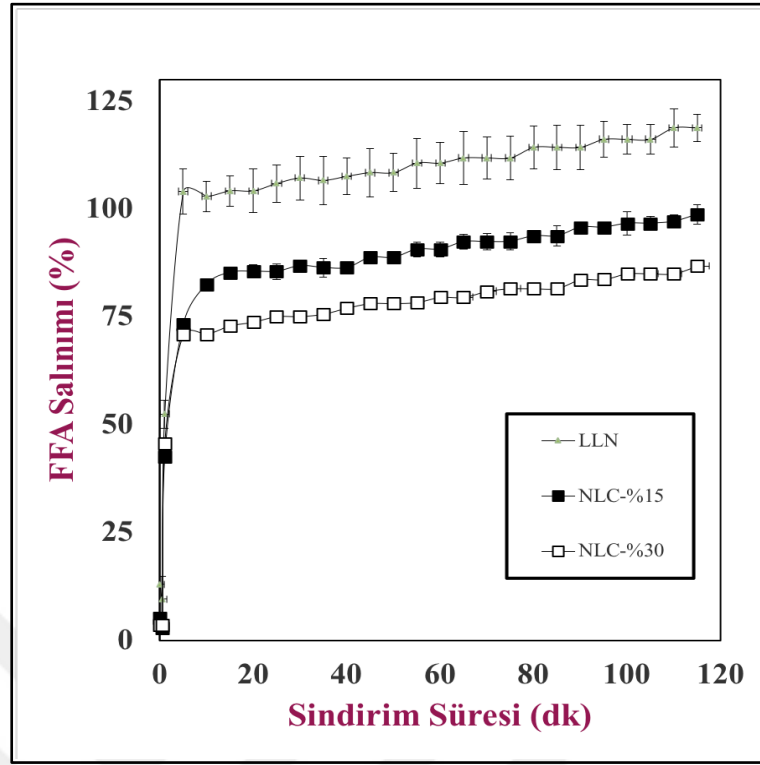
4.2.7. Yağ fazına γ -Orizanol ve β -Sitosterol İlavesinin Lipit Sindirimi Üzerine Etkisi

Lipit fazı formülasyonunun nano-emülsiyon partiküllerinin içeriğindeki trigliseritlerin sindiriminin hızı ve düzeyi üzerine etkisi pH-stat metodu ile görüntülenmiştir. pH-stat metodunda titratöre eklenen 0,1 N NaOH çözeltisi trigliseritlerin sindirimi sırasında açığa çıkan serbest yağ asitlerinin neden olduğu pH değerindeki düşüşü pH 7 değerine nötrlemek üzere 120 dk boyunca salınmakta ve harcanan NaOH miktarı kayıt altına alınmaktadır. Birim zamanda harcanan NaOH çözeltisinin miktarından zamana karşı sindirim sonucu salınan serbest yağ asidi miktarının başlangıçta ortamda bulunan yağın yüzde kaçını oluşturduğu ifade edilmektedir. Farklı lipit fazı kompozisyonlarından oluşan LLN, NLC-%15 ve NLC-%30 örneklerinin ince bağırsak koşullarında lipolitik aktivite sonucu sindirimlerine bağlı olarak titratörde harcanan NaOH miktarının sindirim zamanına karşı değişimi Şekil 4.20 da verilmiştir. LLN örneğinin yağ fazı kompozisyonu %100 pirinç kepeği yağından oluşurken; NLC-%15 örneğinde %85 pirinç kepeği yağı- %15 jelatör karışımı; NLC-%30 örneğinde ise %70 pirinç kepeği yağı %30 jelatör karışımı ile oluşturulmuştur. Grafikte görülen eğriler değerlendirildiğinde NaOH tüketiminin lipit fazının trigliserit kaynağını oluşturan pirinç kepeği yağı miktarı arttıkça harcanan NaOH miktarının arttığı açık şekilde görülmektedir.



Şekil 4.20. Simüle edilmiş ince bağırsak koşullarında bekletildikten sonra LLN, NLC-%15 ve NLC-%30 örneklerine ait NaOH tüketiminin zamana karşı değişimi

Harcanan NaOH miktarlarından yararlanarak ortamda bulunan yağ miktarları, yağ fazı kompozisyonu oluşturan bileşkerin molekül ağırlıkları ve kullanılan NaOH çözeltisinin normalitesinden oluşan eşitlikle ince bağırsak koşullarında zamana karşı salınan serbest yağ asidi miktarları hesaplanmış ve elde edilen grafik Şekil 4.21 de verilmiştir. LLN, NLC-%15 ve NLC-%30 örneklerinde 120 dk sindirim süresi sonunda salınan toplam serbest yağ asidi yüzdeleri ortalama olarak sırasıyla %119, %99 ve %87 olarak ölçülmüştür. NLC-%30 örneğinde elde edilen serbest yağ asidi salınımlarının beklenen %100 oranının üzerinde olması emülsüfyer olarak kullanılan Q-Naturel'in sindirim sırasında iyonlaşmasıyla açıklanabilir. Serbest yağ asidi salınımlarının toplam miktarları nano-emülsiyon örneklerinin lipid fazlarının kompozisyonlarındaki pirinç kepeği yağı miktarıyla doğrudan ilgili olduğu söylenebilir. γ -orizanol ve β -sitosterol'ün jelatör olarak eklenmesinin pirinç kepeği yağı trigiliseritlerinde sindirimi inhibe eden bir etkisi olmamıştır. Formülasyonda bulunan γ -orizanol'ün steril ferrulat bileşeni ihtiva etmesi ve sterol-ferulik asit arasındaki ester bağının da yine lipolitik aktivite sonucu parçalanmış olması da harcanan NaOH miktarının artmasında etkili olmuş olabilir. Ancak bu durum üzerine detaylı bir araştırma yapılmamıştır.



Şekil 4.21. Simüle edilmiş ince bağırsak koşullarında bekletildikten sonra NLC-%15, NLC-%30 ve LLN örneklerinin sindirilebilir yağlarına ait serbest yağ asidi salınımının zamana karşı değişimi

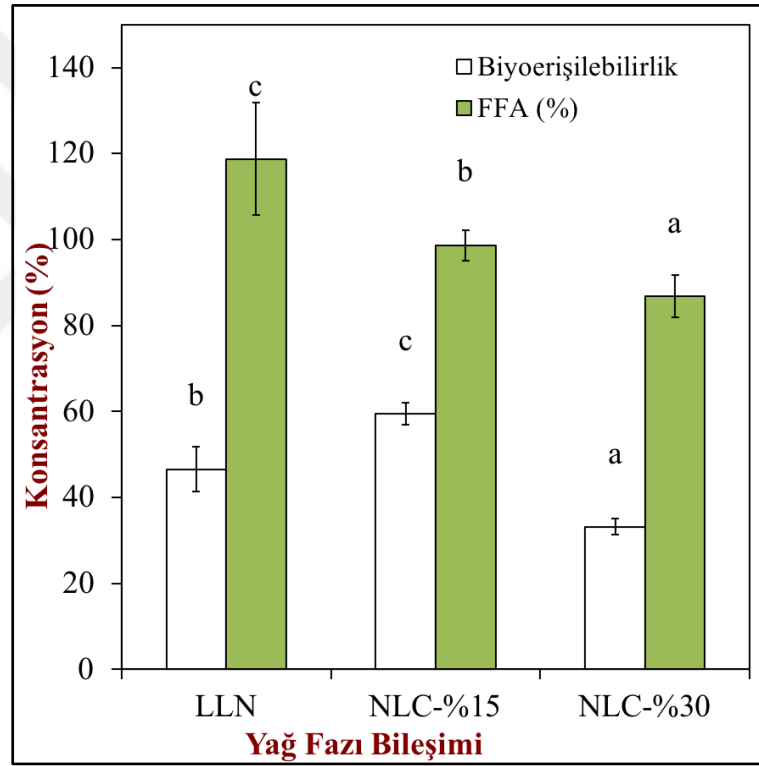
4.2.8. γ -Orizanol ve β -Sitosterol İlavesinin β -Karotenin Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

Farklı yağ fazı kompozisyonlarından oluşan nano-emülsiyon örneklerine β -karoten enkapsüle edilmiş, *in vitro* sindirim koşullarında tutulduktan sonra elde edilen ince bağırsak fazına ait digest örneği içerisinde bulunan β -karoten miktarı saptanmıştır. Nano-emülsiyon örneklerine ait β -karotenin biyoerişilebilirlik miktarını hesaplamak amacıyla digest örneği yüksek devirde santrifüj edilmiş daha sonra misel olarak kabul edilen süpernatant fazında bulunan β -karoten miktarı saptanarak diggestte bulunan β -karoten miktarına oranlanmasıyla biyoerişilebilirlik oranına ulaşılmıştır. Elde edilen biyoerişilebilirlik oranı miseller içerisinde bulunan, bağırsak duvarından epitel hücreler aracılığıyla emilime hazır miktarı yansıtan β -karoten miktarını ifade etmektedir.

Örneklerin sindirim sonunda salınan serbest yağ asitleri yüzdeleri ile birlikte β -karotenin farklı formülasyonlarla hazırlanan örneklerde biyolojik olarak erişilebilirlik oranları Şekil 4.22’de verilmiştir. Grafikten anlaşıldığı üzere en yüksek serbest yağ

asidi salınımı pirinç kepeği yağı miktarına bağlı olarak LLN örneğinde sonra NLC-%15 ve en düşük NLC-%30 örneğinde ölçülmüştür. Buna karşın en yüksek β -karoten biyoerişilebilirlik oranı NLC-%15 örneğinde ölçülürken, en düşük biyoerişilebilirlik oranı NLC-%30 örneğinde tespit edilmiş, örnekler arasında hem serbest yağ asidi salınımı hemde β -karotenin biyoerişilebilirliği bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar elde edilmiştir ($p < 0,05$). Bu bağlamda biyoerişilebilirlik düzeyi üzerine etkili olabilecek unsurlardan bazıları; (i) yağ fazı bileşiminde bulunan antioksidan bileşikler sindirim koşulları testi sırasında koruma sağlamış, bunun sonucunda yararlanım oranı yüksek elde edilmiş olabilir, (ii) pro-oksidan unsurlar β -karoten'in oksidasyonuna sebep olarak biyoyararlanım oranını düşürmüş olabilir, (iii) yağ partikülleri içerisinde bulunan β -karotenin pozisyonu yağ fazı bileşimine, polaritesine, kristalleşmeler ya da kendiliğinden birleşimle oluşmuş izole bölümler olmasına bağlı olarak değişkenlik göstermiş ve bu durumun sonucu olarak β -karoten farklı derecelerde parçalanmaya maruz kalmış olabilir. Antioksidan madde konsantrasyonu bakımından ele alındığında yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen γ -orizanol bütün örneklerin bileşiminde farklı oranlarda bulunmaktadır. Pirinç kepeği yağı bileşiminde doğal olarak bulunan γ -orizanol en düşük miktarda LLN örneğinde mevcut olup yapılan ilave sonucu en yüksek miktarda NLC-%30 örneğinin formülasyonunda bulunmaktadır. Buna karşın en yüksek biyoerişilebilirlik miktarı yağ fazına %15 jelatör yani %10 γ -orizanol eklenen örnekte tespit edilmiştir. GIT koşullarında her bir sindirim basamağında stabiliteleri araştırılan örneklerin elde edilen sonuçları gözden geçirildiğinde NLC-%15 örneğinin konfokal ve optik mikroskop görüntülerine bakılarak, ince bağırsak fazına stabilitesinde en az değişikliğe uğrayarak ulaşılan örneğin yine NLC-%15 olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ağız fazından itibaren flokülasyonlar meydana gelen NLC-%30 örneğinin mide fazının asidik koşullarında düşük pH değerlerine duyarlı olduğu stabilite testinin sonucunda gösterilmiştir. Bu stabilite kaybının bir sonucu olarak NLC-%30 örneğinde β -karoten parçalanmaya karşı antioksidan bileşikler tarafından korunamamış olabilir. GIT'da flokülasyonların oluşmasının düşük pH ya duyarlı aktif bileşenleri ortam koşullarının oksidatif etkisinden koruduğuna dair çalışmalar olmakla birlikte (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013) bu mekanizmanın NLC-%30 örneğinde geçerli olmadığı saptanmıştır. Beklenenin aksine en düşük biyoerişilebilirlik oranının NLC-%30 örneğinde görülmesinin altında yatan bir başka ihtimal de β -karotenin partikül

içerisinde konumlanma durumu olabilir. β -karoten'in nano-emülsiyonlarda yağ-su arayüzeyine yakın bulunması çevresel koşulların neden olacağı hasarın daha fazla olmasına sebep olabilir. Yine NLC-%30 örneğinde partikülde meydana gelen flokülasyonların organojelör konsantrasyonunun yüksek olması sonucunda suya karşı duyarlı olan γ -orizanolün etkileşime girerek organojel formunun bozulmuş olabileceği ihtimalinden kaynaklanmış olabilir. Buradan yola çıkarak NLC-%15 örneğinin organojel nano-emülsiyon formunun ağızdan ince bağırsak fazına stabilitesini diğer örneklerle kıyasla oldukça iyi şekilde koruyarak ulaşabildiği, bu durumun β -karotenin daha az kayıpla ince bağırsak fazına ulaşarak misel oluşumuna katılım sonucu yüksek biyoerişilebilirlik düzeyine ulaşmasıyla gerçekleşmiş olabileceği söylenebilir.



