

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROKAPSÜLE KARANFİL UÇUCU YAĞININ ANTIOKSİDAN VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ ÜZERİNE FARKLI DUVAR MATERYAL
KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma ÇOLAKDALCI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Dr. Öğretim üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ

HAZİRAN 2022

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROKAPSÜLE KARANFİL UÇUCU YAĞININ ANTIOKSİDAN VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ ÜZERİNE FARKLI DUVAR MATERYAL
KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma ÇOLAKDALCI
(36183220005)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca yol gösterici olan, her daim olumlu tavrı ile cesaretlendiren, her konuya farklı açılardan bakmamı sağlayan her daim şanslı hissettiren ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum ve öğrencisi olmaktan ömür boyu gurur duyacağım değerli danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ'a;

Bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İhsan KARABULUT'a;

Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Grv. Hüseyin KARAKAYA'ya;

Hayatımda attığım her adımda koşulsuzca arkamda duran, her türlü fedakarlığı sınırsızca sunan, sınavım sandığım her topu yumuşatıp önüme süren, maddi ve manevi olarak hiçbir zaman hakkını ödeyemeyeceğim babam Mesut ÇOLAKDALCI' ya, annem Fadime ÇOLAKDALCI'ya, kardeşim Melih ÇOLAKDALCI'YA;

İyi ve kötü yaşadığım her olayda varlığını hissettiren, cesaretlendiren, güldüren, biricik kuzenim ve en yakın arkadaşım olan Esra ŞAHİN'e;

Çalışmalarımız sırasında kolaylık sağlayıp destekleyen Sayın Proje Müdürüm Merdan DÜZGÜNER'e;

Tezin uygulama aşamasında FYL-2019-1951 nolu proje ile vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine

en içten teşekkürlerimi sunarım.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Mikrokapsüle Karanfil Uçucu Yağının Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkisi Üzerine Farklı Duvar Materyal Kombinasyonlarının Etkisi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Şeyma ÇOLAKDALCI



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR	5
2.1.1 Oksidasyon mekanizması	8
2.2 Yağların oksidasyonu üzerinde antioksidan maddelerin etkisi	10
2.3 Uçucu Yağlar	11
2.3.1 Uçucu yağların antimikrobiyal etkisi	12
2.3.2 Uçucu yağların antioksidatif etkileri	14
2.3.3 Karanfil uçucu yağı	15
2.4 Mikroenkapsülasyon.....	16
2.4.1 Emülsifikasyon	20
2.4.2 Dondurarak kurutma.....	21
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1 Materyal.....	23
3.1.1 Karanfil uçucu yağı ve materyalleri	23
3.1.2 Besiyeri ve kimyasallar	23
3.2 Metot.....	23
3.2.1 Karanfil uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi	23
3.2.2 Karanfil uçucu yağının mikroenkapsülasyonu	24
3.3 Analizler	25
3.3.1 Mikroenkapsülasyon etkinliği	25
3.3.2 SEM görüntüleme.....	26
3.3.3 Antimikrobiyal aktivite	26
3.3.4 <i>In-situ</i> antimikrobiyal aktivite	28
3.3.5 Antioksidan aktivite.....	29
3.3.5.1 DPPH testi	29
3.3.5.2 ABTS testi	30
3.3.5.3 FRAP testi	30
3.3.6 Salınım testi	30
3.3.7 İstatistiksel analizler	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	32
4.1 Karanfil uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi.....	32
4.2 Etkinlik değeri	33
4.3 SEM görüntüleme	35
4.4 Antimikrobiyal aktivite.....	37
4.5 <i>In situ</i> antimikrobiyal aktivite.....	41
4.6 Antioksidan aktivite kapasitesinin belirlenmesi	45
4.6.1 DPPH Testi	45
4.6.2 ABTS testi	48
4.6.3 FRAP	49

4.7 Salınım testi	52
6. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	68



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: Bazı uçucu yağların antibakteriyel aktiviteleri	14
Çizelge 2.2: Mikroenkapsülasyon teknolojisinde yaygın olarak kullanılan duvar materyalleri	18
Çizelge 3.1: Mikroenkapsül üretiminde kullanılan duvar materyal formülasyonları.....	25
Çizelge 4.1: Karanfil uçucu yağının bileşenleri.....	32
Çizelge 4.2: Antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	38
Çizelge 4.3: Antioksidan aktivite test sonuçlarının değerlendirilmesi.....	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Oksidasyonun başlama ve ilerleyişi.....	9
Şekil 2.2: Antioksidanların etki mekanizması	11
Şekil 3.1: Öjenol standartının farklı konsantrasyonları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiği.	26
Şekil 3.2: <i>In-situ</i> antimikrobiyal test ortamları; a: uçucu yağ test ortamı, b: mikroenkapsül test ortamı.	29
Şekil 4.1: Karanfil uçucu yağı mikrokapsüllerinin etkinlik değeri.	33
Şekil 4.2: Mikropartiküllerin SEM görüntüleri.....	36
Şekil 4.3: <i>In-situ</i> antimikrobiyal aktivite testinde karanfil uçucu yağı (KUY) (a) ve mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının (MKUY) (b) <i>E.coli</i> üzerindeki redüksiyon hızı.	44
Şekil 4.4: DPPH yöntemi ile antioksidan test sonuçları.	46
Şekil 4.5: ABTS Yöntemi ile antioksidan aktivite test sonuçları.	48
Şekil 4.6: FRAP yöntemi ile antioksidan aktivite test sonuçları.....	50
Şekil 4.7: Örneklerin zamana bağlı salınım değerleri grafiği.	53

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

G	: Gam arabik
BHA	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHI	: Brain Heart İnfusion Broth
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
GIC-FID	: Gaz Kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektörü
GRAS	: Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
J	: Jelatin
KUY	: Karanfil Uçucu Yağı
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Maltodekstrin
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
S	: Sodyum Kazeinat
TBHQ	: Tert Bütıl Hidrokinon

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROKAPSÜLE KARANFİL UÇUCU YAĞININ ANTIOKSİDAN VE ANTIMİKROBİYAL ETKİSİ ÜZERİNE FARKLI DUVAR MATERYAL KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ

ŞEYMA ÇOLAKDALCI

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

68 + viii sayfa

2022

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ

Bu çalışmanın amacı farklı kabuk materyalleri kombinasyonu ile hazırlanan mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının (KUY) antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinde iyileşme sağlanıp sağlanamayacağını tespit edilmesidir. Bu amaçla maltodekstrin (M), sodyum kazeinat (S), gam arabik (G) ve jelatin (J) kullanılarak üç farklı duvar materyal formülasyonu (M:S, M:S:G ve M:S:J) hazırlanmıştır. Duvar materyal:KUY oranı 3:1 olacak şekilde hazırlanan emülsiyonlar dondurarak kurutulmuş ve toz haline getirilerek denemelerde kullanılmıştır. Elde edilen mikroenkapsüllerin karakterizasyonu yapılmış, antioksidan aktivitesi ile gıda sistemlerindeki antimikrobiyel aktivite özellikleri incelenmiştir.

Karanfil uçucu yağı oluşturan bileşenler arasında öjenol (%71.86) ana fenolik bileşen olarak belirlenmiştir. En yüksek mikroenkapsülasyon etkinliği M/S (%86.22) mikroenkapsüllerinde tespit edilmiştir. M/S mikroenkapsülleri küresel bir yapı sergilerken, diğerleri çentikli ve kırık cam benzeri bir yapı gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen salınım testinde duvar materyallerin çözünürlüğünün mikroenkapsüllerin salınımına etki ettiği görülmüş ve MD/SK/J mikroenkapsülleri en düşük salınımına sahip olan mikroenkapsül olarak belirlenmiştir. Antioksidan aktivite testlerinde KUY un antioksidan aktivitesinin mikroenkapsülasyon işleminden olumlu etkilendiği belirlenmiştir. Serbest formdaki KUY en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Streptococcus mutans* (7 µg/mL) üzerinde gösterirken Gram negatif bakteriler ve mayalar üzerinde daha düşük bir etki saptanmıştır. M/S ve M/S/G mikroenkapsülleri birbirine yakın minimum inhibisyon konsantrasyonu değeri verirken, M/S/J mikroenkapsülleri en düşük antimikrobiyal etkiye sahip mikroenkapsül olarak belirlenmiştir. Mikroenkapsül yapısındaki ve serbest formdaki KUY'un gerçek gıda sistemlerinde (vişne suyu, kayısı suyu ve tam yağlı süt) antimikrobiyal aktiviteler 24 saat boyunca takip edilmiştir. Belirlenen süre içerisinde KUY un, serbest formunun her üç gıda ortamında da tam inhibisyonu sağladığı, ancak mikroenkapsüle formun vişne ve kayısı suyu ortamlarında başarılı olduğu, bununla beraber tam yağlı sütte düşük antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, KUY'ın M/S ve M/S/G formülasyonları ile hazırlanan mikroenkapsüllerin M/S/J formülasyonuna kıyasla hem mikroenkapsül karakterizasyon testlerinde hem de antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerde daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karanfil uçucu yağı, Mikroenkapsülasyon, Antioksidan, Antimikrobiyal

ABSTRACT

Phd. or Master Thesis

THESIS TITLE

Author Name and Surname

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Food Engineering

68+XIV pages

2022

Supervisor: Assist. Prof. Tuğça BİLENLER KOÇ

The purpose of present study was to determine whether improvement in antioxidant and antimicrobial activity of clove essential oil (CEO) microencapsulated by different wall material combinations could be achieved. For this purpose, maltodekstrin (M), sodium caseinate (S), gam arabic (G) and gelatine (G) were used to prepare three different wall formulations (M:S, M:S:G, M:S:G). Emulsions prepared with a wall material:CEO ratio of 3:1 were freeze-dried, powdered and used in the experiments. The characterization, antioxidant activity and antimicrobial activity properties in food system of the obtained microencapsules were investigated.

Eugenol (71.86%) was determined as the major compound of clove essential oil. The highest microencapsulation efficiency was determined in M/S (86.22%) microencapsules. The M/S microencapsules exhibited a spherical structure, while the others exhibited a notched and broken glass-like structure. In the release test, it was observed that the solubility of the wall materials affected the release properties of the microencapsules and M/S/G microencapsules have the lowest release rate. In antioxidant activity tests, it was determined that the antioxidant activity of CEO was positively affected by the microencapsulation process. Clove essential oil in free form showed the highest antimicrobial activity on *Streptococcus mutans* (7 µg/mL), while it showed a lower effect on Gram-negative bacteria and yeasts. While M/S and M/S/G microencapsules have a minimum inhibition concentration value close to each other, M/S/G microencapsules were determined as the microcapsule with the lowest antimicrobial effect. Antimicrobial activities in real foods (cherry juice, apricot juice and whole milk) were monitored for 24 hours. It was determined that the free CEO provides complete microbial inhibition in all three food environments, while microencapsulated counterpart was successful in sour cherry and apricot juice environments, however, it had a low antimicrobial effect in whole milk at every test time of 24 h storage.

As a result, it was determined that the microencapsules prepared with formulations M/S and M/S/G were better antioxidant and antimicrobial activity compared to wall material formulation of M/S/G.

Keywords: Clove essential oil, Microencapsulation, Antioxidant, Antimicrobial

1. GİRİŞ

Yiyecekler insan yaşamında büyük bir öneme sahiptir; bu nedenle tüketiciler için olduğu kadar gıda üreticileri için de hayati bir konudur. Gıda kaynaklı hastalıklar dünyanın her yerinde artan bir halk sağlığı problemidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) her yıl 10 kişiden 1'inin kontamine olmuş gıda tükettiği için hastalandığını ve bunun sonucunda 420,000 kişinin öldüğü tahmin etmektedir. Sadece Amerika'da ise her yıl 9,4 milyon gıda kaynaklı hastalıktan 31 patojenik suşun sorumlu olduğu bildirilmiştir. Gıda kaynaklı, halk sağlığını tehlikeye atan problemlerdeki artış nedeniyle bakteri üremesine engel olarak gıdanın raf ömrünü uzatmak, dağıtım sırasında bozulmasını önlemek, tat ve koku gibi değişikliklere neden olan etmenlerin önüne geçmek için geniş bir yelpazede sentetik koruyucular, antimikrobiyal maddeler ve fiziksel işlemler uygulanmaktadır (Gutiérrez-del-Río, Fernández, ve Lombó 2018).

Patojen suşunun kontrol edilmesi amacı ile yaygın olarak kullanılan kimyasal koruyucular insan sağlığı açısından büyük bir risk teşkil etmektedir. Ticari gıda koruyucusu olarak kullanılan kükürt bazlı bir bileşik olan sülfidler eklendiği gıdanın içindeki B vitaminin bozulması gibi bazı beslenme karşıtı sorunlara neden olmaktadır (Scallan vd., 2011). Gazlı içecekler, biralar, reçeller, meyve suları, margarin, jöleler, unlu mamuller, peynir, turşu ve soslarda mantarlar ve bakteriler dahil olmak üzere mikroorganizmaların büyümesini önlemek için sıklıkla kullanılan sodyum benzoatın da vücutta benzene metabolize edildiği ve benzenin de DNA'ya zarar verdiği bildirilmiştir. Ayrıca karaciğer ve böbreklerde işlev bozukluğu ve gastrointestinal tahrişi içeren sağlık üzerinde olumsuz etkileri olduğu, hematolojik parametrelerde değişikliğe yol açarak, zayıflamış bağışıklık durumuna ve zehirlenmeye yol açabileceği görülmüştür (Femi-Oloye vd., 2020).

Kimyasal antimikrobiaların yanı sıra gıdaları patojen mikroorganizmalardan korumak amacıyla termal ve termal olmayan fiziksel işlemler de kullanılmaktadır, özellikle termal işlemler yüksek etkinlikleri nedeni ile gıda endüstrisinde en çok tercih edilen koruma yöntemlerinden biridir fakat yüksek güvenlik seviyelerine çıkmak amacı ile uygulanan

yüksek sıcaklıklar bazı gıdaların duyuşal ve besleyici özelliklerinde olumsuz değişimlere neden olabileceği görülmüştür (Garcia-Fuentes vd., 2015).

İnsan sağlığını gıdalar yönünden tehdit eden diğer bir önemli husus ise lipit oksidasyonudur, lipitlerin okside olması sadece sağlık açısından değil aynı zamanda gıdaların raf ömrünü kısaltarak ekonomik bir zarara da neden olması bakımından önem arz etmektedir. Kimyasal koruyucu katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin doğal bir sonucu olarak gıdanın doğal veya yeşil bir imaja sahip olmasını sağlayan daha güvenli koruyuculara olan eğilim gün geçtikçe artmaktadır. Bu bağlamda bitkilerden ekstrakte edilen aroma bakımından zengin ve güçlü antimikrobiyal ve antioksidan etkilere sahip olan uçucu yağlar doğal gıda katkı maddelerine bir seçenek olarak ortaya çıkmaktadır. Terpenler (linalool, öjenol, timol, karvon, karvakrol, sitral, limonen) açısından zengin olan uçucu yağlarda patojenik bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere gıda kaynaklı mikroorganizmalara karşı birçok antimikrobiyal ajan bulunmaktadır. Uçucu yağların gıda ürünlerinde kullanımının ön koşulları arasında hedef mikroorganizma, minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK), etki mekanizması ve gıda matrisi ve duyuşal gıda karakteristiği ile olası ilişkiler yer almaktadır (Bensid vd., 2020).

Syzygium aromaticum (karanfil), Endonezya'nın Moluccas Adası'nda bulunan *Myrtaceae* familyasına ait bir *Syzygium gaertn* cinsi bitkidir. Karanfil dünyanın birçok yerinde ağrı kesici, yara izini tedavi edici, gıda koruyucu, aynı zamanda tıbbi diş hekimliğinde analjezik ve genel antiseptik olarak kullanılmaktadır. Karanfil tomurcukları ve yapraklarının önemli bir bileşeni olan öjenol alilbenzen fenilpropanoid sınıfına ait, hoş bir koku ve tada sahip fenolik aromatik bir maddedir. Öjenolün uçucu karakteri ve çözünürlüğünün sınırlı olması gibi etmenler nedeniyle etkinliğini sınırlandırmış fakat bu olumsuzluk ağız yolundan uygulanması ile giderilmiştir (Michiels vd., 2008). Öjenol yutulduğu zaman karaciğerde emilip hızla metabolize olurken alınan miktarın %95'i 24 saat içinde atılmaktadır. Çoğu uçucu yağ, ağız, solunum ve deri teması ile alımın ardından mide ve proksimal ince bağırsak tarafından hızla emilir. Bu nedenle, erken absorpsiyonu önlemek ve suda çözünürlüğünü ve etkinliğini geliştirmek için öjenolün kapsüllenmesi tercih edilmektedir (Michiels vd., 2008).

Uçucu yağlar; nem, ısı, ışık, oksijen ve metallerin varlığında bozulmaktadır. Bu problemi çözmek amacı ile en iyi yöntemler arasında mikroenkapsülasyon yer almaktadır. Mikroenkapsülasyon, belli bileşenlerin hoş olmayan tadlarını ve kokularını maskelemek, kapsüllenmiş içeriğin doğru yerde ve zamanda salınmasını sağlamak amacı ile kullanılan,

bir malzemenin başka bir malzeme ile kaplanarak içine hapsedildiği aktif bileşenin çevre koşullarından korunduğu bir uygulamadır. Hassas bileşiklerin kapsüllemesi işlemi iki aşamadan oluşmaktadır: birincisi, genellikle, bir polisakkarit veya protein gibi bir duvar malzemesinin yoğun bir çözeltisi ile lipid-aroma sistemi gibi bir aktif materyalin emülsiyonlaştırılmasıdır. Aktif materyalin özelliklerini korumak amacı ile (kaplayıcı) duvar materyalde aranan şartlardan bir tanesi duvar materyalinin stabilitesidir. Duvar malzemesinin türü, aktif materyalinin duvar malzemesine oranı, kapsülleme yöntemi ve saklama koşulları gibi birçok faktör kapsüllemiş aktif materyalinin anti-oksidatif kararlılığını etkilemektedir (Madene vd., 2006).

Kullanılan duvar materyalleri olarak: Proteinler (sodyum kazeinat, peynir altı suyu proteinleri, soya proteinleri ve jelatin), hidrokolloidler (modifiye nişasta, gam arabik) ve karbonhidratlar (nişastalar, maltodekstrinler) sayılabilir. Sodyum kazeinat sütte bulunan en baskın fosfoproteindir. Kazein net yükü, hidrofobitesi ve metal bağlayıcılığı oldukça değişkendir. Kazeinin ısı stabilitesi oldukça yüksektir, sıcaklık uygulaması ile koagüle olmamaktadır. İzoelektrik noktası olan pH 4,6 civarında çözünmez durumdadır (Wandrey, Bartkowiak, Harding 2010). Jelatin suda düşük çözünürlüğe sahip, kolajenin kontrollü şartlarda kısmi bir şekilde hidroliz edilmesiyle H bağlarının zayıflaması sağlanarak kollajenden daha küçük ve daha çok işlevsel özelliğe sahip bir proteindir. Jelatin yüksek emülsifiye edici, yüksek stabilize edici aktivite ve kuruduktan sonra ince yoğun ağ oluşturması gibi özellikleri nedeniyle mikrokapsül oluşturmada sıkça tercih edilmektedir (Gharsallaoui vd., 2007). En yaygın kullanılan bir diğer duvar materyali maltodekstrindir; düşük maliyeti, nötr tadı ve aroması ve iyi oksidatif stabilitesine sahip olmasına rağmen bazı olumsuz özelliklere (emülsifiye etme kapasitesi ve emülsiyon stabilitesinin düşük olması ve düşük yağ tutma özelliği) sahiptir. Söz konusu olumsuzlukları gidermek amacı ile çoğu zaman maltodekstrinler iyi emülsifiye edici özelliklere sahip proteinler veya hidrokolloidler ile birlikte kullanılmaktadır. Gam arabik yüksek çözünürlük, düşük vizkozite, iyi emülsüfiye etme ve uçucu maddeleri iyi tutma gibi mikroenkapsülasyon için ideal özellikler sunmaktadır (Hee vd., 2015).

Liyofilizasyon olarak bilinen dondurularak kurutma neredeyse tüm ısıya duyarlı malzemelerin dehidrasyonu için kullanılmaktadır. Dondurularak kurutulmuş bileşenlerin morfolojik yapıları incelendiğinde yüzeydeki gözenek yapısının daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum aktif materyal salınımında daha yüksek değerlerin elde edilmesinin muhtemel sebebidir (Bakry vd., 2016).

Farklı fonksiyonel özelliklere sahip olan (antibakteriyel ve antioksidan gibi) uçucu yağlar çevre şartlarına oldukça hassastırlar. Çoğu uçucu yağın genel olarak güvenilir olduğu (GRAS) kabul edilmesine rağmen gıda koruyucu olarak kullanımları genelde keskin koku ve tatlandırıcı hususlar nedeniyle sınırlıdır, çok etkili antimikrobiyal dozlar organoleptik olarak kabul edilen seviyeleri aşabilir. Bu sebeple uçucu yağların çevre şartlarından etkilenmesini önlemek ve eklendiği gıdanın tat özelliklerine etki etmesini engellemek için mikroenkapsülasyon teknolojisi uygulanmaktadır. Bu çalışmada ilk aşama olarak karanfil uçucu yağının farklı duvar materyal kombinasyonları ile kapsülasyon başarısını ölçmek amaçlanmıştır. Böylece ana duvar materyal olarak maltodekstrin sodyum kazeinat tercih edilmiş ve ayrıca jelatin ve gam arabik ile formülasyonlar çeşitlendirilmiştir. Elde edilen kapsüllerin karakterizasyon testleri (kapsülasyon etkinliği, morfolojik yapı ve salınım profili) yapıldıktan sonra çalışmanın ilk aşaması tamamlanmıştır. İkinci aşamada ise farklı duvar materyal kombinasyonları ile hazırlanan karanfil uçucu yağı içeren kapsüllerin ve serbest formdaki karanfil uçucu yağının antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri hem kontrol ortamlarında hem de sıvı gıda sisteminde test edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR

Mikrobiyal bozulmanın neden olduğu küresel gıda kaybı yıldan yıla artmaktadır ve buna ek olarak, son zamanlarda *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella saintpaul*, *Listeria monocytogenes* ve benzeri mikroorganizmalar ile ilişkili olarak gıda kaynaklı hastalık salgınları, özellikle gıda işleme ve depolama sırasında mikrobiyolojik güvenliği bir öncelik haline getirmiştir. Gıdalarda mikroorganizmaların gelişmesini ve büyümesini önlemek, gıdaların raf ömrünü uzatmak için diğer muhafaza prosedürlerine ek olarak antimikrobiyal ajanlar kullanılması elzem olmuştur. Bunlar doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılmaktadır. İçme suyu kaynakları başta olmak üzere, çeşitli araçlarla sentetik antimikrobiyal ajanların çevreye salınması ve kontamine suyun içilmesi gibi riskleri kamuoyunda endişeler uyandırmıştır ve antimikrobiyal ajanların kronik varlığı antibiyotik direncini artırabileceği bilinmektedir. Bu yüzden günümüzde tüketiciler, saklaması ve kullanması kolay, ancak daha taze, daha doğal ve minimum işlenmiş gıdalar talep etmektedir. Gıda endüstrisini, tüketicilerin gereksinimlerini karşılamak için mevcut koruma teknolojilerini değiştirilmesi veya geleneksel sentetik antimikrobiyal maddelerin yerini alacak yeni alternatifler bulması oldukça elzem olmuştur. Doğal antimikrobiyaller hayvan, bitki ve mikrobiyal kaynaklar olarak sınıflandırılabilir. Bitki kaynaklı antimikrobiyal ajanlardan olan uçucu yağlar büyük ilgi görmektedir. Uçucu yağlar, çiçek, tohum, tomurcuk, yaprak, ağaç kabuğu, meyve, kök ve reçineler gibi tüm bitki veya bitki kısımlarından elde edilen aromatik uçucu sıvılar veya yarı sıvılardır. Hidrofobik yapıları nedeniyle, bakterilerin hücre zarlarının lipitleri boyunca hareket eder ve hücre duvarlarına zarar vererek onları daha geçirgen hale getirir. Bu membran geçirgenliğindeki değişim iyonların ve diğer hücre malzemelerin sızmasına neden olarak hücrenin ölmesini sağlar (Zhang, Chen, ve Pan 2017).

Gıdaların muhafazasında karanfil, çay ağacı, nane gibi bitkilerden elde edilen uçucu yağlar sıklıkla kullanılmaktadır. Yaprak dökmeyen bir ağaç olan karanfil, özellikle Avrupa ve Asya'da binlerce yıldır geleneksel olarak baharat olarak kullanılmaktadır. *Myrtaceae* familyasına ait olan karanfil (*Syzygium aromaticum*), önemli aromatik baharatlardan biridir. Bitkinin kurutulmuş çiçek tomurcuklarından elde edilen karanfil uçucu yağı, başlıca antioksidan özelliklere sahip fenilpropanoidleri içerir. Karanfilden elde edilen yağın sayısız

tıbbi özelliği vardır. Hint Ayurveda tıbbı ve Çin tıbbında geniş bir yelpazede kullanılmaktadır (Packyanathan ve Prakasam 2017).

