



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ÇİFT KATLI EMÜLSİYON/PÜSKÜRTMELİ KURUTMA TEKNİĞİ İLE
BİYOAKTİF GIDA KATKI MADDESİ OLARAK MİKROENKAPSÜLE
KAZEİN HİDROLİZATI ÜRETİMİ**

**PELİN SALUM ERBAY
DOKTORA TEZİ**

ADANA 2023



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKES BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ÇİFT KATLI EMÜLSİYON/PÜSKÜRTMELİ KURUTMA TEKNİĞİ İLE
BİYOAKTİF GIDA KATKI MADDESİ OLARAK MİKROENKAPSÜLE
KAZEİN HİDROLİZATI ÜRETİMİ**

**PELİN SALUM ERBAY
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. LEVENT YURDAER AYDEMİR**

ADANA, 2023

ÖZET

ÇİFT KATLI EMÜLSİYON/PÜSKÜRTMELİ KURUTMA TEKNİĞİ İLE BİYOAKTİF GIDA KATKI MADDESİ OLARAK MİKROENKAPSÜLE KAZEİN HİDROLİZATI ÜRETİMİ

Pelin SALUM ERBAY

Doktora, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Levent Yurdaer AYDEMİR

Ağustos 2023, 189 sayfa

Biyoaktif peptitler proteinlerin hidrolizi ile üretilebilmektedirler. Fakat hidrolizatın gıda katkısı olarak kullanılmasında bir dizi zorluk mevcuttur. Kazein, biyoaktif peptitlerin önemli bir öncülüdür. Peptitlerin sahip oldukları yüksek biyoaktiviteyi gıdanın işlenmesi, depolanması ve sindirimi süreçlerinde korumak gerekmektedir. Bu anlamda enkapsülasyon teknolojisi etkili bir çözümdür. Bu tez çalışmasında, kazein hidrolizati, çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ile enkapsüle edilmiş bir gıda katkı maddesi üretilmiştir. Bunun için, öncelikle çift katlı emülsiyon üretiminde kullanılabilecek emülsiyon formülasyonu belirlenmiş ve emülsifikasyon yöntem koşulları optimize edilmiştir. Sonrasında ise mikroenkapsülasyon amacıyla kullanılacak duvar materyalleri ile kullanım oranları belirlenmiş ve üretilen tozların *in vitro* sindirim sonrasındaki potansiyel biyoaktif özellikleri incelenmiştir. Bu kapsamda en uygun birincil emülsiyonlar (%70 ayçiçek yağı, %5 poligliserol polirisinolat, %25 hidrolizat) rotor-statör tipi homojenizatör ile üretilmiştir. Çift katlı emülsiyon üretiminde en uygun formülasyon %80 a/a dış su (% 1 polisorbata 20, % 30,8 sodyum kazeinat:maltodekstrin ve %68,2 saf su) fazında birincil emülsiyonun ulturases homojenizatörü ile dağıtılması sonucu oluşturulmuştur. Bu çift katlı emülsiyonun püskürtmeli kurutucu ile kurutulması ile elde edilen tozlar *in-vitro* sindirim sonrası serbest radikal süpürme aktivitesi ($214,1 \pm 1,4$ umol Troloks/g örnek) ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü etkisi ($34,7 \pm 0,1$) göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Bioaktif peptit; Çift katlı emülsiyon, *In-vitro* sindirim, Kazein, Püskürtmeli kurutma

ABSTRACT

PRODUCTION OF MICROENCAPSULATED CASEIN HYDROLYSATE AS A BIOACTIVE FOOD ADDITIVE USING THE DOUBLE EMULSION/SPRAY DRYING TECHNIQUE

Pelin SALUM ERBAY

PhD, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Levent Yurdaer AYDEMİR

August 2023, 189 pages

Casein is an important precursor of bioactive peptides, which can be produced through the hydrolysis of casein. However, there are several challenges associated with using hydrolyzate as a food additive. It is crucial to maintain the high bioactivity of peptides during food processing, storage, and digestion. Moreover, the peptides formed after hydrolysis can have an unpleasant taste and exhibit high hygroscopicity. Encapsulation technology offers an effective solution to overcome these limitations.

In this thesis, a food additive encapsulated with casein hydrolyzate using the double-emulsion/spray drying technique was developed. Initially, an emulsion formulation suitable for producing a two-layer emulsion was determined, and the conditions for emulsification were optimized. Subsequently, the wall materials for microencapsulation and their usage rates were identified, and the potential bioactive properties of the resulting powders were examined after *in vitro* digestion. Within the scope of this thesis, the most suitable primary emulsions were produced using a rotor-stator type homogenizer. The optimal formulation for creating a double emulsion involved dispersing the primary emulsion in an 80% outer water phase using an ultrasound homogenizer. The powders obtained from the spray dryer drying process of this double-layered emulsion exhibited free radical scavenging activity (214.1 ± 1.4 $\mu\text{mol Trolox/g}$ sample) and angiotensin-converting enzyme inhibitory effects ($34.7 \pm 0.1\%$) after *in-vitro* digestion.

Keywords: Bioactive peptides; Double emulsion; *In-vitro* digestion; Casein; Spray drying

İthaf

Tezimi, genç yaşda gözlerini dünyaya yuman, kızlarının üniversite okuması için didinen tanıdığım en inatçı kadın anneannem Şükran Uçar'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bilimsel bilginin üretimi, bireysel çabaların yanı sıra kollektif bir emeğin sonucunda oluşmaktadır. Bu sebeple teşekkür bölümünün tezimde en önemli kısımlardan biri olduğuna inanıyorum. Öncelikle bana bilim insanı olma şansı verdiği ve doktoram boyunca harcadığı emekler için Danışmanım Doç. Dr. Levent Yurdaer Aydemir'e içtenlikle teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, bu süreçte tezime sundukları önemli katkıdan dolayı Tez İzleme Komitemde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa Çam ve Doç. Dr. Aysun Şener Gedük'e çok teşekkür ederim. Tezimin olgunlaşmasına katkı sunan jüri üyelerim Prof. Dr. Haşım Kelebek ve Prof Dr. Mecit Halil Öztop'a ayrıca teşekkür etmek isterim.

Tezim süresince bir projenin parçası olmaktan çok mutlu oldum. Bu anlamda projenin yürütücüsü Doç. Dr. Zafer ERBAY'ya ve proje araştırmacıları Doç. Dr. Levent Yurdaer Aydemir, Prof. Dr. Mustafa ÇAM, Doç. Dr. Onur Güven, Dr. Öğr. Sevgin Dılban ve Dr. Öğr. Özgür Cem Ertekin'e bana güvendikleri için çok teşekkür ederim. Ek olarak Doç. Dr. Onur Güven'e Mastersizer analizlerinde sağladığı destek ve Dr. Öğr. Görevlisi Sevgin Dılban'a kullandığım konjugat üretimindeki emekleri için çok teşekkür ederim. Projede çalışan benim gibi bursiyer diğer emektar arkadaşlarım Özlem Uğurlu Çelik, Çağla Ulubaş, Enise Betül Bolat Gedik, Aylin Bilen, Nimet Soylu ve Abdullah Mohammed Naji'ye emekleri için çok teşekkür ederim.

Bu emek yoğun süreçte üniversitemizin Gıda Mühendisliği bölümünde araştırmalarını sürdüren tüm araştırmacılarla bir arada bulunmaktan büyük zevk aldım. Bu araştırma sistemindeki her bir kişi gerek çalışmalarımda gerek ise yaşantımda izler bıraktı. Bu anlamda tüm bölüme çok şey borçluyum.

Ayrıca, bu günlere gelmemde emeği büyük olan tüm aileme minnettarım. Ek olarak, sevgili arkadaşım Feride Afiz Köseoğlu'na, Adana'da yaşadığım sürece hiçbir kötü günümde beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım Eren ve Nur Özseser'e ve Gamze ve Fulya Güçlü'ye teşekkür ederim.

Son olarak her an yanımda olan çok sevdiğim ve görüşlerine çok önem verdiğim, hatta çoğunlukla hayranlık duyduğum eşime hayatıma kattığı değerden dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışma TÜBİTAK 120O763 no'lu proje tarafından desteklenmiştir. Ayrıca doktoram "Yenilikçi Gıda İşleme Teknolojileri ve Gıda Biyoteknolojisi" alanında YÖK 100/2000 bursu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
<i>İthaf</i>	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1. Kazein hidrolizati	7
2.2. Çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği	10
2.2.1. Çift katlı emülsiyonlar	10
2.2.1.1. Çift katlı emülsiyonların bileşimi	18
2.2.1.2. Çift katlı emülsiyonların hazırlanmasında kullanılan homojenizatörler	34
2.2.2. Çift katlı emülsiyonların kurutulması	45
2.2.3. Protein ve türevlerinin çift katlı emülsiyonlar ile enkapsülasyonuna yönelik çalışmalar	53
2.2.3.1. Farmasötik alanındaki çalışmalar	55
2.2.3.2. Gıda alanındaki çalışmalar	61
3. MATERYAL VE METOT	71
3.1. Kazein hidrolizati üretimi	71
3.2. Mikroskop destekli dijital görüntü analizi ile damlacık boyut dağılımının belirlenmesi: Damlacık Boyut Dağılımlarının Belirlenmesi İçin Protokol Oluşturulması ve Bu Protokolün Etkinliğinin Saptanması	72
3.3. Çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ile biyoaktif gıda katkı maddesi olarak mikroenkapsüle kazein hidrolizati üretim aşamaları	74