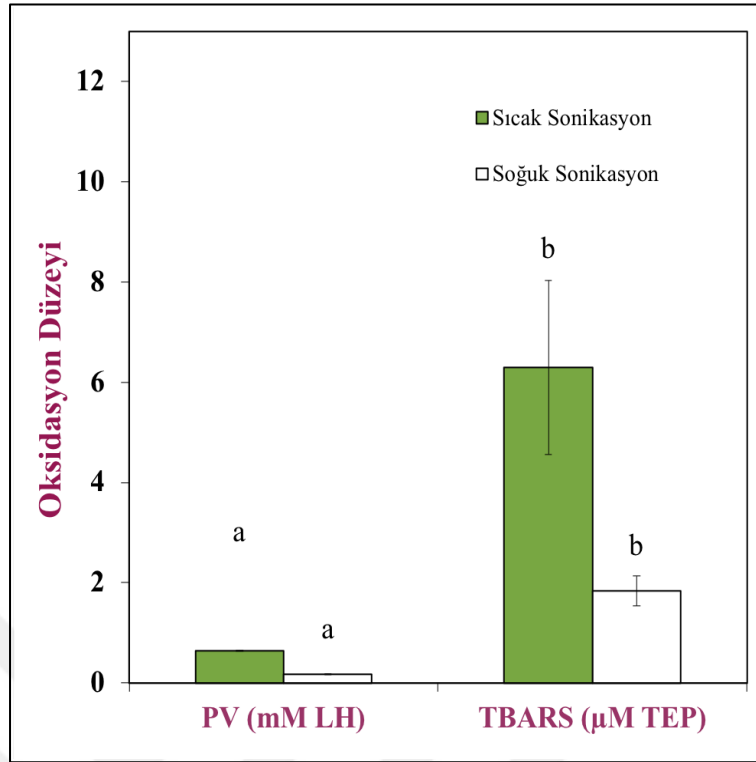
Şekil 4.22. β -karoten enkapsüle edilmiş NLC-%15, NLC-%30 ve LLN örneklerinin ince bağırsak koşullarında FFA salınımı (%) ve biyoerişilebilirlik oranları

Küçük harfler (a, b, c) farklı yağ fazı içerikleri ile üretilen LLN, NLC-%15 ve NLC-%30 örnekleri arasındaki farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$; paired samples t-Test, Duncan).

4.3. Keten Tohumu Yağı Nano-Emülsiyonu ve γ -Orizanol- β -Sitosterol ile Yapılandırılmış Nano-Emülsiyonların Karışımı

4.3.1. Nano-emülsiyonların Üretimi ve Oksidatif Stabilitite

Düşük oksidatif stabilitesi nedeniyle keten tohumu yağı ve balık yağı gibi çoklu doymamış yağ asidi bileşimine sahip olan yağlar sıcaklık uygulamalarında daha hızlı zamanda okside olurlar. Keten tohumu yağı ile farklı teknikle üretilen iki nano-emülsiyonun oksidasyon seviyeleri PV ve TBARS analizleri ile izlenmiştir. Soğuk sonifikasyon tekniğinde fazlar herhangi bir ısıl işlem uygulamadan %5 yağ, %95 su fazı olmak üzere doğrudan karıştırılıp pre-emülsiyon hale getirilmiştir. Sonrasında sonifikasyon işleminde emülsiyonun olduğu beher buzlu su bulunan bir kaba daldırılarak sonifikasyon enerjisinin örnekte sıcaklık yükselmesine sebep olması önlenmeye çalışılmıştır. Sıcak sonifikasyon yönteminde ise yağ ve su fazları ayrı beherlerde sıcaklık yaklaşık 90 °C'ye ulaştığında 10 dk boyunca karıştırılarak ısıtılmıştır. Devamında hemen %70 Attn de 5 dk sonifikasyon uygulanarak partikül boyutu submikron boyuta düşürülmüştür. Her iki yolla üretilen nano emülsiyonların oksidasyon düzeyleri kıyaslanarak Şekil 4.23'de grafik üzerinde gösterilmiştir. Sıcak ve soğuk sonifikasyonla üretilen nano emülsiyonların lipid hidroperoksit değerleri sırasıyla 0,64 ve 0,17 mM olarak ölçülmüştür. İkincil oksidasyon ürünlerinin miktarının tespit edildiği TBARS analizi sonuçları ise sıcak sonifikasyonla üretilen nano-emülsiyonda 6,29 μ M TEP olarak ölçülürken, soğuk teknikte bu değer 1.84 μ M TEP olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre; sıcak teknikle üretimin keten tohumu yağı emülsiyonlarının yağ fazında oksidasyonu hızlandırdığı saptanmıştır. Katı ve sıvı yağ karışımlarının sıcaklık uygulanarak eritilip emülsüfiye edildiği NLC sistemlerin üretiminde keten tohumu yağı gibi oksidatif stabilitesi düşük yağların sıvı yağ olarak kullanımlarının depolama sırasında yağın oksidatif stabilitesini azaltacağından uygun olmadığı kanaatine varılmıştır. Bu sebeple çalışmanın devamında keten tohumu nano-emülsiyonu ile 1:1 oranında karıştırılmak üzere oksidatif stabilitesi yüksek olan orta uzunlukta karbona zincirlerine sahip MCT ile anti-oksidatif özelliği bilinen γ -orizanol, β -sitosterol ile kombine ve ayrı ayrı eritilerek NLC ler hazırlanmış nihai emülsiyon karışımının oksidatif stabiliteleri depolama süresince takip edilmiştir.



Şekil 4.23. Farklı üretim tekniklerinin keten tohumu yağı nano-emülsiyonlarının oksidasyon düzeyine üzerine etkisi

Soğuk sonifikasyon tekniğinde fazlar ısıl işlem uygulamadan doğrudan karıştırılmış, sıcak sonifikasyon tekniğinde yağ fazı ve su fazı sıcaklık uygulanarak 90 °C'de 10 dk ısıtılmıştır. Soğuk sonifikasyonda örnekler buz dolu kaba daldırılmış, sonifikasyon enerjisinin ısıyı en aza indirilmiştir. Örneklere ait sonuçlar 3 üretim ve en az 2 ölçüm olarak elde edilmiştir. Küçük harfler (a, b) farklı üretim teknikleri arasındaki PV ve TBARS ölçümlerindeki farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$); paired samples t-Test, Duncan).

4.3.2. Nano emülsiyon Karışımlarının Oksidatif Stabilitesi

γ -Orizanol ve β -sitosterol, birlikte eritilip sıvı formdaki yağda çözündürüldükleri zaman kendiliğinden bir araya gelerek fibril yapıda ağlar oluşturan ve sıvı yağın bu fibril ağlar arasında hapsedilmesiyle organojel oluşturabilen düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Yapılan çalışmalarda γ -orizanol ve β -sitosterol'ün eş molar (moleküler ağırlıkları: γ -orizanol: 600 g/mol, β -Sitosterol: 400 g/mol) miktarda kullanımlarında ideal organojel yapının oluşumunun sağlandığına dair literatürde çalışmalar bulunmaktadır. Bu tez kapsamında da nano emülsiyonların lipit fazının yapılandırılmasında her iki molekül ayrı ayrı ve kombinasyonları halinde kullanılarak üretilen nano emülsiyonların oksidatif ve fiziksel stabiliteyi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla oksidasyona karşı stabil olan orta zincir uzunluklu trigliseritler içerisinde %5 oranında γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı, (γ -orizanol ve β -sitosterol; 3:2, w/w) hazırlanmıştır. Yine β -sitosterol ve γ -orizanolün ayrı ayrı

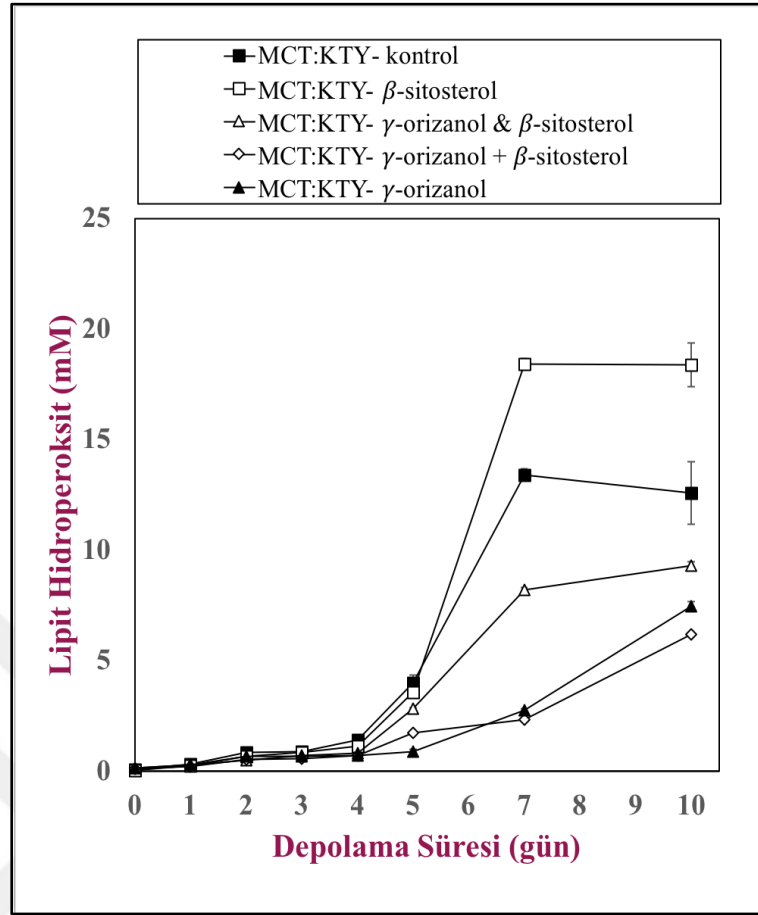
hazırlanan nano-emülsiyonlarının hazırlanan kompleks karışımlarıyla aynı oranda (3:2, w/w) birbiriyle etkileşime girmeden üretilen karışımları da hazırlanarak depolama stabilitesi izlenmiştir.

Tablo 4.5. 1:1 oranda karıştırılmak üzere hazırlanan Nano-emülsiyon 1 ve Nano-emülsiyon 2 örneklerinin yağ fazı formülasyonları

Örnekler	Nano-emülsiyon-1			Nano-emülsiyon-2
	γ -orizanol	β -sitosterol	MCT	Keten tohumu yağı
<i>Kontrol</i>	-	-	2,5 g	2,5 g
<i>β-Sitosterol</i>	-	0,125 g	2,375 g	2,5 g
<i>γ-orizanol</i>	0,125 g	-	2,375 g	2,5 g
<i>γ-orizanol ve β-Sitosterol</i>	0,075 g	0,050 g	2,375 g	2,5 g
<i>γ-orizanol + β-Sitosterol</i>	0,075 g	0,050 g	2,375 g	2,5 g

Nano-emülsiyon 1 örneği toplam %5 yağ fazı ve bu yağ fazının %5'i oranında toplam jelatör bileşenleri içerecek şekilde formüle edilmiştir. Tartılan bileşenler 90°C de 10 dk 300 rpm de karıştırıldıktan sonra aynı sıcaklığa getirilen %0,5 Q-Naturel içeren 10 m fosfat tamponun 2dk blender ile pre-emülsiyon hale getirildikten sonra sonikatörle toplam 5dk (3sn çalış-3sn dur) muamele edilerek nano-emülsiyonlar hazırlanmıştır. Nano-emülsiyon 2 örneği yağ fazı yalnızca MCT içerecek şekilde aynı koşullarda hazırlanmış, sonikasyon sonrası hızla soğutulan örnekler 1:1 oranlarında birbirleriyle karıştırılmıştır.

Hazırlanan nano emülsiyonlar 50:50 oranda keten tohumu yağıyla soğuk sonifikasyonla üretilen nano-emülsiyonlarla karıştırılmış, 55 °C’de depolama boyunca birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşumları üzerine etkileri incelenmiştir. Birincil oksidasyon ürünü olan lipit hidroperoksitleri üzerine etkileri Şekil 4.24’de gösterilmiştir. Lipit hidroperoksitleri üzerine etkileri incelendiğinde örneklerde genel olarak ilk dört gün önemli bir artış gözlemlenmezken, dördüncü günden itibaren lipit hidroperoksitleri oluşumu hızlanmıştır. On günlük depolama sonucunda nano-emülsiyonları yapılandırma ajanları olarak kullanılan moleküllerin ve kullanım şekillerinin keten tohumu yağının oksidatif stabilitesi üzerinde belirgin etkilere sahip oldukları tespit edilmiştir. Peroksit değerlerinde oksidasyon hızları bakımından örnekler arasında bir sıralama yapıldığında; kontrol > β -sitosterol > γ -orizanol ve β -Sitosterol kompleksi > γ -orizanol + β -sitosterol sıralaması elde edilmiştir ($p < 0,05$).

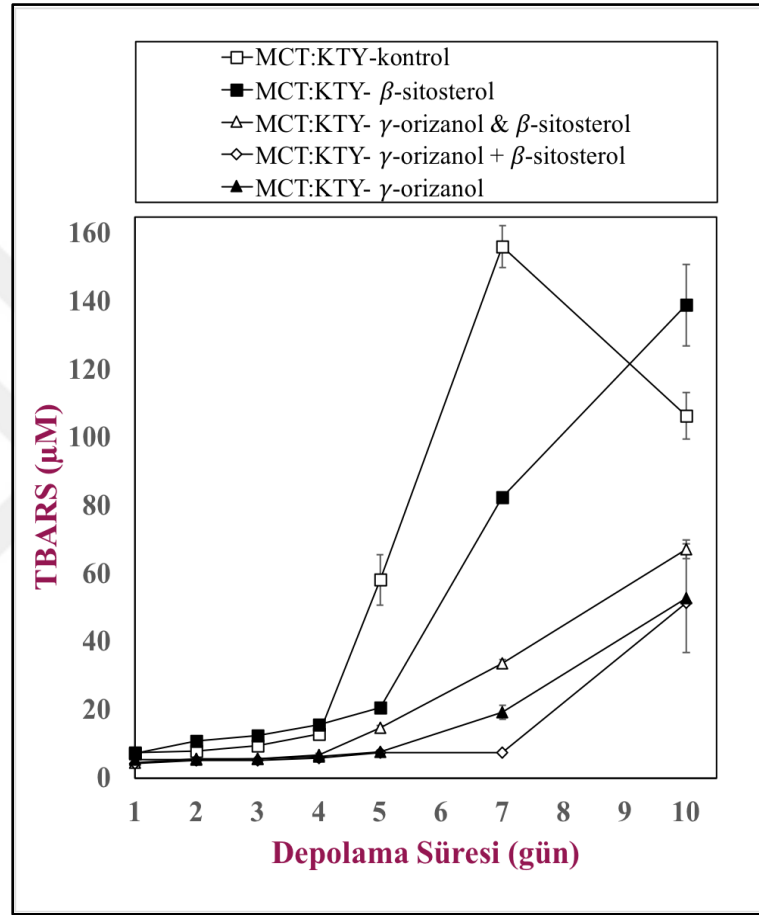


Şekil 4.24. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarının oksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitleri üzerine γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano-emülsiyonlarının etkisi

Nano emülsiyon örneklerinin ikincil oksidasyon ürün miktarlarının tespit edildiği TBARS sonuçlarının depolama süresince değişimleri Şekil 4.25’de gösterilmiştir. PV sonuçlarına benzer şekilde ilk dört günde önemli bir artış gözlemlenmezken, dördüncü günden itibaren, örnekler arasında belirgin farklılığın oluştuğu tespit edilmiştir. TBARS değerlerine göre örneklerin okside olma hızları sıralandığında kontrol > β -sitosterol > γ -orizanol ve β -sitosterol kompleksi > γ -orizanol+ β -sitosterol olarak ölçülmüştür ($p<0,05$).