Karanfil uçucu yağı en az 30 bileşen içermektedir; bunlar arasında baskın bileşen en az %50 lik oran ile öjenoldür. Kalan %10-40'lık kısmı öjenil asetat, β -karyofillen ve α -humulen oluşmaktadır. Öjenol, renksizden açık sarıya kadar değişen ve suda düşük çözünürlüğe, güçlü bir kokuya ve yoğun bir tada sahip uçucu bir bileşiktir. Öjenolün bildirilen biyolojik aktiviteleri arasında insektisidal, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiviral, antioksidan ve antikanser aktivitesi bulunmaktadır. Karanfil uçucu yağının, patojenlere karşı inhibitör aktivite gösterdiği bilinmektedir. Antibakteriyel mekanizma, ana kimyasal bileşimde sırasıyla meta ve orto konumlarında bulunan -OH gruplarıyla ilişkilendirilmektedir. Bu fonksiyonel gruplar, mikrobiyal hücrelerin sitoplazmik membranı ile etkileşime girebilir. Karanfil uçucu yağı, Gram-pozitif bakterileri, Gram-negatif bakterilerden daha fazla inhibe etmektedirler. Bu durum, Gram-pozitif bakterilerde onları antimikrobiyal ajanlara daha duyarlı hale getiren yayılabilir bir peptidoglikan tabakası varlığıyla açıklanmaktadır. Buna karşılık, Gram-negatif bakterilerin dış hücre zarındaki karmaşık lipopolisakarit tabakası, lipofilik antibakteriyel bileşiklerin hücre zarından difüzyon hızını önemli ölçüde azaltmaktadır. Benzer şekilde, gıda ile ilgili patojenler, karanfil uçucu yağına probiyotikler ve mantarlardan daha fazla hassasiyet göstermektedir (Haro-González vd., 2021).

Karanfil uçucu yağı, hücreleri serbest radikal oksidasyonundan koruyan öjenol, öjenil asetat, β -karyofillen ve α -humulen antioksidan bileşiklerine sahiptir. Süperoksit, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve nitrojen serbest radikalleri gibi diğer serbest radikallerin, çeşitli iç veya dış kaynaklar nedeniyle insan vücudunda üretildiği bilinmektedir. ROT ve diğer serbest radikaller, moleküler oksijenin her yerde bulunduğu aerobik yaşamdaki normal hücresel metabolizmanın yan ürünleridir. ROT, canlı hücrelerde lipitlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasarına katkıda bulunabilir. Serbest radikaller veya ROT, yaşlanma süreci, kalp hastalığı ve kanser gibi birçok kronik hastalığın gelişiminde önemli roller oynamaktadır. Vücutta serbest radikallerin oluşumunu azaltmak veya bastırmak için etkili yollar aramak sağlık için elzem bir hale gelmiştir. Kanser, damar sertliği, alzheimer hastalığı ve parkinson hastalığı gibi hastalıklar, ROT bileşiklerinin varlığı ile ilişkilidir. Şu anda, çeşitli sentetik antioksidanlar gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, toksik ve kanserojen etkilerine ilişkin bulgular nedeniyle bu bileşiklerin kullanımı mevzuatla

sınırlandırılmıştır. Karanfil uçucu yağı bileşiminde major bileşen olarak bulunan öjenol sentetik antioksidanlar ile kıyaslandığında güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir (Gülçin 2011).

Mikrobiyal büyümeyi kontrol etmek ve antioksidan aktivite göstermesi için gıda ürünlerinde uçucu yağların uygulanması, yüksek uçuculuk, istenmeyen tat, düşük çözünürlük ve ısıya, ışığa ve oksijene duyarlı olmaları sebebi ile sınırlamalara sahiptir. Uçucu yağların kullanımında yaşanan problemleri gidermek için muhtemel çözüm önerilerinden bir tanesi mikroenkapsülasyon tekniğidir. Mikroenkapsülasyon, duvar materyalinin ısıtma, oksidasyon, buharlaşma ve ışık gibi dış faktörler tarafından oluşturulan bozulma hassasiyetinden kaçınarak uçucu yağı çevrelediği modern bir teknolojik gelişmedir. Uçucu yağları kapsüllemek için aljinat, jelatin, kitosan, lesitin, zein, sodyum aljinat, b-siklodekstrin, nişasta, maltodekstrin, gam arabik, peynir altı suyu proteini, inülin, polilaktid-ko-glikolid, pektin selüloz, kazein, kollajen, soya proteinleri ve buğday gluteni gibi biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir duvar materyalleri kullanılmaktadır (Maurya vd., 2021).

Farklı dekstroz eşdeğerinin (DE) maltodekstrinlerin, suda yüksek çözünürlüğü, düşük viskozitesi, düşük şeker içeriği ve bunların çözeltilerinin renksiz olması nedeniyle duvar malzemesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Jelatin, emülsiyonlaştırma, film oluşturma, suda çözünürlük, yüksek stabilize etme aktivitesi ve ince, yoğun bir ağ oluşturma eğilimi gibi iyi özelliklerinden dolayı özellikle püskürtmeli kurutmada duvar materyali olarak tercih edilmektedir. Akasyanın doğal renksiz bir bitki polisakkarit olan gam arabik, uzun yıllardır kullanılan iyi bilinen etkili bir duvar materyalidir ve stabil emülsiyon oluşumu ve uçucu maddeleri iyi tutması nedeniyle mikroenkapsülasyon için tercih edilmektedir (Akhavan Mahdavi vd., 2016).

Mikroenkapsülasyon için, sprey kurutma, akışkan yataklı kaplama, lipozom yakalama, ekstrüzyon, dondurarak kurutma ve koaservasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır. Dondurarak kurutma, ısıya duyarlı tüm malzemelerin dehidrasyonu ve ayrıca mikroenkapsülasyon için en uygun teknik olarak bilinmektedir. Dondurma, süblimasyon, desorpsiyon ve son olarak depolamadan oluşan dört ana işlemle malzemeleri stabilize eden çok aşamalı bir işlemdir (Ezhilarasi vd., 2013).

2.1 Lipitlerin Oksidasyonu

Gıda bozulmalarının en önemli sebeplerinden biri de lipit oksidasyonudur. Çok sayıda gıda maddesi içinde yağ bulundurması nedeniyle, yağların oksidasyonu insan sağlığı bakımından da oldukça ciddi bir önem taşımaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ısı, ışık, iz metaller ya da enzimler tarafından katalizlenir ve serbest radikaller oluşmaktadır. Oluşan serbest radikaller gıdaların bozulmasına sebep olan kötü koku ve tada sahip istenmeyen oksidasyon ürünler olarak bilinmektedir. Lipit oksidasyonu sadece gıda bileşenlerinin besin kalitesinin düşmesi ve tadının olumsuz yönde değişmesi ile ilgili değil aynı zamanda membran bozuklukları, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar gibi sağlık üzerinde olumsuz etkilere sebep olması bakımından da istenmemektedir (Duh ve Yen 1997).

2.1.1 Oksidasyon mekanizması

Lipit oksidasyonunda yapıda yer alan doymamışlık ve ortamdaki oksijen tepkimelerin başlamasına neden olan iki temel nedendir. Yağların oksidasyonunda ışık, sıcaklık, enzimler, metaller, metaloproteinler ve mikroorganizmalar gibi birçok katalitik mekanizma bulunmaktadır. Bu reaksiyonların çoğu, tekli oksijen gibi bir tür serbest radikal veya oksijen türlerini içerir. Bu reaksiyonların substratı genellikle doymamış yağ asitleridir. Oksitlendikleri zaman otokatalitik bir süreç oluşturabilmektedirler, diğer bir deyişle bu şekilde oluşan oksidatif ürünler reaksiyonu daha fazla katalize edebilir ve bu da hızın zamanla artmasına neden olmaktadır. Gıda sistemlerinde oksijen aracılı oksidasyonu genellikle otoksidasyon olarak adlandırılmaktadır. Lipid moleküllerinin oksidasyonu için genel olarak kabul edilen yol, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi üç aşamadan oluşmaktadır. Başlatma, yayılma ve sonlandırmayı içeren serbest radikal reaksiyonlarla ilerlemektedir (St. Angelo 1996).

1. Tepkimenin başlaması $RH \rightarrow R^* + H^*$
2. Tepkimenin gelişmesi $R^* + O_2 \rightarrow RO_2^*$
 $RO_2^* + RH \rightarrow RO_2H + R^*$
3. Tepkimenin sona ermesi $R^* + R^* \rightarrow R-R$
 $RO_2^* + R^* \rightarrow RO_2R$
 $RO_2^* + RO_2^* \rightarrow RO_2R + O_2$

RH : Yağ Asidi

R* : Alkil Radikali

RO₂ : Peroksit Radikali

RO₂H : Hidroperoksit

RO₂R : Oksidasyon Ürünü

Şekil 2.1: Oksidasyonun başlama ve ilerleyişi (St. Angelo 1996).

Lipitlerin okside olmasında indüksiyon periyodunun uzunluğu ve tepkimenin hızı asıl olarak lipitlerin yağ asidi bileşimine göre değişim göstermektedir; yağ asitlerinin içerdiği allil grubu (-C=C-) sayısı arttıkça tepkimenin indüksiyon periyodu kısalmış ve tepkimenin hızında artış gözlemlenir. Bu durum zincir üzerinde bulunan hidrojen atomlarından birinin aktif bir hale dönüşerek yapıdan kopması ile mümkün olmaktadır. Aktif hidrojen atomu oluşumu ise karbon zincirinde en az bir tane doymamış bağın yer almasını gerektirir. Elde edilen araştırma sonuçlarına göre aralarında allil bağın var olduğu karbon atomlarındaki hidrojen atomları, bu karbon atomlarına komşu olan karbon atomuna bağlı olanlarla kıyaslandığında daha stabil bir haldedir. Buna şart olarak, allil grubuna komşu olan karbon atomlarında bulunan daha labil olan hidrojen atomları, ışık, ısı ve çok değerlikli metal iyonları gibi nedenlerle kolaylıkla zincirden kopar ve bağlı olduğu radikale aktivite kazandırır. Ortamda yukarıda sayılan etkenlerden biri olursa eğer doymamış yağ asitlerinde allil grubunun sağından veya solundan komşu olan karbon atomlarından birinde bulunan hidrojenlerden bir tanesi iyonlaşarak ayrıldığı atom radikale aktivite kazandırır. Buna ek olarak allil gruptaki çift bağ, yerinde sabit kalabileceği gibi, aktif duruma geçiş yapan karbon atomu bu gruba komşu olduğu için labilite kazanarak sağa veya sola kayabileceği böylece zincire moleküler formda girecek olan yağda erimiş oksijen radikalindeki dört farklı karbon atomuna bağlanabileceği için buna şart olarak oksidasyon tepkimesi de, dört karbon atomunun herhangi birinden başlayabilecektir (Kayahan, 2014).

Lipitlerde birincil oksidasyon ürünleri olan hidroperoksitlerin oluşturduğu bozulmalar sonucunda asitlik yükselmesi, keton ve aldehit oluşumu görülür. Yağlarda oksidatif bir şekilde oluşan asitlik yükselmesi sadece oksidasyon reaksiyonlarında hidroperoksitlerin parçalanma ürünü veya yağlarda doymamış zicirlerde su varlığında O₂ alınarak parçalanması ile oluşmaktadır. Herhangi bir yağın yapısında olmayan ve yapıdaki yağ asidi zincir uzunluğundan daha küçük zincirli yapılara rastlamak buna bir kanıt olarak gösterilebilir. Yağlarda keton oluşumunun küf mantarlarının etkisi ile veya oksijen bulunan ortamda ışık ve sıcaklığın etkisi ile meydana geldiği bilinmektedir fakat bu iki oluşum birbirinden oldukça farklıdır. Oksidatif yol ile oluşan keton oluşumunda ortamda bağlı formda azot olması gerekmezken küf mantarlarının keton oluşturması için gerekmektedir. Yağlarda aldehit oluşumu ketonlarda olduğu gibi ışık ve sıcaklığın etkisi ile oluşur. Serbest aldehitler sıcaklık etkisi ile oldukça hızlı şekilde oluşur fakat sürenin ilerlemesi ile yavaş yavaş azalmaktadır (Başoğlu, 2017).

2.2 Yağların oksidasyonu üzerinde antioksidan maddelerin etkisi

Serbest radikallerin zararlı etkisi, serbest radikalleri temizleyen ve organizmayı kendine zararlı olan toksinlerden temizleyen antioksidan maddeler tarafından engellenebilir. Antioksidanlar, oksitleyici zincir reaksiyonlarının başlamasını veya yayılmasını inhibe ederek lipit veya diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktirebilen veya inhibe edebilen bileşiklerdir. Tüm aerobik organizmalar, zarar görmüş molekülleri gidermek veya onarmak için antioksidan enzimler ve yiyecekler dahil olmak üzere antioksidan savunmalara sahip olduğu bilinmektedir. Antioksidan bileşikler, işleme ve saklama sırasında gıda ve farmasötik ürünlerin bozulmasının ana nedenlerinden biri olan lipit peroksidasyon sürecini geciktirerek serbest radikalleri temizleyebilir ve raf ömrünü uzatabilir. Antioksidanlar, insan vücudunu serbest radikallerden ve reaktif oksijen türlerinin etkilerinden koruyabilir, birçok kronik hastalığın ilerlemesini ve ayrıca lipit peroksidasyonunu geciktirirler. Günümüzde en yaygın kullanılan sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), propil galat ve tert butilhidrokinondur (TBHQ). Bunun yanı sıra BHA ve BHT'nin karaciğer hasarı ve karsinojenezden sorumlu olduğuna dair şüpheler bulunmaktadır. Bu nedenle, doğal ve daha güvenli antioksidanlara artan bir ilgi olduğu görülmektedir (Gülçin, Elmastaş, ve Aboul-Enein 2012).



AH : Antioksidan

R* : Karbon Merkezli Radikal

LOO* : Peroksit Radikali

Şekil 2.2: Antioksidanların etki mekanizması (Başoğlu, 2017).

Gıdalarda bulunan lipitlerin oksidasyonunu önlemek için antioksidanların kullanılması etkili bir yöntemdir çünkü Şekil 2.2 de verildiği gibi ortamda antioksidan bulunması halinde henüz oksidatif tepkimenin başlangıcında oluşan oksi- ve peroksit radikallerinin zincir tepkimeleri başlamadan önlenmiş olur. Gıdalara eklenecek olan antioksidan maddeler gıdanın yapısını ve renk, tat, koku gibi özelliklerini olumsuz yönde etkilememesi gerekmektedir. Bunlara ek olarak antioksidan olarak kullanacak maddenin katıldığı ortamda çözünerek gıda maddesinin tüketilebilirliğini korumalı, toksik olmamalı ve uygun fiyatlı olmalıdır (Başoğlu, 2017).

2.3 Uçucu Yağlar

Bitkiler biyolojik özelliklerinden dolayı kendilerini patojenlere karşı korumada işlev gördüğü bilinen birçok molekül üretmektedir. Bu moleküllerden ikincil metabolitler arasında yer alan kompleks karışımlardan oluşan 3000'den fazla uçucu yağ tanımlanmıştır. Uçucu yağlar, aromatik bitkiler tarafından doğal olarak üretilir ve salgı hücrelerinde, boşluklarda, kanallarda epidermik hücrelerde depolanırlar. Renksiz veya sarıdan kahverengiye değişen bir renge sahiptirler ve bu yağlar oda sıcaklığında genellikle sıvıdır fakat yoğunlukları çok farklı olabilir ve bazı yağlar reçineli hatta katı bir formda olabilir. Suda çok az ancak organik çözücülerde yüksek oranda çözünürler. Uçucu yağlar biyolojik olarak aktif olan antibakteriyel, böcek öldürücü, mantar öldürücü, antioksidan ve antiinflamatuvar bileşiklerin önemli bir kısmına kaynaklık etmektedir (Carrubba ve Catalano, 2009).

Uçucu yağlarda bulunan ana bileşenler iki ana grupta toplanabilir bunlar: monoterpenler ve seskiterpenlerden oluşan terpen hidrokarbonlardır. Monoterpenler uçucu yağların yaklaşık %80'ini temsil etmektedirler. Çoğunlukla alkoller, fenoller, aldehitler ve esterlerden oluşan oksijenli bileşikler ise %20'lik kısmını oluşturmaktadır. Aromatik ve oksijenli bileşikler, uçucu yağlarda terpenlerden daha az miktarlarda bulunurlar. Aynı bitki türü için uçucu yağların verimi ve kimyasal bileşimleri elde edildikleri bitkilerin gelişme koşullarına (sıcaklık, yağış, nem), hasat zamanına göre değişmektedir. (Raveau, Fontaine, ve Lounès-Hadj Sahraoui 2020).

Gıda ürününün kalite kaybında ve raf ömründe etkili olan faktörler arasında lipit oksidasyonu ve istenmeyen mikrobiyal aktiviteler almaktadır. Gıda sistemlerinde uçucu yağ kullanımlarının, ürünün raf ömrünü uzatan ve kalitesini artıran antimikrobiyal ve antioksidan etkiler sergilediği bildirilmiştir. Bunlara ek olarak, bu yağlar insan sağlığı üzerine olumsuz etkilere sebep olan sentetik katkı maddelerinin kullanımını azaltmak için bir alternatif olarak dikkat çekmektedir (Ribeiro-Santos vd., 2018).

2.3.1 Uçucu yağların antimikrobiyal etkisi

Uçucu yağların sergiledikleri antimikrobiyal aktivite oldukça farklı mekanizmalar ile açıklanmaktadır. Söz konusu etki mekanizmalar arasında, zar geçirgenliğini bozmak, iyon taşıma süreçlerini kesintiye uğratarak hücre içindeki membran proteinleri ve diğer bileşiklerle etkileşime girmek, enzimlerin aktif bölgelerine etki ederek çalışma düzenlerini bozmak, plazma membranı ve mitokondri fonksiyonlarını bozmak yer almaktadır (Kedia vd., 2015).

Uçucu yağların bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri iki şekilde ortaya çıkmaktadır: bunlardan ilki bakteriyostatik etki olarak adlandırılan bakteri büyümesinin kısıtlanması olarak açıklanan etki diğeri ise, bakterisidal olarak adlandırılan, bakteri hücrelerinin öldürülmesi olarak açıklanan etkidir. Bu antibakteriyel aktivitelerin ölçümü, dilüsyon ve difüzyon temelinde gerçekleştirilir. Agar ortamında agar disk difüzyon ve agar seyreltme teknikleri ile sıvı ortamda mikro makro seyreltme yöntemleri kullanılabilir. Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi temel olarak bitkinin hangi kısmından elde edildiğine ve kimyasal bileşimine bağlıdır. Öte yandan, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler uçucu yağlara karşı duyarlılıkları açısından farklılık gösterir (Tariq vd., 2019).

Genel olarak Gram negatif bakteriler Gram pozitif bakterilere kıyasla uçucu yağlara karşı daha dirençlidirler bu farkın temel nedeni hücre duvarı bileşenleri ve peptidoglikan

kalınlıkları ile ilişkilidir. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarının yaklaşık %90-95'i, teikoik asit ve proteinler gibi diğer moleküllerin bağlı olduğu peptidoglikandan oluşur. Gram pozitif bakteri hücre duvarının yapısı, hidrofobik moleküllerin hücrelere kolayca nüfuz etmesine ve hem hücre duvarında hem de sitoplazma içinde hareket etmesine izin verir. Uçucu yağlarda da bulunan fenolik bileşikler genellikle Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterir. Uçucu yağların etkileri, mevcut bileşiğin miktarına bağlıdır; düşük konsantrasyonlarda enerji üretiminde yer alan enzimlere müdahale edebilirler ve daha yüksek konsantrasyonlarda proteinleri denatüre edebilirler. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı daha karmaşıktır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarından daha ince olan ve hücrenin kuru ağırlığının yaklaşık %20'sini oluşturan 2-3 nm kalınlığında bir peptidoglikan tabakasına sahiptir. Bir dış zar, ince peptidoglikan tabakasının dışında yer alır. Bir dış zarın varlığı, Gram negatif bakterileri Gram-pozitif bakterilerden ayıran özelliklerden biridir. Lipopolisakkaritler (LPS) ile iç zara bağlanan çift katmanlı fosfolipidlerden oluşur. LPS polisakkarit ve Gram-negatif bakterilerin uçucu yağlara ve antimikrobiyal aktiviteye sahip diğer doğal özlere karşı daha dirençli olmasını sağlayan oksijen yan zincirinden oluşur ve bu da Gram-negatif bakterilerin hidrofobik antibiyotiklere ve toksik ilaçlara nispeten dirençli olmasının nedenidir (Nazaro vd., 2013).

En yaygın kullanılan uçucu yağlar, geniş bir bakteri yelpazesi üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri nedeniyle listelenmekte ve bu konuda son beş yılda yapılan bazı çalışmalar Çizelge 2.1'de özetlenmektedir (Mutlu-Ingok vd., 2020).

Çizelge 2.1: Bazı uçucu yağların antibakteriyel aktiviteleri (Mutlu-Ingok vd. 2020).

Uçucu yağ	Bakteri kültürü	Method	MIC
<i>Zanthoxylum bungeanum</i> (biber)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Mikrodilüsyon	1-4 mg/mL
<i>Zingiber officinale Roscae</i> (zencefil)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Mikrodilüsyon	0.15–9.85 mg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (biberiye)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Mikrodilüsyon	0.67–10.8 mg/mL
<i>Syzygium aromaticum</i> (karanfil)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Mikrodilüsyon Broth	0.5–1 mg/mL
<i>Syzygium aromaticum</i> (karanfil)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Dilüsyon	0.304 mg/mL
<i>Rosmarinus officinalis</i> (biberiye)	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>	Broth dilüsyon	0.5–85 µg/mL

2.3.2 Uçucu yağların antioksidatif etkileri

Geçtiğimiz yıllarda oksidasyon mekanizmaları ve canlı sistemlerdeki serbest radikal rolüne olan ilgi artmaktadır. Hücre metabolizmasına özgü olan oksijen alımı, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna sebep olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin lipid molekülleri ile reaksiyona girmesi peroksil radikallerinden kaynaklanmaktadır ve bunların nükleik asitler ve proteinlerle olan etkileşimi bazı değişikliklere ve fonksiyonel bozulmalara yol açmaktadır. ROT, normal fizyolojik olaylar sırasında (solunum gibi) sürekli olarak üretilmektedir ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu kolayca başlatarak lipid peroksitlerin birikmesine

yol açabilmektedir. Eğer ROT etkili bir şekilde hücrel bileşenler tarafından temizlenmezse biyolojik sistemlerle girdiği sitotoksik etkileşim sonucunda prostat, kolon kanseri gibi hastalık yapıcı koşullara neden olabilmektedir. Serbest radikallerin bu olumsuz etkileri antioksidan kullanımı ile engellenebilmektedir. Antioksidanlar, oksidatif stresin olumsuz etkilerini nötralize eden doğal veya sentetik maddelerdir ve insan vücudunu serbest radikallerden koruyabilir ve birçok kronik hastalığın ilerlemesini ve lipid peroksidasyonunu geciktirebilmektedirler (Halliwell, 1996).

Çeşitli işlemlere ve koşullara dayanabilmesi ve ayrıca raf ömrünü uzatabilmesi için gıdalara sentetik veya doğal antioksidanlar eklenmektedir. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) en yaygın kullanılan sentetik antioksidanlardır. Fakat sentetik antioksidanların sağlık üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle oksidasyonu engelleyebilen, serbest radikalleri temizleyen ve indirgeyici olarak hareket edebilen, sağlık ve çevre bakımından risk taşımayan flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler ve tokoferoller gibi doğal antioksidanların kullanımı yaygınlaşmaktadır. Başlıca antioksidan bitki fenolikleri 4 genel gruba ayrılabilir: fenolik asitler (gallik, protokatekuik, kafeik ve rosmarinik asitler, fenolik diterpenler (karnosol ve karnosik asit; , flavonoidler (kersetin ve katesin); ve uçucu yağlar (majör bileşenleri öjenol, karvakrol, timol ve mentol) güçlü antioksidan etki sergilemiştir (Brewer, 2011).

Dorman ve diğ. (1995) limon nanesi, misk cevizi, yabani mercanköşk ve kekik bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antioksidatif özelliklerini yumurta sarısı, civciv karaciğerleri ve olgun tavuklardan elde edilen kası temel alan üç farklı sistemde araştırmışlardır. Araştırma sonucunda limon nanesi, misk cevizi ve kekik uçucu yağının yumurta sarısı üzerinde antioksidatif etki gösterdiği görülürken; misk cevizi uçucu yağının civcivlerin karaciğerinde; limon nanesi, misk cevizi, yabani mercanköşk ve kekik uçucu yağlarının ise tavuk kaslarında antioksidatif özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir (Damien Dorman vd., 1995).

2.3.3 Karanfil uçucu yağı

Karanfil (*Syzygium aromaticum*), uç kümeler halinde gruplanmış büyük yaprak ve çiçeklere sahip, 8-12 m yüksekliğe kadar büyüyen yaprak dökmeyen bir ağaçtır. Çiçek tomurcukları başlangıçta soluk bir renk tonuna sahiptir ve yavaş yavaş yeşile dönmektedir (Mbaveng ve Kuete 2017). Karanfil ağacının çiçeklerinin, gövdelerinin ve yapraklarının damıtılmasıyla karanfil uçucu yağı elde edilmektedir. Dünya çapında gıda aroması olarak

bilinmesinin yanı sıra diş hekimliğinde topikal analjezik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca karanfil, "genel olarak güvenli kabul edilen" (GRAS) bir bileşik olarak sınıflandırmıştır (Mylonas vd., 2005).