3.3.1. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı W_1/O birincil emülsiyonu için uygun formülasyonun belirlenmesi	74
3.3.2. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı W_1/O birincil emülsiyonu için uygun emülsifikasyon yöntem ve optimum işlem koşullarının belirlenmesi	76
3.3.3. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonu için uygun formülasyonun belirlenmesi	78
3.3.4. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonu için optimum emülsifikasyon işlem koşullarının belirlenmesi	79
3.3.5. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonunun püskürtmeli kurutulmasında kullanılacak uygun duvar materyallerinin belirlenmesi	81
3.3.6. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonunun püskürtmeli kurutulmasında kullanılacak duvar materyallerinin oranının optimizasyonu	83
3.4. Analiz yöntemleri	84
3.4.1. Emülsiyonların ve tozların partikül (damlacık) boyut dağılımlarının belirlenmesi	85
3.4.1.1. Damlacık boyut dağılımlarının mikroskop destekli görüntü analizi yardımı ile belirlenmesi	85
3.4.1.2. Damlacık boyut dağılımlarının lazer kırınımı yardımı ile belirlenmesi	88
3.4.1.3. Toz partikül boyut dağılımlarının lazer kırınımı yardımı ile belirlenmesi	88
3.4.2. Emülsiyonların akış özelliklerinin belirlenmesi	88
3.4.3. Elektiriksel iletkenlik /pH değerlerinin belirlenmesi	89
3.4.4. Emülsiyonların stabilite indekslerinin belirlenmesi	89
3.4.5. Emülsiyonların bulanıklık (türbidite) değerlerinin belirlenmesi	90
3.4.6. Emülsiyonların ve rekonstitüye tozların morfolojisinin incelenmesi	90
3.4.7. Emülsiyonların iç fazının tutulma etkinliğinin belirlenmesi	90
3.4.8. Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	91
3.4.9. Tozların nem miktarının belirlenmesi	92
3.4.10. Tozların yüzey yağ miktarlarının belirlenmesi	92

3.4.11. Tozların su aktivitesinin belirlenmesi	93
3.4.12. Kuruma veriminin hesaplanması	93
3.4.13. Tozların <i>in vitro</i> sindirimi	93
3.4.13.1. Toplam peptit miktarının hesaplanması	94
3.4.13.2. Serbest radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi	94
3.4.13.3. Anjiyotensin dönüştürücü Enzim İnhibisyonunun belirlenmesi	95
3.4.13.4. α -Amilaz inhibisyonunun belirlenmesi	95
3.4.13.5. α -Glukozidaz inhibisyonunun belirlenmesi	96
3.4.14. İstatistiksel değerlendirme	97
3.4.14.1. Örnekler arasındaki korelasyonun belirlenmesi	97
3.4.14.2. İdeal Sonuç Odaklı Çok Ölçütlü Karar Verme (TOPSIS)	97
3.4.14.3. Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon	98
3.4.14.4. Örneklerin kıyaslanması	98
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	99
4.1. Mikroskop destekli dijital görüntü analizi ile damlacık boyut dağılımının belirlenmesi: Damlacık boyut dağılımlarının belirlenmesi için protokol oluşturulması ve bu protokolün etkinliğinin saptanması	99
4.2. Kazein yüklü çift katlı emülsiyon üretiminde kullanılacak olan birincil emülsiyonun (W/O) formülasyonunun belirlenmesi	105
4.2.1. Ön denemeler	105
4.2.2. Formülasyonun belirlenmesi	106
4.3. Birinci homojenizasyon aşamasının optimizasyonu ve homojenizatörlerin karşılaştırılması	114
4.3.1. Optimizasyon	114
4.3.2. Optimum işlem koşullarında homojenizatörlerin karşılaştırılması	125
4.4. Çift katlı emülsiyon üretimi için uygun formülasyonun belirlenmesi	127
4.5. İkinci homojenizasyon adımının optimizasyonu	134
4.6. Çift katlı emülsiyonların püskürtmeli kurutulmasında uygun duvar materyallerinin belirlenmesi.	140
4.6.1. Ön denemeler	140
4.6.2. Uygun duvar materyallerinin belirlenmesi	148
4.6.2.1. Farklı duvar materyalleri ile üretilmiş çift katlı emülsiyonların özellikleri	149

4.6.2.2. Farklı duvar materyalleri ile üretilmiş tozların özellikleri	153
4.7. Çift katlı emülsiyonların püskürtmeli kurutması için kullanılacak duvar materyalli formülasyonunun optimizasyonu	160
5. SONUÇLAR	167
KAYNAKÇA	169
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	Çift aşamalı su içinde yağ içinde su ($W_1/O/W_2$) emülsiyonlarının hazırlanması.	15
Şekil 2.2.	Su içinde yağ içinde su emülsiyonlarının şematik görünümü.....	19
Şekil 3.1.	Eğitimde kullanılan mikrogramlar.	86
Şekil 3.2.	Eğitim sonucu sınıflandırılmış görüntüler.....	87
Şekil 3.3.	Sınıflandırılmış görüntülere örnek bir partükül boyut analizi uygulaması.	87
Şekil 4.1.	PGPR emülgatörü ile hazırlanan farklı W/O emülsiyonları.	106
Şekil 4.2.	Farklı emülgatörlerle ile hazırlanan W/O emülsiyonları.....	107
Şekil 4.3.	Farklı emülgatörlerle ile hazırlanan W/O emülsiyonlarının ve kazein hidrolizatının elektriksel iletkenlik değerleri.	108
Şekil 4.4.	Farklı emülgatörlerle ile hazırlanan W/O emülsiyonlarının mikrogramları.	111
Şekil 4.5.	Farklı formülasyonlar ile üretilmiş emülsiyonların D(90), D[4,3] ve D[3,2] değerleri.....	112
Şekil 4.6.	Farklı formülasyonlar ile üretilmiş emülsiyonların D(90), D[4,3], D[3,2] ve kıvam katsayısı (K) değerleri ile oluşturulmuş PCA biplot diyagramı.	113
Şekil 4.7.	Rotor-statör homojenizatör ile hazırlanmış emülsiyonlarda karıştırma hızı ile işlem süresinin değişiminin (a) taze emülsiyonun D(90) değeri, (b) 30 gün depolanmış emülsiyonun D(90) değeri, (c) emülsiyon viskozitesi ve (d) stabilite indeksi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.	119
Şekil 4.8.	Ultrases homojenizatör ile hazırlanmış emülsiyonlarda karıştırma hızı ile işlem süresinin değişiminin (a) 30 gün depolanmış emülsiyonun D(90) değeri ve (b) emülsiyon viskozitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.	122
Şekil 4.9.	Yüksek basınç homojenizatör ile hazırlanmış emülsiyonlarda karıştırma hızı ile işlem süresinin değişiminin (a) taze emülsiyonun D(90) değeri, (b) 30 gün depolanmış emülsiyonun D(90) değeri, (c) emülsiyon viskozitesi ve (d) stabilite indeksi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.	123
Şekil 4.10.	Çift katlı emülsiyon hazırlanmasında kullanılan US genlik ve işlem süresi faktörlerinin değişiminin emülsiyonda iç faz tutulma etkinliği üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği.	137
Şekil 4.11.	Çift katlı emülsiyonların püskürtmeli kurutulmasında kurutma kabini çıkışı ile siklon girişi arasında (çıkış hava sıcaklığının ölçüldüğü bölge) gözlemlenen sakızimsı (a) ve lor benzeri topaklı (b) yapılaşma görünümü.	143
Şekil 4.12.	(a) NaC-GA çözeltisinin görünümü, (b) püskürtmeli kurutulmasında yaşanan nozul tıkanmasına dair bir görünüm (iğne görünümünde uzayan, katılaşmış çözeltilidir, nozul iğnesi nozulun içerisinde).	147
Şekil 4.13.	Karbonhidrat:protein oranı ve duvar materyali oranının (a) kurutma verimi, (b) mikroenkapsülasyon etkinliği, (c) yüzey yağı, (d) ABTS değerlerinin ve (e) ACE değerlerinin kontrol örneklerine göre farkının üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.	164

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1.	Ön çalışma için kullanılan emülsiyonların formülasyonları.	73
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan lipofilik emülgatörler ve HLB değerleri.	74
Tablo 3.3.	Birincil emülsiyon formülasyonunun belirlenmesinde kullanılan emülsiyon üretim koşulları.	75
Tablo 3.4.	Hazırlanan birincil emülsiyonların formülasyonları	76
Tablo 3.5.	Rotor-statör (RS), ultrases (US) ve yüksek basınç homojenizatörü (HPH) optimizasyonda kullanılan Merkezi Karma Dönel Tasarım deneme planları	77
Tablo 3.6.	Dış su fazında kullanılan emülgatörler.	78
Tablo 3.7.	Çift katlı emülsiyon formülasyonunun belirlenmesinde kullanılan formülasyonlar.	79
Tablo 3.8.	Çift katlı W/O/W emülsiyonunun üretiminin ikinci aşamasındaki US işleminin optimizasyonunda kullanılan Merkezi Karma Dönel Tasarım (CCRD) deneme planı.	80
Tablo 3.9.	Polimerik çözeltilerde kullanılan protein ve karbonhidrat çeşitleri ve üretilen örneklerin kısaltmaları.	82
Tablo 3.10.	Toz üretiminde kullanılacak duvar materyallerinin oranının optimizasyonunda kullanılan Merkezi Karma Dönel Tasarım (CCRD) deneme planı.	84
Tablo 3.11.	Tez kapsamında yürütülen iş paketlerinde gerçekleştirilen analizler*.	85
Tablo 4.1.	Mikroskop ölçümleri ile belirlenen damlacık boyut özellikleri ile lazer kırınımı tekniği ile belirlenen damlacık boyut özelliklerinin ve diğer emülsiyon özelliklerinin ilişkisi.	104
Tablo 4.2.	Çeşitli emülgatör konsantrasyonları ve dağılmış faz oranları ile farklı emülgatörler kullanılarak üretilen W/O emülsiyonlarının akış davranışları.*	109
Tablo 4.3.	Birincil emülsiyonun formülasyonuna karar verilmesi için TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri ve elde edilen göreceli yakınlık değerleri.	114
Tablo 4.4.	W/O emülsiyon üretimi için rotor-statör homojenizatör kullanımının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamli olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).	117
Tablo 4.5.	W/O emülsiyon üretimi için ultrases homojenizatör kullanımının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamli olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).	118
Tablo 4.6.	W/O emülsiyon üretimi için yüksek basınç homojenizatör kullanımının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamli olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).	118
Tablo 4.7.	Optimum işlem koşulları ve istenilirlik fonksiyonu değerleri.	124