PV ve TBARS analiz sonuçlarının birlikte değerlendirildiğinde en yüksek oksidasyon seviyesinin hiçbir yapılandırma unsurunun katılmadığı keten tohumu yağı ve orta zincirli trigliseritten ayrı ayrı elde edilen nano emülsiyonların eş hacimde karıştırılmasıyla elde edilen kontrol örneğine ait olduğu görülmüştür. Üretilen nano-emülsiyonlar arasında %15 β -sitosterolün lipit fazına eklenerek yapılandırıldığı karışımın ketem tohumu yağı nano emülsiyonunun oksidatif stabilitesi üzerine etkisi

incelendiğinde oksidasyon hızının kontrol dışındaki örneklere kıyasla daha hızlı gerçekleşmektedir. γ -Orizanol β -sitosterol karışımının birlikte üretildiği nano emülsiyonun ayrı ayrı üretilip eş oranda karıştırıldığı emülsiyonla kıyaslandığında γ -orizanol ve β -Sitosterolün birbiriyle kendiliğinden bağlanarak kompleks organojel oluşturduğu örneğin oksidatif stabilitesinin, ayrı ayrı üretildikten sonra karıştırıldığı örneğe kıyasla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.



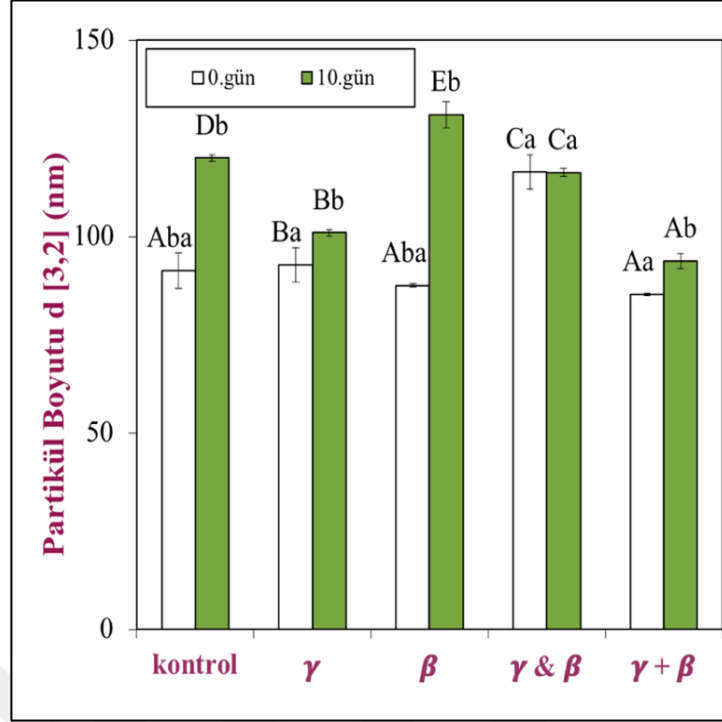
Şekil 4.25. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarının oksidasyonu sonucu oluşan TBARS değerleri üzerine γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano-emülsiyonlarının etkisi

4.3.3. Fiziksel Stabiliteler

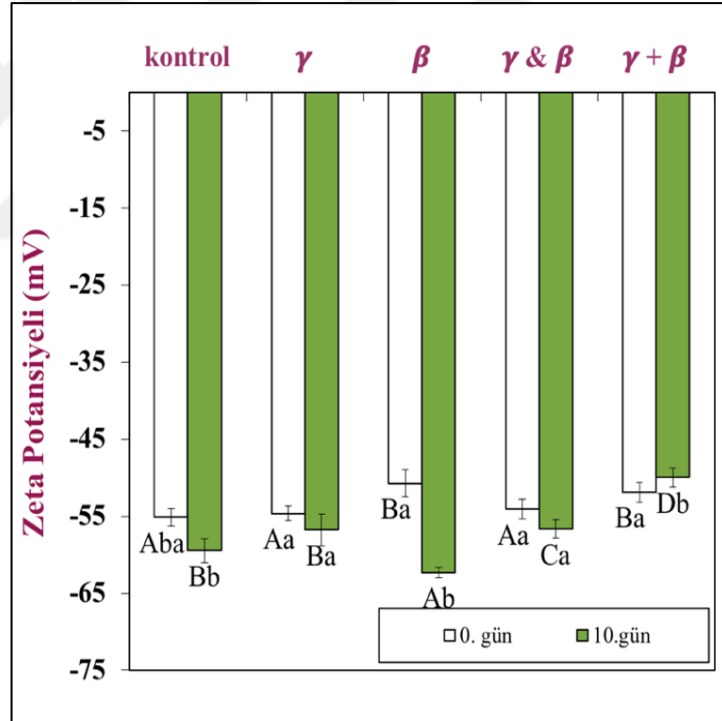
Üretilen karışım nano-emülsiyonların fiziksel stabiliteyi, depolama boyunca partikül boyutu, zeta potansiyel ölçümleri ile tayin edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.26.a-b'de gösterilmiştir. Ayrıca optik ve konfokal mikroskopla büyütülerek nano-emülsiyon kesitlerinin görüntüleri alınmış, 5 er ml lik test tüplerine alınan örnekler sarsmadan sabit tutularak bekletilip, görüntülerindeki değişim depolama boyunca gözlemlenmiştir (Şekil 4.27).

Elektrik yükünün nano emülsiyonların oksidatif stabilitesi üzerinde önemli role sahip olduğu kanıtlanmış bir gerçektir. Negatif yüklü lipit partikülleri pozitif yüklü metalleri yüzeylerine çekme eğilimi gösterirler. Böylelikle pro-oksidadant unsurları lipit ara yüzeyine yaklaştırarak oksidasyon hızını artırmaktadırlar (Mei *et al.*, 1998). Pozitif yüklü partikül arayüzeyi katyonik metal iyonlarını iterken, negatif yüklü partiküllerin arayüzeyi oksidasyonu hızlandıran bu pro-oksidadan iyonları çekerek lipit yüzeyine yaklaştırmaktadırlar. Ortamda bulunması muhtemel bu iyonlara karşı negatif yüklü lipit partiküller daha savunmasız olduklarından oksidasyon daha hızlı gerçekleşir. Örneklerin depolama başındaki yüklerine kıyasla genel olarak depolama sonunda zeta potansiyellerinde negatif yönde artış meydana gelmiştir. Non-anyonik bir sürfaktan olan Q-Naturel küçük ampifilik bir moleküldür, nonpolar aglikon gruplarına bağlı hidrofilik şeker grupları içerir. Saponinler genel olarak düşük konsantrasyonda küçük partiküller üretilmesi bakımından diğer birçok emülsüfiyere kıyasla daha etkilidir. Nötral pH değerlerindeki ortamlarda oldukça yüksek negatif yüklü olma eğilimi gösterirler. Ayrıca saponinlerle kaplanan partiküller aralarındaki güçlü elektrostatik itme özelliklerinden dolayı yüksek sıcaklıklarda depolamaya uygundur (Uluata *et al.*, 2015b) Saponin aktif bileşenini içeren Q-Naturel ile stabilize edilmiş örneklerin partikül yükleri negatif olup net yük bakımında β -sitosterol ile hazırlanan örnek ile γ -orizanol ve β -sitosterol ile ayrı ayrı hazırlanıp 1:1 oranda karıştırılan örneklerin yükleri diğerlerine kıyasla daha düşük bulunmuştur. 55° C de 10 gün depolama sonrasında bütün örneklerde istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlenirken, γ -orizanol+ β -sitosterol örneğinde tam tersi yönde omak üzere azalma meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Depolama sonrasında örneklerde genel olarak partikül yüklerinde artış gözlemlenmekle birlikte en yüksek yük başlangıçta en düşük zeta potansiyele sahip olan %15 β -sitosterolle yapılandırılan orta zincir trigliserit-keten tohumu nano-emülsiyonu karışımında ölçülmüştür. Nano-emülsiyonların oksidasyon sırasında yağ fazlarında kimyasal parçalanma meydana gelmesi sonucunda kısa zincirli organik asitler gibi anyonik reaksiyon ürünlerin miktarında artış meydana gelir. Yağ fazında meydana gelen kimyasal parçalanma, fonksiyon kaybı ve kötü koku meydana gelmesi açısından ticari uygulamalarda arzu edilmeyen bir durum teşkil eder. Oksidasyon düzeyine bağlı olarak bu anyonik yapıların miktarındaki artış nano emülsiyonların partikül yüklerinde negatif yönde artış meydana getirir.

a)



b)



Şekil 4.26. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarının depolama sonucu Partikül Boyutu ve Partikül yükü değişimleri üzerine γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano-emülsiyonlarının etkisi

Örnekle ait sonuçlar 3 üretim ve en az 2 ölçüm olarak elde edilmiştir. Küçük harfler (a, b, c) depolama sürecinde değişimleri ifade ederken (aynı örnekte), büyük harfler (A, B, C) farklı yağ fazı içerikleri ile üretilen örnekler arasındaki farklılığı (aynı koşulda) ifade etmektedir ($p < 0,05$; One way ANOVA, Duncan).

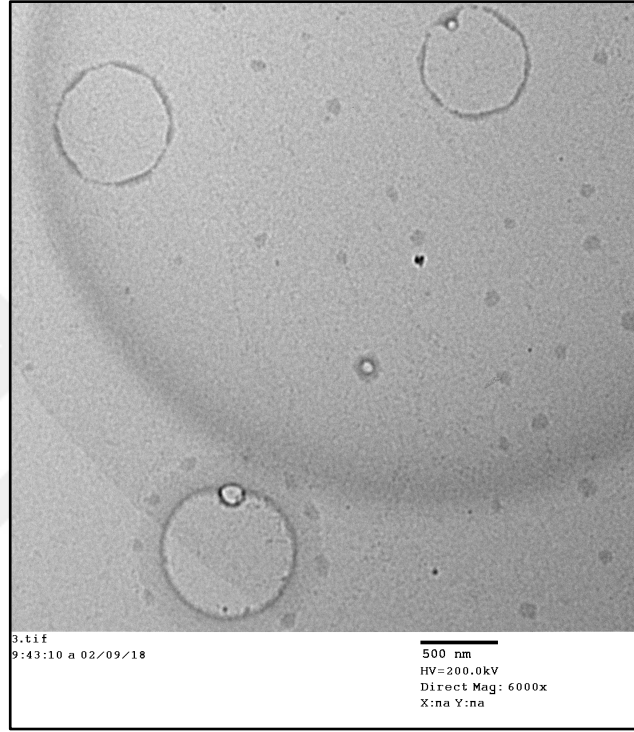
Ayrıca kuvvetli negatif ve kuvvetli pozitif yüke sahip nano emülsiyonlar, yağ partikülleri arasında kuvvetli elektrostatik repulsiyon özelliğine sahip olup, topaklanmayı inhibe ederler. Örneklerin başlangıç koşullarındaki partikül boyutları incelendiğinde başlangıç koşullarında en yüksek partikül boyutuna sahip olan örneğin γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı ile yapılandırılan organojel nano emülsiyonun etkisinin incelendiği karışıma ait olduğu tespit edilmiştir (d [3,2]; 116 nm). Üretilen nano-emülsiyon karışımlarda 55 °C’de on gün depolamanın sonucunda bazı örneklerde fark edilir partikül boyutu artışları meydana gelmiştir. Özellikle %15 β -sitosterolle yapılandırılan nano-emülsiyonun karıştırıldığı grup örneklerin ortalamasına bakıldığında partikül boyutunca artış meydana gelerek örneğin topaklanmaya eğilimli olduğu görülmüştür. Bu durum başlangıç zeta potansiyel değerleri dikkate alındığında en düşük yüke sahip olmasının ($50,70 \text{ mV} \pm 1,75$) partiküller arası elektriksel repulsiyonun düşük olması sonucu partikül boyutunda artış meydana gelmesi ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca depolama öncesi ve sonrasında partikül boyutları ve zeta potansiyellerindeki değişim dikkate alındığında, partikül agregasyonuna karşı en stabil örneğin γ -orizanol ve β -sitosterol karışımı ile yapılandırılan organojel nano emülsiyonun etkisinin incelendiği karışıma ait olduğu görülmüş, bu sonuç depolama öncesi ve sonrasında örneklerin görüntüleriyle doğrulanmıştır. Depolama öncesinde örneklerin hepsi benzer şekilde süt beyaz, homojen görünüme sahipken depolama sonrasında kontrol örneğinde belirgin bir yağ tabakası test tüpünün üst kısmında birikirken, β -sitosterol içeren örneklerde farklı düzeylerde kremaj meydana gelmiştir.