Karanfil özleri ve karanfil uçucu yağı gibi antioksidan ajanlar, oksidatif streten kaynaklanan hafıza eksikliklerinin tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Halder vd. (2011) karanfil uçucu yağının ön tedavisinin, farelerin beyinlerinde glutasyon tarafından değerlendirilen oksidatif stresi ve malondialdehit seviyelerini azalttığını bildirmiştir. Karanfil yağının kısa ve uzun süreli skopolamin tedavisinden kaynaklanan hafıza ve öğrenme eksikliklerini geri kazanma yeteneğinin oksidatif stresi azaltmadaki etkinliğine bağlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Baharatların renklendirici ve koruyucu olarak kullanımı gıda endüstrisinde gün geçtikçe daha fazla ilgi çekici hale gelmektedir ve bu baharatlar arasında karanfil büyük önem teşkil etmektedir. Sodyum benzoat, potasyum sorbat ve diğer kimyasal gıda koruyucuları ile karşılaştırıldığında, karanfil uçucu yağı, antimikrobiyal aktivite, aromalar ve güvenlik açısından çeşitli avantajlara sahiptir ve kimyasal gıda koruyucularının ideal bir ikamesi olarak bilinmektedir. Karanfil uçucu yağının en önemli bileşimi olan öjenol, Çin, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği ve diğer ülke ve bölgeler tarafından gıda koruyucusu olarak kabul edilmiştir (Hu, Zhou, ve wei 2018).

Öjenolün bakteri hücreleri üstündeki aktivitesini açıklamak için farklı mekanizmalar öne sürülmüştür; öncelikle, zarın spesifik olmayan geçirgenliğini artıran ve iyonların ve ATP'nin taşınmasını etkileyen sitoplazmatik zarın bozulması ile bakteri inhibisyonunun sağlanması bu mekanizmalar arasında yer almıştır (Filgueiras ve Vanetti, 2006).

Bahsi geçen avantajlarına rağmen, karanfil uçucu yağının kullanım potansiyeli uçucu yağların karakteristik stabilite problemleri nedeni ile istenilen düzeye ulaşamamaktadır. Mikroenkapsülasyon teknolojisi söz konusu stabilite problemine çözüm önerisi sunmaktadır.

2.4 Mikroenkapsülasyon

Işık, hava, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlerden oldukça fazla etkilenen uçucu yağların depolanmasında ve renk ve tat gibi istenmeyen değişikliklerin önüne geçmek ve aktif bileşikleri korumak amacıyla kullanılan tekniklerin arasında mikroenkapsülasyon tekniği oldukça popüler bir yöntem olmuştur. Kaplanan malzemeye aktif veya aktif malzeme

denir ve kaplama malzemesine kabuk, duvar malzemesi, taşıyıcı veya enkapsülen denmektedir. Mikroenkapsülasyon aktif bileşiğin depolanması ve kontrollü salınmasını sağlamak için oldukça etkili bir yöntemdir (Cetin Babaoglu vd., 2017).

Gıda endüstrisinde, aktif maddenin buharlaşmasını ve dış ortama transferini engellemek, ana malzeme üzerinde istenen fiziksel değişimi daha kolay elde etmek, doğru uyarana kadar aktif malzemenin salınmasını engelleyerek kontrollü bir salınım yaratmak, aktif malzemenin tat ve aromasını maskeleyerek, aktif maddenin çevresel koşullardan etkilenmesini önlemek gibi amaçlarla mikroenkapsülasyon tekniği kullanılmaktadır (Desai ve Park 2005).

Hassas bileşiklerin kapsüllenmesi işlemi iki aşamadan oluşmaktadır: birinci aşama, bir polisakkarit veya protein gibi bir duvar malzemesinin yoğun bir çözeltisi ile lipid-aroma sistemi gibi bir aktif malzemenin emülsiyonlaştırılmasıdır. İkinci aşama ise emülsiyonların kurutulması veya soğutulmasıdır. Kullanılan duvar materyallerinin stabilitesi, aktif malzemelerin özelliklerini korumak için önemli bir şart olarak bilinmektedir. Duvar materyalinin türü, aktif malzemesinin duvar malzemesine oranı, kapsülleme yöntemi ve saklama koşulları gibi birçok faktör kapsüllenmiş aktif maddenin antioksidatif kararlılığını etkilediği rapor edilmiştir (Madene vd., 2006).

İdeal bir duvar materyali aşağıdaki özellikleri sergilemelidir.

- İşleme ve depolama süreçlerinde aktif bileşen ile herhangi bir reaksiyona girmemeli ve aktif maddeyi tutabilmeli
- Aktif materyali çevresel koşullara karşı en yüksek düzeyde korumalı
- Gıda endüstrisinde güvenilir kabul edilen çözücülerde çözünmeli
- Ekonomik bir fiyatı olmalı

Genellikle tek başına hiçbir duvar malzemesi yukarıda sıralanan özellikleri sağlayamadığı için kombinasyonlar halinde veya bazı yardımcı ajanların eklenmesi ile kullanılmaktadır. Mikroenkapsülasyon teknolojisinde yaygın olarak kullanılan duvar materyalleri Çizelge 2.2'de belirtilmiştir (Desai ve Park, 2005).

Çizelge 2.2: Mikroenkapsülasyon teknolojisinde yaygın olarak kullanılan duvar materyalleri (Desai ve Park, 2005).

Kategori	Kaplama materyali	Yaygın olarak kullanılan method
Karbonhidrat	Nişasta, maltodekstrin, kitosan, mısır şurubu tozu, modifiye nişasta, siklodekstrinler	Püskürterek ve dondurarak kurutma, ekstrüzyon, koaservasyon
Selüloz	Karboksimetilselüloz, metil selüloz, etilselüloz, selülozasetat-fitalat, selülozasetat-bütilat-fitalat, selülozasetat-bütilat-fitalat	Koaservasyon, püskürterek kurutma ve yenilebilir filmler
Gamlar	Gam akasya, agar, sodyum aljinat, karregenan	Püskürterek kurutma, şırınga metodları (jel boncukları)
Lipitler	Vaks, parafin, diaçilgliserol, yağlar	Emülsiyon, lipozom, film oluşturma
Proteinler	Gluten, kazein, jelatin, albumin, peptidler	Emülsiyon, püskürterek kurutma

Mikroenkapsülasyonda kullanılan duvar materyallerinden biri hidrofilik malzemeleri tutma ve düşük maliyet gibi avantajlara sahip olan nişastadır. Yüksek konsantrasyonlarda düşük vizkozite ve yoğun olmayan bir tade sahiptir ancak nişasta granüllerinin iyi bir emülsifiye etme kapasitesinin olmaması biyoaktif maddeleri tutmasını zorlaştırır (Gupta vd., 2015).

Nişastanın hidroliz ürünlerinden olan maltodekstrinler α -(1-4) glikozidik bağlar ile bağlanan α -D-glikoz birimlerinden oluşan ürünlerdir. Gıda sanayisinde çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılan maltodekstrinler yüksek çözünürlük, düşük vizkozite, yumuşak tat ve duvar malzemesinde kullanıldığında oksidasyona karşı aktif materyali koruma gibi avantaj sağlayan özelliklere sahiptir. Ancak hidroksil gruplarının varlığı sebebi ile zayıf emülsifiye özellik sergiledikleri için kapsülleme üzerinde tek başına duvar malzemesi olarak tercih edildiğinde sınırlayıcı olabilmektedir. Maltodekstrin, toz verimini artırmak, nihai

üründeki nemi azaltmak ve emülsifiye özelliğini artırmak amacı ile diğer duvar malzemeleri ile birlikte kullanılabilir (Saéenz vd., 2009).

Gam arabik, yaklaşık %2 protein içeriği ile D-glukuronik asit, L-ramnoz, D-galaktoz ve L-arabinozdan oluşan bir biyopolimerdir. Suda çözünlük, yüksek vizkozite ve cam geçiş sıcaklığına sahip olması mikroenkapsülasyonda yaygın kullanılmasının nedenleri arasında yer almasına rağmen maliyeti yüksek bir duvar materyalidir (Tonon vd., 2009).

Mikroenkapsülasyon uygulamasında duvar materyali olarak proteinler de yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Proteinlerin kimyasal özellikleri kapsüllemede önemli rol oynamaktadır, tek başına veya aktif materyalin tutunmasını sağlayan diğer moleküller ile birlikte kullanılarak filmler ve polimerler oluşturabilirler. Proteinlerin üç boyutlu yapısı pH ile değiştirilebilmektedir ve dolayısıyla izoelektrik nokta yakınlarında çözünlükleri azaltarak emülsiyon oluşturma özellikleri değişmektedir. Mikroenkapsülasyon teknolojisinde duvar materyalinin suda çözünür olması önem arz ettiğinden söz konusu durum dezavantaj oluşturmaktadır (Koç, Sakin, ve Kaymak-Ertekin, 2010).

Kazeinler gıda dağıtım sistemlerinde, bol bulunmaları, düşük elde etme maliyetleri ve oldukça iyi olan yüzey aktiviteleri gibi özellikleri nedeni ile sıkça kullanılmaktadır. Sığır sütünde kazein, koloidal bir dispersiyon olarak stabiliteini sağlayan kazein miselleri olarak bulunurlar. Sodyum kazeinat ise ticari olarak yağsız sütün asitle çökeltmesi, çökelmiş kazeinlerin yeniden süspanse edilmesi, NaOH kullanılarak nötralizasyonu ve püskürterek kurutulması sonucunda üretilmektedir. Toz sodyum kazeinat ürünleri % 86 protein, % 0.5 karbonhidrat, % 5 kül ve% 2 yağ içermektedir. Sodyum kazeinat ve kazein misellerinde, örneğin doğal kazein misellerini stabilize eden kalsiyum fosfat miktarı gibi farklılıklar vardır. Sodyum kazeinatın hidrasyonu üzerine yapılan çalışmalar, dönüştürülmüş kazein partiküllerinin hidrodinamik yarıçapının hem 10 nm ila 100 nm'den daha küçük olduğu hem de sığır sütündeki doğal kazein misellerininkine benzer olduğunu bildirmiştir. Buna ek olarak sodyum kazeinat ve kazein misellerinin iç parçacık yapılarındaki farklılıklar bilinmemektedir. İyonik kuvvet ve kazein konsantrasyonunun yanı sıra, sodyum kazeinat kaynağı kazein partiküllerinin tam boyutunu etkileyebilmektedir.(Zhang ve Zhong, 2013).

Jelatin düşük maliyeti, bol bulunması, biyouyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve çok sayıda aktif grubu nedeniyle, farmasötik ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Granül veya toz halinde elde edilebilen jelatin tatsız ve kokusuz bir maddedir. Bileşimi esas olarak %50.5 karbon, %6.8 hidrojen, %17 nitrojen ve

% 25.2 oksijendir. Propilen glikol ve gliserol gibi polihidrik alkollerin sulu çözeltilerinde çözünürlüğünün yüksek olmasının yanı sıra yüksek polariteli, hidrojen bağı, asetik asit, trifloroetanol ve formamid gibi organik çözücüler içinde de çözülebilir. Ancak jelatinin aseton, benzen, dimetilformamid ve birincil alkoller gibi daha az polar organik çözücülerde zayıf bir çözünürlüğe sahip olduğu bildirilmiştir (Ali vd., 2019).

2.4.1 Emülsifikasyon

Çeşitli yağların mikroenkapsülasyonunda emülsifikasyon, püskürterek kurutma, koaksiyel elektrosprey sistemi, dondurarak kurutma, koaservasyon, yerinde polimerizasyon, ekstrüzyon kaplama, süper kritik akışkan teknolojisi ve akışkan yataklı kaplama gibi teknikler kullanılmaktadır. Emülsifikasyon teknolojisi yağların mikrokapsüllemesinde büyük öneme sahip yöntemlerden biridir. Genellikle, doğrudan sıvı halde kullanılabilen veya emülsifikasyondan sonra tozlar oluşturmak için kurutulabilen (püskürtmeli veya dondurarak kurutma) sulu çözeltilerde biyoaktif maddelerin kapsüllemesi için uygulanan adımdır. Mikrokapsüllemede, aktif ve duvar malzemeleri, son kurutmadan önce emülsiyon teknikleriyle hazırlanmaktadır. Basit bir anlamda bakıldığında bir emülsiyon, diğerinde küçük küresel damlacıklar halinde dağılan sıvılardan biri ile genellikle yağ ve su olmak üzere en az iki karışım sıvıdan oluşmaktadır. Sulu bir fazda dağılmış yağ damlacıklarından oluşan bir sistem, su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu olarak adlandırılırken, bir yağ fazında dağılmış su damlacıklarından oluşan bir sisteme yağda su (S/Y) emülsiyon olarak adlandırılmaktadır (Bakry vd., 2016).

Kinetik olarak stabil bir çözelti elde etmek için emülsiyonlaştırıcılar veya doku değiştiriciler genellikle emülsiyon sistemine eklenmekte ve gıda sistemlerindeki emülsiyon damlacıklarının çapları 0,1 ila 100 µm arasında değişen boyutlarda olabilmektedir (Fang ve Bhandari, 2010). Emülsiyonlar, homojenleştirici (yüksek kesmeli karıştırıcı, yüksek basınçlı homojenleştirici, kolloid öğütücü, sonikatör veya membran homojenleştirici) olarak bilinen mekanik bir cihaz kullanılarak yağ, su ve emülsiyonlaştırıcının birlikte homojenleştirilmesiyle hazırlanan çözeltilerdir. Y/S emülsiyonu, sulu bir ortamda dağılmış küçük yağ damlacıklarından oluşur ve yağ damlacıkları, emülgatör moleküllerinden oluşan ince bir ara yüzey tabakası ile çevrelenirler. Emülsifikasyon yöntemi diğer mikrokapsül hazırlama tekniklerine kıyasla çeşitli avantaj (hazırlık kolaylığı ve düşük maliyet) ve dezavantajlara (çevresel faktörlerin değişimine karşı (ısıtma, soğutma, dondurma, kurutma,

aşırı pH ve yüksek mineral konsantrasyonu) fiziksel dengesizlik ve sınırlı kontrollü salım) sahiptir (McClements vd., 2009).

2.4.2 Dondurarak kurutma

Dondurarak kurutma, neredeyse tüm ısıya duyarlı malzemelerin ve yağlar gibi aromaların dehidrasyonu için kullanılmaktadır. Kurutmanın mekanizması: kurutmadan önce, su içinde yağ emülsiyonu oluşturulmakta, hazırlanan emülsiyon dondurulmakta, vakum altında emülsiyondaki donmuş suyun doğrudan katı fazdan gaz fazına süblimleşmesine izin vermek için ısı yeteri kadar artırılmaktadır. Süblimasyon ile yapıdan suyun uzaklaşması sonucunda dehidre edilmiş oldukça düşük nem içeriğine sahip son ürün (mikrokapsüller) elde edilmektedir. Dondurularak ve püskürtülerek kurutulmuş uçucu bileşikler içeren mikrokapsüllerin etkinlik başarıları kıyaslandığında dondurarak kurutma tekniğinin maksimum tutma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Dondurarak kurutma yöntemi diğer kurutma yöntemlerine kıyaslandığı zaman yüksek enerji kullanımı, uzun işlem süresi ve yüksek üretim maliyeti gibi bazı dezavantajlara sahip olduğu görülmektedir (Krokida ve Philippopoulos, 2006).

Dondurularak kurutulmuş bileşenler daha yüksek gözenekliliğe sahip olduğu için bu teknik ile üretilen mikroenkapsüllerin salınım hızı daha yüksek olmaktadır. Bu durum uzatılmış salınımın periyodunun istenildiği son ürünleri için uygun değildir (Desobry, Netto, ve Labuza, 1997).

Sodyum kazeinatı farklı polimerlerle kullanılarak mikroenkapsülasyon uygulanan çalışmalar mevcuttur. Sodyum kazeinat ve sodyum aljinat ile stabilize edilmiş, kurkumin yüklü bir zein nanopartikülleri hazırlanarak yapılan çalışmada mikrokapsüllemenin, kurkuminin fotokimyasal stabilitesini ve antioksidan aktivitesini önemli ölçüde iyileştirdiği ve simüle edilmiş gastrointestinal sıvılarda kontrollü salım sağladığı belirlenmiştir (Liu vd. 2019).

Gam arabikin modifiye nişasta, maltodekstrin ve inülin ile kısmen veya tamamen değiştirilmesinin sprey kurutma ile mikrokapsüllenmiş biberiye uçucu yağının özellikleri üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmada; İnülinin varlığı parçacıkların ıslanabilirliğini iyileştirdiği fakat enkapsülasyon etkinliğini düşürürken modifiye nişasta ve inülin kombinasyonunun gıdalarda gam arabik için uygun bir ikame olduğu bildirilmiştir (Fernandes, Borges, ve Botrel, 2014).

Farklı duvar materyal kombinasyonlarının mikroenkapsülasyon verimliliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Birçok tropikal ülkede yetiştirilen, az kullanılan en faydalı gıda ürünlerinden biri Moringaceae familyasına ait olan drumstick (*Moringa oleifera*), bitkisine ait uçucu yağın kapsüllemesinde maltodekstrin ve gam arabik duvar kombinasyonu kullanılmıştır ve yüksek vizkozite ve daha stabil bir ürün elde edilmiştir (Premi ve Sharma, 2017). Kahve telvesinden ekstrakte edilen antioksidan fenolik bileşiklerin kapsüllemesi üzerinde yapılan bir çalışmada gam arabik, maltodekstrin duvar materyal olarak kullanılmış, elde edilen kapsüllerin termal olarak daha kararlı olduğu tespit edilirken, mikroenkapsülasyon işleminin aktif materyal antioksidan aktivitesi üzerinde azaltıcı bir etki sergilediği bildirilmiştir. Duvar malzemesi olarak maltodekstrinin kullanılması, özellikle dondurarak kurutma yapıldığında fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin en yüksek tutma yüzdelerini sağladığı ve bu bileşenleri korumak için uygun bir materyal olduğu bilinmektedir (Ballesteros vd., 2017).

Literatürden derlenen bilgiler göz önüne alındığında farklı duvar materyallerinde karanfil ve diğer uçucu yağların mikroenkapsülasyonu duvar materyalin özelliğine göre değişim gösterdiği görülmüştür. Gıdalarda oksidatif bozulmayı engellemek ve patojen mikroorganizmaları yok etmek insan sağlığı açısından ve ekonomik nedenlerden dolayı elzem bir konudur. Gıdalarda kullanılan sentetik koruyucuların söz konusu etkileri sergilemesi ancak aynı zamanda insan sağlığını tehdit etmesi ve diğer yararlı bileşenlerin emilimini azaltması gibi olumsuz özellikleri olduğu görülmüştür. Bu bağlamda doğal bileşenlerden elde edilen koruyucuların kullanılması sağlık açısından daha faydalı bir işlem olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışmada, antioksidan ve antimikrobiyal etkilere sahip olan karanfil uçucu yağının yağının maltodekstin, sodyum kazeinat, gam arabik ve jelatin ile hazırlanan farklı duvar materyal formülasyonları ile mikrokapsüle edilmesi sonucunda stabilitesi ve fonksiyonallitesini geliştirmek amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Karanfil uçucu yağı ve materyalleri

Bu çalışmada karanfil uçucu yağı Simya evi (Ankara) firmasından, duvar materyalleri maltodekstin (18 DE), sodium kazeinat, gam arabik ve Tween 80 Sigma-Aldrich firmasından (Steinheim, Almanya), jelatin 250 bloom Benosen firmasından (İstanbul) temin edilmiştir.

3.1.2 Besiyeri ve kimyasallar

Bakteri ve maya suşlarının aktifleştirilmesinde, antimikrobiyal deneylerde farklı besiyerleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal testlerde stok kültürlerden bakterilerin aktifleştirilmesinde Brain Hearth Infusion (BHI) Broth (Merck, Darmstadt, Germany), mayaların aktifleştirilmesinde Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Merck, Darmstadt, Germany), antimikrobiyal testlerde bakteriler için Mueller Hinton broth (Merck, Darmstadt, Germany), mayalar için Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Merck, Darmstadt, Germany) kullanılmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO), Etil asetat, sodium hidroksit (NaOH), hidroklorit asit (HCl), Merck (Darmstadt, Germany) firmasından p-iodonitrotetrazolium violet Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) firmasından İn situ antimikrobiyal aktivite deneyi için kullanılan kayısı suyu, tam yağlı süt ve vişne suyu yerel bir marketten satın alınmıştır.

3.2 Metot

Bu çalışmada, öncelikle duvar materyal olarak temelde maltodekstrin, sodyum kazeinat, ayrıca gam arabik ve jelatin ile farklı duvar materyal kombinasyonları ile hazırlanmış karanfil uçucu yağı mikrokapsüle edilmiştir. Elde edilen kapsüllerin karakterizasyon testleri tamamlandıktan sonra karanfil uçucu yağının antioksidan ve antimikrobiyal kapasitesi üzerine mikroenkapsülasyon işleminin etkisi belirlenmiştir.

3.2.1 Karanfil uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

Karanfil uçucu yağının kimyasal kompozisyonu GC-MS analizi ile belirlenmiştir. GC-MS analizi, Agilent 6890 GC cihazına bağlı 5793M MSD dedektörden oluşan GC-MS ile gerçekleştirilmiştir. HP-INNOWax PEG kapiler kolonu (60 m × 0.25 mm, 0.25 µm), akış hızı 1.7 mL/dk olan helyum taşıyıcı gazı ile birlikte kullanılmıştır. Analiz süresince GC-MS koşulları şöyledir: split oranı 30:1, enjeksiyon hacmi 1 µL, fırın sıcaklık programı; 10 dk

süresince 60 °C’de tutulup, sonra 5 °C/dk hızla 150 °C’ye çıkartılarak bu sıcaklıkta 20 dk tutulup tekrar 5 °C/dk hızla 250 °C’ye çıkartılıp bu sıcaklıkta da 30 dk tutulması şeklinde olup toplam süre 98 dk ve enjeksiyon sıcaklığı 250 °C olarak belirlenmiştir. Kütle spektrumları 70 eV enerjide ve 35-450 m/z (kütle/yük) aralığında alınmıştır. Analizi gerçekleştirilen karanfil uçucu yağının bileşenleri, NIST05a.L, Nist08Wiley8.L ve Flavor2.L kütüphaneleri taranarak belirlenmiş ve kromatogramdaki pik alanlarından yüzde oranları hesaplanarak bileşenlerin yüzde olarak rölatif miktarları da belirlenmiştir.

3.2.2 Karanfil uçucu yağının mikroenkapsülasyonu

Karanfil uçucu yağının mikroenkapsülasyonu önce duvar materyalleri ve uçucu yağ ile hazırlanan emülsiyonun dondurarak kurutulması sonucunda elde edilmiştir. Karanfil uçucu yağının mikroenkapsülasyonunda Hee vd. (2015)’nin önerdiği yöntemde bazı değişiklikler yapılarak emülsiyon oluşturulmuştur. Bu amaçla öncelikle aktif ve duvar materyal ile emülsiyon hazırlanmış, sonrasında dondurarak kurutma tekniği ile mikrokapsüller toz haline getirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işleminde maltodeskrin/sodyum kazeinat (M/S), maltodeskrin/sodyum kazeinat/gam arabik (M/S/G) ve maltodeskrin/sodyum kazeinat/jelatin (M/S/J) olmak üzere üç farklı duvar materyali karışımı hazırlanmış ve formülasyonlar Çizelge 3.1 de verilmiştir. Üç farklı duvar materyal formülasyonu (her biri 17 g ağırlıkta) 70 mL saf su ile 60°C’de 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve tam çözümleri sağlanmıştır. Karışım soğuduktan sonra duvar materyal formülasyonuna 12 mL karanfil uçucu yağı ve emülsiyon stabilitesini sağlamak amacı ile 1 mL Tween 80 eklenmiş ve yüksek devirli homojenizatör (Ultra Turrax® T18, IKA®-WERKE GmbH, Staufen, Almanya) kullanılarak 15.500 rpm’de 5 dk homojenizasyon sağlanarak emülsiyon elde edilmiştir. Kullanılan miktarlar aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir. Oluşturulan emülsiyonlar petrilere dökülerek -18°C de 24 saat bekletilip ardından dondurularak kurutulmuştur (Buchi, Lyovapor L-200). Kurutma işlemi sonrasında elde edilen toz formdaki mikrokapsüller kullanılıncaya kadar -18 °C hava geçirmez vida kapaklı kaplarda saklanmıştır.

Çizelge 3.1: Mikroenkapsül üretiminde kullanılan duvar materyal formülasyonları.

Formülasyon (%)	M:S	M:S:G	M:S:J
Karanfil uçucu yağı (KUY)	12	12	12
Su	70	70	70
Maltodekstrin (M)	13	10	10
Sodyum kazeinat (S)	4	3,5	3,5
Gum arabik (G)	-	3,5	-
Jelatin (J)	-	-	3,5
Tween 80	1	1	1

3.3 Analizler

3.3.1 Mikroenkapsülasyon etkinliği

Mikroenkapsülasyon etkinliği, mikroenkapsülasyon işleminin başarısını ölçen bir parametredir. Karanfil uçucu yağının mikroenkapsülasyon etkinliği yapısında bulunan öjenol üzerinden belirlenmiştir. Karanfil uçucu yağında baskın olan ve fonksiyonel özelliklerden sorumlu olduğu kabul edilen major bileşen öjenoldür (Sruthi et al. 2014). Böylece, mikroenkapsülasyon etkinliğini belirlemek amacı ile öncelikle öjenol standardının farklı konsantrasyonları hazırlanmış ve gaz kromatografisi- alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID) yardımı ile Şekil 3.1’de verildiği gibi konsantrasyona karşı pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve elde edilen denklem etkinlik hesaplamalarında kullanılmıştır.