Tablo 4.8. Üç farklı homojenizatör için belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulanması.	125
Tablo 4.9. Optimum koşullarda üretilen emülsiyonların TOPSIS analizinde kullanılan özellikleri ve hesaplanan göreceli yakınlık değerleri.*	127
Tablo 4.10. Emülsiyon örneklerinin sıcaklık, elektriksel iletkenlik, iç faz tutulma etkinliği, viskozite ve damlacık boyut analiz sonuçları.	128
Tablo 4.11. Çift katlı emülsiyonların formülasyonlarının belirlenmesinde kullanılan deneysel veriler ve TOPSIS analizinde elde edilen göreceli yakınlık değerleri*.	133
Tablo 4.12. W/O/W emülsiyon üretimindeki US işlem koşullarının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamlı olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).	137
Tablo 4.13. Çift katlı emülsiyon üretilmesindeki US uygulaması için optimum işlem koşulları ve istenilirlik fonksiyonu değeri.	139
Tablo 4.14. Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulanması.	140
Tablo 4.15. Toz elde edilebilmesi amacıyla, çift katlı emülsiyonların kurutulması kapsamında yapılan ön deneme üretimleri*.	142
Tablo 4.16. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların elektriksel iletkenlik, pH, sıcaklık ve bulanıklık değerleri.*	149
Tablo 4.17. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların damlacık boyutuna dair elde edilen ölçüm sonuçları.*	151
Tablo 4.18. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların viskozite analiz sonuçları.*	152
Tablo 4.19. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen tozların tanecik boyutuna dair elde edilen ölçüm sonuçları ve enkapsülasyon etkinliği değerleri.*	154
Tablo 4.20. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen tozların enkapsülasyon etkinliği ve yüzey yağı değerleri.*	155
Tablo 4.21. Farklı duvar materyali formülasyonu ile üretilen tozların ve hidrolizat içermeyen kontrollerinin <i>in vitro</i> sindirim sonrası toplam peptit miktarı, serbest radikal süpürme aktivitesi ve ACE inhibisyonu özellikleri.*	157
Tablo 4.22. Farklı duvar materyali formülasyonu ile üretilen tozların ve hidrolizat içermeyen kontrollerinin <i>in vitro</i> sindirim sonrası toplam α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu özellikleri.*	158
Tablo 4.23. Mikroenkapsüle kazein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan çift katlı emülsiyonların dış faz formülasyonu seçiminde kullanılan TOPSİS tablosu*.	160
Tablo 4.24. Mikroenkapsüle kazein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan çift katlı emülsiyonların dış faz formülasyonlarının optimizasyonunda ANOVA sonucu her bir yanıtla ilgili elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler.*	162

Tablo 4.25. Çift katlı emülsiyon üretilmesindeki US uygulaması için optimum işlem koşulları ve istenilirlik fonksiyonu değeri.	166
Tablo 4.26. Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulanması.	166



KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
W/O	: Yağ İçinde Su Emülsiyonu
W/O/W	: Su İçinde Yağ İçinde Su Emülsiyonu
O/W	: Su İçinde Yağ Emülsiyonu
O/W/O	: Yağ İçinde Su İçinde Yağ Emülsiyonu
S/O/W	: Su İçinde Yağ İçinde Katı Emülsiyonu
NaCl	: Sodyum Klorür
RS	: Rotor-Statör
HPH	: Yüksek Basınç Homojenizatör
US	: Ultrases Homojenizatör
PGPR	: Polirisinoleikasin Poligliserol Esteri
C1	: Sorbitan Monolaurat
C3	: Sorbitan Monostearat
C4	: Sorbitan Monooleat
AMP	: Amonyum Fosfatit
T20	: Polisorbat 20
T60	: Polisorbat 60
T80	: Polisorbat 80
NHD	: Nozul Hava Debisi
GA	: Gam Arabik
WPC	: Peynir Altı Suyu Proteini Konsantresi
WPI	: Peynir Altı Suyu Proteini İzolatı
NaC	: Sodyum Kazeinat
BSA	: Sığır Serum Albümini
Lac	: Laktoz
MD	: Maltodekstrin
K	: Konjugat
a/a	: Ağırlık/Ağırlık
a/h	: Ağırlık/Hacim
°C	: Santigrat Derece
Kg	: Kilogram

g	: Gram
µg	: Mikrogram
L	: Litre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
s	: Saniye
dk	: Dakika
MPa	: MegaPascal
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions per Minute)
FNU	: Formazin Nefelometrik Bulanıklık birimi
TPM	: Toplam Peptit Miktarı
SRGA	: Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

1. GİRİŞ

Son yıllarda, sağlık ve beslenme alanlarındaki bilimsel gelişim, güvenli ve sağlıklı gıdaya yönelik tüketici talepleri, yaşlanan nüfus, sağlık hizmetlerinin artan maliyetleri gibi sebepler gıda sektöründe önemli değişikliklere yol açmıştır. Bu, “ilaç olarak gıda” yaklaşımını gün yüzüne çıkarmış ve bu doğrultuda gıdaların tasarımını önemli hale getirmiştir. Bu durumun sonucunda, gıdalardan besleyici işlevlerinin yanı sıra sağlık açısından bir çok olumlu değişimlere olanak sağlamaları ve yaşam konforunu uzun vadede geliştirmeleri beklenmektedir (Korhonen, 2002; Ozen, Pons ve Tur, 2012; Siró, Kápolna, Kápolna ve Lugasi, 2008). Bu beklentiler doğrultusunda, gıdaların yeniden tasarlanması önem kazanmış, “fonksiyonel gıdalar” ve “yeni/yenilikçi gıdalar” terimleri ortaya çıkmıştır.

Fonksiyonel gıdalar, “yeterli besleyicilikle birlikte metabolizmada bir veya daha fazla fonksiyonu olumlu şekilde etkileyen gıdalar olmalarının ötesinde bireyin sağlığında, fiziksel performansında veya ruhsal durumunda olumlu etki yaratan gıdalar” olarak tanımlanmaktadır (Diplock ve diğerleri, 1999). Bu tanıma göre, fonksiyonel gıdalar diyetle gıda olarak alınabilen, doğal veya farklı teknolojik yaklaşımlarla fonksiyonelliği sağlanmış/artırılmış gıdalardır. Bu gıdaların tanımlanması veya üretilmesinde, gıda içeriğinde bulunan biyolojik olarak aktif bileşenler belirleyicidir. Bu anlamda, ilgili bileşenin biyoaktif bir bileşen olarak kabul edilmesi için "vücutta bir veya daha fazla hedef fonksiyonu olumlu bir şekilde etkilemesi" gerekmektedir.

Biyoaktif gıda bileşenleri içerisinde önemli bir grubu biyoaktif peptitler oluşturmaktadır. Biyoaktif peptitler, bulundukları protein yapısı içerisinde inaktiftirler. Bu peptitler, proteinlerin sindirimi sürecindeki koşullar ve proteolitik enzimler ile parçalanması sonucu ortaya çıkmaktadırlar. Bu moleküller; yapısal özelliklerine, aminoasit bileşimlerine, dizilimlerine ve yüklerine bağlı olarak farklı tür ve düzeyde biyoaktif özellikler gösterebilmektedirler (Gür, Güzel, Öncül, Yıldırım ve Yıldırım, 2010; Kınık ve Oğuz, 2002; Korhonen, 2002; Marciniak, Suwal, Naderi, Pouliot ve Doyen, 2018). Bu sahip oldukları özellikler, biyoaktif peptitlerin gıda katkı maddesi olarak kullanımlarını oldukça ilgi çekici kılmaktadır.

Süt, kazeinlerin yanı sıra serumda bulunan α -laktalbümin, β -laktoglobülin, immünoglobülinler, laktoferrin, proteoz-peptit fraksiyonları ve minör serum proteinleri içerir ve bu proteinler oldukça önemli biyoaktif peptit kaynaklarıdır (Clare ve Swaisgood, 2000). Süt proteinlerinin proteazlar ile hidrolizi biyoaktif peptitlerin salımının yanı sıra amino asitlerin de üretimine sebep olur. Özellikle dallı zincirli amino asitler (lösin, izölösin ve valin) sporcuların, emziren kadınların ve yaşlılara dönük fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılmaktadır. Süt proteini hidrolizatları, sağlık yararlarına ek olarak, düzenleyici otoriteler tarafından günlük tüketim için tavsiye edilen değerlere yakın makro ve mikro besin seviyelerine sahip olmaları nedeniyle öne çıkmaktadırlar (Girolodi, Grambusch, Neutzling Lehn ve Volken de Souza, 2021).

Fakat bu proteinlerden elde edilen biyoaktif peptit açısından zengin gıda katkılarının ticari ürünlere dönüştürülmesinde bir dizi zorluk mevcuttur. Hidroliz işlemi, istenmeyen lezzet oluşumu, yüksek higroskopisite ve düşük suda çözünürlük gibi olumsuz değişiklikler ile renk değişikliği ve raf ömrünün kısalması gibi fizikokimyasal kararsızlıklara da neden olabilmektedir (Girolodi ve diğerleri, 2021). Bunun yanı sıra, hidroliz sonucunda oluşan biyolojik olarak aktif peptitlerin ilgili aktiviteyi göstereceği bölgeye, sindirim sürecinde bozulmadan ve aktivitesini koruyarak ulaşması önemlidir. Bu sebeple, biyoaktif bir bileşenin aktivitesi korunarak vücuttaki hedef bölgeye taşınmasında, uygun teknolojileri kullanmak ve doğru gıda matrisini seçmek oldukça önemlidir. Bunun için, her bir biyoaktif bileşenin, hedef bölgeye ulaştırılmasının planlanması, uygun bir gıda formülasyonunun belirlenmesi ve bu süreçlerin optimize edilmesi gereklidir (Korhonen, 2002).