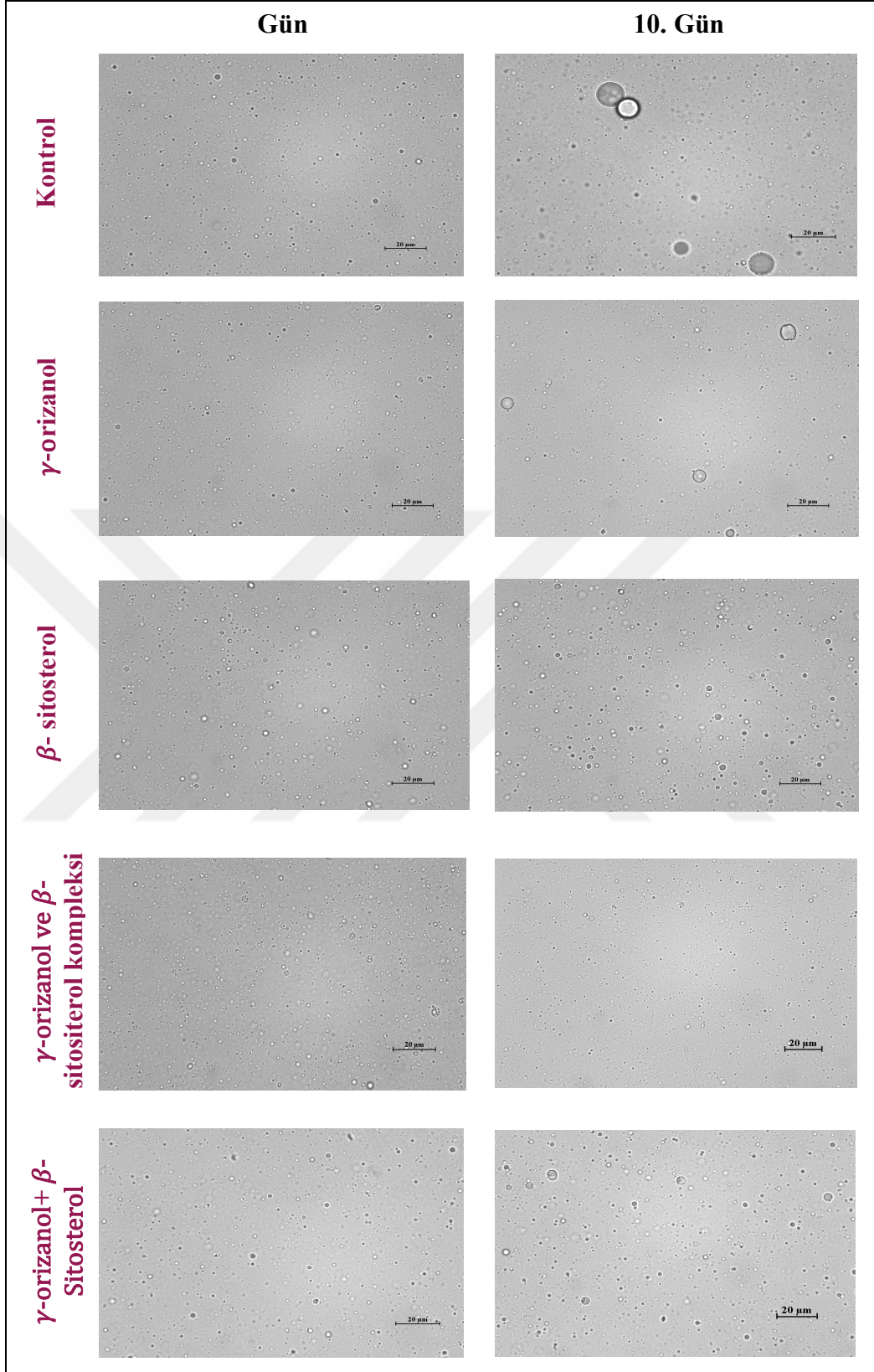
Şekil 4.27. Keten Tohumu Yağı (KTY) Nano-emülsiyonlarına γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırılmış nano- emülsiyonların ilavesinin depolama sonrası görüntüleri üzerine etkisi

Konfokal ve optik mikroskopla nano emülsiyon örneklerine ait büyütülmüş görüntülerin alınması partikül boyutları hakkında daha net bilgi edinmek adına önem arz etmektedir. Partikül boyutu analizi ışığın uygun bir çözeltilde (genellikle tampon çözeltilerinde) seyreltilip karıştırıldığı partiküller üzerinden yansıtılması ile gerçekleştirilmektedir. Seyreltme yapmadan doğrudan ölçülen mikroskop ölçümleri kantitatif partikül boyutu sonuçlarına kıyasla nano-emülsiyonların mikro yapıları hakkında daha doğru bilgi verebilmektedir. Bu bağlamda değerlendirme yapıldığında mikroskopla elde edilen sonuçlara göre kontrol örneğinde test tüpünün üst kısımda belirgin bir lipid tabakası şeklinde görülen tabaka, optik mikroskop görüntüsünde oldukça büyük yağ damlacıkları şeklinde, konfokal mikroskopta ise nil red ile kırmızıya boyanan yağ damlaları şeklinde yansımıştır. γ -orizanol ile yapılandırılmış örnekte ve γ - orizanol β -sitosterol karışımı ile organojel nano-emülsiyonuna dönüştürülmüş örnekte genel olarak partikül dağılımları mikroskop görüntülerine bakıldığında yer yer iri yağ damlacıkları dışında partikül boyutlarında belirgin bir artış gözlemlenmiş olup, β -sitosterol ile yapılandırılan örnekte partikül boyutlarının

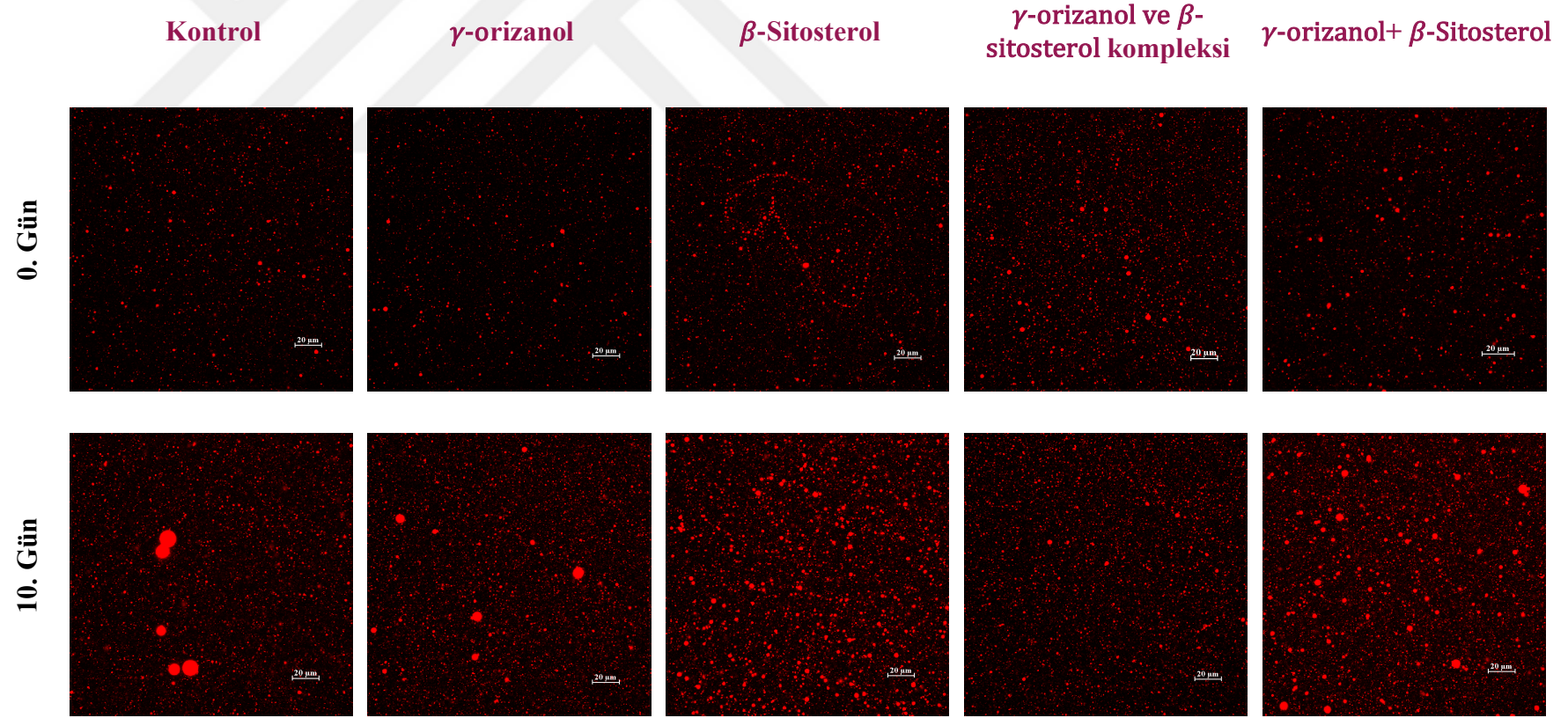
apında artış fark edilir ölçüdedir. γ -Orizanol ve β -sitosterolün içeren nano-emülsiyonların ayrı ayrı hazırlanıp keten tohumu yağı emülsiyonu ile karıştırıldığı örneklerde mastersizer ile ölçülen partikül boyutu sonuçlarında depolama sonrasında belirgin bir artış gözlemlenmezken, mikroskop görüntülerinde partikül çaplarında kısmen homojen bir artış gözlemlenmiştir. Bu durumun ölçüm esnasında yığını yansıtmayan örnek alımından ya da ölçüm sırasında büyük partiküllerin ölçüme katılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



şekil 4.28. MCT'nin γ -orizanol ve β -sitosterol ile yapılandırılmasıyla hazırlanan organojel nano-emülsiyon ile keten tohumu yağı (KTY) nano-emülsiyonlarının karışımı sonrası farklı nano-emülsiyonlar arası etkileşimi gösteren TEM görüntüsü



Şekil 4.29. Orta zincirli trigliseritin γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırıldığı nano-emülsiyonlarının keten tohumu yağı nano-emülsiyonları ile karışımlarının depolama sonrasında optik mikroskop görüntülerindeki değişim



Şekil 4.30. Orta zincirli trigliseritin γ -orizanol, β -sitosterol ile yapılandırıldığı nano-emülsiyonlarının keten tohumu yağı nano-emülsiyonları ile karışımlarının depolama sonrasında konfokal mikroskop görüntülerindeki değişim

5. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Nano-yapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemler diğer kolloidal salınım sistemlerinin avantajlarını kendisinde toplayan ve dezavantajlarını elimine eden bir salınım sistemidir. Organojel nano-emülsiyonlar ise nano-yapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemlerin yağ fazını oluşturan katı ve sıvı yağ karışımında, sağlığa olumsuz etkileri bilinen katı yağın yerine sindirilmeyen ya da sağlığa faydalı jelatörlerin kullanımının önerildiği en güncel lipit taşıyıcı sistemdir. Nano-yapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemler nutrasötik bileşiklerin stabiliteilerinin ve biyoyararlanımlarının artırılmasında da geniş bir uygulama alanına sahip bileşikleridir. Tez çalışması kapsamında önerilen organojel nano-emülsiyon sistemlerin, nano-yapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemlerin yeni jenerasyonu olabileceği önerilmiş benzer avantajların organojel nano-emülsiyon sistemlerde de bulunduğu deneysel sonuçlarla gösterilmiştir.

Araştırma bulguları bölümünde sonuçları tartışılan ilk çalışma da Kandelilla vaks kullanılarak jelleştirilmiş mısır özü yağı partikülleri oldukça düşük boyutlarda üretilmiştir. Termal özellikleri ve çeşitli fizikokimyasal özellikleri incelenen Kandelilla organojel emülsiyonların partiküller içerisinde kristal ağlar oluşturmuş olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. *In vitro* sindirim sistemi koşullarındaki özellikleri araştırılmış ve sadece Kandelilla vaks kullanılarak üretilen katı lipit nanopartikülün ince bağırsakta lipaz aktivitesiyle sindirilemediği gözlemlenmiştir. Ancak Kandelilla vaks organojel nano-emülsiyon oluşumuna dahil edildiğinde kontrollü serbest yağ asidi salınımını sağladığı ve tamamen sindirilmeyen Kandelilla vaksın lipolitik aktivite sonucu düşük oranda sindirime uğradığı, geri kalan kısmın sindirilmeden sistemi terkedeceği sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda Kandelilla vaksın katı yağların yerine geçerek sağlığa olumsuz etkiye neden olmayacağı ve organojel nano-emülsiyon sistemlerle kullanılabilmesi düşünülmektedir.

İkinci kısmı oluşturan çalışmada, nanoyapılandırılmış lipit taşıyıcı sistemlerin avantajlarını yine bir üst noktaya taşıyabilecek organojel nano-emülsiyon sistemi önerilmiş, bu kez kristal ağlarla organojel oluşturan Kandelilla vakstan farklı olarak kendiliğinden bileşimle organojel oluşturabilen, γ -orizanol β -sitosterol karışımı jelatör olarak kullanılmıştır.

γ -orizanol ve β -sitosterolün jelasyon mekanizmasına etki eden farklı konsantrasyonlarda değerlerinde organojel görüntüleri alınmıştır ve buradan karar verilen oranlarda organojel nano-emülsiyon üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nano-emülsiyon örneğinin ve organojelin termal özellikleri karşılaştırıldığında kendiliğinden bileşimle üç boyutlu nanofibriller oluşturarak bu ağların içerisine hapsettiği yağı jelleştirmiş olan örneklerde, kristal ağlarla organojel oluşumu sağlayan Kandelilla vaks organojellerine göre DSC termogramlarında daha yayvan pikler elde edilmiş, nano-emülsiyon örneğinde ise herhangi bir pik gözlemlenememiştir. İleriki çalışmalarla daha hassas sonuç veren mikro-DSC kullanılarak organojel nano-emülsiyon örneklerinin termal özellikleri daha ayrıntılı olarak incelenebilir ve istenilen kristallenme ya da erime noktasına sahip organojel nano-emülsiyon üretimi seçilen jelatör konsantrasyonlarıyla kontrol edilebilir.

γ -Orizanol ve β -sitosterol karışımı kullanılarak üretilen nano-emülsiyon örneklerinde β -karotenin enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş, sadece pirinç kepeği yağı içeren kontrol örneğinde enkapsüle edilen β -karotenin stabilitesine göre hızlandırılmış koşullarda 55°C de pH 3 ve pH 7'ye ayarlanan koşullarda organojel nano-emülsiyon örneklerinde β -karotenin stabilitesinin, pH 7 de daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yağ fazına %15 ve %30 jelatör karışımının eklendiği nano-emülsiyon örneklerinde %0,5 oranında β -karoten yüklenmiş, örneklerin *in vitro* sindirim koşullarında simüle edilen GIT basamaklarında fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Jelatör konsantrasyonu artıkça β -karotenin kimyasal stabilitesinin artmasına karşın, γ -orizanol β -sitosterol kompleksinin emülsiyon sistemde stabilitesinin azaldığı sonucuna varılmış, β -karotenin ince bağırsak koşullarında misel oluşumuna katılımının bir göstergesi olan biyoerişilebilirlik değerinin γ -orizanol β -sitosterol kompleksinin emülsiyon formulasyonu içerisinde stabilitesine bağlı olduğu görülmüştür. En yüksek biyoerişilebilirlik değerinin ağız fazından ince bağırsak fazına gelene kadar stabilitesini en etkin şekilde koruyan %15 jelatör karışımının kullanıldığı örnek optimum β -karoten enkapsülasyonunu sağlamıştır.