Mikroenkapsüllerin etkinliklerini belirlemek amacıyla, farklı duvar materyal formülasyonları ile hazırlanan mikroenkapsüllerin her birinden 0.25 gr örnekler deney tüplerine iki paralel olarak tartılmış ardından tüplere 1 mL saf su eklenip vortex yardımı ile karıştırılmış sonrasında 1 mL etil asetat ekleyip 4100 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir, üst faz içerisinde bulunan karanfil uçucu yağı miktarı GIC-FID tekniği ile analiz edilmiş, kalibrasyon eğrisi denklemi ve seyreltme faktörleri kullanılarak hesaplanmıştır. Belirlenen karanfil uçucu yağ miktarları aşağıdaki formülde yerine konularak, mikroenkapsüllerin mikroenkapsülasyon etkinlikleri hesaplanmıştır.

$$\text{Mikroenkapsülasyon etkinliği (\%)} = \frac{\text{Kapsüldeki toplam karanfil uçucu yağı miktarı}}{\text{Kullanılan toplam karanfil uçucu yağı}} \times 100$$

GC-FID koşulları;

Gaz kromatografisi (Agilent 7890A) analizinde kapiler kolon (TRB-WAX, TR-140232; 30m× 0.25mm i.d., 0.25 µm film kalınlığı; Teknokroma, Barcelona, Spain), oto enjektör (Agilent 7683B) ve alev iyonizasyon dedektör (FID) kullanılmıştır. Cihaz split-less modunda, enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırası ile 200 ve 270 °C olarak çalıştırılmıştır. Kolon sıcaklık programlaması; 40 °C'de 2 dk tutulmasından sonra 5 °C/dk artış ile 260°C'de 15 dk tutulması şeklinde yapılmıştır. Toplam taşıyıcı gaz olarak 30 mL/dk akış hızı ile helyum kullanılmıştır.



Şekil 3.1: Öjenol standartının farklı konsantrasyonları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiği.

3.3.2 SEM görüntüleme

Mikrokapsüllerin morfolojik yapıları taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope; SEM; Leo EVO-40 VPX, Carl Zeiss SMT, Cambridge, UK) kullanarak belirlenmiştir. Toz halindeki mikrokapsül örnekleri ince bir tabaka halinde karbon yapışkanlı kalıplara yapıştırıldıktan sonra ve üzerleri ince bir tabaka altın ile kaplanmış ve mikrokapsüllerin dijital resimleri SEM kullanılarak çekilmiştir.

3.3.3 Antimikrobiyal aktivite

Mikrokapsül ve serbest formda karanfil uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi Pessini vd. (2003) tarafından önerilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Antimikrobiyal aktivite dilüsyon temelli tekniklerden minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) yöntemi ile belirlenmiştir. MIK mikroorganizma gelişiminin olmadığı en düşük uçucu yağ miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Karanfil uçucu yağının serbest ve mikrokapsüle antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla test edilen mikroorganizmalarının bir kısmı Refik Saydam Hıfzısıhha

Müdürlüğünden Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu Numarası (ATCC No) ve Refik Saydam Kültür Numarası (RS No) ile bir kısmı da İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Mikrobiyoloji Laaboratuvarı (TÖTM, ML) dan temin edilmiştir. Çalışmada 3 Gram negatif (*Escherichia coli* (ATCC No25922) (RS No: 347/01003), *Salmonella* (ATCC No 13076) (TÖTM, ML), *Shigella flexneri* (RS No: 184)), 3 Gram pozitif (*Bacillus cereus* (RS No:869), *Staphylococcus aureus* (RS No: 1020/06008), *Streptococcus mutans* (ATCC No 25175)) ve iki maya (*Candida albicans* (ATCC No: 90028), *Saccharomyces cerevisiae* (RS No: 08022)) kullanılmıştır. Test öncesinde stok kültürleri aktifleştirmek amacı ile her bir mikroorganizmanın gece kültürleri hazırlanmış, bu amaçla bakteriler BHI broth da +37°C'de 24 saat, mayalar SDB da +27°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrasında MIK belirlendiği test tüplerine 50 µg (10⁶ kob/mL) hacimlerde inoküle edilmiştir.

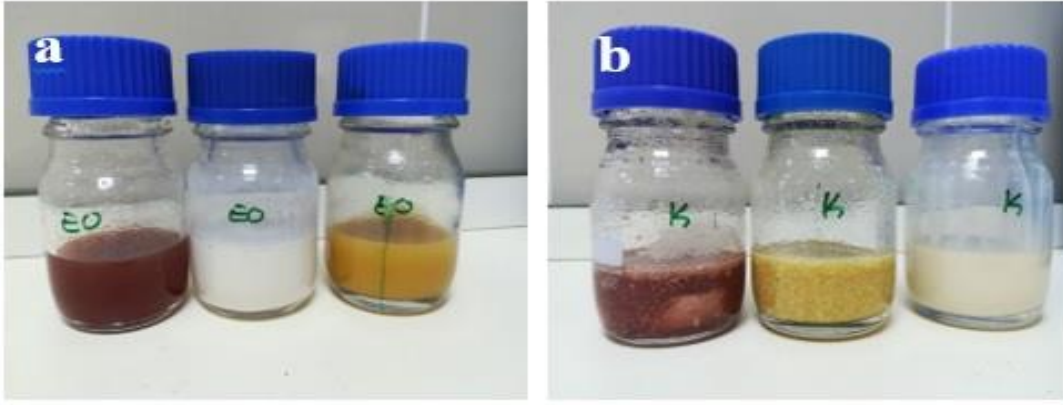
Uçucu yağların broth ortamında homojen dağılımını sağlamak amacı ile dimetil sulfoksit (DMSO), %10 (v/v) kullanılmıştır. Böylece %10 DMSO'lu broth (bakteriler için Mueller Hinton Broth, maya için Sabouroud Dextrose Broth) ve test edilecek mikroorganizmayı içeren tüplere 1000'den 3.9 µg/mL konsantrasyonda karanfil uçucu yağı iki katı seri dilüsyon olacak şekilde eklenmiştir. Serbest karanfil uçucu yağı ile aynı miktarda karanfil uçucu yağı içeren mikroenkapsüller enkapsül etkinliği yardımı ile hesaplanmış ve teste tabi tutulmuştur. İnokülasyon işlemleri tamamlanan tüpler bakteriler için +37°C'de 24 saat, maya +27°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antimikrobiyal testlerle eş zamanlı olarak pozitif ve negatif kontroller yapılmış ve bu amaçla negatif kontrol olarak testlerde kullanılan broth ortamına ilgili mikroorganizma ekimleri yapılmış, her hangi bir antimikrobiyal ajan ilavesi yapılmadan inkübasyona bırakılarak kullanılan mikroorganizmaların sağlıklı gelişebildiği belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak standart antimikrobiyal ajanlar (tetrasiklin ve ampisilin) (100 µg/mL'den 1.56 µg/mL'ye değişen konsantrasyonlarda) kullanılarak test edilen mikroorganizmaların herhangi bir dirence sahip olup olmadığı, antimikrobiyal ajanlar ile inhibe edilebileceği belirlenmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin broth dilüsyon yöntemi ile tespit edilmesinde olarak ρ-iodonitrotetrazolium violet (INT) mikrobiyal gelişim indikatörü olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin tamamlayan test tüplerine 50 µg miktarında (0.2 mg/mL olacak konsantrasyonda steril suda hazırlanan) INT indikatörü ilave edilmiş ve tüpler 30 dk daha inkübasyona bırakılmış ve ileri inkübasyon süresi sonunda bakteri gelişimi INT d-formazan üretimine bağlı olarak açığa çıkan kırmızı renk değerlendirmesi ile belirlenmiştir, bakteri

gelişiminin olmadığı en düşük uçucu yağ konsantrasyonu MIK ($\mu\text{g/mL}$) olarak belirlenmiştir.

3.3.4 *In-situ* antimikrobiyal aktivite

Kontrol ortamları olan besiyerinde belirlenen antimikrobiyal aktivite de besiyeri formülasyonu (karbon, azot kaynaklarının varlığı ve muhteviyatın yağ içermemesi) ve koşulları (pH'nın optimum gelişme değeri olan 7 civarında tutulması ve ortamda tamponlama amacıyla fosfatlı bileşiklerin bulunması) oldukça kararlıdır. Antimikrobiyal aktivitenin gıda sistemlerinde gıdaların kendine has bileşim ve pH koşullarında test edilmesi ile oluşabilecek antimikrobiyal etkinlik farkını belirlemek amacı ile *in-situ* testler yapılmıştır. Mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini gıda sisteminde yani yerinde (*in-situ*) olarak test etmek amacıyla sıvı gıdalar tercih edilmiştir. Bu bağlamda gıda ortamlarında pH'nın etkisini gözlemlemek amacıyla vişne suyu ve kayısı suyu seçilmiştir ve gıda bileşenlerinden yağın antimikrobiyal özellik üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla tam yağlı süt seçilmiştir. Kontrol ortamında yapılan MIK verileri ışığında en yüksek antimikrobiyal etki sergileyen MD-SK mikroenkapsülü antimikrobiyal ajan olarak, yapay kontaminasyonda ise en dirençli bakterilerden *E.coli* test mikroorganizması olarak tercih edilmiştir. MIK test sonuçlarında elde edilen etkin doz ($125 \mu\text{g/mL}$) *in-situ* test konsantrasyonu ($5 \text{ mL}/40 \text{ mL}$) olarak kullanılmıştır. Donsi vd. (2011)'nin takip ettiği yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilen testte, Şekil 3.2'de görüldüğü gibi her birinden 40 mL olmak üzere; tam yağlı süt, vişne suyu ve kayısı suyu otoklavda steril edildikten sonra *E.coli* (10^5 kob/mL) ile inoküle edilmiş ve son konsantrasyon ($5 \text{ mL}/40 \text{ mL}$) olacak etkinlik temelinde hesaplanan mikroenkapsül ve eşdeğer miktarda serbest uçucu yağ test ortamına eklenmiştir. İnkübasyona ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de) bırakılan test ortamlarından belirlenen zaman aralıklarında (0, 2, 4, 6, 8 ve 24. saat) örnekler alınarak katı besiyerine (plate count agar) yayma yöntemi ile ekimler yapılmış, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyon sonrasında zamanla *E.coli* yükündeki değişim takip edilmiştir (Donsi vd., 2011).



Şekil 3.2: *In-situ* antimikrobiyal test ortamları; a: uçucu yağ test ortamı, b: mikroenkapsül test ortamı.

3.3.5 Antioksidan aktivite

Farklı duvar materyalleri ile enkapsüle edilen karanfil uçucu yağının antioksidan aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,20-azinobis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS) ve Ferric Reducing Antioxidant Activity (FRAP) teknikleri kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.5.1 DPPH testi

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) analizi Bilenler vd., (2015) belirttiği yöntemde bazı modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 100 µg metanolik uçucu yağ stok solüsyonu (40g/L olacak şekilde hazırlanmış) üzerine 1900 µg metanolik DPPH (absorbans 0.700 ± 0.020 , 517 nm'de) radikal solüsyonu ilave edilip, vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodunun 15 ve 30. dakikalarında 517 nm' de absorbans okumaları yapılmıştır. Farklı konsantrasyonda hazırlanan Troloks, standart antioksidan olarak kullanılmış ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Herhangi bir antioksidan ajan içermeyen solüsyon (metanol %100) kontrol olarak kullanılmıştır. Örneklerin DPPH radikal süpürme gücü Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) mmol/L olarak ifade edilmiştir. Aktif materyal olmadan üretilen kapsüller (kontrol) ve test edilen serbest forma uçucu yağ ile aynı miktarda Aktif materyale sahip mikroenkapsül miktarı etkinlik verileri yardımı ile hesaplanarak ve aynı koşullarda test edilmiştir.

3.3.5.2 ABTS testi

ABTS (2,20-azinobis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid]) analizi Karabulut vd. (2018)'in belirttiği yöntemde bazı modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. ABTS reaktif solüsyonu hazırlamak için 7.0 mM ABTS solüsyonu 2.45 mM potasyum persulfat ile 16 saat karanlıkta bekletilerek hazırlanacak, inkübasyon sonunda stok solüsyon etanol ile seyreltilerek absorbans 0.700 ± 0.020 , 734 nm'de ayarlanmıştır ve hazırlanan reaktiften 3800 µg alınmış 200 µg metanolik uçucu yağ stok solüsyonu (20 g/L olacak şekilde hazırlanmış) üzerine eklenerek 60 dk karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 734 nm absorbans okumaları yapılmıştır. Troloksun bilinen konsantrasyonları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak sonuçlar hesaplanmış ve mmol TEAC/ L olarak ifade edilmiştir. Aktif materyal olmadan üretilen kapsüller (kontrol) ve test edilen serbest forma uçucu yağ ile aynı miktarda aktif materyale sahip mikroenkapsül miktarı etkinlik verileri yardımı ile hesaplanarak ve aynı koşullarda test edilmiştir.

3.3.5.3 FRAP testi

Mikroenkapsüle ve serbest karanfil uçucu yağının ferrik indirgeme gücü (FRAP) Viuda-Martos vd.,'nin önerdiği potasyum ferrisiyanür-demir klorür yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır (Viuda-Martos vd., 2010). Kısaca 2.5 mL fosfat tamponuna (0.2 M, pH 6.6) uçucu yağdan 100 µg (20g/L olacak şekilde hazırlanmış) eklenmiş, üzerine 2.5 mL potasyum ferrik siyanid (%1) ilave edilmiştir. Karışım 50 °C'de 20 dk inkübasyona bırakılacak, ardından 2.5 mL trikloroasetik asit (%10) ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımdan 2500 µg alınarak üzerine 2500 µg su ve 500 µg %1 FeCl₃ ilave edilmiş ve 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir 30 dk inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda 700 nm'de absorbans okumaları yapılmıştır. Troloksun bilinen konsantrasyonları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi ve seyreltme faktörleri kullanılarak sonuçlar hesaplanmış ve mmol TEAC/ L olarak ifade edilmiştir.

3.3.6 Salınım testi

Mikrokapsüllerden karanfil uçucu yağ salınımı Roa vd., (2016) önerdiği yöntemde bazı değişiklikler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Gastrointestinal alanın koşullarının taklit edildiği koşullarda gerçekleştirilecek olan salınım testi için 3 g mikrokapsül 15 mL 0.1 M hidroklorik asit (pH 2) solüsyonuna ilave edilmiş 37°C 'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda ortam pH değeri 7,5 olarak ayarlanmış (5M NaOH) ve 2 saat ileri inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (her 30 dakikada bir) 0.5 mL örnek alınmış ve

son hacmi sabit tutmak amacı ile alınan örnek miktarı kadar uygun pH değerinde stok solüsyon ilave edilmiştir. Alınan örnek 1 mL etil asetata eklenerek, 1 dk vorteks ile karıştırdıktan sonra üst faz alınarak GC-FID ile analiz edilmiştir. GC-FID analiz koşulları Bölüm 3.3.1’ de verilmiştir öjenol ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak zamana bağlı salınan örnek miktarı belirlenmiştir.

3.3.7 İstatistiksel analizler

Elde edilen analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi SPSS paket programı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Karanfil uçucu yağı ve üç farklı duvar materyali ile elde edilen kapsüllerin antioksidan aktivite test sonuçlarındaki verilerin farklılığın belirlenmesi için varyans analiz (ANOVA) irdelenmiştir. Örnek gruplar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P < 0.05$ önem düzeyinde test edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Karanfil uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

Toplam uçucu yağın %97,04 'ünü oluşturan ana bileşenler Çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Karanfil uçucu yağının bileşenleri.

Alıkonma süresi	Majör Bileşen	% Alan
23.597	kopaen	0,65
25.920	β -karyofilen	14,98
27.734	α -karyofilen	4,64
29.685	naphthalene	1,85
49.937	öjenol	71,86
55.589	fenol	1,72
68.366	n-heksadekanoik asit	1,34

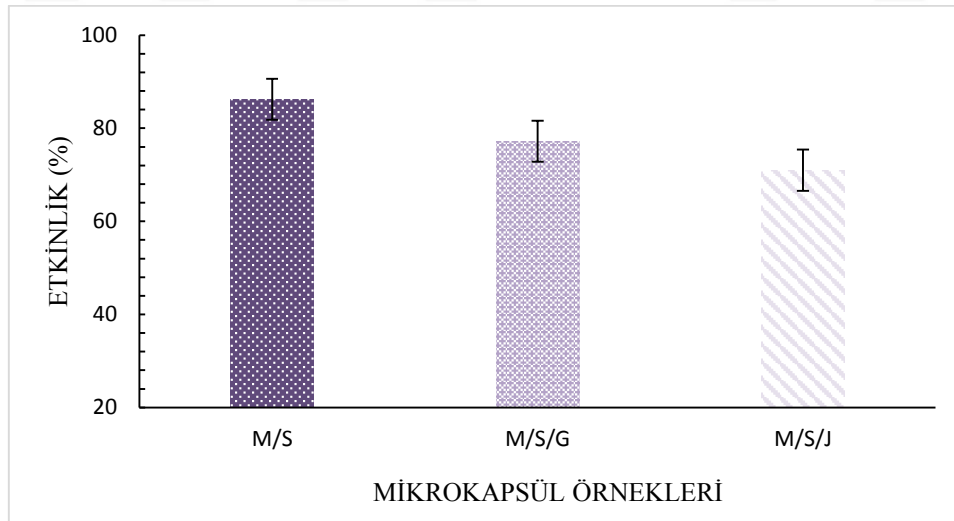
Tanımlanan bileşenler arasında öjenol (%71,86) ana fenolik bileşen olarak belirlenmiştir, diğer önemli bileşenler ise β -karyofilen (%14,98), α -karyofilen (%4,64), naftalen (%1,85), fenol (%1,72), n-heksadekanoik asit (1,34), kopaen (%0,65) olarak belirlenmiştir. Karanfilin ana bileşeni olan öjenol, karanfil uçucu yağının antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve anti-kanser özellikleri gibi biyoaktif özelliklerinden sorumludur. Bu nedenle, karanfil uçucu yağının birçok biyolojik faaliyetinin mekanizması öjenol ile ilişkilendirilmektedir. Literatürde karanfil uçucu yağ kompozisyonunun belirlendiği birçok çalışma mevcut olup elde edilen sonuçların çoğu çalışma bulgularımız ile örtüşse de bazı çalışmalar ile farklılıklar olduğu görülmüştür. Çin'den karanfil uçucu yağının bileşimini inceleyen bir çalışmada GC-MS ile toplam yağın %94,8'ini oluşturan on bileşik tespit edilmiş ve ana bileşenler öjenol (%76,8), öjenil asetat (%9,5) ve β -karyofilen (%6,0) olarak bulunmuştur (Huang vd., 2013).

Wang vd., (2021) ise hidrodistilasyon sonucu elde ettikleri karanfil uçucu yağının %96,45' ini oluşturan ana bileşenleri tanımlamışlardır: bu bileşenler öjenol (%68,95), ve asetil öjenol (%4,88), β karyofilen (%21,03), α -küben (%0,87) ve δ -cadinen (%0,72) olarak bildirilmiştir. Bitki uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu mevsimsel değişimler, bitkinin hasat zamanı ve uçucu yağın elde etme şekli gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Haro-González vd., 2021). Çalışma bulgularımız ile literatür arasında gözlemlenen minör farklılık bu veri ile açıklanabilmektedir.

4.2 Etkinlik değeri

Karanfil uçucu yağı maltodekstrin/sodyum kazeinat (M/S), maltodekstrin/sodyum kazeinat/gam arabik (M/S/G) ve maltodekstrin/sodyum kazeinat/jelatin (M/S/J) duvar materyal olarak kullanıldığı mikroenkapsülasyon yönteminde enkapsüle edilmiştir. Mikroenkapsülasyon işleminin başarısı enkapsülasyon etkinliği ile ölçülmektedir. Çalışmamızda karanfil uçucu yağının duvar materyaller tarafından yakalanma başarısı, GC-FID ile karanfil uçucu yağının baskın bileşeni olan öjenol üzerinden belirlenmiştir. Öjenol standardının farklı konsantrasyonlarında hazırlanan kalibrasyon eğrisi denklemi ve seyreltme katsayıları kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, duvar materyallerinin etkinlik değerleri yüksekten düşüğe M/S >M/S/G >M/S/J olarak sırasıyla %86,22, %77,22 ve %71 olarak belirlenmiştir.

M ve S duvar materyali karışımına diğer malzemelerin eklenmesinin mikroenkapsülasyon etkinliğini düşürmek yönünde etki yaptığı ve kaplama materyalinin mikroenkapsülasyon etkinliği için büyük önem gösterdiği görülmüştür. Maltodekstrin iyi çözünülebilirlik, düşük vizkozite ve aktif materyal için iyi bir oksidasyon stabilitesi sunması gibi avantajlara sahipken düşük emülsiyon ve film oluşturma gibi dezavantajlar da taşımaktadır.



Şekil 4.1: Karanfil uçucu yağı mikroenkapsüllerinin etkinlik değeri.

Maltodekstrin ve sodyum kazeinata gam arabik ile jelatin eklenmesi ile oluşturulan duvar materyalinin M/S duvar bileşimine göre düşük etkinlik göstermesinin düşük çözünürlük özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Düşük çözünürlük zayıf emülsiyonlaşmaya neden olabilir ki bu da düşük kapsülleme etkinliği ile sonuçlanmaktadır.

Yüzey morfolojileri ile birlikte değerlendirildiğinde ise jelatin ve gam arabik bulunan kapsüllerde çentik ve çatlaklar gözlemlenmiştir. Kaushik ve Roos, (2007)' a göre kapsüllerin yüzeylerindeki çatlak ve çentik benzeri yapılar sulandırılma davranışlarını etkileyerek düşük çözünürlüğe neden olmaktadır.

Shao vd., (2019) maltodekstrinin düşük emülsiyon oluşturma kapasitesini iyileştirmek amacıyla soya proteini, whey proteini ve sodyum kazeinatı farklı oranlarda kullanarak duvar materyal oranının ve türünün kapsülleme özellikleri üzerine etkisini araştırmıştır ve aktif materyal oranının 1:2 olduğu durumlarda farklı duvar materyallerine rağmen mikroenkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olduğunu görülmüştür. MD/SK duvar bileşiminin 2:1 oranında kullanıldığı kapsüllerde etkinlik %80, 1:1 oranında %82, 1:2 oranında kullanıldığı kapsüllerde ise yaklaşık %85 etkinliğe ulaşılmıştır. Yüksek maltodekstrin içeriği diğerlerine kıyasla daha düşük mikroenkapsülasyon etkinliği ile sonuçlansa da daha yüksek yükleme kapasitesi elde edilmiştir. Chatterjee ve Bhattacharjee, (2013) duvar materyali olarak maltodekstrin ve gam arabik kullanılarak karanfil uçucu yağı kapsülledikleri çalışmada mikroenkapsülasyon etkinliğini %65 olarak bildirmişlerdir.

Ferrari vd., (2012) %7 gam arabik ile enkapsüle edilmiş böğürtlen özünde antosiyaninlerin %78,2 etkinlik gösterdiği sonucuna ulaşırken, De Souza vd., (2015) üzüm kabuğu sulu ekstraktını kapsüllemek için %10 maltodekstrin kullanıldığında antosiyaninlerin %88,3-93,8 tutulduğunu bildirmişlerdir. Zengin antosiyanin içeriğine sahip olan kızamik meyvesinin ekstraktları maltodekstrin, gam arabik ve jelatin duvar materyallerinin farklı kombinasyonları kullanılarak kapsüllenmiştir. En yüksek (%92.83) mikroenkapsülasyon etkinliğine MD/GA bileşiminin kullanıldığı kapsüllerde ulaşıldığı bildirilmiştir (Akhavan Mahdavi vd., 2016).