Enkapsülasyon, stabiliteyi artırmak, fonksiyonelliği korumak ve salımı kontrol etmek için umut verici bir strateji olarak kabul edilir. Peptitlerin enkapsülasyonunun avantajları arasında, acı tatlarını maskeleyerek duyuusal özelliklerin iyileştirilmesi, çözünürlüklerinin artması ve peptitlerin higroskopisite etkilerinin azaltılması da yer almaktadır (Aguilar-Toala, Quintanar-Guerrero, Liceaga ve Zambrano- Zaragoza, 2022). Ancak, suda çözünen bileşikler olan biyoaktif peptitlerin gıda matrisine ve endüstriyel üretime uygun şekilde enkapsülasyonu kolay değildir. Son yıllarda, lipofilik biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonu, korunması ve

salınmasını amaçlayan gıda sınıfı kolloidal dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak, hidrofilik biyoaktif bileşenleri etkili bir şekilde enkapsüle edebilen, koruyabilen ve salabilen, ekonomik taşıyıcı sistemlerin varlığı halen sınırlıdır. Günümüze dek protein hidrolizatlarının ve biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonunda püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma, lipozomlar, koaservasyon ve çift katlı emülsiyonlar kullanılmıştır (McClements, 2015).

Enkapsülasyon yönteminin yanı sıra, uygun enkapsülasyon ajanlarının seçimi de işlemin başarısı için önemlidir. Gıda endüstrisi yenilebilir, biyolojik olarak parçalanabilen ve toksik olmayan enkapsülasyon maddelerinin kullanımını gerektirmektedir (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2022; Girolodi ve diğerleri, 2021). Halihazırda endüstriye uygulanabilen en temel enkapsülasyon tekniği, üretim maliyetleri ve gıdada uygulanabilirliği nedeniyle püskürtmeli kurutma tekniğidir. Bu teknik, korunacak değerli bileşenin bir duvar materyali ile kaplanması ve püskürtmeli kurutma ile toza dönüştürülmesi temeline dayanmaktadır (Chawda, Shi, Xue ve Young Quek, 2017; McClements, 2012). Bir diğer teknik olan ve liyofilizasyon olarak da bilinen dondurarak kurutmada ise su süblimasyon ile uzaklaştırılır ve süblimasyon aşamasında düşük basınçlar ile sıcaklıklardan yararlanır. Bunun bir sonucu olarak üründeki besin ve duyu kayıpları azaltılabilir. Ancak, dondurarak kurutma pahalı bir kurutma teknolojisidir (Girolodi ve diğerleri, 2021). Suda çözünen değerli bileşenler, lipozomlar içerisinde hapsedme, ko-ekstrüzyon, kompleks koaservasyon gibi tekniklerle de enkapsüle edilebilmektedir, ancak bu teknikler görece pahalı, düşük verimli, standardizasyon sorunları yaşanabilen ve endüstriyel uygulamaya dönüştürülebilmesi veya gıda sistemlerine uygulanabilmesinde zorluklarla karşılaşılabilen tekniklerdir (McClements, 2018; Mohan, Rajendran, He, Bazinet ve Udenigwe, 2015). Benzer şekilde, biyoaktif peptitler gibi suda çözünen bileşiklerin de suda çözündürüldükten sonra bir yağ katmanı ile kaplanması, yani emülsiyona dönüştürülmesi (W/O) makul bir seçenektir. Ancak, hem değerli bileşenin emülsiyon formunda veya gıda matrislerinde uzun süre tutulması, emülsiyonun düşük kararlılığa sahip doğası nedeniyle çoğunlukla mümkün değildir. Ayrıca, dış fazın yağ oluşu, bu W/O emülsiyonlarının daha kararlı olan toz forma dönüştürülmelerini neredeyse imkansız kılmaktadır. Bir diğer alternatif yaklaşım olarak, bu emülsiyonlar (W/O) bir diğer dış su fazında dağıtılabilir ve su içinde yağ içinde su emülsiyonları (W/O/W) üretilebilir. Bu

emülsiyon sistemleri çift katlı veya çifte veya çift emülsiyon olarak adlandırılmaktadırlar. Bu emülsiyonlar ile en iç fazda taşınan maddelerin korunması ve kontrollü salınımı mümkündür (Benichou, Aserin ve Garti, 2004; Dickinson, 2011; Sapei, Naqvi ve Rousseau, 2012). Ancak, bu emülsiyonların uzun depolama koşullarındaki termodinamik kararsızlıkları, bunların gıda uygulamalarında kullanımını önemli ölçüde kısıtlar. Fakat W/O emülsiyonlarının aksine, W/O/W emülsiyonları toz ürünlere dönüştürülebilmektedir. Suda çözünen değerli bileşenlerin tutulması ve kontrollü salımında önemli potansiyel barındıran çoklu emülsiyonların kararlılığını artırmak için kurutmak etkin bir yöntemdir. Bu emülsiyonların kurutulmasında sadece ekonomik nedenlerle değil, teknolojik avantajlarıyla da püskürtmeli kurutma öne çıkmaktadır. Bu alternatif, yani çoklu emülsiyonların püskürtmeli kurutma ile toza dönüştürülmesi, biyoaktif peptitler gibi suda çözünen değerli bileşenlerin enkapsülasyonundaki sorunların aşılabilmesinde iyi bir alternatif çözüm sunmaktadır (Adachi, Imaoka, Ashida, Maeda ve Matsuno, 2004; Adachi, Imaoka, Hasegawa ve Matsuno, 2003; Bruckner, Bade ve Kunz, 2007; Bušić ve diğerleri, 2018; Nissim Garti, 1997a; Lee, Ahn ve Kwak, 2013).

W/O/W emülsiyonlarının tasarımı, kullanılacağı uygulamanın amacına göre kapsamlı bir şekilde değiştirilebilmektedir. Ancak W/O/W emülsiyonları tipik olarak iki aşamalı bir homojenizasyon yaklaşımı ile üretilmektedir. İlk adımda, su fazı (W_1) yağda çözünen emülgatör içeren bir yağ fazında (O) dağıtılır ve birincil emülsiyon olarak adlandırılan W_1/O emülsiyonu üretilir. İkinci adımda, birincil emülsiyonun, suda çözünür emülgatör içeren bir su fazında (W_2) dağıtılması ile $W_1/O/W_2$ emülsiyonu elde edilir. Bu emülsiyonlar toz ürüne dönüştürülecek ise dış su fazına ayrıca duvar materyalleri ilave edilir. Tüm bu süreçte son ürünün enkapsülasyon etkinliği, kararlılığı ve aktif bileşenin salım özellikleri, tüm bu aşamalardaki fazların özelliklerine ve işlem koşullarına bağlıdır. Bu nedenle, bu sürecinin tam olarak anlaşılması, dizaynı ve optimizasyonu çok önemlidir (Ding, Serra, Vandamme, Yu ve Anton, 2019).

Bu tez çalışmasında, kazein hidrolizatının yüksek biyoaktiviteye sahip bir gıda katkı maddesi olarak üretilmesi için emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği kullanılarak çift katlı emülsiyonların oluşum koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu kapsamda;

- Dağılmış fazı kazein hidrolizatı olan $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonunun üretiminde kullanılabilecek uygun emülgatörler ve konsantrasyonları ile emülsiyon üretimindeki faz oranları (W_1/O ve ($W_1/O/W_2$)) belirlenmiştir.
- Çift katlı emülsiyon oluşturulmasında farklı mekanizmalarla çalışan homojenizatörler (rotor-statör, yüksek basınç homojenizatör ve ultrases homojenizatör) denenmiş ve emülsifikasyon etkinlikleri kıyaslanmıştır.
- Kazein hidrolizatlarının mikroenkapsülasyonunda çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ilk kez uygulanmıştır.
- Mikroenkapsülasyonda uygun duvar materyalleri ile kombinasyonları, kombinasyon içerisindeki duvar materyali oranları ve duvar materyali konsantrasyonu incelenmiş ve yöntemin etkinliği *in vitro* sindirimdeki salım dikkate alınarak değerlendirilmiştir.
- Mikroenkapsülasyonda protein ve karbonhidratların birlikte kullanımının yanı sıra, protein-karbonhidrat konjugatının duvar materyali olarak kullanımı ve üretilmiş olan tozlardaki biyoaktif peptitlerin *in vitro* sindirimdeki salımları incelenmiştir.

Ülkemiz, gıda katkı maddelerinin üretimi konusunda dışa bağımlı bir konumdadır. Son yıllarda, çeşitli kamu kurumlarının konu ile ilgili verdiği desteklerle, çağrılı projelerle ve bazı özel sektör kuruluşlarının alana yaptıkları yatırımlarla bir miktar yol kat edilmiştir. Ancak, halen bilgi ve deneyim açısından ciddi eksiklikler mevcuttur. Bu tez kapsamında, çift katlı emülsiyon üretimi, çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ile mikroenkapsülasyon gibi yeni, ülkemizde hiç kullanılmayan veya çok nadir uygulanan üretim teknikleri uygulanmıştır. Bu tez çalışmasının, gıda katkı maddeleri üretim teknolojileri alanında gelişimimize katkı sunacağı düşünülmektedir. Ayrıca, tez çalışması ile kazein hidrolizatlarının biyoaktivitelerinin korunması ve ince bağırsak ortamında salımı için çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ilk kez çalışılmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kazein hidrolizati

Biyoaktif peptitler, bulundukları protein yapısı içerisinde inaktif haldeyken, proteinlerin sindirim sürecinde proteolitik enzimler ve ortam koşullarının etkisi ile parçalanması sonucu ortaya çıkmakta ve hormon benzeri özellikleriyle çok çeşitli fizyolojik etkiler gösterebilmektedirler. Genellikle, 2-20 aminoasit kalıntısı içeren, düşük molekül ağırlığına sahip bu moleküller, yapısal özelliklerine, aminoasit bileşimine, dizilimine ve elektiksel yüküne bağlı olarak çeşitli biyolojik özellikler göstermektedirler (Gür ve diğerleri, 2010; Kınık ve Oğuz, 2002; Korhonen, 2002; Marciniak ve diğerleri, 2018). Buna karşın, bu peptitlerin gıda matrisine katıldıklarında, diğer gıda bileşenleri ile etkileşerek (örneğin Maillard reaksiyonları) yeni bileşikler oluşturma riski bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, biyoaktif peptitler acı lezzete sahip bileşiklerdir ve katıldıkları gıdanın lezzetini olumsuz etkileme potansiyeline sahiptirler. Özetle, biyoaktif peptitlerin sadece biyoaktif özellikleri ile değil, gıda uygulamaları ile değerlendirilmeleri gerekmektedir (Daliri, Lee ve Oh, 2018; Korhonen, 2002; Udenigwe ve Fogliano, 2017).