Son olarak yine γ -orizanol β -sitosterol karışımının kullanıldığı durumlarda γ -orizanolün bilinen antioksidan özelliği dolayısıyla, oksidasyona meyilli yüksek doymamış yağ asidi bileşimine sahip keten tohumu yağı ile hazırlanan nano-emülsiyonlar üzerinde etkisi araştırılmıştır. SLN, NLC ve organojel nano-

emülsiyonların üretiminde her iki su ve yağ fazının belli bir sıcaklığa ısıtılıp karıştırıldıktan sonra homojenize edildiği sıcak homojenizasyon tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak sıcak homojenizasyon tekniği oksidatif bozulmaya elverişli çoklu doymamış yağ asidi bileşimi bakımından zengin olan yağlar için üretim sırasında bozulmaların başlaması nedeniyle elverişli olmamaktadır. Oksidatif bozulmaya eğilimli yağların oksidasyona karşı stabilitelerini artırmak amacıyla antioksidan bileşikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda jelatör bileşenlerinin ayrı ayrı kullanıldığı, ayrı ayrı hazırlanıp 1:1 oranda karıştırıldığı ve organojel nano-emülsiyon formunda γ -orizanol β -sitosterolün kompleks oluşturduğu nano-emülsiyon örnekleri oksidatif bakımdan stabil çoklu doymamış yağ asidi içermeyen MCT de hazırlanmış, oksidatif bakımdan stabil olmayan keten tohumu yağı ile hazırlanan nano-emülsiyon ile karıştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar oldukça ilginç olup, β -sitosterol içeren MCT emülsiyonu ile karıştırılan keten tohumu yağı emülsiyonunun oksidasyona karşı antioksidan değil prooksidan etki gösterdiği gözlemlenmiş, γ -orizanol içeren örneklerin ise oksidasyona karşı antioksidan etki ile koruma sağladığı görülmüştür. MCT emülsiyon damlacıkları içerisindeki bileşenlerin keten tohumu yağı emülsiyon damlacıkları içerisine geçerek antioksidan ya da prooksidan etki etmesi sonucu elde edilen sonuçlar ışığında γ -orizanol içeren nano-emülsiyon ve γ -orizanol ve β -Sitosterolün ayrı ayrı hazırlanarak karıştırıldıktan sonra keten tohumu yağı nano-emülsiyonuna karıştırıldığı örneklerde diğer örneklerle kıyasla daha oksidatif bakımdan stabil bir profil görülürken organojel nano-emülsiyon örneğinin ilavesinin kontrol örneğine kıyasla koruma sağladığı görülmektedir. Keten tohumu yağı nano-emülsiyonlarının fiziksel stabilitelerinin korunmasına katkıda bulunan örneğin ise diğerlerine kıyasla en çok organojel nano-emülsiyon örneğinin olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçların oksidatif ve fiziksel stabilite bakımından önemli farklılıklar olduğunu göstermesi dolaylı yoldan organojel nano-emülsiyon örneğinde γ -orizanol ve β -sitosterol moleküllerinin kendiliğinden bileşimle kompleks yapılar meydana getirip, nano ölçekli bir ortamda organojel oluşumunu sağlandığını doğrular nitelikte olması bakımından oldukça önemlidir. Ayrıca oksidatif bozulmaya karşı antioksidan bileşiklerin farklı üretim koşullarında elde edildikten sonra nano-emülsiyon damlacıklar arası taşınmayla etki gösterebildiğinin deneysel olarak kanıtlandığı bu çalışma nano-emülsiyon sistemlere yeni bir bakış açısı kazandırabilecek ileri ki birçok çalışmaya model oluşturabilecek niteliktedir.

Nano boyutta tasarlanan organojel emülsiyon üretimleri gerçekleştirilmiştir ancak; farklı jelatör, farklı emülsüfyer, farklı biyoaktif nutrasötikler ve vitaminlerin olduğu denemelerle organojel nano-emüsiyon sistemde avantajlarının ve dezavantajlarının araştırılması, yeni çözüm yollarının ve uygulamaların tasarlanabilmesi bakımından önemlidir.



6. KAYNAKLAR

- Abdallah, D.J., Lu, L.D. and Weiss, R.G. (1999). Thermoreversible organogels from alkane gelators with one heteroatom. *Chem Mater.* **11**, 2907-2911.
- Abdallah, D.J., Sirchio, S.A. and Weiss, R. G. (2000). Hexatriacontane organogels. The first determination of the conformation and molecular packing of a low-molecular-mass organogelator in its gelled state. *Langmuir.* **16**, 7558-7561.
- Abdallah, D.J. and Weiss, R.G. (2000). N-alkanes gel n-alkanes (and many other organic liquids). *Langmuir.* **16**, 352-355.
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* **14**, 3-15.
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* **14**, 3-15.
- Adams, F. Walstra, P. Brooks, B.W., *et al.* (2007). *Modern Aspects of Emulsion Science*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK ,430p.
- Aguirre-Mandujano, E., Lobato-Calleros, C., Beristain, C.I., Garcia, H.S. and Vernon-Carter, E.J. (2009). Microstructure and viscoelastic properties of low-fat yoghurt structured by monoglyceride gels. *Lwt-Food Sci Technol.* **42**, 938-944.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., *et al.* (2000). Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J Agric Food Chem.* **48**, 2313-2319.
- Akoh, C. C. (2017). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Fourth Edition*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1028 p.
- Almdal, K., Dyre, J., Hvidt, S. and Kramer, O. (1993). What is a Gel. *Makromol Chem-Macrom Symp.* **76**, 49-51.
- Almeida, I. F. and Bahia, M. F. (2006). Evaluation of the physical stability of two oleogels. *Int J Pharm.* **327**, 73-77.
- Anton, N., Benoit, J. P. and Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *J Control Release.* **128**, 185-199.
- Asumadu-Mensah, A., Smith, K.W. and Ribeiro, H. S. (2013). Solid Lipid Dispersions: Potential Delivery System for Functional Ingredients in Foods. *J Food Sci.* **78**, E1000-E1008.
- Ausman, L.M., Rong, N. and Nicolosi, R. J. (2005). Hypocholesterolemic effect of physically refined rice bran oil: studies of cholesterol metabolism and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *J Nutr Biochem.* **16** 521-529.

- Avramiotis, S., Papadimitriou, V., Hatzara, E., Bekiari, V., Lianos, P. and Xenakis, A. (2007). Lecithin organogels used as bioactive compounds carriers. A microdomain properties investigation. *Langmuir*. **23** 4438-4447.
- Bei, W.Y., Zhou, V., Xing, X.Y., *et al.* (2015). Organogel-nanoemulsion containing nisin and D-limonene and its antimicrobial activity. *Front Microbiol* **6**.
- Berger, A., Rein, D., Schafer, A., *et al.* (2005). Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied gamma-oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. *Eur J Nutr*. **44**, 163-173.
- Bin Sintang, M.D., Rimaux, T., Van De Walle, D., Dewettinck, K. and Patel, R. (2017). Oil structuring properties of monoglycerides and phytosterols mixtures. *Eur J Lipid SciTech*. **119**.
- Blake, I., Co, E.D. and Marangoni, G. (2014). Structure and Physical Properties of Plant Wax Crystal Networks and Their Relationship to Oil Binding Capacity. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 885-903.
- Bohidar, H.B. (2001). Dynamics in thermoreversible polymer gels. *Curr. Sci.* **80**, 1008-1017.
- Bonnaire, L., Sandra, S., Helgason, T., Decker, E. A., Weiss, J. and McClements, D.J. (2008). Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids. *J Agric Food Chem.* **56**, 3791-3797.
- Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J. and Decker, E.A. (2009). Role of Iron and Hydroperoxides in the Degradation of Lycopene in Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem.* **57**, 2993-2998.
- Boon, C.S., Xu, Z., Yue, X., McClements, D.J., Weiss, J. and Decker, E.A. (2008). Factors affecting lycopene oxidation in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem.* **56**, 1408-1414.
- Borel, P., Armand, M., Ythier, P., *et al.* (1994). Hydrolysis of Emulsions with Different Triglycerides and Droplet Sizes by Gastric Lipase *In-Vitro* - Effect On Pancreatic Lipase Activity. *J Nutr Biochem.* **5**, 124-133.
- Bot, A. and Agterof, W. G. M. (2006). Structuring of edible oils by mixtures of gamma-oryzanol with beta-sitosterol or related phytosterols. *J Am. Oil Chem. Soci.* **83**, 513-521.
- Bot, A., Den Adel, R. and Roijers, E. C. (2008). Fibrils of gamma-Oryzanol plus beta-Sitosterol in Edible Oil Organogels. *J Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 1127-1134.
- Bot, A., Den Adel, R., Roijers, E. C. and Regkos, C. (2009a). Effect of Sterol Type on Structure of Tubules in Sterol plus gamma-Oryzanol-Based Organogels. *Food Biophys.* **4**, 266-272.
- Bot, A., Veldhuizen, Y.S.J., Den Adel, R. and Roijers, E.C. (2009b). Non-TAG structuring of edible oils and emulsions. *Food Hydrocolloid.* **23**, 1184-1189.

- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., *et al.* (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Reg Toxicol Pharmacol.* **53**, 52-62.
- Calligaris, S., Mirolo, G., Da Pieve, S., Arrighetti, G. and Nicoli, M.C. (2014). Effect of Oil Type on Formation, Structure and Thermal Properties of gamma-oryzanol and beta-sitosterol-Based Organogels. *Food Biophys.* **9**, 69-75.
- Chang, Y.H. and McClements, D. J. (2014). Optimization of Orange Oil Nanoemulsion Formation by Isothermal Low-Energy Methods: Influence of the Oil Phase, Surfactant, and Temperature. *J.Agric Food Chem.* **62**, 2306-2312.
- Chopin-Doroteo, M., Morales-Rueda, J., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M. A., De La Pena-Gil, A. and Toro-Vazquez, J. (2011). The Effect of Shearing in the Thermo-mechanical Properties of Candelilla Wax and Candelilla Wax-Tripalmitin Organogels. *Food Biophys.* **6**, 359-376.
- Cicero, F. G. and Gaddi, A. (2001). Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. *Phytother Res.* **15**, 277-289.
- Co, E.D. and Marangoni, G. (2012). Organogels: An Alternative Edible Oil-Structuring Method. *J.Am. Oil Chem. Soc.* **89**, 749-780.
- Cornwell, D.J., Okesola, B.O. and Smith, D.K. (2013). Hybrid polymer and low molecular weight gels - dynamic two-component soft materials with both responsive and robust nanoscale networks. *Soft Matter* **9**, 8730-8736.
- Coupland, J.N. (2002). Crystallization in emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 445-450.
- Da Pieve, S., Calligaris, S., Co, E., Nicoli, M.C. and Marangoni, G. (2010). Shear Nanostructuring of Monoglyceride Organogels. *Food Biophys.* **5**, 211-217.
- Daniel, J. and Rajasekharan, R. (2003). Organogelation of plant oils and hydrocarbons by long-chain saturated FA, fatty alcohols, wax esters, and dicarboxylic acids. *J.Am. Oil Chem. Soc.* **80**, 417-421.
- Dassanayake, L.S.K., Kodali, D.R. and Ueno, S. (2011). Formation of oleogels based on edible lipid materials. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **16**, 432-439.
- Dassanayake, L.S.K., Kodali, D.R., Ueno, S. and Sato, K. (2009). Physical Properties of Rice Bran Wax in Bulk and Organogels. *J.Am. Oil Chem. Soc.* **86**, 1163-1173.
- Davidov-Pardo, G., Gumus, C.E. and McClements, D.J. (2016). Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability. *Food Chem.* **196**, 821-827.
- Davidovich-Pinhas, M., Barbut, S. and Marangoni, G. (2016). Development, Characterization, and Utilization of Food-Grade Polymer Oleogels. *Annu Rev Food Sci Technol.* **7**, 65-91.

- Davidovich-Pinhas, M., Gravelle, J., Barbut, S. and Marangoni, G. (2015). Temperature effects on the gelation of ethylcellulose oleogels. *Food Hydrocolloid*. **46**, 76-83.
- Den Adel, R., Heussen, P. C. M. and Bot, A. (2009). Effect of water on self-assembled tubules in beta-sitosterol plus gamma-oryzanol-based organogels. (pp 1-12), In: *14th International Conference on Small-Angle Scattering (SA S09)*. Oxford, September 13-18, UK.
- Dexter, F., Coalescence of Emulsions, WIPO (PCT) WO2011116412A1, March 2011.
- Doan, C.D., Van De Walle, D., Dewettinck, K. and Patel, R. (2015). Evaluating the Oil-Gelling Properties of Natural Waxes in Rice Bran Oil: Rheological, Thermal, and Microstructural Study. *J Am. Oil Chem. Soc.* **92**, 801-811.
- Duffy, N., Blonk, H. C. G., Beindorff, C.M., Cazade, M., Bot, A. and Duchateau, G. (2009). Organogel-Based Emulsion Systems, Micro-Structural Features and Impact on In Vitro Digestion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **86**, 733-741.
- Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N. and Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 628-647.
- Fan, Y.T., Gao, L.Y., Yi, J., Zhang, Y.Z. and Yokoyama, W. (2017). Development of beta-Carotene-Loaded Organogel-Based Nanoemulsion with Improved In Vitro and In Vivo Bioaccessibility. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 6188-6194.
- Fang, N.B., Yu, S.G. and Badger, T.M. (2003). Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3260-3267.
- Fathi, M., Mozafari, M.R. and Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci Technol.* **23**, 13-27.
- Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M. and Shahidi, F. (2013). Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 1464-1475.
- Ferry, J. (1980) *Viscoelastic Properties of Polymers*. Wiley, New York, USA, 672 p.
- Flanagan, J. and Singh, H. (2006). Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 221-237.
- Flory, P.J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 672 p.
- Gandolfo, F.G., Bot, A. and Floter, E. (2004). Structuring of edible oils by long-chain FA, fatty alcohols, and their mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81**, 1-6.