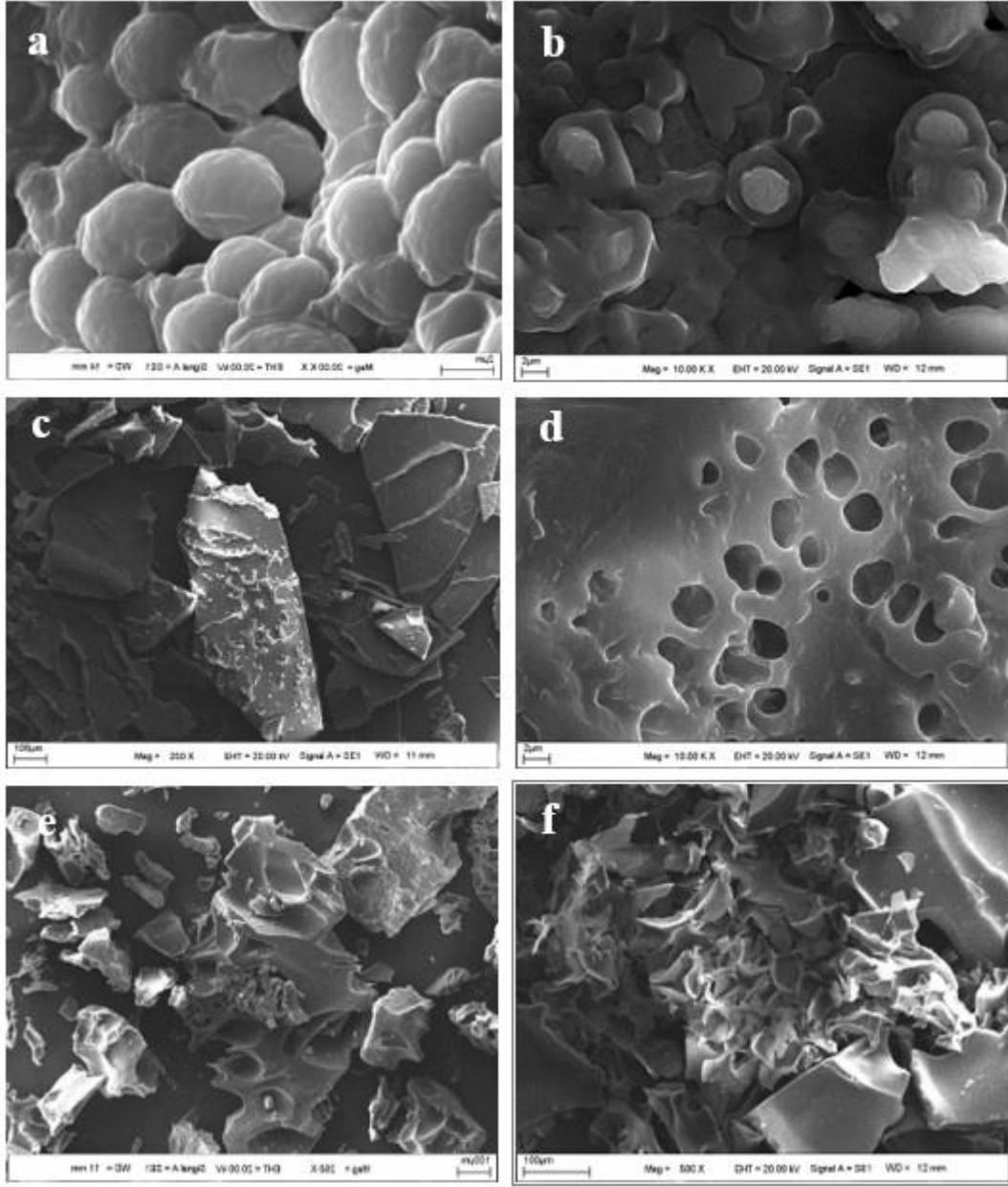
Başka bir çalışmada, karanfil yağı kapsüllemek için gam arabik kullanılmış ve enkapsülasyon etkinlik değeri %78'e kadar kaydedilmiştir (Luo vd., 2014). Karanfil uçucu yağının, iki aşamalı bir emülsiyon-iyonik jelleşme tekniği kullanılarak kitosan nanoparçacıklarında kapsüllendiği bir çalışmada; kitosan nanoparçacıklarına yüklenen karanfil uçucu yağı kapsüllerinin %55.8-73.4 arasında etkinlik göstermiştir (Hadidi vd., 2020). Sodyum kazeinat ve pektin kullanılarak hazırlanan karanfil uçucu yağı emülsiyonlarının enkapsülasyon etkinliği %87.83 olarak bildirilmiştir (Sharma vd. 2017). Karanfil uçucu yağının sprey kurutma yöntemi kullanılarak kapsüllendiği çalışmada enkapsülasyon etkinliği %97,8 olarak rapor edilmiştir (Sahlan vd., 2019)

4.3 SEM görüntüleme

Maltodekstrin/sodyum kazeinat, maltodekstrin/sodyum kazeinat/gam arabik ve maltodekstrin/sodyum kazeinat/jelatin duvar materyalleri ile kapsüllenen karanfil uçucu yağının ve aktif materyal kullanılmadan oluşturulan (boş) kapsüllerin yüzey morfolojilerindeki değişiklik ve partikül boyut dağılımları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda Şekil 4.2’de de verilmiştir.

M/S duvar bileşiminde (Şekil 4.2 a) nispeten daha küresel ve düzenli bir görünüm sergilemiştir bu da aktif materyalin daha iyi korunduğuna işaret etmektedir. Aktif materyal kullanılmadan oluşturulan (boş) kapsüllerde (şekil b, d) ise daha gözenekli bir yapı gözlemlenmiştir, bu durumun buz kristallerinden kalan boşluklardan veya donma sırasında tutulan hava kabarcıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Üzüm çekirdeği ekstresi polifenollerinin peynir altı suyu protein konsantresi (WPC), maltodekstrin (MD) ve gam arabik (GA) ile mikroenkapsülasyonunu gerçekleştiren çalışmalarda benzer morfolojik yapılar elde etmiştir (Yadav vd., 2020).

Çalışmamızda üretilen parçacıklarda karanfil uçucu yağı içeren M/S/G ve M/S/J (şekil 4.2 c, e) mikrokapsüllerinde kırık cam benzeri düzensiz yapıların oluşumunda üretimde duvar materyal çözünme ve emülsiyon oluşturma başarısının yanı sıra düzensiz ve kırık cam benzeri yapıların dondurarak kurutmanın etkisi olduğu düşünülmektedir. Mikroenkapsül üretiminde camsı yapı oluşumunun da aktif materyali olumsuz koşullardan (oksidasyonu, ısı) koruduğunu ve aktif materyalin yapısı üzerine camsı yapıların olumsuz etkisinin olmadığını bildiren Tao vd., (2017) , çalışma bulgularımız ile benzer sonuçlar rapor etmiştir. Kaushik ve Roos (2007) limoneni jelatin kullanarak mikroenkapsüle etmiş ve çalışmamızla benzer morfolojik görünüm elde etmiştir. Araştırmacı ayrıca kurutulmuş partiküllerin yüzeyinde çatlak ve çentiklerin azlığı ile tozun akış kabiliyeti ve rehidrasyonunda olumsuzluklar yaşanabileceğini bildirmiştir. Çalışmamızın ilerleyen kısımlarında söz konusu duvar materyal ile elde edilen mikroenkapsüllerin su (salınım ve antimikrobiyal) ve organik çözücü (antioksidan) ortamlarında salınım ve aktivite başarısının düşük olduğu verisi göz önüne alınırsa bulgularımız araştırmacı ile uyumludur.



Şekil 4.2: Mikropartiküllerin SEM görüntüleri.

Yapıda görülen kırışıklık benzeri yapılar duvar gelişiminden sonra partiküllerin içinde boşlukların oluşması anlamına gelirken içbükey boşluklar, genişlemenin başlamasından önce duvar materyallerinin katılaşması ile açıklanabileceği ve gam arabik kullanılarak sprey kurutma yöntemi ile kapsüllenen keten tohumu yağı mikrokapsülleri için diğer benzer morfolojik yapı bildirilmiştir (Hee vd., 2015). Maltodekstrin, gam arabik, gam arabik – modifiye nişasta , modifiye nişasta – kitosan ve modifiye nişasta – maltodekstrin – kitosan duvar materyalleri kullanılarak dondurarak kurutma yolu ile oluşturulan mikroenkapsüller, aktif materyali ısı ve oksijene maruz kalmaktan koruduğu düşünülen amorf cam benzeri bir

oluşum gösterdiği ve maltodekstrin ile oluşturulan enkapsüllerin gam arabiğe kıyasla daha az parçacık farklılıkları sunduğunu bildirmişlerdir(Chranioti, Nikoloudaki, ve Tzia, 2015).

Maltodekstrin ve gam arabik kullanılarak oluşturulan kapsüllerin sprej kurutma ve dondurarak kurutulan örneklerin SEM görüntülerinde iki kurutma metodunun partiküllerin morfolojisi üzerinde farklılıklara yol açtığı görülmüştür. Aynı metod kullanılarak görüntülenen örnekler birbirine benzerken farklı kurutma yöntemlerinde kapsüllerdeki farklılıklar göze çarpmıştır. Sprej kurutma metodunda kapsüller daha küresel ve düzenli bir şekil sergilerken; dondurarak kurutulanlarda kırıklı ve düzensiz yapı sergilediği görülmüştür ve kurutma metodunun kapsülleme verimliliği ve kapasitesini etkileyebileceğini bildirmişlerdir (Ballesteros vd., 2017).

Çalışmamızda görüldüğü gibi M/S duvar bileşimi dışındaki diğer iki kapsülün küresel formda kapsül üretmediği gözlemlenmiştir. Duvar materyal karakteristik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülen bu durum üzerinde başta çözünme ve emülsiyon oluşturma olmak üzere çeşitli faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (Kokina vd., 2019).

4.4 Antimikrobiyal aktivite

Bu çalışmada, serbest ve kapsüllenmiş formdaki karanfil uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi, altı bakteri ve iki mayaya karşı test edilmiştir. Negatif kontrol olarak serbest ve mikroenkapsül formda karanfil uçucu yağı ve içermeyen tüpler kullanılmıştır. Karanfil uçucu yağı örneklerinin MİK değerler broth dilüsyon testi ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi serbest formdaki karanfil uçucu yağı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi Gram pozitif bakteriler üzerinde: *S.mutans* (7 µg/mL), *B.cereus* (15 µg/mL) ve *S.aureus* (31 µg/mL) göstermiştir. Gram negatif bakteriler üzerinde ise gram pozitiflere oranla daha düşük bir antimikrobiyal etki göstermiştir: *Salmonella* (62 µg/mL) *S.felexneri* (62µg/mL), *E.coli* (62 µg/mL). Mayalarda ise 1000 µg/mLden daha fazla MİK değeri ile karanfil uçucu yağına karşı daha dirençli oldukları belirlenmiştir. Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere kıyasla karanfil uçucu yağına karşı daha yüksek hassasiyet sergilemesi Mangena ve Muyima (1999) tarafından Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan lipopolisakarit (LPS) tabakasının bakterilere direnç kazandırması ile açıklanmıştır.

Çizelge 4.2: Antimikrobiyal aktivite sonuçları.

Mikroorganizma	KUY	Antimikrobiyal aktivite sonuçları (MİK, µg/mL)														
		Dolu kapsül						Boş kapsül						Pozitif kontrol, (µg/mL)		Negatif kontrol
		M/S	M/S/G	M/S/J	M/S	M/S	M/S/G	M/S/J	M/S	M/S	M/S/G	M/S/J	Tetrasiklin	Ampisilin		
<i>E. coli</i>	62	125	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,56	12,5	+	
Gr(-) <i>Salmonella spp.</i>	62	125	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,56	3,12	+	
<i>S. flexneri</i>	62	125	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	3,12	12,5	+	
<i>B.cereus</i>	15	31	31	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,56	3,12	+	
Gr(+) <i>S.aureus</i>	31	31	31	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,56	3,12	+	
<i>S.mutans</i>	7	7	7	62	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1,56	1,56	+	
<i>S. cerevisiae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	Test edilmedi		+	
Maya <i>C. albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	Test edilmedi		+	

Farklı duvar materyalleri ile kapsüle edilen karanfil uçucu yağı mikroenkapsüllerinin tümünün Gram pozitif bakteriler üzerinde Gram negatif bakterilere kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği ve ayrıca mikroenkapsüller arasında MD/SK/J formülasyonunun antimikrobiyal aktivite bakımından en başarısız duvar materyal formülasyonu olduğu öne çıkan bilgiler arasındadır. Mikroenkapsüllerden M/S ve M/S/G'nin MİK değerlerinin tüm test edilen mikroorganizmalar için aynı ölçüde olduğu (*S.mutans*: 15 µg/mL, *B.cereus*: 31 µg/mL, *S.aureus*: 31 µg/mL, *Salmonella* spp.: 125 µg/mL, *S.felexneri*: 125 µg/mL, *E.coli*, 125 µg/mL) gözlemlenirken, M/S/J formülasyonunda tüm mikroorganizmalar için MİK değerlerinin daha yüksek olduğu (*S.mutans*: 62 µg/mL, *B.cereus*: 125 µg/mL, *S.aureus* : 125 µg/mL, tüm Gram negatif bakteriler için MİK >1000 µg/mL) belirlenmiştir. Çalışmamızda iki farklı maya çeşidine (*S.cereviciae* ve *C. albicans*) karşı hem serbest hem de mikroenkapsül formda karanfil uçucu yağının MİK değeri 1000 µg/mL'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstrakt ya da uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivite göstergesi olarak kabul edilen MİK değerlerinin sınır aralıkları: 100 µg/mL'ye kadar güçlü etki, 100 ile 500 µg/mL arasında orta dereceli etki, 1000 µg / mL'nin üzerinde zayıf etki olarak belirtilmiştir (Gokbulut, Bilenler, ve Karabulut, 2013). Bu veri ışığında serbest karanfil uçucu yağının tüm bakteriler üzerinde güçlü, mayalar üzerinde ise zayıf antimikrobiyal etki gösterdiği, M/S ve M/S/G mikroenkapsülünün Gram pozitifler bakteriler üzerinde güçlü, Gram negatifler üzerinde ise orta dereceli bir aktivite sergilediği, M/S/J mikroenkapsülünün ise Gram pozitif bakteriler üzerinde orta dereceli, Gram negatif bakteriler üzerine ise zayıf etki gösterdiği ifade edilebilir. Ayrıca tüm mikroenkapsül karanfil uçucu yağı formülasyonlarının mayalar üzerinde zayıf antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Kitosan ile enkapsüle edilen karanfil uçucu yağının antifungal etkisi *Aspergillus niger*'e karşı test edilmiş ve kapsülleme işlemi ile karanfil uçucu yağı antifungal etkinliğinin arttığı bildirilmiştir. Gıda ürünlerinde mikrobiyal bozulmayı önlemek için yüksek konsantrasyonlarda uçucu yağ kullanımı, lezzetlerini ciddi şekilde etkileyebilmekte; bununla birlikte, kapsülleme, kullanılan konsantrasyonu düşürerek organoleptik özelliklerin değişimini en aza indirebilmektedir (Hasheminejad, Khodaiyan, ve Safari, 2019).

Test edilen mikroorganizmalar arasında karanfil uçucu yağına en duyarlı olan bakterinin *S.mutans* olduğu görülmüştür, *S.mutans* çoğunlukla insan ağız boşluğunda bulunan Gram pozitif, fakültatif anaerobik bir bakteridir ve diş çürüğünün oluşumunda önemli bir etkidir. Bu da karanfil uçucu yağı ve onun majör bileşeni olan öjenolin diş

tedavilerinde ve uygulamalarında ağrı kesici ve tedavi amaçlı yaygın kullanılmasının bir nedenidir (Xu vd. 2013).

Çalışma sonuçlarımızda antimikrobiyal aktivite bakımından en zayıf mikrokapsül formülasyonunun M/S/J' de belirlenmesi yapıda bulunan jelatinin sudaki zayıf çözünürlüğü ve sıkı duvar oluşturma özellikleri neticesinde, oluşan mikrokapsülden karanfil uçucu yağının salınımının sınırlı kalması ile açıklanabilmektedir. Beirão-da-Costa vd. (2013) kapsüllenmiş uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesini etkileyen difüzyon hızı ve dolayısı ile salınım profili üzerinde etkili olan parametreler arasında duvar materyal özelliği, mikrokapsül üretim yöntemi ve kurutma tarzının yer aldığını bildirmiştir. Karanfil, limon ve tursi uçucu yağının gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etkinliklerinin araştırıldığı çalışmada çeşitli tiplerde Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler kullanılmıştır. Uçucu yağların başarılı etkinliği, kimyasal koruyucuların kullanımından kaynaklanan insan sağlığı problemlerinin çözümünde önemli bir rol oynayabileceğinin yanı sıra karanfil uçucu yağının, mantar ve bakteri türlerine karşı limon otu ve tursi uçucu yağlarından daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, karanfil uçucu yağı limon otu ve tursi uçucu yağından daha ucuz olduğu için gıda kaynaklı patojenlere karşı bir gıda koruyucu olarak kullanılması daha ekonomik ve ümit verici olabileceği rapor edilmiştir (MONIKA YADAV vd., 2019).

Literatürde karanfil uçucu yağının ve kapsüllerinin antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı çalışmalarda farklı MİK değerlerine ulaşıldığı görülmektedir. Sun vd. (2021) karanfil uçucu yağı emülsiyonlarının *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkisini test etmişlerdir ve karanfil yağı nanoemülsiyonunun *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 500, 250 µg/mL olarak bildirmişlerdir. Kazein duvar materyali kullanılarak karanfil uçucu yağının *S.mutans*'a karşı test edildiği bir çalışmada MİK değeri 0,25 mg/mL olarak rapor edilmiştir (Sahlan vd., 2019).

Radünz vd., (2019) karanfil uçucu yağını *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium* için güçlü bir inhibitör (MİK 0.304 mg/mL) olarak bildirmiştir. Karanfil uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin oldukça yüksek olduğu bilinmekte ve bu durum bileşiminde yüksek miktarda öjenol ile açıklanmaktadır (Nazaro vd., 2013). Öjenolün antibakteriyel aktivitesinin ve *S. typhi*'ye karşı etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada bu bileşiğin anti-salmonella aktivitesinin, öjenolün bakteriyel hücre zarı üzerindeki etkisinden kaynaklandığını bildirmiştir. İnhibisyon mekanizmasını; öjenolün ilk olarak zar geçirgenliğini değiştirmesi bu hiper geçirgenliği, iyonların sızması ve diğer

hücrel içeriklerin büyük ölçüde kaybının izlemesi ve sonrasında hücre ölümünün gerçekleşmesi ile açıklamıştır (Devi vd., 2010). Bakteri inhibisyonunda sitoplazmik zarın öjenolün eylemi için bir hedef olduğu varsayımını doğrulamak amacıyla öjenol ile muamele edilmiş *L. monocytogenes*'den K⁺ iyonlarının akışını inceledikleri çalışmada sonuç olarak bu bileşiğin *L. monocytogenes* hücrelerinin K⁺ iyon geçirgenliğini artırdığını ve öjenolün bakterisidal konsantrasyonunun eklenmesinin fosfat tamponlu salin (PBS) ortamında K⁺ salınımını büyük ölçüde artırdığını kanıtlamıştır (Filgueiras ve Vanetti, 2006).

Özetle karanfil uçucu yağının antimikrobiyal etkisi, öjenolün varlığına atfedilir. Karanfil uçucu yağının serbest olarak ya da farklı kabuk materyalleri ile enkapsüle edildiği çalışmalarda tespit edilen antimikrobiyal aktivite değerindeki farklılıklar duvar materyali bileşimi, mikroenkapsülasyon prosesi, mikroenkapsülasyon etkinliği ve duvar materyali ile aktif materyal arasındaki interaksyonları veyahutta kullanılan yağın elde edilme prosesi, karanfillerin yetiştikleri bölge ve içerdikleri öjenol miktarından kaynaklandığı düşünülebilir (Radünz vd., 2019).

4.5 *In situ* antimikrobiyal aktivite

İkincil bitki metabolitleri ve özellikle uçucu yağlar, yiyecekleri korumak için benzersiz bir yeteneğe sahiptir. Mikroorganizmaların büyümesini önleyen bu etkiyi fenolik ve antimikrobiyal bileşikler aracılığıyla gösterirler. Karanfilin biyolojik koruyucu ve tatlandırıcı ajan olarak kullanılmasında, gıda ürünleri üzerinde kabul edilebilir ve arzu edilen etkiler sağlayan biyoaktif özellikler etkilidir (Ahmadabadi vd., 2022).

Gıda sistemlerinde karanfil uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini ölçmek, gıda bileşenlerinin (özellikle yağ) ve pH değerinin söz konusu aktivite üzerine etkisini belirlemek amacı ile test ortamı olarak vişne suyu (pH 2,81), kayısı suyu (pH 3,23) ve tam yağlı süt (pH 6,21) seçilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin yerinde (*in situ* olarak) belirlenmesinde test mikroorganizması olarak *E.coli*, antimikrobiyal ajan olarak ise serbest ve M/S duvar materyali ile mikroenkapsüle edilen karanfil uçucu yağı kullanılmıştır. Gerek test mikroorganizmasına, gerekse mikrokapsül formülasyonu ve konsantrasyonuna karar verilirken MİK değerlerinden faydalanılmıştır. Bu amaçla her bir test ortamından 2 set (birinci set serbest karanfil uçucu yağı için, ikinci set mikroenkapsüle KUY için kullanılmıştır) otoklavda steril edilen her test ortamlarına *E. coli* (10⁵ kob/mL) inoküle edilmiş, serbest ve mikroenkapsüle karanfil uçucu yağı eklendikten sonra belirli zaman periyotlarında örnekler alınarak 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ seyreltileri yapılmış ve yayma yöntemi ile

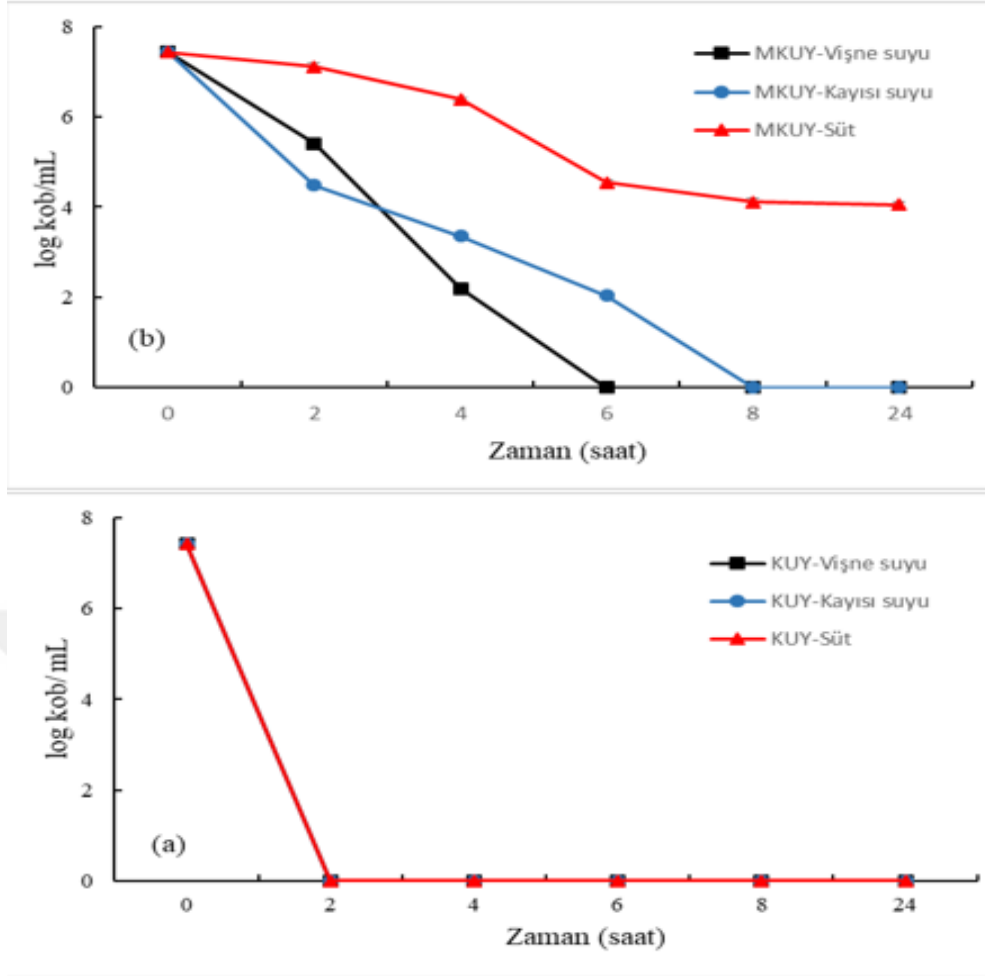
ekimler tamamlanmıştır. İnkübasyona bırakılan petrilere alınan ortalama sonuçlar Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi logaritmik koloni oluşturma birimi/mililitre (log kob/ mL) birimi ile ifade edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde serbest formdaki karanfil uçucu yağının her üç gıda ortamında da eklendikten sonra bakteriyel büyümeye izin vermediği gözlemlenmiştir. Karanfil uçucu yağının diğer uçucu yağlar da olduğu gibi, antimikrobiyal aktivitesi sahip olduğu bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Hidrofobik karakterde olan uçucu yağ ve bileşenleri hücre zarında bulunan fosfolipidlerle etkileşime girmekte ve hücre zarını daha geçirgen bir forma dönüştürmektedir. Bu da membran potansiyelinin kaybına ve hücre içeriğinin (potasyum iyonları ve adenosin trifosfat (ATP) sızmasına neden olmakta ve dolayısı ile hücre ölmektedir (Hatab vd., 2016).

Kapsül formdaki karanfil uçucu yağının diğer test ortamlarına kıyasla, pH değeri en düşük ortam olan (2,81) vişne suyunda ilk 4 saat içinde hızlı bir redüksiyon ile %100 inhibisyon gerçekleştirdiği Çizelge 4.3'de görülmektedir. En yavaş redüksiyonun tam yağlı süt ortamında gerçekleştiği, 24 saatlik süre sonunda *E.coli* inhibisyonunun % 37,42 olduğu dikkat çekmektedir. Tam yağlı süt hem en yüksek pH (6,21) değerine sahip, hem de bileşiminde %3,3 civarlarında yağ içeren bir test ortamıdır. Smith-Palmer, Stewart, ve Fyfe (2001) karanfil, tarçın, defne ve kekik uçucu yağlarını 1:10 oranında seyrelterek krem peynirde *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis*'e karşı test etmişlerdir. Düşük yağ oranına sahip olan krem peynirde yüksek yağlı krem peynire göre daha güçlü inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiş, araştırmacılar krem peynirdeki yağ oranının, kullanılan uçucu yağ karşı bakteri hücrelerini farklı oranda koruduğu bildirilmiştir.