Tüketilen gıdadaki farklılıklar, yapı içi etkileşimler ve sindirim sürecinin doğası gereği, protein parçalanması ile açığa çıkan bu peptitlerin oluşum süreci ve vücuttaki hedef organlara ulaşması büyük ölçüde tesadüfi olmaktadır. Biyoaktif peptitlerin üretilmesi, özgün peptitlerin faydalarının saptanması ve bu faydalardan yararlanmayı tesadüfi olmaktan çıkarma çabası, bu alandaki çalışmaların merkezine oturmaktadır. Çeşitli gıdalardaki biyoaktif peptitlerin kaynağında da, gıdada doğal olarak bulunan proteolitik enzimlerin veya gıdada gelişen mikroorganizmalar tarafından salgılanan proteolitik enzimlerin aktivitesi yatmaktadır. Gıdaların fonksiyonelliğini artırmak amacıyla, katkı maddesi olarak biyoaktif peptitlerin üretiminde de benzer mekanizmalar kullanılmaktadır. Ya *in vitro* koşullarda proteolitik enzimlerle, ya da proteolitik aktivitesi yüksek olan mikroorganizmalarla hidrolizasyon gerçekleştirilmektedir (Korhonen ve Pihlanto, 2003; Marciniak ve diğerleri, 2018; Toldrá, Reig, Aristoy ve Mora, 2018). Proteoliz sonucu elde edilen hidrolizat doğrudan kullanılabildiği gibi, çeşitli membran ayırma, jel filtrasyonu, iyon değiştirme ve sıvı

kromatografisi teknikleri ile saflaştırılabilmekte, özgün peptit veya peptit grupları elde edilebilmektedir. Enzimatik hidroliz ve saflaştırmanın birlikte kullanıldığı sürekli sistemler de denenmektedir. Ancak, hem yüksek maliyet ve düşük verim, hem saflaştırmada karşılaşılan teknik sorunlar, hem de biyoaktif bileşenlerin karışımlar halinde bulunduklarında sıklıkla gösterdiği sinerjistik etki sonucu ortaya çıkan yüksek biyoaktivite, peptitlerin tek tek saflaştırılması çalışmalarının laboratuvar düzeyinin ötesine geçmesini engellemektedir (Agyei ve Danquah, 2011; Chawda ve diğerleri, 2017; Daliri ve diğerleri, 2018; Lemes ve diğerleri, 2016).

Biyoaktif peptit kaynağı olarak literatürde en çok kullanılan proteinler, süt proteinleridir. Süt proteinlerinin hidrolizi sonucu ortaya çıkan biyoaktif peptitler, insan metabolizmasında gösterdikleri biyolojik fonksiyonlarla hipertansiyon, diyabet, damar tıkanıklığı, bağışıklık bozukluğu, hiperkolesterol, oksidatif stres, duygu durum bozukluğu gibi rahatsızlıkların oluşumunu engelleyici veya geciktirici rol oynamaktadırlar. Ayrıca, biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal özellik taşıyabildiği ve mineral emilimini de desteklediği belirlenmiştir (Akpınar ve Uysal, 2013; Chakrabarti, Guha ve Majumder, 2018; Clare ve Swaisgood, 2000; Daliri ve diğerleri, 2018; Marcone, Belton ve Fitzgerald, 2017; Wang, Dong, Li, Han ve Su, 2017).

Süt ürünlerindeki biyoaktif peptit içeriği, gerçekleşen proteoliz düzeyi ile ilişkilidir. Süt ürünleri içerisinde en yüksek miktarda biyoaktif peptide, olgun peynirlerde rastlanmıştır. Olgunlaşma ile genellikle biyoaktivite artmış, ancak belirli bir düzeydeki olgunlaşma sonrasında bu aktivitede azalmalar saptanmıştır (Korhonen, 2009; Korhonen ve Pihlanto, 2003; Otağ ve Hayta, 2013). Bu azalmanın temel nedeni, oluşan biyoaktif peptitlerin, olgunlaşma sürecinde devam eden proteolizle parçalanmaları ve aktivitelerini kaybetmeleridir. (Ay ve Şanlı, 2018; Korhonen, 2009).

Süt proteinlerinin çeşitli enzimler veya kombinasyonları ile farklı koşullarda hidrolizlenerek elde edilen hidrolizatların özelliklerine dair literatürde çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Contreras, Carrón, Montero, Ramos ve Recio, 2009; Contreras, Hernández-Ledesma, Amigo, Martín-Álvarez ve Recio, 2011; Tavares ve diğerleri, 2011). Bununla beraber, enzim çeşidi ile

miktarının ve inkübasyon koşullarının her bir uygulama için optimize edilmesi gerekmektedir. Özellikle hidroliz hızını arttırarak veya biyoaktivitesi daha yüksek hidrolizatlar elde ederek verimi yükseltmeyi amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda, mikrodalga, yüksek voltaj vurgulu elektrik alan, yüksek hidrostatik basınç ve ultrases gibi çeşitli yeni tekniklerin enzimatik hidroliz sürecinde uygulanması, son yıllarda çalışılmaya başlanmıştır (Boukil, Suwal, Chamberland, Pouliot ve Doyen, 2018; Fu, Woo ve Chen, 2011; A. F. García, Zöller, Butz, Stärke ve Tauscher, 2006; Lin, Kelly, O'Mahony ve Guinee, 2018; Marciniak ve diğerleri, 2018; Mikhaylin, Boussetta, Vorobiev ve Bazinet, 2017; Quirós, Boltes ve Rosal, 2016; Zhao, Huo, Qian, Ren ve Lu, 2017).

Süt içerisindeki temel protein, toplamın yaklaşık %78'ini oluşturan kazeinlerdir (α_{s1} -, α_{s2} -, β - ve κ -kazein) ve kalan kısmı da serumda bulunan α -laktalbümin, β -laktoglobülin, immünoglobülinler, laktoferrin, proteoz-peptit fraksiyonları ve minör serum proteinlerinden oluşmaktadır (Clare ve Swaisgood, 2000). Süt proteinleri arasında, kazeinin başta anjiyotensin dönüştürücü enzim (angiotensin converting enzyme, ACE) inhibitör aktivitesi olmak üzere, çok çeşitli biyoaktif özellik açısından değerli bir kaynaktır. Bunun temel sebebinin, kazein içeriğinde prolin aminoasidinin fazla miktarda bulunması olduğu düşünülmektedir (Contreras ve diğerleri, 2011; Otte, Shalaby, Zakora, Pripp ve El-Shabrawy, 2007).

Kazeinin hidrolizi antioksidan, antibakteriyel, antikoagülan, immünomodülatör ve anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivitesi gibi sağlığı geliştirmeye ve hastalığı önlemeye yönelik birçok aktiviteye sahip biyoaktif peptitleri serbest bırakır (Salami ve diğerleri, 2011; Sarabandi, Mahoonak, Hamishehkar, Ghorbani ve Jafari, 2019; Tu ve diğerleri, 2018). Örneğin, κ -kazein hidrolizi ile ACE inhibitör aktivitesine sahip RYPSYG (fragman 25–30) ve DERF (fragman 15–18) peptitler, β -kazeinin hidrolizinden antihipertansif peptitler olarak LHLPLP (fragman 133–138) ve LVYPPFGPIPNSLPQNIPP (fragman 58–76), ACE inhibisyonu ve antikoagülan etkiye sahip YQEPVLGPVRGPFPIIV (fragman 193–209) olduğu bildirilmiştir (Tu ve diğerleri, 2018). Tu ve diğerleri (2018) toksik veya alerjik olmadığı öngörülen biyoaktif peptitler açısından zengin kazein hidrolizatları üretmişlerdir. Yazarlar farklı hidroliz oranlarında kazein hidrolizatlarından yetmiş farklı peptit

belirlemişlerdir (Tu ve diğerleri, 2018). Bir diğer çalışmada α_{s2} - ve κ -kazein hidrolizatlarında antibakteriyel, ACE inhibitörü ve antioksidan aktiviteleri saptanmıştır. Çalışmada koyun α_{s2} - kazeininden elde edilen LKKISQ (fragman 165–170), ve PYVRYL (fragman 203–208), peptitlerinin güçlü bir ACE inhibe edici aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca, PYVRYL dizili (203-208) fragmanının, ACE-inhibitör aktivitesine ek olarak antibakteriyel ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir (López-Expósito, Quirós, Amigo ve Recio, 2007). Bir diğer çalışmada manda sütünden elde edilen peptitlerin ACE inhibitör aktivitesi ve antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Bu çalışmada ACE inhibitörü etki gösteren peptitler (FPGPIPK, IPPK, IVPN ve QPPQ) ve antioksidan etki gösteren peptitler (YPSG, HPFA ve YPSG, HPFA ve KFQ) tanımlanmıştır (Abdel-Hamid, Otte, De Gobba, Osman ve Hamad, 2017).