- Gao, S.R. and McClements, D.J. (2016). Formation and stability of solid lipid nanoparticles fabricated using phase inversion temperature method. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* **499**, 79-87.
- George, M. and Weiss, R.G. (2006). Molecular organogels. Soft matter comprised of low-molecular-mass organic gelators and organic liquids. *Acc. Chem. Res.* **39**, 489-497.
- Ghosh, M., Begg, F., Bhattacharyya, D.K. and Bandyopadhyaya, N. (2017). Nutritional Evaluation of Oleogel Made from Micronutrient Rich Edible Oils. *J Oleo Sci.* **66**, 217-226.
- Giacomozzi, S., Carrin, M.E. and Palla, C.A. (2018). Muffins Elaborated with Optimized Monoglycerides Oleogels: From Solid Fat Replacer Obtention to Product Quality Evaluation. *J. Food Sci.* **83**, 1505-1515.
- Gu, L.P., Pan, C., Su, Y.J., *et al.* (2018). In Vitro Bioavailability, Cellular Antioxidant Activity, and Cytotoxicity of beta-Carotene-Loaded Emulsions Stabilized by Catechin-Egg White Protein Conjugates. *J.Agric Food Chem.* **66**, 1649-1657.
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A. and Doyle, P.S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter.* **12**, 2826-2841.
- Gutierrez, J, M., Gonzalez, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C. M. and Nolla, J. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Curr Opin. Colloid Interface Sci.* **13**, 245-251.
- Hagens, W.I., Oomen, G., De Jong, W.H., Cassee, F.R. and Sips, A. (2007). What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul Toxicol Pharmacol.* **49**, 217-229.
- Hare, R. F.B., A. P. (1910). Examination of Candelilla Wax. *J Ind. Eng Chem.* **2**, 3.
- Hentschel, A., Gramdorf, S., Muller, R.H. and Kurz, T. (2008). beta-Carotene-loaded nanostructured Lipid carriers. *J Food Sci.* **73**, N1-N6.
- Higaki, K., Sasakura, Y., Koyano, T., Hachiya, I. and Sato, K. (2003). Physical analyses of gel-like behavior of binary mixtures of high- and low-melting fats. *J.Am. Oil Chem. Soc.* **80**, 263-270.
- Hu, L.D., Tang, X. and Cui, F.D. (2004). Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol* **56**, 1527-1535.
- Huang, H.D., Hallinan, R. and Maleky, F. (2018a). Comparison of different oleogels in processed cheese products formulation. *Int J Food Scie Technol.* **53**, 2525-2534.
- Huang, J., Wang, Q., Sun, R., Li, T., Xia, N. and Xia, Q. (2018b). Antioxidant Activity, In Vitro Digestibility and Stability of Flaxseed Oil and Quercetin Co-Loaded Submicron Emulsions. *Eur J Lipid Sci Technol.* **120**.

- Huang, Q.R. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Abs Pap Am Chem Soc.* **240**.
- Hughes, N.E., Marangoni, G., Wright, J., Rogers, M.A. and Rush, J.W.E. (2009). Potential food applications of edible oil organogels. *Trends Food Sci Technol.* **20**, 470-480.
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chem.* **125**, 1-12.
- Hwang, H.S., Kim, S., Singh, M., Winkler-Moser, J.K. and Liu, S.X. (2012). Organogel Formation of Soybean Oil with Waxes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **89**, 639-647.
- Hwang, H.S., Singh, M., Bakota, E.L., Winkler-Moser, J.K., Kim, S. and Liu, S.X. (2013). Margarine from Organogels of Plant Wax and Soybean Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 1705-1712.
- Hwang, H.S., Singh, M. and Lee, S. (2016). Properties of Cookies Made with Natural Wax-Vegetable Oil Organogels. *J. Food Sci.* **81**, C1045-C1054.
- Iqbal, M.A., Md, S., Sahni, J.K., Baboota, S., Dang, S. and Ali, J. (2012). Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *J Drug Target.* **20**, 813-830.
- Jafari, S.M., He, Y.H. and Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *Int J. Food Prop.* **9**, 475-485.
- Jibry, N., Sarwar, T. and Murdan, S. (2006). Amphiphilic gels as drug carriers: effects of drug incorporation on the gel and on the active drug. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 187-194.
- John, G., Samateh, M. and Sagirii, S.S. (2018). Fat for the future: Designing multifunctional molecular oleogels. *Abs Pap Am. Chem. Soc.* **256**.
- Joshi, M. and Patravale, V. (2008). Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *Int J Pharm.* **346**, 124-132.
- Judd, J.T., Clevidence, B.A., Muesing, R.A., Wittes, J., Sunkin, M.E. and Podczasy, J. J. (1994). Dietary *Trans*-Fatty-Acids - Effects on Plasma-Lipids and Lipoproteins of Healthy-Men and Women. *Am J Clin Nutr.* **59**, 861-868.
- Juliano, C., Cossu, M., Alamanni, M.C. and Piu, L. (2005). Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *Int J. Pharm.* **299**, 146-154.
- Kabalinov, A. (2001). Ostwald ripening and related phenomena. *J. Disp Sci Technol* **22**, 1-12.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B. and Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under

- conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res.* **23**, 165-176.
- Kaltsa, O., Spiliopoulou, N, Yanniotis, S and Mandala, I (2016). Stability and physical properties of model macro- and nano/submicron emulsions containing fenugreek gum. *Food Hydrocolloid.* **61**, 625-632.
- Karthik, P., Ezhilarasi, P.N. and Anandharamakrishnan, C. (2017). Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Cri. Rev. Food Sci Nutr.* **57**, 1435-1450.
- Kasongo, K.W., Pardeike, J., Muller, R.H. and Walker, R.B. (2011). Selection and Characterization of Suitable Lipid Excipients for use in the Manufacture of Didanosine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. *J Pharm Sci.* **100**, 5185-5196.
- Kirilov, P., Lukyanova, L., Franceschi-Messant, S, Perier, V., Perez, E. and Rico-Lattes, I. (2008). A new type of colloidal dispersions based on nanoparticles of gelled oil. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **328**, 1-7.
- Klinkesorn, U. and McClements, D.J. (2009). Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions. *Food Chem.* **114**, 1308-1315.
- Komaiko, J.S. and McClements, D.J. (2016). Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Comp Rev Food Sci Food Saf.* **15**, 331-352.
- Kumar, R. and Katare, O.P. (2005). Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: A review. *Aaps Pharmscitech.* **6**.
- Laredo, T., Barbut, S. and Marangoni, G. (2011). Molecular interactions of polymer oleogelation. *Soft Matter.* **7**, 2734-2743.
- Leeson, P, and Floter, E, (2002). Solidification behaviour of binary sitosteryl esters mixtures. *Food Res Int.* **35**, 983-991.
- Lerma-Garcia, M.J., Herrero-Martinez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., Mendonca, C.R.B. and Ramis-Ramos, G. (2009). Composition, industrial processing and applications of rice bran gamma-oryzanol. *Food Chem.* **115**, 389-404.
- Liang, L., Chen, F., Wang, X.G., Jin, Q.Z., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2017). Physical and Oxidative Stability of Flaxseed Oil-in-Water Emulsions Fabricated from Sunflower Lecithins: Impact of Blending Lecithins with Different Phospholipid Profiles. *J.Agr. Food Chem.* **65**, 4755-4765.
- Lloyd, B.J., Siebenmorgan, T.J. and Beers, K.W. (2000). Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem.* **77**, 551-555.
- Lloyd, D. (1926). *The problem of gel structure* (pp 767-782). In: Alexander, J. (Ed), Colloid Chemistry Chemical Catalog Co, New York.

- Lu, M.W., Cao, Y., Ho, C.T. and Huang, Q.R. (2016). Development of Organogel-Derived Capsaicin Nanoemulsion with Improved Bioaccessibility and Reduced Gastric Mucosa Irritation. *J Agr Food Chem.* **64**, 4735-4741.
- Lundin, L., Golding, M. and Wooster, T.J. (2008). Understanding food structure and function in developing food for appetite control. *Nutr Diet* **65**, S79-S85.
- Mallia, V.A., George, M., Blair, D.L. and Weiss, R.G. (2009). Robust Organogels from Nitrogen-Containing Derivatives of (R)-12-Hydroxystearic Acid as Gelators: Comparisons with Gels from Stearic Acid Derivatives. *Langmuir.* **25**, 8615-8625.
- Mao, Y.Y. and McClements, D.J. (2012). Influence of electrostatic heteroaggregation of lipid droplets on their stability and digestibility under simulated gastrointestinal conditions. *Food Funct.* **3**, 1025-1034.
- Marangoni, G. and Garti, N. (2015). *Edible Oleogels: Structure and Health Implications*. AOCS Press, Urbana, Illinois, 342 p.
- Marciani, L., Faulks, R., Wickham, M.S.J., *et al.* (2009). Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *Br J Nutr.* **101**, 919-928.
- Martins, J., Cerqueira, M.A., Cunha, R.L. and Vicente, A. (2017). Fortified beeswax oleogels: effect of beta-carotene on the gel structure and oxidative stability. *Food Funct.* **8**, 4241-4250.
- Martins, J., Vicente, A., Cunha, R.L. and Cerqueira, M.A. (2018). Edible oleogels: an opportunity for fat replacement in foods. *Food Funct.* **9**, 758-773.
- Mauludin, R., Muller, R.H. and Keck, C.M. (2009). Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals. *Eur J Pharm Sci.* **36**, 502-510.
- McClements, D.J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter.* **7**, 2297-2316.
- McClements, D.J. (2012a). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **174**, 1-30.
- McClements, D.J. (2012b). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter.* **8**, 1719-1729.
- McClements, D.J. (2013). Utilizing food effects to overcome challenges in delivery of lipophilic bioactives: structural design of medical and functional foods. *Expert Opin Drug Del.* **10**, 1621-1632.
- McClements, D.J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Third Edition*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 690 p.
- McClements, D.J. and Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct.* **1**, 32-59.

- McClements, D.J. and Rao, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Cri Rev Food Sci Nutr.* **51**, 285-330.
- McClements, D.J. and Xiao, H. (2012). Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. *Food Funct.* **3**, 202-220.
- Mei, L.Y., Decker, E.A. and McClements, D.J. (1998). Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *J Agr Food Chem.* **46**, 5072-5077.
- Mensink, R.P. and Katan, M.B. (1990). Effect Of Dietary Trans-Fatty-Acids On High-Density And Low-Density-Lipoprotein Cholesterol Levels In Healthy-Subjects. *N Engl J Med.* **323**, 439-445.
- Mert, B. and Demirkesen, I. (2016a). Evaluation of highly unsaturated oleogels as shortening replacer in a short dough product. *Lwt Food Sci Technol.* **68**, 477-484.
- Mert, B. and Demirkesen, I. (2016b). Reducing saturated fat with oleogel/shortening blends in a baked product. *Food Chem.* **199**, 809-816.
- Minatel, I.O., Francisqueti, F.V., Correa, C.R. and Lima, G.P.P. (2016). Antioxidant Activity of gamma-Oryzanol: A Complex Network of Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **17**.
- Moghtadaei, M., Soltanizadeh, N. and Goli, S.H. (2018). Production of sesame oil oleogels based on beeswax and application as partial substitutes of animal fat in beef burger. *Food Res Int.* **108**, 368-377.
- Morales-Rueda, J.A., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M.A. and Toro-Vazquez, J F (2009a). Rheological Properties of Candelilla Wax and Dotriacontane Organogels Measured with a True-Gap System. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **86**, 765-772.
- Morales-Rueda, J.A., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M.A., Weiss, R.G. and Toro-Vazquez, J.F. (2009b). Thermo-mechanical properties of candelilla wax and dotriacontane organogels in safflower oil. *Eur J Lipid Sci Technol.* **111**, 207-215.
- Mortensen, A. and Skibsted, L.H. (2000). Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. *J.Agr. Food Chem.* **48**, 279-286.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Sampson, J., Riceevans, C. and Everett, S.A. (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *Febs Letters.* **418**, 91-97.
- Moschakis, T., Panagiotopoulou, E. and Katsanidis, E. (2016). Sunflower oil organogels and organogel-in-water emulsions (part I): Microstructure and mechanical properties. *Lwt Food Sci Technol.* **73**, 153-161.

- Muller, R.H., Runge, S.A., Ravelli, V., Thunemann, F., Mehnert, W. and Souto, E.B. (2008). Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN (R)): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur J Pharm Biopharm.* **68**, 535-544.
- Mun, S., Kim, Y.R., Shin, M. and McClements, D.J. (2015). Control of lipid digestion and nutraceutical bioaccessibility using starch-based filled hydrogels: Influence of starch and surfactant type. *Food Hydrocolloid.* **44**, 380-389.
- Murdan, S., Gregoriadis, G. and Florence, T. (1999). Inverse toroidal vesicles: precursors of tubules in sorbitan monostearate organogels. *Int. J. Pharm.* **183**, 47-49.
- Nestel, P. (1999). Saturated and trans fatty acids and coronary heart disease. *Eur Heart J. Suppl.* **1**, S19-S23.
- O'sullivan, C.M., Barbut, S. and Marangoni, G. (2016). Edible oleogels for the oral delivery of lipid soluble molecules: Composition and structural design considerations. *Trends Food Sci. Technol.* **57**, 59-73.
- Ogutcu, M., Arifoglu, N., Temizkan, R. and Yilmaz, E. (2018). Preventing oil leakage with natural wax additions during the storage of tahini halva. *Riv Ital Sostanze Gr.* **95**, 95-104.
- Ogutcu, M. and Yilmaz, E. (2015). Characterization of Hazelnut Oil Oleogels Prepared with Sunflower and Carnauba Waxes. *Int J. Food Prop.* **18**, 1741-1755.
- Okesola, B.O., Vieira, V.M. P., Cornwell, D.J., Whitelaw, N.K. and Smith, D.K. (2015). 1,3:2,4-Dibenzylidene-D-sorbitol (DBS) and its derivatives - efficient, versatile and industrially-relevant low-molecular-weight gelators with over 100 years of history and a bright future. *Soft Matter.* **11**, 4768-4787.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M. and McClements, D.J. (2014). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. *J Food Eng.* **142**, 57-63.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M. and McClements, D.J. (2015). Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D-3 bioaccessibility. *Food Chem.* **187**, 499-506.
- Ozturk, B. and McClements, D.J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Curr. Opin. Food Sci.* **7**, 1-6.
- Park, C., Bemer, H.L. and Maleky, F. (2018). Oxidative Stability of Rice Bran Wax Oleogels and an Oleogel Cream Cheese Product. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **95**, 1267-1275.
- Patel, R., Babaahmadi, M., Lesaffer, A. and Dewettinck, K. (2015a). Rheological Profiling of Organogels Prepared at Critical Gelling Concentrations of Natural Waxes in a Triacylglycerol Solvent. *J Agric Food Chem.* **63**, 4862-4869.