Mikroenkapsüle karanfil uçucu yağ antimikrobiyal aktivitesinin test ortamının pH değeri ile ters orantılı olarak şekillendiği gözlemlenmiştir. Mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının testin ilk 6. saatinde inhibisyon başarısı vişne, kayısı ve süt ortamlarında sırası ile %100, %72,54 ve %38,76 iken pH değerleri sırası ile 2,81, 3,23 ve 6,21 dir. Bir başka anlatımla, vişne suyu ortamında %100 inhibisyon 4 saate, kayısı suyu ortamında %100 inhibisyon 8 saate belirleniyorken test edilen süre içinde süt ortamında %100 inhibisyon başarılamamıştır. Test ortamındaki pH ve mikroenkapsülün antimikrobiyal aktivitesi arasında belirlenen söz konusu durumun düşük pH değerinin mikroenkapsülden karanfil uçucu yağ salınımını tetiklemesi sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Gıdaların pH değeri ne kadar düşükse, uçucu yağlar ve bileşenlerinin antimikrobiyal etkinliği o kadar yüksektir (Burt, 2004). Çalışma bulgumuz literatür verisi ile oldukça tutarlıdır. 4 °C'de depolama süresi boyunca tavuk filetolarının stabilitesini artırmak ve antimikrobiyal ve kalite

özelliklerini geliştirmek amacı ile biyo koruyucu olarak soya fasulyesi ve mısır yağlarından hazırlanan karanfil uçucu yağı yüklü nanoemülsiyonlar kullanılmıştır. Farklı nanoemülsiyonlarla kaplanmış tavuk filetolarının toplam ve psikrofilik bakteri sayılarındaki değişiklikler, önemli ölçüde nanoemülsiyon formülasyonuna ve numunelerin 4 °C'nin altındaki saklama süresine bağlı olduğu, boş nanoemülsiyonlar ile kaplanan filetolara kıyasla karanfil uçucu yağı yüklü nanoemülsiyonların tavuk filetoların stabilitelelerinin korunmasında daha etkili olduğu bildirilmiştir (Ahmadabadi vd., 2022).

Negi (2012) pH değerinin düşmesi ile uçucu yağların hidrofobitesinin artma eğiliminde olduğunu ve bu sayede bakteri hücre duvarından daha rahat geçerek daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergileyeceğini, dolayısı ile uçucu yağların biyoaktivitelerinin pH ile ters orantılı olduğunu bildirmiştir. Gıdaların bileşimsel özellikleri (yağ, protein, karbonhidrat, tuz ve su oranı gibi) ve fiziksel yapıların uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerini azaltma yönünde etki gösterdiği bilinmektedir. Özellikle protein ve yağ içeriği yüksek olan gıdalarda uçucu yağların antimikrobiyal başarılarının düştüğü bildirmiş, bu durumun sebebi olarak da söz konusu gıda bileşenlerinin bakterilerin etrafını bir film gibi sararak uçucu yağları absorblamak sureti ile bakteriler ile temaslarını engellemelerini göstermiştir. Roller ve Seedhar (2002) yaptıkları çalışmada karvakrol ve sinnamaldehit uçucu yağları, daldırma çözeltisinde 0.15 µg/mL'de kullanıldığında kivi üzerindeki doğal floranın canlı sayısını azaltmada çok etkili olduğunu ancak şeker kavunu üzerinde daha az etkili olduğunu rapor etmişlerdir ve bu sonucun meyveler arasındaki pH farkı (kivinin pH'ı 3.2-3.6 ve kavunun pH'ı 5.4-5.5) ve şeker oranı ile ilgili olabileceğini bildirmiştir. Araştırmacılar farklı gıda bileşenlerinin antimikrobiyal aktivite üzerinde farklı etki gösterdiğini örneğin su ve tuz gibi bileşenlerin uçucu yağların antimikrobiyal etkinliğini arttırdığını, şekerlerin ise olumsuz etki gösterdiğini bildirmiştir (Gutierrez, Barry-Ryan, ve Bourke 2008).



Şekil 4.3: *In-situ* antimikrobiyal aktivite testinde karanfil uçucu yağı (KUY) (a) ve mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının (MKUY) (b) *E.coli* üzerindeki redüksiyon hızı.

Lipozom kapsülü ve serbest formdaki karanfil uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi *S.aureus* ve *E.coli* ye karşı hem kontrol ortamı (besiyeri) hem de gıda sisteminde (soya peyniri) test edilmiştir. Kontrol ortamında serbest ve mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının her iki mikroorganizma üzerinde oldukça etkili olduğu ancak gıda sisteminde *E.coli* inhibisyonunun azaldığı bildirilmiştir (Cui, Zhao, ve Lin 2015).

E. coli ile kontamine olmuş elma suyunda uçucu yağların antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada asidik pH (yaklaşık 3,7) değerine sahip elma suyunun uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi üzerine önemli bir etkide bulunmadığı bildirilmiştir (Friedman vd., 2004).

Et ürünlerinde kullanılan kanserojenik etkileri olduğu bilinen nitritler, renk ve tat gibi et ürünlerine özgü duyuşal özelliklerden de sorumlu olduklarından, bunların yağ ile

tamamen ikame edilmesi, bu ürünlerden beklenen duyuşal özellikleri sağlamak için alternatif katkı maddelerinin kullanılmasını da gerektireceği bilinmektedir. Kapsüllenmiş ve serbest haldeki karanfil uçucu yağının *S.aureus*'a karşı burger benzeri etlerde *in situ* antimikrobiyal aktivite testi yapılmış ve ürünün korunmasında kullanılan nitritlere (nitrozamin oluşturdukları için potansiyel kanserojen kabul edilmektedirler) kıyasla daha etkili oldukları rapor edilmiştir (Radünz vd., 2019). Aralarında karanfil uçucu yağının da bulunduğu çeşitli doğal antimikrobiyal ajanlar sodyum aljinat ile enkapsüle edilmiş ve tavuk göğsünün depolama süresi boyunca mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Tavuk göğsünün raf ömrünün uzatılmasında sonuçların oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir (Hosseini vd., 2021).

Karanfil uçucu yağının antimikrobiyal özelliğinden yapıda baskın miktarda bulunan öjenolün sorumlu olduğu bilinmektedir. Nanodisperse edilen öjenol %4, %2 yağ içeriğine sahip ve yağsız sütün raf ömrünü uzatmak için kullanılmıştır. Nanodisperse eugenol, yağsız süt ortamında 3.5 g/L'da *E. coli* 'nin büyümesini tamamen inhibe ederken, tam yağlı süt ortamında inhibisyonun daha yüksek konsantrasyonda gerçekleştiği (4.5 g/L) karanfil uçucu yağ bileşimdeki yağ miktarının artışı ile ters etki gösterdiği bildirilmiştir (Majeed vd., 2015).

4.6 Antioksidan aktivite kapasitesinin belirlenmesi

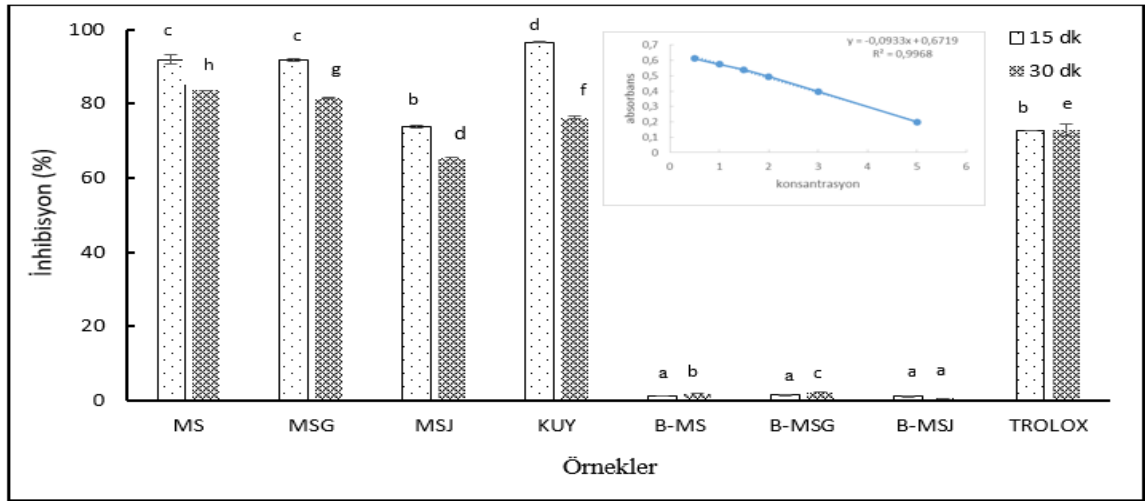
Serbest radikal zincir reaksiyonu, yaygın bir şekilde lipid peroksidasyonunun ortak bir mekanizması olarak kabul edilmektedir. Radikal temizleyiciler, peroksidasyon zincir reaksiyonunu sona erdirmek ve gıda ürünlerinin kalitesini ve stabilitesini iyileştirmek için doğrudan peroksit radikalleri ile reaksiyona girmekte ve onları söndürmektedir. Antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde basit, hızlı, hassas ve tekrarlanabilir prosedürleri nedeniyle en popüler spektrofotometrik yöntemler arasında DPPH ve ABTS⁺ ve FRAP yer almaktadır (Gülçin, Elmastaş, ve Aboul-Enein 2012). Serbest ve mikroenkapsüle formda karanfil uçucu yağının antioksidan aktivitesini belirlemek amacı ile DPPH, ABTS⁺ ve FRAP testleri kullanılmıştır

4.6.1 DPPH Testi

Stabil serbest radikal olan DPPH alkol içinde çözüldüğünde 517 nm'de karakteristik bir absorpsiyon sergilemektedir. Antioksidan moleküller, hidrojen vericisi olarak hareket eder ve DPPH tahlil solüsyonunun rengini koyu mordan açık sarıya çevirerek serbest

radikalleri temizlemekte, bu da absorbans değerinde bir azalmaya neden olmaktadır. Test ortamında serbest halde karanfil uçucu yağı (20 µg/mL) ve aynı miktarda karanfil uçucu yağı içeren (mikroenkapsülasyon etkinliği ile hesaplanmıştır) farklı duvar materyalleri (M/S, M/S/G, M/S/J) ile hazırlanan karanfil uçucu yağı kapsülleri, sadece duvar materyalden oluşan boş kapsüller (kontrol) ve serbest haldeki karanfil uçucu yağının antioksidan aktivitesi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile ve 15 ve 30. dakikalarda ölçülmüş ve sonuçlar % inhibisyon olarak verilmiştir.

Şekil 4.3’de görüldüğü kapsül ve serbest haldeki karanfil uçucu yağı inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında 15. dk ölçümlerinde uçucu yağ kapsüllere kıyasla daha yüksek aktivite gösterirken 30. dk ölçümlerinde uçucu yağın aktivitesi kapsüllere kıyasla daha fazla düşüş göstermiştir. On beşinci dakika için antioksidan aktiviteler sıralandığında KUY > M/S > M/S/G > M/S/J > troloks > boş kapsüller iken 30. dk antioksidan aktivitelerde ise M/S > M/S/G > KUY > Troloks > M/S/J > boş kapsüller şeklinde sıralanmıştır aktif materyal olmadan elde edilen boş kapsüllerde ise herhangi bir antioksidan aktiviteye rastlanmamıştır.



Şekil 4.4: DPPH yöntemi ile antioksidan test sonuçları.

Karanfil uçucu yağının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Akdeniz beslenmesinde yaygın olarak kullanılan beş baharattan elde edilen uçucu yağların antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH testi yapılmıştır ve en güçlü (%98.74) radikal süpürme aktivitesi karanfil uçucu yağında görülmüştür (Viuda-Martos vd., 2010). Gülçin, Elmastaş ve Aboul-Enein (2012) BHA, BHT, α -tokoferol ve trolox radikal süpürücüler için referans olarak kullandıkları çalışmada karanfil uçucu yağı DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkisi 45 µg/mL konsantrasyonunda, karanfil uçucu yağı > BHT > α -

tokoferol>BHA>Trolox sırasıyla %83.6, 67.8, 64.9, 62.5 ve %29.4, olarak bildirmişlerdir. Maltodekstrin kullanılarak hazırlanan karanfil uçucu yağı nanoemülsiyonlarının antioksidan aktivitesini DPPH tekniği ile incelenmiş, karanfil uçucu yağı nanoemülsiyonları 100 µg/mL'lik konsantrasyonda maksimum %80'lik bir inhibisyon gösterirken serbest formdaki karanfil uçucu yağının %40 düzeyinde bir inhibisyon sergilediği bildirilmiştir. Kapsülleme işlemi uçucu yağlarda sadece uçucu bileşenlerin buharlaşma oranını düşürmekle kalmaz, aynı zamanda oksijen ve sıcaklık gibi olumsuz etkilere karşı koruma sonucunda bu biyoaktif maddelerin serbest formlarına göre antioksidan aktivitesini artırmaktadır (Nagaraju vd., 2021).

Hadidi vd. (2020) kitosan nanopartiküllerine karanfil uçucu yağını kapsülleyerek serbest ve kapsül formdaki uçucu yağın antioksidan aktivitesini incelemişler ve çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde kapsüllemiş formdaki uçucu yağın daha fazla antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

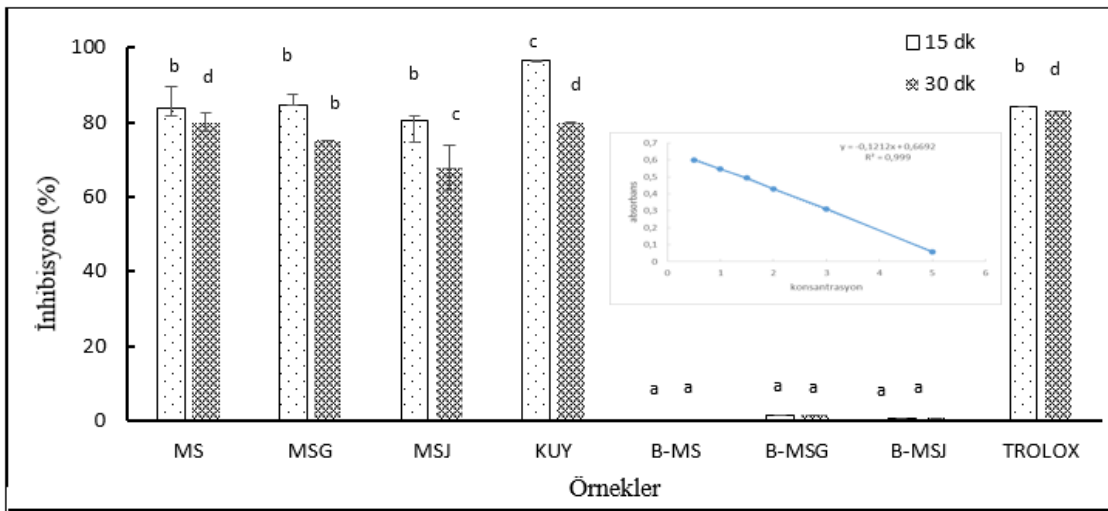
Kekik uçucu yağını zein partiküllerinde kapsüllemesi sonucunda antioksidan aktivitenin daha uzun süre gözlemlenebildiği ve gıdalarda antioksidan aktivite özellikleri nedeniyle kekik yağının kapsüllemiş formunun kullanılabilirliğini rapor ettiler (Bilenler vd., 2015).

Öjenolün termal stabilitesini arttırmak amacı ile kitosanın duvar materyal olarak kullanıldığı emülsiyon-iyonik jelleşme yönteminden elde edilen kapsüllemiş öjenolün serbest öjenole kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği belirtilmiştir (Woranuch ve Yoksan 2013).

El Ghallab vd. (2019) 0,8 mg/mL'lik etkili bir konsantrasyonda, karanfil uçucu yağının süpürme gücünü % 71,62 olarak belirttiler. Radünz vd. (2019) ise sodyum aljinat kullanarak kapsülledikleri karanfil uçucu yağının DPPH süpürme aktivitesini 484,7 mg/mL de %94,86 olarak tespit etmişlerdir. Sebaaly vd. (2016) siklodekstrin içinde kapsüllemiş karanfil uçucu yağı için %89,3 ile %92,31 arasında değişen DPPH süpürme gücü elde etmişlerdir. Literatürde yer alan kapsüllemiş karanfil uçucu yağının antioksidan aktivitesi ile ilgili veriler ile çalışma sonuçlarımız kıyaslandığında, küçük farklar olduğu görülmüştür. Bu farklılıklar kullanılan duvar materyalinin salım özellikleri, yükleme kapasitesi, çözünürlük özellikleri ve yöntemdeki küçük farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.6.2 ABTS testi

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve birçok uçucu yağın antioksidan aktivitesinin bu bileşiklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu çalışmada serbest halde karanfil uçucu yağının (20 µg/mL) ve aynı miktarda karanfil uçucu yağı içeren (mikroenkapsülasyon etkinliği ile hesaplanmıştır) farklı duvar materyalleri (M/S, M/S/G, M/S/J) ile hazırlanan karanfil uçucu yağı ve aktif materyal kullanılmadan oluşturulan boş kapsüllerin (kontrol) 15 ve 30. dakikalarda 734 nm’de absorbans okumaları yapılarak radikal süpürme kapasiteleri %inhibisyon olarak verilmiştir.



Şekil 4.5: ABTS Yöntemi ile antioksidan aktivite test sonuçları.

Şekil 4.4’de görüldüğü gibi DPPH test sonuçları ile benzer olarak; 15. dakikada en yüksek antioksidan aktiviteyi serbest formdaki karanfil uçucu yağı göstermiştir. Devam eden inkübasyon süresi boyunca örneklerin inhibisyon güçlerinde bir azalma gerçekleştiği, en yüksek düşüşün serbest karanfil uçucu yağında olduğu belirlenmiştir. Otuz dakikalık inkübasyon sonunda örneklerin % inhibisyon değerleri Troloks> karanfil uçucu yağı > M/S > M/S/G > M/S/J olarak belirlenmiştir. Şu anda en yaygın kullanılan antioksidanlar BHA, BHT, propil gallat ve tert butilhidrokinondur. Bunun yanı sıra BHA ve BHT'nin karaciğer hasarı ve karsinojenezden sorumlu olduğundan şüphelenilmektedir. Bu zararlı olduğu düşünülen antioksidanlara alternatif olarak bazı bitki ve baharatlardan elde edilen uçucu yağlar kullanılmaktadır, karanfil uçucu yağı içerisindeki majör bileşen olan öjenolden dolayı yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir. Karanfil uçucu yağı ve sentetik antioksidanların ABTS radikal süpürme gücünün kıyaslandığı çalışmada 45 ug/mL konsantrasyonunda BHA = karanfil uçucu yağı > BHT > α-tokoferol> trolox,

konsantrasyonunda % 100, % 98,7, 97,8, 86,3 ve % 4,4 olduğu bildirilmiştir (Gülçin, Elmastaş, ve Aboul-Enein 2012).

Serbest formdaki karanfil uçucu yağın antioksidan aktivitesinde daha yüksek bir düşme gözlemlenirken kapsüllerin antioksidan aktivitesinde zamanla daha küçük bir azalma belirlenmiştir. Mikroenkapsülasyon, yalnızca kontrollü salınım ve uçucu yağların gelişmiş biyo-erişilebilirliğinde gelişim sağlamakla kalmaz, aynı zamanda uçucu yağların olumsuz koşullara karşı kararlılığını da arttırmaktadır. Majeed vd. (2015) aynı veya daha düşük konsantrasyonda bile serbest yağa kıyasla kapsülleme matrisinde uçucu yağların artan biyoaktivitelerinin (antimikrobiyal ve antioksidatif) olduğunu ve bu durumun uçucu yağların oksidasyon, izomerizasyon, polimerizasyon, termal yeniden düzenlenmeler ve bozunmaya karşı dirençlerini artırdığını bildirmişlerdir.

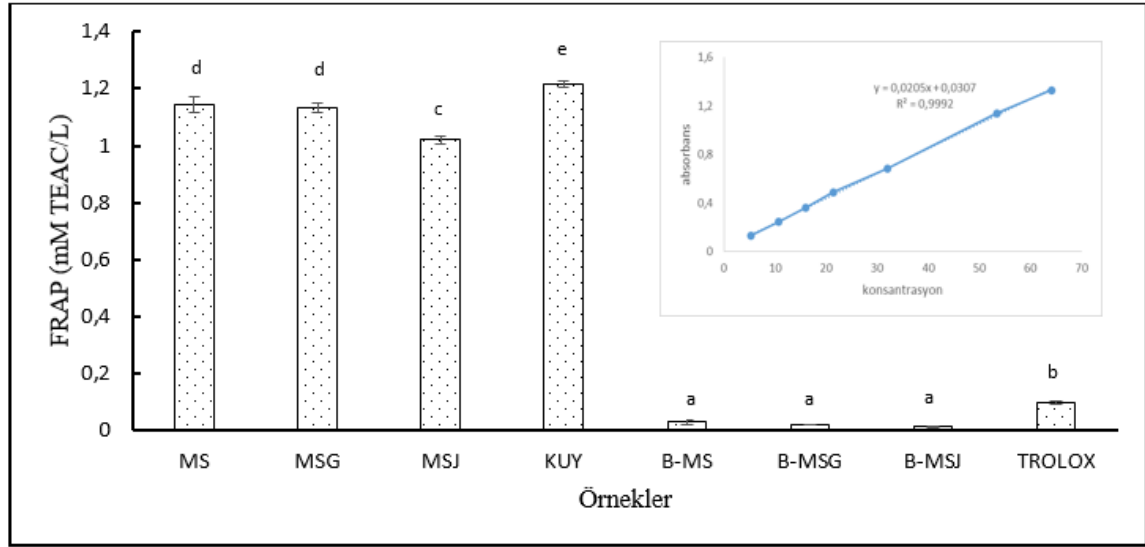
Aralarında karanfil uçucu yağının da bulunduğu 10 adet uçucu yağın farklı duvar materyalleri ile mikroenkapsüle edilmeleri sonucunda en yüksek ABTS radikal süpürme gücünün karanfil uçucu yağın da olduğu mikroenkapsülasyon işlemi ile elde edilen son ürünün gıda ve ilaç endüstrisinde kullanım kolaylığı sağlayacağı, ayrıca söz konusu işlem ile antioksidan aktivitenin arttığı bildirilmiştir(Fadel vd., 2020).

4.6.3 FRAP

FRAP yöntemi, plazma veya botanik alanlardaki örneklerin antioksidan aktivitelerini belirlemek amacı ile yaygın uygulanabilen basit, çok hızlı, ucuz ve tekrarlanabilir bir tekniktir. FRAP testinde serbest formda karanfil uçucu yağı (60 µg/mL), serbest karanfil uçucu yağı ile aynı konsantrasyonda karanfil uçucu yağı içeren (mikroenkapsülasyon etkinliği ile hesaplanmıştır) farklı duvar materyalleri ile elde edilen mikroenkapsüller ve kontrol (boş) mikroenkapsüller test edilmiştir. Test edilen tüm kapsüllenmiş ve serbest formdaki karanfil uçucu yağı için demir indirgeme gücü bulunmuş ve sonuçlar mili mol troloks eşdeğeri antioksidan kapasite/ litre (mM TEAK/L) birimi ile verilmiştir.

Test edilen konsantrasyonda serbest karanfil uçucu yağı ve mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının sonuçlarına bakıldığında (Şekil 4.5) örneklerin demir indirgeme güçleri arasındaki sıralamanın karanfil KUY>MD/SK>MD/SK/GA>MD/SK/J>troloks olduğu bulunmuş ve boş kapsüllerde ise herhangi bir etkinlik gözlenmemiştir. Kapsüller arasında DPPH ve ABTS sonuçlarımız ile benzer şekilde en yüksek antioksidan aktiviteyi 1.145 mM TEAC/L ile MD/SK duvar bileşimi gösterirken düşük etkinliği ve salım gücünün az olması nedeniyle en düşük aktiviteyi MD/SK/J duvar bileşiminde gözlemlenmiştir. Kapsüllemenin

karanfil uçucu yağının dış etkenlerden etkilenmesini engellediği ve antioksidan aktivitesini daha uzun süre korumasına yardımcı olduğu görülmüştür. Elde edilen değerler de göstermektedir ki karanfil uçucu yağı yüksek antioksidan etkiye sahip olmakla birlikte bu etkiyi kapsüllendiği duvar materyalde oldukça etkiler.



Şekil 4.6: FRAP yöntemi ile antioksidan aktivite test sonuçları.

Çalışmamızla uyumlu olarak, Akdeniz beslenmesinde yaygın olarak kullanılan beş adet bitkiden elde edilen uçucu yağların antioksidan aktivitesinin incelendiği çalışmada analiz edilen tüm konsantrasyonlarda karanfil uçucu yağı, Trolox konsantrasyonları açısından en yüksek demir indirgeme kapasitesini göstermiş ve bunu kekik uçucu yağı takip etmiştir. Adaçayı ve biberiye uçucu yağının, karanfil ve kekik uçucu yağına kıyasla çok az demir azaltma kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Karanfil uçucu yağının antioksidan aktivite değeri 50 mg/mL konsantrasyonda 1.47 mM TEAC/L olarak bildirilmiştir (Viuda-Martos vd. 2010).

Gülçin, Elmastaş, ve Aboul-Enein (2012) tarafından karanfil uçucu yağının antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, karanfil yağının standartla karşılaştırıldığında indirgeme gücü, DPPH radikali ABTS radikali ve süperoksit anyon radikal süpürme, hidrojen peroksit süpürme ve metal şelatlama aktiviteleri gibi farklı in vitro analizlerde etkili bir antioksidan olduğu bulunmuştur. Karanfil, karanfil ağacının kurutulmuş çiçek tomurcuklarıdır ve bazıları oldukça etkili antioksidanlar ve antimikrobialer olan bir dizi biyoaktif bileşik içerir. Karanfil ağacının kuru çiçek tomurcuğundan elde edilen karanfil

uçucu yağı (*Syzygium aromaticum* L.), öjenol ve diğer fenolik bileşiklerin varlığı nedeniyle antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahiptir (Radünz vd., 2019).