2.2. Çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği

2.2.1. Çift katlı emülsiyonlar

Emülsiyonlar metastabil kolloidlerin bir örneğidir ve birbirine karışmayan iki sıvıdan oluşan sistemlerdir (Leal-Calderon, Bibette ve Schmitt, 2007). Gıda endüstrisinde bu sistemler birbirleri içerisinde karışmayan yağ ve su ile oluşmakta veya oluşturulmaktadır. Emülsiyonlar endüstriyel uygulamalarda reolojik özelliklerin modifikasyonu, optik ve organoleptik özelliklerin değiştirilmesi, kayganlaştırılma, aktif bileşenlerin enkapsülasyonu ve vücutta dağıtımı gibi çeşitli nedenlerle kullanılmaktadır.

Emülsiyon sistemlerinde kullanılan ve birbiri içerisinde karışmayan sıvılardan birisi, diğer sıvı içinde küçük küresel damlacıklar halinde dağılır. Geleneksel emülsiyonlardaki damlacıklar genellikle 100 nm ile 100 μ m aralığında çaplara sahiptir, ancak son zamanlarda yeni fizikokimyasal özelliklerinden dolayı daha küçük çaplı (<100 nm) emülsiyonların kullanımına yönelik artan bir ilgi vardır. Emülsiyonlarda damlacıklar, onları agregasyona karşı görece kararlı hale getiren bir yüzey aktif bileşen katmanı ("emülgatörler") ile kaplıdır. Bu sistemler termodinamik olarak kararsızdır ve yerçekimsel ayrılma, koagülasyon, flokülasyon, Ostwald olgunlaşması ve fazın ters çevirimi gibi fizikokimyasal mekanizmalar nedeniyle zamanla bozulma eğilimindedir (David Julian McClements, 2012).

Geleneksel emülsiyonlar, farklı fazların göreceli uzamsal dağılımına göre farklı şekilde sınıflandırılabilirler. Sulu bir fazda dağılmış yağ damlacıklarından oluşan bir emülsiyon, su içinde yağ (O/W) emülsiyonu olarak adlandırılırken, yağ fazında dağılmış su damlacıklarından oluşan bir emülsiyon, yağ içinde su (W/O) emülsiyonu olarak adlandırılır. Damlacıkları oluşturan faz genellikle "dağılmış faz", "sürekli olmayan faz" veya "iç faz" olarak tanımlanırken, bu damlacıkları çevreleyen faz "dağılma fazı", "sürekli faz" veya "dış faz" olarak adlandırılır (McClements, 2007).

Herhangi bir emülsiyon bazlı dağıtım sisteminin, gıda endüstrisinde kullanılmaya uygun olması için sahip olması gereken bir dizi özellik vardır:

- Dağıtım sisteminin gıdada kullanılabilir olması gerekmektedir. Bir başka ifadeyle, emülsiyon sistemi, gıdanın tüketileceği ülkenin regülasyonlarına uygun içeriğe sahip olmalı ve uygun işleme teknikleri ile üretilmelidir.
- Dağıtım sistemi, ekonomik şekilde tasarlanmalı ve uygun maliyetli bileşenler kullanılarak üretilmelidir. Aktif bileşenin enkapsülasyonu ile elde edilen faydalar, enkapsülasyon işlemi ile ilişkili maliyetlerden daha ağır basmalıdır.
- Dağıtım sistemi, dahil edileceği gıda matrisi ile uyumlu olmalı, yani ürünün görünümünü, dokusunu, aromasını veya raf ömrünü olumsuz etkilememelidir.
- Bir dağıtım sisteminin, amaca bağlı olacak şekilde (gıda işlenmesinde, depolamada veya tüketim sonrası sindirim süreçlerinde) kimyasal veya biyokimyasal bozunmaya karşı, aktif bileşeni korumak için tasarlanmış olması gerekmektedir.
- İdeal olarak, bir dağıtım sistemi, taşıyıcı malzemenin birim kütlesi başına nispeten büyük miktarda aktif bileşeni içerisinde hapsedebilmeli ve enkapsüle edilmiş içeriği, iletilmesi hedeflenen yere/ana kadar verimli bir şekilde tutabilmelidir. Korunması hedeflenen aktif bileşenin yüksek bir yüzdesinin, taşıyıcı malzemenin içerisinde tutulması (yüzeyinde veya dışında değil), yani enkapsülasyonu önemlidir.

Tüm bunlara ek olarak, dağıtım sisteminin, aktif bileşeni belirli bir etki bölgesinde, kontrollü bir oranda veya belirli bir çevresel tetikleyiciye (pH, iyonik güç, sıcaklık, enzimatik aktivite vb.) yanıt olarak salacak şekilde tasarlanması gerekebilir (McClements, 2016).

Geleneksel O/W veya W/O emülsiyonlarına ek olarak, yağ içinde su içinde yağ (O/W/O) veya su içinde yağ içinde su (W/O/W) emülsiyonları gibi çeşitli tipte çoklu veya çok katlı emülsiyonlar hazırlamak mümkündür. Örneğin; bir W/O/W emülsiyonu, sulu bir sürekli fazda dağılmış olan görece büyük yağ damlacıkları içinde dağılmış küçük su damlacıklarından oluşur. Literatürde bu tip çok katlı emülsiyonlar, belirli bileşenlerin salımını kontrol etmek, emülsiyon temelli gıda ürünlerinin toplam yağ içeriğini azaltmak veya bir bileşeni normalde etkileşime girebileceği başka bir bileşenden izole etmek için kullanılmıştır. Çok katlı emülsiyonlar, geleneksel emülsiyonlara göre potansiyel avantajları nedeniyle, gıda endüstrisinde kullanım alanının artması beklenen, yapısal olarak tasarlanmış emülsiyonlar grubunun bir parçasıdır (McClements, 2012). Bu grup ayrıca, nanoemülsiyonları, çok katmanlı emülsiyonları, kolloidozomları, doldurulmuş hidrojel partiküllerini ve mikrokümeleri içermektedir (McClements, 2016).

Çok katlı emülsiyonlar, “emülsiyon içerisinde emülsiyon” veya “bir emülsiyonun emülsiyonu” olarak tarif edilebilirler (Muschiolik ve Dickinson, 2017). Bu çok katlı emülsiyon sistemleri, “emülsiyon içerisinde emülsiyon” oluşturma sayısına göre, çift katlı, üç katlı veya daha karmaşık yapılara sahip olabilirler. Çok katlı emülsiyonlar, düşük termodinamik stabilite ile karakterize edilen çok karmaşık dispersiyon sistemleridir (Muschiolik, 2007).

Çok katlı emülsiyonların en basit hali çift katlı emülsiyonlardır ve içerisinde üç faz bulunmaktadır (Jiao ve Burgess, 2009). Çift katlı emülsiyonların iki ana tipi yağ içinde su içinde yağ (O/W/O) veya su içinde yağ içinde su (W/O/W) emülsiyonlarıdır. Yani, çift katlı emülsiyonlarda, tipine göre iki adet su veya iki adet yağ fazı, ayrı ayrı olarak yer almaktadır. Ancak, bu aynı temeldeki fazların bileşimleri farklı olabilmekte, hatta sıklıkla farklı olmaktadır ve bu farklılığı ifade edebilmek için genellikle emülsiyon yazımında harflere alt indis olarak rakamlar eklenmektedir. Örneğin; su içerisinde yağ içerisinde su (W/O/W) emülsiyonunda, en iç su fazı W_1 , en dış su fazı ise W_2 olarak gösterilmekte ve emülsiyon $W_1/O/W_2$ olarak yazılmaktadır (Muschiolik ve Dickinson, 2017). Bu tez çalışmasında, suda çözünen bileşenlerin enkapsülasyonu hedeflendiğinden, en içteki fazın su olduğu $W_1/O/W_2$

emülsiyonları ile çalışılmıştır ve aksi belirtilmedikçe, çift katlı emülsiyon denildiğinde $W_1/O/W_2$ emülsiyonlarının anlaşılması beklenmektedir.

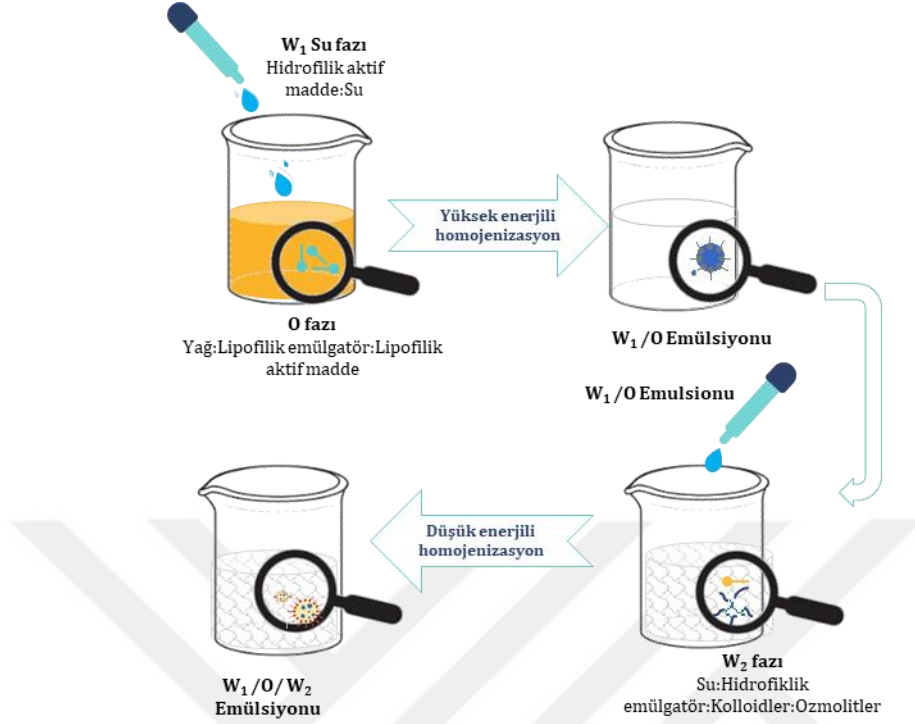
Çok katlı emülsiyonların keşfi William Seifriz'e atfedilir ve 1925 yılına dayanır (Nissim Garti, 1997a; Muschiolik ve Dickinson, 2017). Seifriz, kazein tarafından stabilize edilmiş O/W emülsiyonlarının faz ters çevrimini araştırırken, çok katlı emülsiyonların karmaşık mikro yapısına ilişkin gözlemlerde bulunmuştur. Daha sonraki araştırmacılar, özellikle zıt hidrofil-lipofil dengesine sahip emülgatörlerin bir karışımını içeren sistemlerde, emülsiyon fazının ters çevrilmesi sırasında sistemin çift katlı emülsiyon oluşturma eğilimini fark etmişlerdir (Dickinson, 2011). Çift katlı emülsiyonların ilk uygulamalarından birisi olan insülinin enkapsülasyonu, bu tekniğin keşfedilmesinden 35 yıl sonra gerçekleştirilmiştir. Çift katlı emülsiyonların gelişim tarihi açısından bir diğer önemli adım ise, Matsumoto ve arkadaşlarının 1976 yılında çift katlı emülsiyon hazırlamak için iki aşamalı standart emülsifikasyon prosedürünü yayınlamasıdır. Bu çalışmada, önce Bancroft kuralına göre bir W/O emülsiyonu hazırlanmış ve ardından ikinci emülsifikasyon adımı için yağ fazı olarak W/O emülsiyonu kullanılarak çift katlı W/O/W emülsiyonu elde edilmiştir. O zamandan beri, iki adımlı emülsifikasyon yöntemi, çift katlı emülsiyon elde etmek için en yaygın kullanılan yöntem haline gelmiştir. Öte yandan, çift katlı emülsiyonun kendiliğinden oluştuğu tek adımlı emülsifikasyon işlemi, işlemin basitliği nedeniyle her zaman ilgi görmüştür (Ding ve diğerleri, 2019).