- Patel, R., Cludts, N., Bin Sintang, M.D., Lewille, B., Lesaffer, A. and Dewettinck, K. (2014). Polysaccharide-Based Oleogels Prepared with an Emulsion-Templated Approach. *Chemphyschem.* **15** 3435-3439.
- Patel, R. and Dewettinck, K. (2016). Edible oil structuring: an overview and recent updates. *Food Funct.* **7**, 20-29.
- Patel, R., Rajarethinem, P.S., Cludts, N., *et al.* (2015b). Biopolymer-Based Structuring of Liquid Oil into Soft Solids and Oleogels Using Water-Continuous Emulsions as Templates. *Langmuir.* **31**, 2065-2073.
- Patel, R., Schatteman, D., Lesaffer, A. and Dewettinck, K. (2013). A foam-templated approach for fabricating organogels using a water-soluble polymer. *RSC Adv.* **3**, 22900-22903.
- Pernetti, M., Van Malssen, K., Kalnin, D. and Floter, E. (2007a). Structuring edible oil with lecithin and sorbitan tri-stearate. *Food Hydrocolloid.* **21**, 855-861.
- Pernetti, M., Van Malssen, K.F., Floter, E. and Bot, A. (2007b). Structuring of edible oils by alternatives to crystalline fat. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **12**, 221-231.
- Pezeshki, A., Hamishehkar, H, Ghanbarzadeh, B, *et al.* (2019). Nanostructured lipid carriers as a favorable delivery system for beta-carotene. *Food Biosci.* **27**, 11-17.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H. and McClements, D.J. (2012). Physical and chemical stability of beta-carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chem.* **132**, 1221-1229.
- Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H. and McClements, D.J. (2013). Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and beta-carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Res Int.* **52**, 342-349.
- Radomska-Soukharev, A. and Muller, R.H. (2006). Chemical stability of lipid excipients in SLN-production of test formulations, characterisation and short-term stability. *Pharmazie.* **61**, 425-430.
- Rai, V.K., Mishra, N., Yadav, K.S. and Yadav, N.P. (2018). Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J Control Release.* **270**, 203-225.
- Rajkamal, Pathak, N.P., Halder, T., Dhara, S. and Yadav, S. (2017). Partially Acetylated or Benzoylated Arabinose Derivatives as Structurally Simple Organogelators: Effect of the Ester Protecting Group on Gel Properties. *Chem Eur J.* **23**, 11323-11329.
- Rehman, K. and Zulfakar, M.H. (2014). Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* **40**, 433-440.

- Ritter Heike, V.D.S.R.L.K.M, Volkmar Muller. Liquid Fatty Component Containing Composition, US6846507B1, May 1997.
- Rocha, J.C.B., Lopes, J.D., Mascarenhas, M.C.N., Arellano, D.B., Guerreiro, L.M.R. and Da Cunha, R.L. (2013). Thermal and rheological properties of organogels formed by sugarcane or candelilla wax in soybean oil. *Food Res Int.* **50**, 318-323.
- Rogers, M.A., Bot, A., Lam, R.S.H., Pedersen, T. and May, T. (2010). Multicomponent Hollow Tubules Formed Using Phytosterol and gamma-Oryzanol-Based Compounds: An Understanding of Their Molecular Embrace. *J. Phys. Chem.* **114**, 8278-8285.
- Rogers, M.A., Smith, K., Wright, J. and Marangoni, G. (2007). A novel Cryo-SEM technique for imaging vegetable oil based organogels. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **84**, 899-906.
- Rogers, M.A., Wright, J. and Marangoni, G. (2009a). Nanostructuring fiber morphology and solvent inclusions in 12-hydroxystearic acid/canola oil organogels. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **14**, 33-42.
- Rogers, M.A., Wright, J. and Marangoni, G. (2009b). Oil organogels: the fat of the future? *Soft Matter.* **5**, 1594-1596.
- Romoscanu, I. and Mezzenga, R. (2006). Emulsion-templated fully reversible protein-in-oil gels. *Langmuir.* **22**, 7812-7818.
- Rong, N., Ausman, L.M. and Nicolosi, R.J. (1997). Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids* **32**, 303-309.
- Roohinejad, S., Greiner, R., Oey, I. and Wen, J. (2018). *Emulsion-based Systems for Delivery of Food Active Compounds: Formation, Application, Health and Safety*. Wiley, West Sussex, UK, 294 p.
- Sagiri, S.S., Behera, B., Rafanan, R.R., *et al.* (2014). Organogels as Matrices for Controlled Drug Delivery: A Review on the Current State. *Soft Mater.* **12**, 47-72.
- Sagiri, S.S., Kasiviswanathan, U., Shaw, G.S., Singh, M., Anis, A. and Pal, K. (2016). Effect of sorbitan monostearate concentration on the thermal, mechanical and drug release properties of oleogels. *Korean J Chem Eng.* **33**, 1720-1727.
- Salminen, H., Gommel, C., Leuenberger, B.H. and Weiss, J. (2016). Influence of encapsulated functional lipids on crystal structure and chemical stability in solid lipid nanoparticles: Towards bioactive-based design of delivery systems. *Food Chem.* **190**, 928-937.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martin-Belloso, O. and McClements, D.J. (2013). Modulating beta-carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chem.* **139**, 878-884.

- Sanguansri, P. and Augustin, M.A. (2006). Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends Food Sci Technol.* **17**, 547-556.
- Sarkar, A., Arfsten, J., Golay, P.A., Acquistapace, S. and Heinrich, E. (2016). Microstructure and long-term stability of spray dried emulsions with ultra-high oil content. *Food Hydrocolloid.* **52**, 857-867.
- Sarkar, A., Goh, K.K.T. and Singh, H. (2009). Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva. *Food Hydrocolloid.* **23**, 1270-1278.
- Sasaki, J., Takada, Y., Handa, K., *et al.* (1990). Effects of Gamma-Oryzanol on Serum-Lipids and Apolipoproteins in Dyslipidemic Schizophrenics Receiving Major Tranquilizers. *Clin Ther.* **12**, 263-268.
- Saupe, A., Wissing, S.A., Lenk, A., Schmidt, C. and Muller, R.H. (2005). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - Structural investigations on two different carrier systems. *BioMed Mater Eng.* **15**, 393-402.
- Sawalha, H., Margry, G., Den Adel, R., *et al.* (2013). The influence of the type of oil phase on the self-assembly process of gamma-oryzanol plus beta-sitosterol tubules in organogel systems. *Eur J Lipid Sci Technol.* **115**, 295-300.
- Schaink, H.M., Van Malssen, K.F., Morgado-Alves, S., Kalnin, D. and Van Der Linden, E. (2007). Crystal network for edible oil organogels: Possibilities and limitations of the fatty acid and fatty alcohol systems. *Food Res Int.* **40**, 1185-1193.
- Sein, A., Verheij, J.A. and Agterof, W.G.M. (2002). Rheological characterization, crystallization, and gelation behavior of monoglyceride gels. *J Colloid Interface Sci.* **249**, 412-422.
- Siddiqui, S.W., Mohamad, W., Rozi, M.F.M. and Norton, I.T. (2017). Continuous, High-Throughput Flash-Synthesis of Submicron Food Emulsions Using a Confined Impinging Jet Mixer: Effect of in Situ Turbulence, Sonication, and Small Surfactants. *Ind Eng Chem Res.* **56**, 12833-12847.
- Simoës, L.D.S., Madalena, D.A., Pinheiro, C., Teixeira, J.A., Vicente, A. and Ramos, O.L. (2017). Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Adv. Colloid Interface Sci.* **243**, 23-45.
- Singh, A., Auzanneau, F.I. and Rogers, M.A. (2017). Advances in edible oleogel technologies - A decade in review. *Food Res Int.* **97**, 307-317.
- Singh, H., Ye, Q. and Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog Lipid Res.* **48**, 92-100.
- Siraj, N., Shabbir, M.A., Ahmad, T., *et al.* (2015). Organogelators as a Saturated Fat Replacer for Structuring Edible Oils. *International J Food Prop.* **18**, 1973-1989.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. and Garcia-Celma, M.J. (2005). Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **10**, 102-110.

- Soleimanian, Y., Goli, S.H., Varshosaz, J. and Maestrelli, F. (2018). Propolis wax nanostructured lipid carrier for delivery of beta sitosterol: Effect of formulation variables on physicochemical properties. *Food Chem.* **260**, 97-105.
- Soundarajan, K., Rajasekar, M. and Das, T.M. (2018). Self-assembly of sugar based glyco-lipids: Gelation studies of partially protected D-glucose derivatives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **93**, 776-781.
- Sun, J., Wang, F., Sui, Y., *et al.* (2012). Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q(10) as naked nanocrystals. *Int J Nanomedicine.* **7**, 5733-5744.
- Tadros, T.F. (2013). *Emulsion Formation and Stability*. Wiley, Berkshire, UK, 252 p.
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J and Nasirpour, A (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov Food Sci Emerg Technol.* **19**, 29-43.
- Taylor, P. (1998). Ostwald ripening in emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **75**, 107-163.
- Toro-Vazquez, J.F., Mauricio-Perez, R., Gonzalez-Chavez, M.M., Sanchez-Becerril, M., Ornelas-Paz, J.D. and Perez-Martinez, J.D. (2013). Physical properties of organogels and water in oil emulsions structured by mixtures of candelilla wax and monoglycerides. *Food Res. Int.* **54**, 1360-1368.
- Toro-Vazquez, J.F., Morales-Rueda, J.A., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M., Alonzo-Macias, M. and Gonzalez-Chavez, M.M. (2007). Thermal and textural properties of organogels developed by candelilla wax in safflower oil. *J American Oil Chem Soc.* **84**, 989-1000.
- Troncoso, E., Aguilera, J.M. and McClements, D.J. (2012). Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloid.* **27**, 355-363.
- Tsuji, E., Takahashi, M., Kinoshita, S., Tanaka, M. and Tsuji, K. (2003). Effects of different contents of gamma-oryzanol in rice bran oil on serum cholesterol levels. *Atherosclerosis Supp.* **4**, 278-278.
- Uluata, S., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2015a). How the Multiple Antioxidant Properties of Ascorbic Acid Affect Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 1819-1824.
- Uluata, S., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2015b). Physical Stability, Autoxidation, and Photosensitized Oxidation of omega-3 Oils in Nanoemulsions Prepared with Natural and Synthetic Surfactants. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 9333-9340.
- Vibhute, M., Muvvala, V. and Sureshan, K.M. (2016). A Sugar-Based Gelator for Marine Oil-Spill Recovery. *Angew Chem Int Ed.* **55**, 7782-7785.

- Vingerhoeds, M.H., Blijdenstein, T.B.J., Zoet, F.D. and Van Aken, G.A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloid*. **19**, 915-922.
- Wang, F.C., Gravelle, J., Blake, I. and Marangoni, G. (2016). Novel trans fat replacement strategies. *Curr. Opin. Food Sci.* **7**, 27-34.
- Wang, S., Su, R., Nie, S.F., *et al.* (2014). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J Nutr Biochem*. **25**, 363-376.
- Weiss, J., Decker, E.A., McClements, D.J., Kristbergsson, K, Helgason, T and Awad, T (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophys*. **3**, 146-154.
- Wilson, T.A., Nicolosi, R J, Woolfrey, B and Kritchevsky, D (2007). Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *J Nutr Biochem*. **18**, 105-112.
- Wooster, T.J., Golding, M. and Sanguansri, P. (2008). Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir*. **24**, 12758-12765.
- Wright, J. and Marangoni, G. (2006). Formation, structure, and rheological properties of ricinelaiddic acid-vegetable oil organogels. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83**, 497-503.
- Xu, Z.M. and Godber, J.S. (1999). Purification and identification of components of gamma-Oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2724-2728.
- Xu, Z.M. and Godber, J.S. (2001). Antioxidant activities of major components of gamma-oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 645-649.
- Xu, Z.M., Hua, N. and Godber, J.S. (2001). Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* **49**. 2077-2081.
- Yaghmur, A., De Campo, L., Salentinig, S., Sagalowicz, L., Leser, M.E. and Glatter, O. (2006). Oil-loaded monolinolein-based particles with confined inverse discontinuous cubic structure (Fd3m). *Langmuir*. **22**, 517-521.
- Yalcinoz, S. and Ercelebi, E. (2018). Potential applications of nano-emulsions in the food systems: an update. *Mater Res Express*. **5**.
- Yang, Y, Leser, M.E., Sher, A. and McClements, D.J. (2013). Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale (R)). *Food Hydrocolloid*. **30**, 589-596.

- Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M.E., Sher, A. and McClements, D.J. (2012). Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloid*. **29**, 398-406.
- Ye, Z., Cao, C., Liu, Y.F., Cao, P R and Li, Q (2018). Triglyceride Structure Modulates Gastrointestinal Digestion Fates of Lipids: A Comparative Study between Typical Edible Oils and Triglycerides Using Fully Designed in Vitro Digestion Model. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 6227-6238.
- Yu, H.L. and Huang, Q.R. (2012). Improving the Oral Bioavailability of Curcumin Using Novel Organogel-Based Nanoemulsions. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 5373-5379.
- Zahi, M.R., Wan, P.Y., Liang, H. and Yuan, Q.P. (2014). Formation and Stability of D-Limonene Organogel-Based Nanoemulsion Prepared by a High-Pressure Homogenizer. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12563-12569.
- Zhang, L.H., Hayes, D.G., Chen, G X and Zhong, Q.X. (2013). Transparent Dispersions of Milk-Fat-Based Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of beta-Carotene. *J.Agric. Food Chem.* **61**, 9435-9443.
- Zhang, R.J., Zhang, Z.P., Kumosani, T., Khoja, S., Abualnaja, K.O. and McClements, D.J. (2016). Encapsulation of beta-carotene in Nanoemulsion-Based Delivery Systems Formed by Spontaneous Emulsification: Influence of Lipid Composition on Stability and Bioaccessibility. *Food Biophys.* **11**,154-164.
- Zheng, Y., Falkeborg, M., Zheng, Y., Yang, T.K. and Xu, X.B. (2013). Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp.* **430**, 76-84.