Doğal antioksidanlar olarak uçucu yağlar, oksidasyon reaksiyonlarını yavaşlatmak için çeşitli etki mekanizmalarına sahiptir. Zincir başlangıcının önlenmesi ve sürekli hidrojen soyutlanması, serbest radikal süpürücüler ve sonlandırıcılar, singlet oksijen oluşumunun söndürücüleri ve geçiş metal iyonu katalizörlerinin bağlanması, etki mekanizmaları arasındadır. Fenolik bileşikler, birkaç uçucu yağın baskın bileşenleri arasındadır ve bazı uçucu yağların toplam bileşiminin % 85'ini oluşturabilir. Karvakrol, öjenol ve timol en iyi bilinen fenolik bileşikler arasındadır. Bu bileşikler, birincil antioksidanlar veya zincir kırıcı antioksidanlar ve etkili serbest radikal süpürücüler olarak tanımlanabilir. Antioksidan olarak aktiviteleri üç aşamada gerçekleşir: başlama, yayılma ve sonlandırma. Hidroksil grupları (-OH) genellikle doymamış yağ asitlerinin oksidasyonundan üretilen serbest radikalleri (lipit peroksil ve lipit alkoksil radikalleri) inaktive eden ve hidrojen veren bölgesidir. Bu redoks özellikleri, onları etkili antioksidanlar yapan ve diğer bileşiklerin oksitlenmesini önleyen serbest radikale bir elektron bağışlama yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Bu reaksiyonlar, doymamış lipidlerden hidrojen atomlarını çıkaramayan yeni radikallerin oluşumuna yol açar. Ortaya çıkan bu radikaller, radikal olmayan türler, inaktive edici peroksil radikalleri (ROO•) ve sonlanma reaksiyonları ile sonuçlanan benzer radikaller veya lipid radikalleri ile reaksiyona girebilir. Bu bağlamda, fenolik bileşikler, lipit oksidasyonunu önlemek, oksidasyon başlatma reaksiyonlarının inhibitörleri olarak hareket etmek gıda ürünlerinde lipid bozulmasını önlemek için kullanılabilir (Pateiro vd., 2018).

Çizelge 4.3: Antioksidan aktivite test sonuçlarının değerlendirilmesi.

Örnek	DPPH (%İnhibisyon)		ABTS (% İnhibisyon)		FRAP (mM TEAC/L)
	15 dk	30 dk	15 dk	30 dk	
M/S	92,01±1,26c	83,61±0,00h	83,99±5,80b	79,96±2,42d	1,15±0,03d
M/S/G	91,80±0,39c	81,69±0,19g	84,68±2,90b	75,24±0,00b	1,13±0,02d
M/S/J	73,84±0,29b	69,51±0,10d	80,57±1,16b	76,72±6,00c	1,02±0,01c
KUY	96,58±0,19d	76,37±0,39f	95,50±0,19c	80,03±0,19d	1,21±0,01e
B-M/S	1,09±0,00a	1,78±0,00b	0,14±0,00a	0,14±0,00a	0,03±0,01a
B-M/S/G	1,30±0,29a	2,19±0,00c	1,64±0,00a	1,64±0,00a	0,02±0,00a
B-M/S/J	1,02±0,10a	0,41±0,00a	0,82±0,00a	0,82±0,00a	0,01±0,00a
TROLOX	72,88±0,00b	72,88±1,64e	84,13±0,00b	83,17±0,00d	0,10±0,01b

15 dakika boyunca 400µg/mL konsantrasyonda serbest KUY'un DPPH ve ABTS süpürme kapasitesi %96,58 ve %96,50 idi. Literatürde KUY antioksidan aktivite sonuçları çalışma verilerimizle uyumludur (Radünz vd. 2019). DPPH testinde 15. dakikadan 30. dakikaya kadar ilerleyen inkübasyon sırasında tespit edilen inhibisyon kaybı serbest formdaki KUY için %20,93 iken M/S, M/S/G, M/S/J mikrokapsülleri için sırasıyla %9,13 , %11,01 , %5,86 idi. ABTS testinde, DPPH ile aynı test koşullarında belirlenen inhibisyon kaybı, serbest KUY için %16,20 iken, M/S, M/S/G, M/S/J mikroenkapsülleri için sırasıyla %4,80 , %11,15, %4,78 idi. Aynı prensipte çalışan DPPH ve ABTS test sonuçlarında küçük farklılıklar tespit edildi. Literatürde bu durum DPPH radikalini rezonans ile stabilizasyonunu sağlayan yan zincirlerdeki çift bağların oluşturduğu sterik faktör ile açıklanmaktadır (Pramod vd. 2015).

DPPH testinin 15. Dk sonuçlarına baktığımızda en yüksek süpürme gücünün karanfil uçucu yağında görülürken kapsüllerde süpürme gücünü incelediğimizde sırasıyla M/S, M/S/G, M/S/J kapsülleri olduğu görülmüştür. Süpürme gücünde oluşan fark istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). DPPH testinin 30. Dakika test sonuçlarında en yüksek aktivite kapsüllerde görülürken (M/S> M/S/G> M/S/J) KUY'da daha dramatik bir düşüş görülmüştür. DPPH 30. dakika test sonuçlarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$). Boş mikrokapsüllerde ise antioksidan aktivite görülmemiştir.

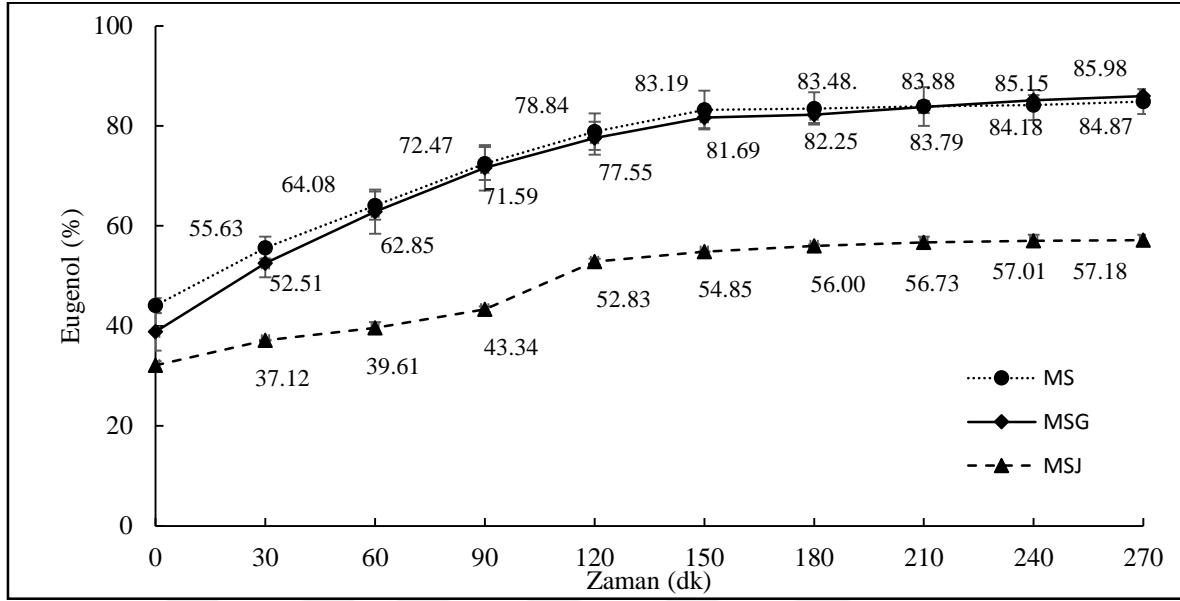
ABTS testinin 15. Dakikasında KUY en yüksek süpürme gücünü gösterirken (%95,50), mikrokapsüllerin süpürme gücü ise sırasıyla M/S, M/S/G, M/S/J olarak belirlenmiştir. Süpürme gücündeki fark istatistiksel olarak incelendiğinde kapsüller ve KUY arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Kapsülleri kendi arasında incelediğimizde ise istatistiksel olarak farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ($P>0,05$).

FRAP testi sonuçlarında KUY en yüksek aktiviteyi sergilerken kapsüller arasında en düşük aktivite M/S/J kapsüllerinde görülmüştür kapsüller ve KUY arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).

4.7 Salınım testi

Farklı duvar materyalleri (M/S, M/S/G, M/S/J) kullanılarak mikroenkapsüle edilen karanfil uçucu yağının salınım testi Bölüm 3.3.6'da tanımlanan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiş salınım testi boyunca her bir kapsülden salınan karanfil uçucu yağ miktarı öjenol miktarı üzerinden takip edilmiştir. Sindirim sisteminin taklit edildiği koşullarda

gerçekleştirilen testte her 30 dakikada bir örnek alınarak kapsüllerden salınım ortamına geçen öjenol miktarı ve dolayısı ile karanfil uçucu yağı miktarı belirlenmiştir.



Şekil 4.7: Örneklerin zamana bağlı salınım değerleri grafiği.

Şekil 4.6’da verildiği gibi salınım periyodunun başlangıcında (0. dk) MD/SK ve MD/SK/GA ve MD/SK/J mikrokapsüllerinden salınan karanfil uçucu yağı miktarları sırası ile %44,07, %38,83 ve %32,14 olarak belirlenmiştir. Asidik koşulların devam ettiği (pH 2) ilk 120 dakikalık salınım periyodunda mikrokapsüllerin sahip oldukları karanfil uçucu yağının büyük bölümünü saldı (M/S ve M/S/G ve M/S/J için sırası ile %78,84, %77,59 ve %43.34) gözlemlenmektedir. Salınım periyodunun ilerleyen zaman dilimlerinde (120-270 dk) ortamın pH değeri artırılmış (pH 7,5) ve bu değişimin tüm mikrokapsül gruplarındaki yansıması salınım hızında artma olarak belirlenmiştir. Salınım testi sonunda (270.dk) MD/SK ve MD/SK/GA ve MD/SK/J örnekleri için belirlenen salınan karanfil uçucu yağı miktarları sırası ile %85,98, %84,87 ve %57,18 olarak belirlenmiştir. Ortam pH’sı artırıldığında salınım oranının artması maltodekstrinin pH 7.5’de gastrik pH değerlerine kıyasla daha çözünür olmasına atfedilebilir (Nagaraju vd., 2021).

Salınım periyodunun tüm zaman dilimlerinde M/S ve M/S/G örneklerinin birbirlerine oldukça yakın bir salınım davranışı sergilediği, ancak M/S/J örneğinin diğer örneklerden farklı olarak daha yavaş hızda ve daha düşük miktarda karanfil uçucu yağı saldı gözlemlenmektedir. M/S/J formülasyonunun duvar bileşiminde bulunan jelatinin sudaki sınırlı çözünürlüğünün salınım özelliklerini etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Kapsüllerin salınım profiline yüzey morfolojileri göz önüne alınarak bakıldığında ise M/S/J

duvar bileşimindeki kapsüllerin çatlak ve düzensiz bir yapı gösterdiği belirlenmiştir. Morfolojilerdeki bu görünüm tozun akış kabiliyetini ve sulandırılma özelliklerini olumsuz etkileyebileceği için jelatinin bulunduğu formülasyonda salınımı azaltıcı yönde etki gösterdiği düşünülmektedir.

Çalışmamız kapsamında yapılan antimikrobiyal ve antioksidan testler de M/S/J mikroenkapsül örneğinin, salınım testi ile benzer şekilde, diğer örneklerin gerisinde kaldığı daha düşük biyo-aktivite sergilediği göz önüne alınır ise söz konusu durumun M/S/J örneğinin tuttuğu karanfil uçucu yağının serbest hale geçmemesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Çalışmamızda da tespit edildiği üzere; salınım testinin ilk 120 dakikasında aktif materyalin büyük miktarda salınması, yüzeyde adsorbe edilen ve arayüzde bulunan aktif materyalin sürekli halde salıverme davranışı ise gömülü aktif materyalin salınımına atfedilebilir ve böylelikle mikroenkapsülasyonun, aktif materyalin kontrollü salınımını kolaylaştırdığı söylenebilir (Nagaraju vd., 2021).

Hem aktif materyal hem de duvar materyal değişen pH değerlerinden etkilenebilmekte ve bu da aktif materyalin salım hızı ve miktarı üzerinde etkili olabilmektedir. Bununla birlikte, aktif materyalin suda çözünme özelliği düşük ise düşük pH ortamında duvar materyal gevşemesi veya çözülme derecesi salımı teşvik etmede yetersiz kalabilmektedir (Cetin Babaoglu vd., 2017).

Serbest kalan aktif materyal salım yüzdesi 30 ile 60 arasında değiştiğinde buna patlama etkisi denmektedir, salımının ilk aşamasında sıkışmış aktif materyalin kontrolsüz sızıntısı olarak da tanımlanabilir ve buna enkapsülenmiş şişmesi eşlik edebilir. Patlama etkisi iki nedenden ötürü meydana gelmektedir; ilki kapsüllenmemiş biyoaktif maddeler yüzeyde birikir ve anında salınır ikincisi ise hapsedilmiş hidrofilik aktif materyal, mikrokürelerin hazırlanması sırasında arayüzde adsorbe olma eğilimindedir. Arayüz daha sonra salım ortamına maruz kalmadan önce biyoaktif bileşik ile doymuş hale gelebilir ve böylece hızlı bir salımı tetikleyebilir (Flores ve Kong, 2017).

Lazim ve Muhamad (2017) maltodekstrin ve sodyum kazeinatın duvar materyal olarak kullanıldığı formülasyonda E vitaminini kapsüllemişlerdir. Maltodekstrin ve sodyum kazeinat ile enkapsüle E vitamini, simüle edilmiş gastik sıvı ve simüle edilmiş bağırsak sıvısı solüsyonunda 30 dakika boyunca salınımı incelenmiştir. Düşük pH değerine sahip gastrointestinal sistemde salım hızı %87, daha yüksek pH değerine sahip bağırsak sıvısında ise %42 oranında salım davranışı sergilemiştir.

Cetin Babaoglu vd., (2017) tarafından bir sistemdeki uçucu bileşenlerin algılanması, serbest bırakılma oranlarına bağlı olduğunu ve buna ek olarak aktif bileşiklerin ayırma ve bölme katsayıları, bunların duvar malzemesi ile birleşimleri, parçacık şekli ve kapsülleme sisteminin çeper kalınlığı, bunların çözünürlükleri ve salım ortamındaki pK değerleri salım hızı üzerinde çok etkili olduğu bildirilmiştir. Kitosan kullanılarak elde edilen uçucu yağ mikrokapsüllerinin salınım çalışmasında 20 °C ve 40 °C çalışma ortamında sıcaklığın artışının karanfil uçucu yağının salma hacmini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu durumun sıcaklıktaki artışın parçacıkların daha hızlı hareket etmesine yol açmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Ancak çalışma ortamının sıcaklığının 60°C'ye yükseltilmesi mikrokapsül içine alınmış karanfil uçucu yağının salım hacmini düşürdüğü tespit edilmiştir ve bunun nedenini mikrokapsül duvar zarı ısıtıldığında kitosan molekül zincirlerinin yavaş yavaş daralması ve moleküller arası boşluğun azalmasına atfetmişlerdir (Jiang vd., 2015). Maltodekstrin kullanılarak hazırlanan karanfil uçucu yağ nanoemülsiyonlarının salımının ilk 9 saatte pH 2,4'te %49'a pH 7,2'de %77'ye kadar sürekli artma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Nagaraju vd., 2021).

Sodyum aljinat kullanarak modifiye emülsifikasyon yöntemiyle karanfil uçucu yağ yüklü mikrokapsüllerin salım oranı çalışması yapılmıştır, 30 ve 60. dakikalarda sırasıyla %33,75 ve %37,83 olarak, deneyin sonunda (240 dk) ise, %48,64 olarak tespit edilmiştir. Karanfil uçucu yağının matristen salınımı kontrollü bir şekilde meydana geldiği ve yavaş bir salınım gösterdiği belirlenmiş, bu durumun nedeni olarak da, yüksek moleküler ağırlığı nedeniyle biyopolimerin hidrasyonundan sonra kalın bir jel tabakasının oluşumu gösterilmiştir (Faidi vd., 2019).

Kitosan nanonoparçacıklarına yüklenmiş karanfil uçucu yağının serbest bırakılma mekanizmasını araştırmışlar ve bunun için gerekli olan pH değerlerini belirlemek için Hasheminejad, Khodaiyan, ve Safari (2019) tarafından farklı konsantrasyonlarda karanfil uçucu yağ yüklü kapsüller iki farklı pH değerinde 56 günlük salınım periyoduna bırakılmıştır. Her iki konsantrasyondaki kapsüllerde ilk 10 gün içinde hızlı salıverme ve daha düşük pH değerinde daha yüksek bir salınım oranına ulaşılmıştır ve bu durum kapsüllerin yüzeyinde absorbe edilen karanfil uçucu yağına atfedilmiştir. 10 günden 30 güne kadar serbest bırakılma oranı ilk günlere göre azalırken 30. günden 56. güne kadar her iki konsantrasyondaki kapsüller sabit bir salınımına ulaşmıştır; bu azalmanın karanfil uçucu yağının kitosan nanoparçacıkları ile arasındaki difüzyon veya konsantrasyon

gradyentindeki azalmadan kaynaklandığı ve son günlerdeki sıfıra yakın salınımın ise tampon çözeltilerin kapsülleri kıramamasından ileri geldiği bildirilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ilk olarak kullanılan karanfil uçucu yağının kimyasal kompozisyonu belirlenmiş ve öjenol (%71,86) ana fenolik bileşen olarak saptanmıştır. Sonrasında duvar materyal olarak temelde maltodekstrin ve sodyum kazeinat kullanılarak (M/S) hazırlanan karışıma, gam arabik (M/S/G) ve jelatinin (M/S/J) eklenmesi ile elde edilen üç farklı formülasyon duvar materyali olarak kullanılmış ve karanfil uçucu yağı mikroenkapsüle edilmiştir. Üç farklı formülasyonda hazırlanan mikroenkapsüller dondurarak kurutulmuş, toz forma getirilen mikroenkapsüllerin etkinlik değeri belirlenmiştir. En yüksek etkinlik değeri (%86,22) maltodekstrin ve sodyum kazeinat duvar bileşimine sahip formülasyonda belirlenmiştir. *In situ* antimikrobiyal aktivite testinde bu en yüksek etkinlik gösteren bileşim kullanılırken diğer tüm testlerde üç duvar bileşimine de yer verilmiştir. Duvar kombinasyonları arasında en düşük etkinliği gösteren jelatinin dahil edildiği formülasyonda olmuştur. SEM görüntüleri incelendiğinde ise M/S bileşimi diğerlerine kıyasla daha küresel bir yapı gösterirken diğer iki bileşimde ise daha çentikli, düzensiz kırık bir yapı gözlemlenmiştir.

Karanfil uçucu yağının serbest ve kapsül formlarının MİK'ini belirlemek için antimikrobiyal aktivite testleri yapılmıştır. Karanfil uçucu yağının serbest formu mayalar üzerinde (*S.cerevisiae*, *C.albicans*) zayıf inhibe edici etki gösterirken, gram pozitif bakteriler (*S.aureus*, *B.cereus*, *S.mutans*) ve gram negatif bakteriler üzerinde (*S.flexneri*, *E.coli*, *Salmonella*) güçlü inhibe edici etki göstermiştir. Kapsül formdaki karanfil uçucu yağlarından M/S/J duvar bileşimine sahip kapsüller diğer kapsül formülasyonlarına kıyasla en başarısız antimikrobiyal etkiyi sergilerken, M/S ve M/S/G kapsül formülasyonlarının antimikrobiyal etki seviyesinin birbirine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. M/S duvar bileşimine sahip kapsüller gram pozitif bakteriler üzerinde güçlü inhibe edici etki gösterirken gram negatif bakteriler üzerinde orta derecede inhibe edici etki göstermiştir. M/S/G kapsülleri ise gram pozitif bakteriler için güçlü inhibitörken gram negatifler üzerinde orta derecede inhibe edici etki göstermiştir. Kapsüllerin her üç formunda da mayalara karşı inhibe edici etki ($>1000 \mu\text{g/mL}$ MİK) gözlemlenmemiştir. Serbest ve mikroenkapsüle (MD/SK/J hariç) karanfil uçucu yağına karşı en hassas mikroorganizma grubu Gram pozitif bakteriler ($15\text{-}31 \mu\text{g/mL}$ MİK) olduğu, bunu Gram negatif bakterilerin ($125 \mu\text{g/mL}$ MİK) takip ettiği öne çıkan veriler arasındadır. Karanfil uçucu yağının serbest ve kapsül formunun Gram pozitif bakteriler üzerinde özellikle insan ağız boşluğunda bulunan gram-pozitif, fakültatif

anaerobik bir bakteri ve diş çürüğüünün oluşumunda önemli bir etkeni olan *S.mutans* için güçlü bir inhibitör olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, antimikrobiyal ve antioksidan bileşiklerin doğal kaynaklarının kullanımı gıda endüstrisinin ilgisini çekmektedir ve bu çalışma göstermiştir ki, karanfil uçucu yağı ve kapsülleri yapay koruyuculara karşı yeşil bir alternatif olabilir.

Karanfil uçucu yağı ve kapsüllerinin antioksidan kapasitelerini belirlemek için DPPH, ABTS ve FRAP testleri yapılmıştır. Üç farklı antioksidan testin ortak paydasında karanfil uçucu yağının yüksek antioksidan özelliklere sahip olduğunu fakat bunun zamanla ortam şartlarına bağlı olarak azaldığı karanfil uçucu yağının mikroenkapsülasyonu antioksidan özelliklerini geliştirip süresini uzatabileceği yer almaktadır.

Kapsüllerin salım davranışlarını incelemek amacıyla gastrointestinal alanın koşullarının taklit edildiği koşullarda zamana bağlı salınım testi gerçekleştirilmiştir. Tüm kapsüllerde patlama etkisi gözlemlenmiş fakat yüzey morfolojisi ve etkinlik değerlerinden öngöröldüğu üzere MD/SK/J kapsüllerinin salınımının diğer iki mikroenkapsül formölasyonundan daha düşük olduğu görölmüştür. Farklı duvar materyal kombinasyonları farklı oranlarda salım göstermektedir ama çeşitli uygulamaların hepsinde hedef salım oranı değişebileceğinden uygulama alanı ve kullanım amacına yönelik olarak farklı oranlarda veya başka duvar materyalleri ile kombinasyonlarıyla birlikte tercih edilebilir.

Karanfil uçucu yağı ve MD/SK karanfil uçucu yağ kapsüllerinin mikrobiyolojik güvenliği sağlama konusundaki etkinlikleri üzerine gıdaların pH değerleri ve bileşenlerinin rolü model sistemler ile test edilmiştir. Bu amaçla *E.coli* ile aşılanan vişne suyu, kayısı suyu ve tam yağlı süt ortamlarına serbest ve mikroenkapsüle karanfil uçucu yağı inoküle (MİK değerine dikkate alınarak) edilmiştir. Serbest karanfil uçucu yağ eklenen gıda ortamlarında *E.coli* redüksiyonunun çok hızlı olduğu (2 saatte) mikroenkapsül formdaki karanfil uçucu yağı pH'sı en düşük ortam olan vişne suyunda 6. saatte, daha ılımlı pH değerine sahip olan kayısı suyunda 8. saatte tam inhibisyon sağlarken, hem pH değerine en yüksek hem de bileşiminde başta yağ ve diğer makro molekülleri iğereren süt ortamında tam inhibisyon sağlanamamış, *E.coli* inhibisyonu oldukça sınırlı düzeyde kalmıştır. Çalışma bulgularımız gıdalar içinde bulunan proteinlerin ve yağın bakterilerin etrafında koruyucu bir film oluşturabileceği ve antimikrobiyal maddeyi emerek antimikrobiyal ajanların etkisini azaltabileceği bilgisi ile uyumludur.

Maltodekstrin ve sodyum kazeinata jelatin ve gam arabik eklenerek hazırlanan üç farklı kabuk materyal formülasyonu ile üretilen karanfil uçucu yağı mikroenkapsüllerin karakterizasyon ve aktivite testlerinde görülmüştür ki jelatinin sudaki sınırlı çözünürlüğü ve düşük kapsülleme etkinliği antioksidan, antimikrobiyal ve salım özelliklerini azaltıcı yönde etkilemiştir. Gam arabikin eklendiği duvar bileşimi ise (M) ve (S) kapsüllerine benzer özellikler sergilemiştir. Yukarıda açıklanan sonuçlar ışığında karanfil uçucu yağının güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri sebebiyle gıdalarda kullanılabileceği ve kapsüllemenin onun bu özelliklerine katkıda bulunabileceğini ve etki süresini uzatabileceği sonucuna varılmıştır. Uçucu yağları kapsüllerken maltodekstrin ve sodyum kazeinat duvar materyallerine glikoz gibi şekerler de kullanılarak sprey kurutma ile daha yüksek etkinlik sağlanabilir çünkü glikoz gibi şekerler kristalleşerek tozların çökmesine neden olur ve buda püskürtülerek kurutulmuş tozlarda gözenekliliği azaltır ve O₂ girişini kısıtlayarak daha düşük lipid oksidasyonları ile sonuçlanabilir. Duvar materyallerinden jelatinin yüzey morfolojisinde görüldüğü gibi çözünürlüğünü kısıtlayan çatlak ve kırık benzeri yapılar görülmüştür; bunun başlıca sebeplerinden biri dondurarak kurutma prosesidir. Kristalleşme üzerine su hacmindeki artış nedeniyle, hidrojenlerin dondurularak kurutulması genellikle gözenekli bir yüzey yapısının ve çatlakların oluşumuna yol açar. Bu durumun önüne geçmek amacıyla tatlandırıcı bir bileşen eklenmesiyle dondurarak kurutulmuş jelatin mikrokapsüllerinin etkinliği artırılabilir. Buna ek olarak birçok mikrokapsüle bileşende karşılaşılan, salınım periyodunda hızlı patlama etkisini azaltmak için stratejiler geliştirilmesi gıda dağıtım sistemlerinde etkin biçimde kullanılması için elzem bir konudur.