Çift katlı emülsiyonlar, yapılacak uygulamanın hedefleri doğrultusunda farklı şekillerde tasarlanabilmektedir (Ding ve diğerleri, 2019). Gıda uygulamaları için çift katlı emülsiyonların ilgi çekmesinin iki ana stratejik nedeni vardır. Birincisi, farmasötik/kozmetik alanındaki uygulamalara benzer şekilde, bir besin ögesi veya aroma bileşiği gibi hassas bir içeriği enkapsüle etmek ve ardından bunun ağız veya sindirim sistemindeki hedef bölgede kontrollü bir şekilde salımını sağlamaktır. İkinci stratejik hedef ise, daha sağlıklı, yağı azaltılmış ürünlerin üretiminde bu emülsiyonların kullanımıdır. Buradaki konsept, geleneksel bir O/W gıda emülsiyonunun yağ içeriğini, duysal olarak benzer algılanan bir şekilde W/O/W emülsiyonu ile değiştirerek, toplamdaki yağ oranını azaltmaktır (Dickinson, 2011). Gıda bilimcileri açısından çift katlı emülsiyonların uygulanmasındaki temel zorluk,

farmasötik ve kozmetik uygulamaların çoğunda kolaylıkla kullanılabilen çözgenlerin, sentetik sürfektanların ve/veya polimerlerin gıda alanında kullanılamaması; yerine çok daha sınırlı tipte var olan gıda sınıfı emülgatörler ve stabilizatörler kullanarak kararlı formülasyonların üretilmesinin zorunlu olmasıdır (Dickinson, 2011).

Şekil 2.1'de gösterilen iki aşamalı emülsifikasyon prosedürü, çift katlı emülsiyon üretimi için en popüler ve geleneksel yöntemdir (Kumar ve diğerleri, 2022). $W_1/O/W_2$ emülsiyonları tipik olarak iki aşamalı bir homojenleştirme yaklaşımı kullanılarak üretilir. İlk adımda, bir su fazının (W_1) yağ ve yağda çözünen bir emülgatör içeren bir yağ fazı (O) ile homojenizasyonu ile W_1/O emülsiyonu üretilir. Bu emülsiyona birincil emülsiyon denilir. İkinci adımda, W_1/O emülsiyonunun su ve suda çözünür bir emülgatör içeren başka bir su fazında (W_2) dağıtılması ile $W_1/O/W_2$ emülsiyonu elde edilir (Kumar ve diğerleri, 2022; McClements, 2016). Tasarım açısından, W_1/O emülsiyonundaki su damlacıklarının boyutu, birinci homojenizasyon adımıda değişen emülgatör tipi, emülgatör konsantrasyonu ve homojenleştirme koşulları (enerji yoğunluğu, süresi vb.) ile kontrol edilebilir. Benzer şekilde, nihai $W_1/O/W_2$ emülsiyonundaki yağ damlacıklarının boyutu ise, ikinci homojenizasyon adımıda değişen emülgatör tipi, emülgatör konsantrasyonu ve homojenleştirme koşulları ile kontrol edilebilir. Aynı zamanda, hem birincil emülsiyon hazırlama aşamasındaki ilk homojenizasyonda hem de çift katlı emülsiyon hazırlamasındaki ikinci homojenizasyon aşamasında kullanılan iç:dış faz oranları emülsiyon özelliklerini doğrudan etkilemektedir ve bu oranlar emülsiyon tasarımı açısından kritiktir.

Çift katlı emülsiyonlardaki damlacık tasarımı açısından bir diğer önemli konu, iç ve dış su fazlarının ozmotik dengesidir. Emülsiyon oluşumundan sonra ozmotik şişme yöntemleri kullanılarak damlacık boyutlarında farklılaşmalar sağlanabilir. Dış su fazındaki çözünen madde konsantrasyonu, iç su fazdakinden daha yüksekse, birincil emülsiyonun iç fazını oluşturan su, yağ damlacıklarından dışarı difüze olma eğilimi gösterir ve bu durum, damlacıkların büzüşmelerine neden olur. Tersine, iç su fazındaki çözünen madde konsantrasyonu dış su fazdakinden daha büyükse, o zaman da dış su fazından yağ damlacıklarına içerisine difüzyon eğilimi gerçekleşir ve bu durumda da damlacıklarda şişme gözlemlenir (McClements, 2016).



Şekil 2.1. Çift aşamalı su içinde yağ içinde su ($W_1/O/W_2$) emülsiyonlarının hazırlanması.

Çift katlı emülsiyonlardaki fazların fiziksel hallerinde değişimler sağlayarak da emülsiyon özelliklerinde farklılaşmalar sağlamak mümkündür. Örneğin; iç ve/veya dış su fazları uygun jelleştirici ajanlar kullanılarak jelleştirilebilir veya yağ fazının bileşimi ya da termal özellikleri kontrol edilerek tamamen veya kısmen yağ fazı kristalleştirilebilmektedir. Sonuç olarak, bu yaklaşımı kullanarak farklı bileşimlere, yapılar, fizikokimyasal özelliklere ve fonksiyonel niteliklere sahip çok katlı emülsiyonlar üretilebilir (McClements, 2016).

Çok katlı emülsiyonlar, birçok gıda uygulamasında önemli bir potansiyele sahiptir. Örneğin; çok katlı emülsiyonların iç fazındaki damlacıklar, kontrollü salım için aktif bileşenleri tutan bir rezervuar işlevi görebilir. Ancak bu durum, pek çok pratik uygulama için teoride kalmaktadır. Çünkü çift katlı emülsiyonlar, klasik emülsiyonlara göre çok fazla termodinamik ve kinetik kararsızlık içermektedir ve bu kararsızlıklar çift katlı emülsiyonların gıda uygulamalarını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır (Nissim Garti ve Benichou, 2004).

Çift katlı emülsiyonlardaki kararsızlıklar çok farklı nedenlere dayanabilir. Damlacıkların flokülasyonu (kümelenme), yerçekimsel ayrılma (sedimentasyon/kremleşme), koalesans (bütünleşme), Ostwald olgunlaşması, işleme veya depolama sırasında faz ayrılması ve enkapsüle edilmiş aktif bileşenin iç su fazından sızması bu nedenlerin en önde gelenleridir (Lamba, Sathish ve Sabikhi, 2015). Flokülasyon durumunda damlacıklar bütünlüklerini korurken, floklar halinde bir arada konumlanırlar. Dağılmış faz damlacıkları arasındaki çekici kuvvetler (van der Waals etkileşimleri), itici kuvvetleri (elektrostatik ve sterik etki) yendiğinde flokülasyon meydana gelir. Düşük konsantrasyonda emülgatör kullanımı flokülasyona (köprülenme flokülasyonu) neden olabileceği gibi, yüksek konsantrasyonda emülgatör veya kıvam arttırıcı kullanımı nedeniyle de flokülasyon (tükenme flokülasyonu) oluşabilir. Flokülasyon ile yerçekimsel ayrılma esasen birbirine bağlıdır ve birbirini tetikler. Yerçekimsel ayrışma, iki faz arasındaki yoğunluk farkından dolayı makroskobik ayrışmaya yol açar. Bu fenomen, damlacık boyutunun ve sürekli fazın viskozitesinin, yerçekimsel ayrımı doğrudan etkilediğini ortaya koyan Stokes teoremi tarafından oldukça iyi tanımlanmıştır. Yerçekimsel ayrım düzeyi, damlacık boyutu ile doğrudan ilişkilidir ve genel olarak küçük damlacık boyutu ile fiziksel olarak görece kararlı bir emülsiyon oluşturmak mümkündür. Hem flokülasyonda, hem de yerçekimsel ayrımda damlacıklar bütünlüklerini korumaktadır. Ancak, emülsiyon kararsızlığının daha ileri aşaması veya sonucu olan koalesans ile, aynı fazdaki dağılmış damlacıklar birleşir ve daha büyük damlacıkları oluştururlar. Çift katlı emülsiyonların davranışı, su-su birleşmesinden neredeyse hiç etkilenmez. Çift katlı emülsiyonlarda iç emülsiyonun damlacık boyut dağılımı değişiklik gösterse de, esas olarak yağ damlacık boyut dağılımı ve yağ damlacıklarının hacim oranı tarafından kararsızlık belirlenir. Ostwald olgunlaşması ise küçük damlacıkların daha büyük damlacıklara difüzyonunu içerir. Bu olgu, dağılmış faz boyutu çok büyüyerek emülsiyonun viskozitesinde ani bir düşüşe neden olduğunda veya sıcaklık ve iyonik güç gibi doğal çevresel parametreler değiştiğinde meydana gelir (Kumar ve diğerleri, 2022; Leister ve Karbstein, 2020).