7. EKLER

EK 1. MCT'ye Ait Sağlayıcı Firmadan Temin Edilen Ürün Bilgisi

01 Germany GmbH 02.03.2009 08:42:59 PAGE 1/002 Fax Server

SASOL
reaching new frontiers



Sasol Germany GmbH

Stadfort Witten
Arthur-Inhause-Str. 92
D-59463 Witten

Warner Graham Company

160 Church Lane
21030 Cockeysville
USA

Fax: 02365497355
Fax 2: 02302925263

Telephone +49(0)2302 825-300 Extension
+49(0)2302/825-0 Switchboard
Fax +49(0)2302 825-358

WITTEN, 26.02.2009

Inspection certificate 3.1 (DIN EN 10 204-3.1)

Product: Miglyol 812 N

Purchase order:

Delivery number: 00016893889 00003

Order number: 4453

Article no.: 6330

Quantity: 1200.000 KG

Batch: 090119

Manufacturing date: 01/2009

Retestdate: 01/2012

Property	Value	Unit	Method
Acid value	0.03	mg KOH/g	Ph. Eur. 2.5.1
Saponificat. value	335	mg KOH/g	Ph. Eur. 2.5.6
Hydroxyl value	3.4	mg KOH/g	Ph. Eur. 2.5.3
Colour	20		Ph. Eur. 2.2.2
Unsaponifiable	<=0.3	%	Ph. Eur. 2.5.7
Water content	0.03	%	Ph. Eur. 2.5.12
Refractive Index	1.4496		Ph. Eur. 2.2.6
Fatty acid C6	0.1	%	Ph. Eur. 2.4.22
Fatty acid C8	58.1	%	Ph. Eur. 2.4.22
Fatty acid C10	41	%	Ph. Eur. 2.4.22
Fatty acid C12	0.5	%	Ph. Eur. 2.4.22
Fatty acid C14	0.1	%	Ph. Eur. 2.4.22

- Continuation -

Die Übersendung dieses Analysenzertifikats erfolgt lediglich zur Information und stellt keine Zusicherung von Eigenschaften dar. Die Übersendung entbindet den Empfänger nicht von der Durchführung einer ordnungsgemäßen Wareneingangsprüfung. Dieses Analysenzertifikat begründet keine Ansprüche Dritter, an die es weitergeleitet wird. Im übrigen gelten unsere Allgemeinen Geschäftsbedingungen in der jeweils aktuellen Fassung.

This certificate of analysis is for information only and does not guarantee any particular product properties. It does not free the recipient of the obligation to carry out a product receiving inspection. This certificate of analysis does not create claims of third parties to which it is passed on. All transactions are subject to our General Business Conditions as amended up to the time concerned.

Sasol Germany GmbH



Delivery number: 0001689388900003
 Batch: 090119

- Page 2

Property	Value	Unit	Method
Viscosity (20)	30	mPa·s	Ph. Eur. 2.2.8
Peroxide value	0	meq/kg	Ph. Eur. 2.5.5
Iodine value	<=0.1	mg I/100mg	Ph. Eur. 2.5.4
Alkal. reac. subst.	0	ml	Ph. Eur. 2.4.19
Density (20)	0.945	g/cm³	Ph. Eur. 2.2.5
Ash	0	%	Ph. Eur. 2.4.16
Heavy metals (Pb)	<10	mg/kg	Ph. Eur. 2.4.8

The product meets Ph.Eur., Medium-Chain Triglycerides, including 5.4, Residual Solvents, and USP:NF

With these results of our inspections we certify that the material described above complies with the product specification.

Sasol Germany GmbH
 Dr. Oeser



This document is automatically generated and no signature is needed.

Die Übersendung dieses Analysenzertifikats erfolgt lediglich zur Information und stellt keine Zusicherung von Eigenschaften dar. Die Übersendung entbindet den Empfänger nicht von der Durchführung einer ordnungsgemäßen Wareneingangsprüfung. Dieses Analysenzertifikat begründet keine Ansprüche Dritter, an die es weitergeleitet wird. Im übrigen gelten unsere Allgemeinen Geschäftsbedingungen in der jeweils aktuellen Fassung.

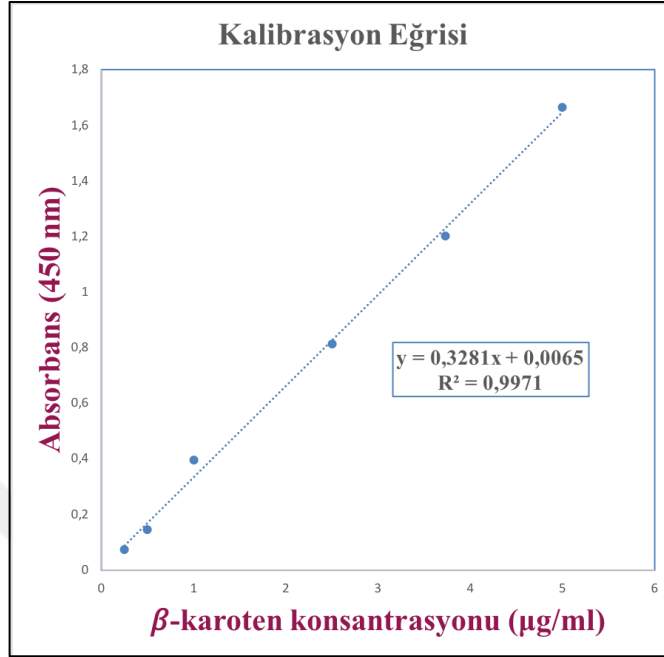
This certificate of analysis is for information only and does not guarantee any particular product properties. It does not free the recipient of the obligation to carry out a product receiving inspection. This certificate of analysis does not create claims of third parties to which it is passed on. All transactions are subject to our General Business Conditions as amended up to the time concerned.

Sasol Germany GmbH

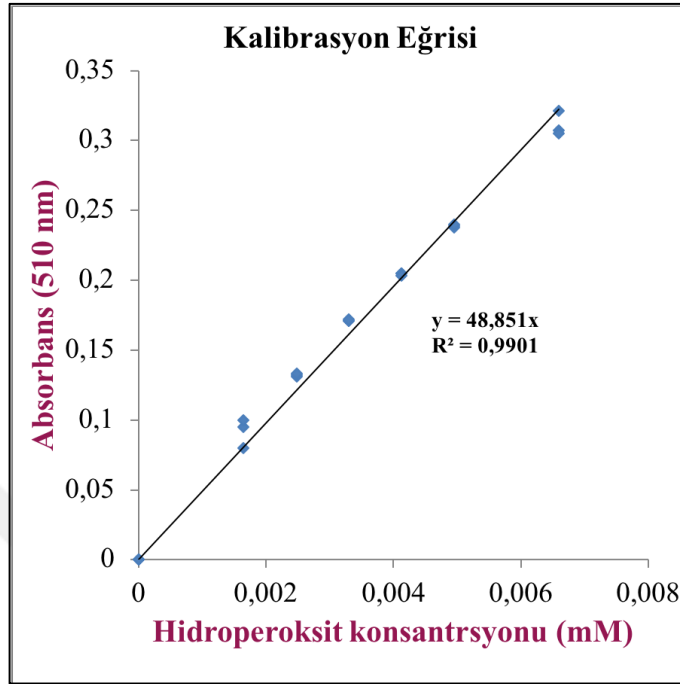
EK 2. γ -Orizanol'e Ait Sağlayıcı Firmadan Temin Edilen Ürün Bilgisi

 TSUNO RICE FINE CHEMICALS CO., LTD. 2283, CHONOMACHI, KATSURAGI-CHO, ITO-GUN, WAKAYAMA, 649-7194, JAPAN TELEPHONE : +81-(0)736-22-8000 FACSIMILE : +81-(0)736-22-6069	 TSUNO FOOD INDUSTRIAL CO., LTD. 94, SHINDEN, KATSURAGI-CHO, ITO-GUN, WAKAYAMA, 649-7194, JAPAN TELEPHONE : +81-(0)736-22-0061 FACSIMILE : +81-(0)736-22-3943
Date: Apr. 17, 2018	
R E P O R T (ANALYSIS CERTIFICATE)	
This is to certify that we, the undersigned, inspector authorized by the TSUNO RICE FINE CHEMICALS research laboratories, examined the commodity, and obtained the following results.	
Commodity	: γ -O r y z a n o l
Quantity	: sample
Packing	:
Lot No.	: F06169
Date of assay	: Jan. 18, 2018
RESULTS	
Description	: A white or yellowish white, odorless, crystalline powder.
Solubility	: Freely soluble in chloroform, soluble in ether, very slightly soluble in ethanol, insoluble in water and sodium hydroxide solution.
Identification	
(1)U. V. absorption	: To pass test
(2)Alkaline reaction	: To pass test
(3)Ferric trichloride reaction	: To pass test
Heavy metals	: To pass test(not more than 20 ppm)
Arsenic	: To pass test(not more than 2 ppm)
Loss on drying (105°C 1 hours)	: 0.23 %
Residue on ignition	: 0.03 %
Assay	: 99.4 %
TSUNO RICE FINE CHEMICALS CO., LTD. <i>Chisa Nagano</i> Quality Assurance Division	

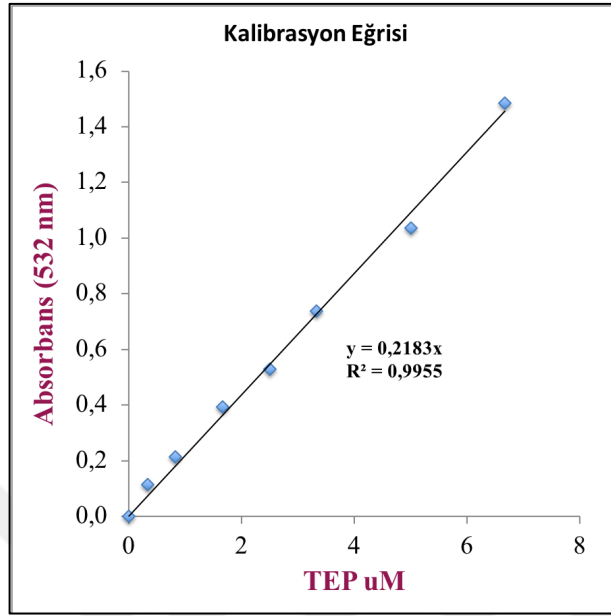
EK 3. Standart β -Karoten Kalibrasyon Eğrisi



EK 4. Standart Kümene-Hidroperoksit Kalibrasyon Eğrisi (PV Analizi)



EK 5. Standart TEP Kalibrasyon Eğrisi (TBARS Analizi)



ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Kübra ŞİŞLİOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri : 16.07.1987 – KAYSERİ
Adres : Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
e-posta : ksislioglu@firat.edu.tr
Lisans : İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalı

YAYIN LİSTESİ

Yayınlar

- Karabulut, I., T. Bilenler, K. Sislioglu, I. Gokbulut, I. S. Ozdemir, F. Seyhan & K. Ozturk (2018). Chemical composition of apricots affected by fruit size and drying methods. *Drying Technology*, 36, 1937-1948.
- Karabulut, I., I. Gokbulut, T. Bilenler, K. Sislioglu, I. S. Ozdemir, B. Bahar, B. Celik & F. Seyhan (2018b). Effect of fruit maturity level on quality, sensory properties and volatile composition of two common apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 55, 2671-2678.
- Karabulut, I., T. Bilenler, K. Sislioglu, I. Gokbulut, F. Seyhan, I. S. Ozdemir & B. Ozturk (2018a). Effect of fruit canopy positions on the properties of apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Food Biochemistry*, 42.
- Boztepe, C., E. Tosun, T. Bilenler & K. Sislioglu (2017). Synthesis and characterization of acrylamide-based copolymeric hydrogel-silver composites: Antimicrobial activities and inhibition kinetics against E-coli. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66, 934-942.
- Bilenler, T., I. Gokbulut, K. Sislioglu & I. Karabulut (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. *Flavour and Fragrance Journal*, 30, 392-398.
- Yilmaztekin, M. & K. Sislioglu (2015). Changes in Volatile Compounds and Some Physicochemical Properties of European Cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) During Ripening Through Traditional Fermentation. *Journal of Food Science*, 80, C687-C694.

BİLDİRİLER

- Şişlioğlu, K., Karabulut İ., (2011), Effect of Cooking on Fatty Acid Composition Including TransFatty Acids in Turkish Traditional Meat Products. 4 th International Congress on Food and Nutrition, 12 Eylül, pp;172, İstanbul, TURKEY.
- Yazlak D. B., Karabulut İ. ve Kübra Şişlioğlu, (2012), Portakal Kabuğu Ekstraktlarının Rafine Zeytinyağı ve Trigliseritlerine İlavesinin Antioksidatif Özellikler ve İndüksiyon Periyodu Üzerine Etkileri, Yabited I. Bitkisel Yağ Kongresi, 12 Nisan, ps; 82, Adana, TÜRKİYE.
- Şişlioğlu, K., Bilenler T.. (2013), Determination of Antimicrobial Activity of Viburnum Opulus Gilaboru Fruit Juice Comparing with Fermented and Pasteurized Product. The 2nd International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, September 24, pp;444, Ohrid, MAKEDONYA.
- Bilenler T., Gökbulut İ., Şişlioğlu K. and Karabulut İ., (2014), Antioxidant Actions of Thyme Essential Oil Encapsulated in Zein, 12th Euro Fed Lipid Congress, 14 Ağustos, pp; 269, Montpellier, FRANCE.
- Sislioglu K. and Yilmaztekin M., (2014), Aroma Compounds Of Gilaburu (Viburnum Opulus L.) During Repining Through Traditional Fermentation, International Food Congress; Novel Approaches In Food Industry, May 26, pp;116, İzmir, TURKEY.
- Bilenler T., Şişlioğlu K., Esansiyel Yağ ve Standart Antimikrobiyalin Etkileşim Şeklinin Belirlenmesi, (2014), 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 17 Nisan, sf; 819-822, Adana, TÜRKİYE.
- Brahima S., Boztepe C., Bilenler T., Şişlioğlu K., Tosun E., (2014), Hidrojel- Gümüş Kompozit Sistemlerin Hazırlanması ve Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi, 11.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 5 Ağustos, sf;14-15, Eskişehir, TÜRKİYE.

TEZDEN TÜRETİLEN YAYIN VE SUNUMLAR

- Şişlioğlu, K., Karabulut, İ., McClements, D.J., (2017). In vitro digestion of organogel based nanoemulsion with Candelilla wax. 2017 AOCS Annual Meeting and Industry Showcases, April 30- May 3, Orlando, Florida, USA,
- Şişlioğlu, K., Karabulut, İ., McClements, D.J., (2016). Encapsulation of Lipid Soluble Food Components with Organogelation. 107th AOCS Annual Meeting, May 1-4, Salt Lake City, Utah, USA.
- Şişlioğlu, K., Karabulut, İ., McClements, D.J., (2019). Beta-Carotene Enriched Nanostructured Organogel Lipid Carrier System; Impact of Storage and pH on Chemical and Physical Stability. Yabited IV. Bitkisel Yağ Kongresi, 18-19 Nisan, İstanbul, TÜRKİYE.