6. KAYNAKLAR

- Ahmadabadi, Lila Rahmati, Seyed Ebrahim Hosseini, Seyed Mehdi Seyedein Ardebili, and Amin Mousavi Khaneghah. 2022.** “Application of Clove Essential Oil-Loaded Nanoemulsions in Coating of Chicken Fillets.” *Journal of Food Measurement and Characterization* 16(1): 819–28.
- Akhavan Mahdavi, Sahar, Seid Mahdi Jafari, Elham Assadpoor, and Danial Dehnad. 2016.** “Microencapsulation Optimization of Natural Anthocyanins with Maltodextrin, Gum Arabic and Gelatin.” *International Journal of Biological Macromolecules* 85 : 379-385
- Ali, O., Hashen, Y., Bekhit, A., Khattab, S., Freag, M., . 2019.** “Nanostructures of Gelatin for Encapsulation of Food Ingredients.” In *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes.*, 1 : 189-216
- St. Angelo, Allen J. 1996.** “Lipid Oxidation in Foods.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 175-224
- Bakry,A., Abbas, S., Majeed, H., Liang, L., 2016.** “Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 315(1) 143-182
- Ballesteros, L., Ramirez, M., Mussatto, S.,.** “Encapsulation of Antioxidant Phenolic Compounds Extracted from Spent Coffee Grounds by Freeze-Drying and Spray-Drying Using Different Coating Materials.” *Food Chemistry.* 237: 623-631
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., .Bourbon, A.I., .Pinheiro, A.C., Isabel, M., .Januário, N., Vicente, A.A., Beirão-da-Costaa, M.L. and Delgadillo, I. (2013).** “Inulin Potential for Encapsulation and Controlled Delivery of Oregano Essential Oil.” *Food Hydrocolloids.* 33(2): 199-206
- Bensid, A., Abed, N., Houicher, A., Ozogul, F., 2020.** “Antioxidant and Antimicrobial Preservatives: Properties, Mechanism of Action and Applications in Food—a Review.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 13: 2985-3001
- Bilenler, T., Gokbulut, I., Sislioglu, K. and Karabulut, I. (2015).** “Antioxidant and Antimicrobial Properties of Thyme Essential Oil Encapsulated in Zein Particles.” *Flavour and Fragrance Journal.* 30(5) : 392-398
- Brewer, M. S. 2011.** “Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4) 221-247
- Burt, Sara. 2004.** “Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods - A Review.” *International Journal of Food Microbiology* 94(3) 223 – 253
- Carrubba, Alessandra, and Caterina Catalano. 2009.** “Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture – A Review.” In *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms.*, 2: 137–187
- Cetin Babaoglu, Humeyra, Ali Bayrak, Necla Ozdemir, and Nuriye Ozgun. 2017** “Encapsulation of Clove Essential Oil in Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin for Characterization, Controlled Release, and Antioxidant Activity.” *Journal of Food Processing and Preservation.* 41(5) : , 212–224.
- Chatterjee, Dipan, and Paramita Bhattacharjee. 2013.** “Comparative Evaluation of the

Antioxidant Efficacy of Encapsulated and Un-Encapsulated Eugenol-Rich Clove Extracts in Soybean Oil: Shelf-Life and Frying Stability of Soybean Oil.” *Journal of Food Engineering* 117(4) 545-550

Chranioti, Charikleia, Aspasia Nikoloudaki, and Constantina Tzia. 2015. “Saffron and Beetroot Extracts Encapsulated in Maltodextrin, Gum Arabic, Modified Starch and Chitosan: Incorporation in a Chewing Gum System.” *Carbohydrate Polymers*.127: 252-263

Cui, Haiying, Chengting Zhao, and Lin Lin. 2015. “The Specific Antibacterial Activity of Liposome-Encapsulated Clove Oil and Its Application in Tofu.” *Food Control*. (56) 128-134

Damien Dorman, H. J., Stanley G. Deans, Raymond C. Noble, and Peter Surai. 1995. “Evaluation in Vitro of Plant Essential Oils as Natural Antioxidants.” *Journal of Essential Oil Research*. 7(6): 645-651

Desai, Kashappa Goud H., and Hyun Jin Park. 2005. “Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients.” *Drying Technology*. 23 (7) : 1361-1394

Desobry, Stephane A., Flavia M. Netto, and Theodore P. Labuza. 1997. “Comparison of Spray-Drying, Drum-Drying and Freeze-Drying for β -Carotene Encapsulation and Preservation.” *Journal of Food Science*. 62 (6) : 1158-1162

Devi, K. Pandima, S. Arif Nisha, R. Sakthivel, and S. Karutha Pandian. 2010. “Eugenol (an Essential Oil of Clove) Acts as an Antibacterial Agent against Salmonella Typhi by Disrupting the Cellular Membrane.” *Journal of Ethnopharmacology* 130(1): 107–15.

Donsì, Francesco, Marianna Annunziata, Mariarenata Sessa, and Giovanna Ferrari. 2011. “Nanoencapsulation of Essential Oils to Enhance Their Antimicrobial Activity in Foods.” *LWT - Food Science and Technology*. 44 (9): 1908-1914

Duh, Pin Der, and Gow Chin Yen. 1997. “Antioxidant Efficacy of Methanolic Extracts of Peanut Hulls in Soybean and Peanut Oils.” *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists’ Society*. 74 : 745

Ezhilarasi, P. N., D. Indrani, B. S. Jena, and C. Anandharamakrishnan. 2013. “Freeze Drying Technique for Microencapsulation of Garcinia Fruit Extract and Its Effect on Bread Quality.” *Journal of Food Engineering* 117(4): 513-520

Fadel, Hoda Hanem Mohamed et al. 2020. “Correlation between Chemical Composition and Radical Scavenging Activity of 10 Commercial Essential Oils: Impact of Microencapsulation on Functional Properties of Essential Oils.” *Arabian Journal of Chemistry*.

Faidi, Adel et al. 2019. “Application of Sodium Alginate Extracted from a Tunisian Brown Algae Padina Pavonica for Essential Oil Encapsulation: Microspheres Preparation, Characterization and in Vitro Release Study.” *International Journal of Biological Macromolecules* 136 : 386-394

Fang, Zhongxiang, and Bhesh Bhandari. 2010. “Encapsulation of Polyphenols - A Review.” *Trends in Food Science and Technology* 21 (10) : 510-523

Femi-Oloye, Oluwabunmi Peace et al. 2020. “Effects of Commonly Used Food Additives on Haematological Parameters of Wistar Rats.” *Heliyon*. 6 (10)

Fernandes, Regiane Victória De Barros, Soraia Vilela Borges, and Diego Alvarenga

- Botrel. 2014.** “Gum Arabic/Starch/Maltodextrin/Inulin as Wall Materials on the Microencapsulation of Rosemary Essential Oil.” *Carbohydrate Polymers*. 101:524-532
- Ferrari, Cristhiane Caroline et al. 2012.** “Influence of Carrier Agents on the Physicochemical Properties of Blackberry Powder Produced by Spray Drying.” *International Journal of Food Science and Technology*. 47 (6): 1237-1245
- Filgueiras, Cristina Tostes, and Maria Cristina Dantas Vanetti. 2006.** “Effect of Eugenol on Growth and Listeriolysin O Production by *Listeria Monocytogenes*.” *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Flores, Floirendo P., and Fanbin Kong. 2017.** “In Vitro Release Kinetics of Microencapsulated Materials and the Effect of the Food Matrix.” *Annual Review of Food Science and Technology*. 8:237-259
- Friedman, Mendel, Philip R. Henika, Carol E. Levin, and Robert E. Mandrell. 2004.** “Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia Coli* O157:H7 and *Salmonella Enterica* in Apple Juice.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(19):6042
- Garcia-Fuentes, Alvaro, Sabrina Wirtz, Ellen Vos, and Hans Verhagen. 2015.** “Short Review of Sulphites as Food Additives.” *European Journal of Nutrition & Food Safety*. 5 (2): 113-120
- El Ghallab, Yassine et al. 2019.** “*Syzygium Aromaticum* L.: Phytochemical Investigation and Comparison of the Scavenging Activity of Essential Oil, Extracts and Eugenol.” *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 20:153–158
- Gharsallaoui, Adem et al. 2007.** “Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview.” *Food Research International*. 40(9): 1107-1121
- Gokbulut, Incilay, Tugca Bilenler, and Ihsan Karabulut. 2013.** “Determination of Chemical Composition, Total Phenolic, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of *Echinophora Tenuifolia* Essential Oil.” *International Journal of Food Properties*. 16(7): 1442-1451
- Gülçin, İlhami. 2011.** “Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure-Activity Relationship Study.” *Journal of Medicinal Food* 14(9): 975-85
- Gülçin, İlhami, Mahfuz Elmastaş, and Hassan Y. Aboul-Enein. 2012.** “Antioxidant Activity of Clove Oil - A Powerful Antioxidant Source.” *Arabian Journal of Chemistry*. 5 (4): 489-499
- Gupta, Chitra, P.Chawlaa,S.Arora,S.K.Tomar,A.K.Singh 2015.** “Iron Microencapsulation with Blend of Gum Arabic, Maltodextrin and Modified Starch Using Modified Solvent Evaporation Method - Milk Fortification.” *Food Hydrocolloids*. 43 : 622-628
- Gutiérrez-del-Río, Ignacio, Javier Fernández, and Felipe Lombó. 2018.** “Plant Nutraceuticals as Antimicrobial Agents in Food Preservation: Terpenoids, Polyphenols and Thiols.” *International Journal of Antimicrobial Agents*. 52(3):309-315.
- Gutierrez, J., C. Barry-Ryan, and P. Bourke. 2008.** “The Antimicrobial Efficacy of Plant Essential Oil Combinations and Interactions with Food Ingredients.” *International Journal of Food Microbiology*.
- Hadidi M., Pouraminb S., Adinepourc F., Haghanib S., Seid M.J., 2020.** “Chitosan

Nanoparticles Loaded with Clove Essential Oil: Characterization, Antioxidant and Antibacterial Activities.” *Carbohydrate Polymers*. 236

- Halder S., Mehta A.K, Kar A., Mediratta P.K., 2011.** “Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice.” *Planta Medica*. 77(8): 830-834
- Halliwell, Barry. 1996.** “Antioxidants in Human Health and Disease.” *Annual Review of Nutrition*. 16:33-50
- Haro-González, José Nabor, Gustavo Adolfo Castillo-Herrera, Moisés Martínez-Velázquez, and Hugo Espinosa-Andrews. 2021.** “Clove Essential Oil (*Syzygium Aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health.” *Molecules* 26(21): 6387
- Hasheminejad, Nayeresadat, Faramarz Khodaiyan, and Mohammad Safari. 2019.** “Improving the Antifungal Activity of Clove Essential Oil Encapsulated by Chitosan Nanoparticles.” *Food Chemistry* 275 : 113-122
- Hatab S., Athanasio R., Holley R., Rodas-Gonzalez A., Bravo C., 2016.** “Survival and Reduction of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* in a Fresh Cold-Pressed Juice Treated with Antimicrobial Plant Extracts.” *Journal of Food Science*. 81 (8) : 1987-1995
- Hee, Yen Yi, Tan, Rahman A., 2015.** “Influence of Different Wall Materials on the Microencapsulation of Virgin Coconut Oil by Spray Drying.” *International Journal of Food Engineering*. 11 (1) :61-69
- Hosseini, Mahzad, Abdollah Jamshidi, Mojtaba Raeisi, and Mohammad Azizzadeh. 2021.** “Effect of Sodium Alginate Coating Containing Clove (*Syzygium Aromaticum*) and Lemon Verbena (*Aloysia Citriodora*) Essential Oils and Different Packaging Treatments on Shelf Life Extension of Refrigerated Chicken Breast.” *Journal of Food Processing and Preservation*. 45(3)
- Hu, Qiao, Meifang Zhou, and Shuyong wei. 2018.** “Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field.” *Journal of Food Science*. 83 (6) 1476-1483
- Huang, Xiao Wei, Yun Chao Feng, Yi Huang, and Hai Ling Li. 2013.** “Chemical Composition, Antioxidant and the Possible Use as Skin-Care Ingredient of Clove Oil (*Syzygium Aromaticum* (L.) Merr. & Perry) and Citronella Oil (*Cymbopogon Goeringii*) from China.” *Journal of Essential Oil Research*. 25(4) :315-323
- Jiang, P., Duxin, L., Xiao, Y., Liu, Y., 2015.** “Preparation and Characterization of Chitosan-Based Core-Shell Microcapsules Containing Clove Oil.” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 15(1) 600-5
- Karabulut, I., Bilenler, T., Sislioğlu, K., Gökbulut, İ., Seyhan, F., Ozdemir, I.S., Ozturk, B., . 2018.** “Effect of Fruit Canopy Positions on the Properties of Apricot (*Prunus Armeniaca* L.) Varieties.” *Journal of Food Biochemistry* 42(1).
- Kaushik, Vikas, and Yrjö H. Roos. 2007.** “Limonene Encapsulation in Freeze-Drying of Gum Arabic-Sucrose-Gelatin Systems.” *LWT - Food Science and Technology*. 40(8):1381-1391
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P., Dubey, N.K., 2015.** “*Trachyspermum Ammi* L. Essential Oil as Plant Based Preservative in Food System.” *Industrial Crops and Products*. 69 : 104-109

- Koç, Mehmet, Melike Sakin, and Figen Kaymak-Ertekin. 2010.** “Mikroenkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı Microencapsulation and Its Applications in Food Technology.” *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* . 77-86
- Kokina, M., Salevic, A., Levic, S., Pantic, M., Nicsic, M., Savikin, K., 2019.** “Characterization, Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Encapsulation into Biodegradable Material Followed by Freeze Drying.” *Food Technology and Biotechnology*. 57(2): 282–289
- Krokida, M. K., and C. Philippopoulos. 2006.** “Volatility of Apples during Air and Freeze Drying.” *Journal of Food Engineering*. 73 (2) : 135-141
- Lazim, Nurul Asmak Md, and Ida Idayu Muhamad. 2017.** “Encapsulation of Vitamin E Using Maltodextrin/Sodium Caseinate/Selenomethionine and Its Release Study.” *Chemical Engineering Transactions*. 56 : 1951-1956
- Liu, Q., Jing, Y., Han, C., Zhang, H., Tian, Y., 2019.** “Encapsulation of Curcumin in Zein/ Caseinate/Sodium Alginate Nanoparticles with Improved Physicochemical and Controlled Release Properties.” *Food Hydrocolloids*. 93 : 432-442
- Luo, Y., Zhang, Y., Oan, K., Critzer, F., Davidson, P., Zhong, Q., 2014.** “Self-Emulsification of Alkaline-Dissolved Clove Bud Oil by Whey Protein, Gum Arabic, Lecithin, and Their Combinations.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(19):4417-24.
- Madene, Atmane, Muriel Jacquot, Joël Scher, and Stéphane Desobry. 2006.** “Flavour Encapsulation and Controlled Release - A Review.” *International Journal of Food Science and Technology*. 41 (1) : 1-21
- Majeed, H., Bian, Y., Ali,B., Jamil, A., Majeed, U., Fang, Z., 2015.** “Essential Oil Encapsulations: Uses, Procedures, and Trends.” *RSC Advances*. 72
- Mangena, T., and N. Y.O. Muyima. 1999.** “Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activities of Essential Oils of Artemisia Afra, Pteronia Incana and Rosmarinus Officinalis on Selected Bacteria and Yeast Strains.” *Letters in Applied Microbiology*. 28(4):291-6
- Maurya, Akash, Jitendra Prasad, Somenath Das, and Abhishek Kumar Dwivedy. 2021.** “Essential Oils and Their Application in Food Safety.” *Frontiers in Sustainable Food Systems* 10(4), 760
- Mbaveng, Armelle T., and Victor Kuete. 2017.** “Syzygium Aromaticum.” In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*.,
- Mcclements, David Julian, Eric Andrew Decker, Yeonhwa Park, and Jochen Weiss. 2009.** “Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49(6):577-606
- Michiels, Joris et al. 2008.** “In Vitro Degradation and in Vivo Passage Kinetics of Carvacrol, Thymol, Eugenol and Trans-Cinnamaldehyde along the Gastrointestinal Tract of Piglets.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88 (13): 2371-2381
- Monika, Y., Roopal, D., , Sohni S., and Tanu Allen. 2019.** “Comparative Study of Antimicrobial Activity of Lemongrass (cymbopogon citratus), Clove (syzygium aromaticum), and Tulsi (ocimum) Essential Oils Against Foodborne Pathogens.” *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 12 (4)

- Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D., Çapanoglu, E., 2020.** “Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review.” *Molecules*. 25(20):4711
- Mylonas, Constantinos C., Gloriana Cardinaletti, Irini Sigelaki, and Alberta Polzonetti-Magni. 2005.** “Comparative Efficacy of Clove Oil and 2-Phenoxyethanol as Anesthetics in the Aquaculture of European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) and Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) at Different Temperatures.” *Aquaculture*. 246 (1-4): 467-481
- Nagaraju, Pramod G., Parineeta Sengupta, Poornima Priyadarshini Chicgovinda, and Pooja J. Rao. 2021.** “Nanoencapsulation of Clove Oil and Study of Physicochemical Properties, Cytotoxic, Hemolytic, and Antioxidant Activities.” *Journal of Food Process Engineering* 44(4).
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppala, R., Feo, V., 2013.** “Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria.” *Pharmaceuticals*. 6(12): 1451–1474.
- Negi, Pradeep Singh. 2012.** “Plant Extracts for the Control of Bacterial Growth: Efficacy, Stability and Safety Issues for Food Application.” *International Journal of Food Microbiology*. 156 (1) : 7-17
- Packyanathan, Jerusha Santa, and Gopinath Prakasam. 2017.** “Antibacterial Effect of Clove Oil against Clinical Strains of Escherichia Coli.” *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 9(7).
- Pateiro, M., Lorenzoa, J., Gomez, B., 2018.** “Essential Oils as Natural Additives to Prevent Oxidation Reactions in Meat and Meat Products: A Review.” *Food Research International* 113: 156–66.
- Pessini, Greisiele Lorena, Benedito Prado Dias Filho, Celso Vataru Nakamura, and Diógenes Aparício Garcia Cortez. 2003.** “Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from Piper Regnellii (Miq.) C. DC. Var. Pallescens (C. DC.) Yunck.” *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Pramod, K., Suneesh C., Shanavas, S., Javed, A., . 2015.** “Unveiling the Compatibility of Eugenol with Formulation Excipients by Systematic Drug-Excipient Compatibility Studies.” *Journal of Analytical Science and Technology* 6(1).
- Premi, Monica, and H. K. Sharma. 2017.** “Effect of Different Combinations of Maltodextrin, Gum Arabic and Whey Protein Concentrate on the Encapsulation Behavior and Oxidative Stability of Spray Dried Drumstick (*Moringa Oleifera*) Oil.” *International Journal of Biological Macromolecules*. 1232-1240
- Radünza, M., Martins da Trindadeb, M.L., Camargoa, T.M., Radünzc, A.L., Borgesd, C.D., Gandrad, E.A. and Helbigb, E. (2019).** “Antimicrobial and Antioxidant Activity of Unencapsulated and Encapsulated Clove (*Syzygium Aromaticum*, L.) Essential Oil.” *Food Chemistry*. 276: 180-186.
- Raveau, Robin, Joël Fontaine, and Anissa Lounès-Hadj Sahraoui. 2020.** “Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review.” *Foods*.
- Ribeiro-Santos, Regiane, Mariana Andrade, Ana Sanches-Silva, and Nathália Ramos de Melo. 2018.** “Essential Oils for Food Application: Natural Substances with Established Biological Activities.” *Food and Bioprocess Technology*. 43–71
- Roller, S., and P. Seedhar. 2002.** “Carvacrol and Cinnamic Acid Inhibit Microbial

Growth in Fresh-Cut Melon and Kiwifruit at 4° and 8°C.” *Letters in Applied Microbiology* 35(5) 390-394

- Saéñz, Carmen, Sandra Tapia, Jorge Chávez, and Paz Robert. 2009.** “Microencapsulation by Spray Drying of Bioactive Compounds from Cactus Pear (*Opuntia Ficus-Indica*).” *Food Chemistry*. 114 (2): 616-622
- Sahlan, M., Lestari, S.L., Indrawati, T., Pratami, D.K., Wijarnako, A., Hermansyah, H., Lischer, K. and Rabbani, A.N. (2019)**“Microencapsulation of Clove Oil Using Spray Dry with Casein Encapsulator and Activity Test towards *Streptococcus Mutans*.” In *AIP Conference Proceedings*,.
- Scallan, E., Hokestra R., Angulo, F., Tauxue, R., Roy, S., Griffin, F., 2011.** “Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens.” *Emerging Infectious Diseases*. 17(1):7-15
- Sebaaly, C., Stainmesse, S., Fessi, H., Gerges, H., 2016.** “Clove Essential Oil-in-Cyclodextrin-in-Liposomes in the Aqueous and Lyophilized States: From Laboratory to Large Scale Using a Membrane Contactor.” *Carbohydrate Polymers* 138: 75-85
- Shao, Ping, Shuangqing Xuan, Weicheng Wu, and Liang Qu. 2019.** “Encapsulation Efficiency and Controlled Release of *Ganoderma Lucidum* Polysaccharide Microcapsules by Spray Drying Using Different Combinations of Wall Materials.” *International Journal of Biological Macromolecules*.345-356
- Sharma, M., Mann, B., Sharma, R., Bajaj, R., Athira, S., Sarkar, P and Pothuraju, R. (2017).** “Sodium Caseinate Stabilized Clove Oil Nanoemulsion: Physicochemical Properties.” *Journal of Food Engineering* 212: 38-46
- Smith-Palmer, A., J. Stewart, and L. Fyfe. 2001.** “The Potential Application of Plant Essential Oils as Natural Food Preservatives in Soft Cheese.” *Food Microbiology* 18(4).
- De Souza, Volnei Brito, Marcelo Thomazini, Julio César De Carvalho Balieiro, and Carmen Sílvia Fávaro-Trindade. 2015.** “Effect of Spray Drying on the Physicochemical Properties and Color Stability of the Powdered Pigment Obtained from Vinification Byproducts of the Bordo Grape (*Vitis Labrusca*).” *Food and Bioproducts Processing*. 93: 39-50
- Sruthi, B. Y.K., B. M. Gurupadayya, K. Venkata Sairam, and T. Narendra Kumar. 2014.** “Development and Validation of GC Method for the Estimation of Eugenol in Clove Extract.” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Sun, H., Luo, D., Zheng, S., Li, Z., Xu, W., 2021.** “Antimicrobial Behavior and Mechanism of Clove Oil Nanoemulsion.” *Journal of Food Science and Technology*. 1939–1947
- Tao, Y., Wang, P., Wang, J., Wu, Y., Han, Y. and Zhou, J. (2017).** “Combining Various Wall Materials for Encapsulation of Blueberry Anthocyanin Extracts: Optimization by Artificial Neural Network and Genetic Algorithm and a Comprehensive Analysis of Anthocyanin Powder Properties.” *Powder Technology*. 311: 77-87.
- Tariq, S., Wani,S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M., Shalla, A., . 2019.** “A Comprehensive Review of the Antibacterial, Antifungal and Antiviral Potential of Essential Oils and Their Chemical Constituents against Drug-Resistant Microbial

Pathogens.” *Microbial Pathogenesis*. 134

- Tonon, R., Baroni, A., Brabet, C., Gibert, O., . 2009.** “Water Sorption and Glass Transition Temperature of Spray Dried Açai (*Euterpe Oleracea* Mart.) Juice.” *Journal of Food Engineering*. 94 : 215-221
- Viuda-Martos, Navajas, Y., Zapata, E., Fernandez, J., 2010.** “Antioxidant Activity of Essential Oils of Five Spice Plants Widely Used in a Mediterranean Diet.” *Flavour and Fragrance Journal*. 25 (1) : 13-19
- Wandrey, Christine, Artur Bartkowiak, and Stephen E. Harding. 2010.** “Materials for Encapsulation.” In *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*,.
- Wang, Wenxia, Yalan Zhang, Zhao Yang, and Qi He. 2021.** “Effects of Incorporation with Clove (*Eugenia Caryophyllata*) Essential Oil (CEO) on Overall Performance of Chitosan as Active Coating.” *International Journal of Biological Macromolecules*. 166: 578-586.
- Xu, Jing Shu, Yao Li, Xue Cao, and Yun Cui. 2013.** “The Effect of Eugenol on the Cariogenic Properties of Streptococcus Mutans and Dental Caries Development in Rats.” *Experimental and Therapeutic Medicine*. 5(6): 1667–1670.
- Yadav, Kanta, Rajesh Kumar Bajaj, Surajit Mandal, and Bimlesh Mann. 2020.** “Encapsulation of Grape Seed Extract Phenolics Using Whey Protein Concentrate, Maltodextrin and Gum Arabica Blends.” *Journal of Food Science and Technology*. 57(2): 426-434.
- Zhang, Yue, Huaiqiong Chen, and Kang Pan. 2017.** “Nanoencapsulation of Food Antimicrobial Agents and Essential Oils.” In *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*,. 11(13), 5778
- Zhang, Yue, and Qixin Zhong. 2013.** “Encapsulation of Bixin in Sodium Caseinate to Deliver the Colorant in Transparent Dispersions.” *Food Hydrocolloids*. 166: 578-586.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Şeyma ÇOLAKDALCI

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği (2014-2018)
- **Yüksek Lisans** : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2019-2022)