Çift katlı emülsiyonlarda yağ fazı boyunca su ve suda çözünür bileşiklerin difüzyonu ile ilgili üç olası mekanizma tanımlanmıştır (Kocaman, Can Karaca ve Van der Meeren, 2020). Bunlar ters misel taşıma, hidratlanmış yüzey aktif madde taşıma ve çok ince bir lamel boyunca difüzyondur. Ters misel mekanizması küçük molekül ağırlıklı emülgatörlerin iç fazdan dış

faza taşınması ile gerçekleşir. Ozmotik basıncın eşit olmaması durumunda, su iç fazdan dış faza akabilir veya tam tersi olabilir. Yağ fazında yeterli sayıda ters misel varsa, ozmotik basınç gradyanı olmasa bile su moleküllerinin ve suda çözünen bileşiklerin ters misellerle önemli düzeylerde taşındığı gösterilmiştir. Çoğu durumda, hidrofobik yüzey aktif maddeler çok fazla eklenir, bu nedenle ters misellere birleşme meydana gelebilir (Garti ve Lutz, 2004). Wen ve Papadopoulos (2000), görsel olarak temas eden ve temas etmeyen W/O ve O/W arayüzleri arasında farklı su geçiş hızları bildirmiş ve her bir durumun farklı bir taşıma mekanizmasına sahip olduğunu belirtmişlerdir. İç ve dış fazlar arasında temasın olduğu durumda, suyun taşınması esas olarak hidratlanmış yüzey aktif maddelerin difüzyonu ile olur. Bu fazlar temas halinde olmadığında, ters miseller ve emülsifiye edilmiş damlacıklar nedeniyle su taşınması gerçekleşir. Ayrıca, hidratlanmış yüzey aktif maddeler tarafından suyun taşınmasının, kendiliğinden emülsifiye edilmiş damlacıklar ve ters misellerden daha hızlı olduğu bildirilmiştir (Wen ve Papadopoulos, 2000). İnce katmanlı difüzyon, iç damlacıklar dış arayüze doğru hareket ederek yağ tabakasında dalgalanmaya neden olduğunda meydana gelir. Bu durumda, su veya suda çözünen moleküller, dış arayüzde ince bir yüzey aktif madde tabakasından geçer. Bu mekanizma, birleşmeye neden olmadan iç fazdaki suyu dış faza salabilir (Garti ve Lutz, 2004).

İki aşamalı homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan çift katlı emülsiyonların kararlılığı, emülsiyonun bileşimine ve birinci ile ikinci adımdaki emülsifikasyon koşullarına bağlıdır. Genel anlamda ilk olarak birincil emülsiyonun küçük damlacık boyutuna ve düşük polidispersliğe sahip olması hedeflenir. Burada amaç Laplace basıncı ile Ostwald olgunlaşmasındaki farklılıkları önlemektir (Muschiolik, 2007). Literatürde W/O/W emülsiyonlarında bunun sağlanması için genellikle homojenizatör çeşidi ve homojenizasyon koşulları, lipofilik emülgatör oranı ve çeşidi, iç su fazı:yağ fazı oranı ve ozmolit ilavesi değiştirilmiştir. İkinci adım ise, birincil emülsiyonun, yüksek bir iç damlacık verimi ve olabildiğince küçük damlacık boyutları ile ikinci bir sürekli faz içerisinde dağıtmaktır (Muschiolik, 2007). Bunun için ikinci homojenizasyon adımıdaki homojenizatör çeşidi ve homojenizasyon koşulları, hidrofilik emülgatör oranı ve çeşidi, birincil emülsiyon:dış su fazı oranı değiştirilmiştir (Garti, 1997a). Ek olarak, su fazlarının ya da yağ fazının yapısının modifiye edilmesi ve viskozitesinin artırılması ile stabilite iyileştirilmeye çalışılabilmektedir.

Bir diğerk yaklaşımda ise, çift katlı emülsiyonlar kurutularak daha kararlı toz ürünlere dönüştürülebilmektedirler.

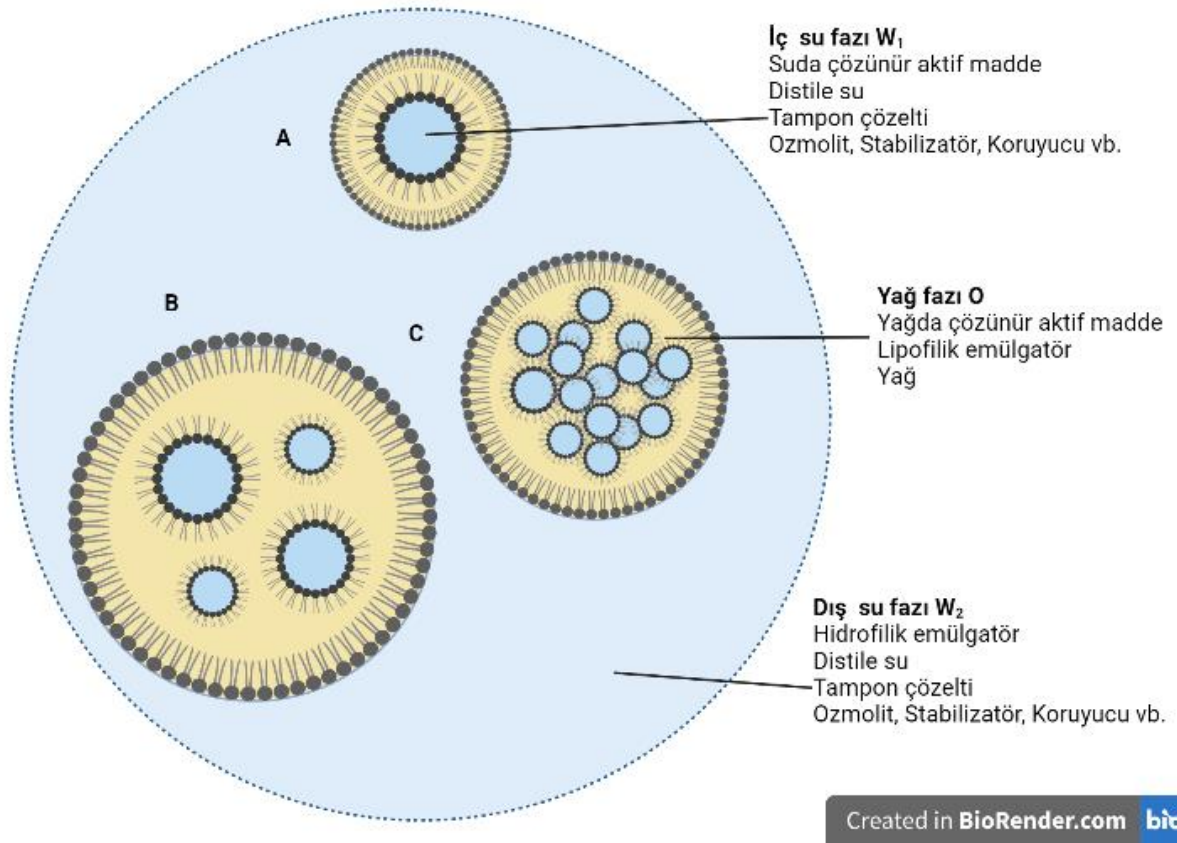
2.2.1.1. Çift katlı emülsiyonların bileşimi

W/O/W emülsiyonlarının genel yapısı Şekil 2.2’de özetlenmiştir. İç su fazı, suda çözünür aktif bileşen ve yardımcı katkıları içerebilmektedir (ozmolitler, kıvam arttırıcı veya stabilizatörler). Yağ fazı ise genellikle içerisinde lipofilik bir emülgatörün çözündürüldüğü yağdan oluşmaktadır. Bazı uygulamalarda bu faz yağda çözündürülmüş aktif bileşeni de içerebilmektedir. Yağ fazı sıvı ya da katı formda olabilir. Dış su fazı ise genellikle hidrofilik özellikte bir emülgatör içerir. Bunun yanı sıra, iç su fazında olduğu gibi dış su fazında da ozmolitler, kıvam arttırıcılar ve stabilizatörler kullanılabilir (Lamba ve diğerkleri, 2015).

Çift katlı emülsiyonlar farklı görünümlere sahip olabilirler. Şekil 2.2’de gösterilen “A” tipi emülsiyonlarda dağılmış faz olan her bir yağ damlacığı içerisinde tek bir su damlası bulunurken, “B” tipi emülsiyonlarda bir yağ damlacığı içinde birkaç su damlacığı olur ve “C” tipi emülsiyonlarda ise bir yağ küreciğı çok daha fazla sayıda su damlacığı içerir (Zhang ve diğerkleri, 2014).

Çift katlı emülsiyonlarda kullanılan yağlar ve etkileri

Mineral ve bitkisel yağlar, çift katlı emülsiyonlarda yağ fazı olarak kullanılabilir. Mineral yağ, bitkisel yağa kıyasla emülsiyonda daha fazla çoklu damlacık verimi sunsalar da biyolojik olarak parçalanabilen bitkisel yağların aksine vücuttan atılması zor olduğundan mineral yağların gıda uygulamalarında kullanılması önerilmemektedir (Lamba ve diğerkleri, 2015). Ayrıca, mineral yağların sindirime karşı dirençli olması, bu yağlar kullanılarak oluşturulan çift katlı emülsiyonların ince bağırsakta kontrollü salımını engellemektedir (Giroux ve diğerkleri, 2019; Giroux, Robitaille ve Britten, 2016).



Şekil 2.2. Su içinde yağ içinde su emülsiyonlarının şematik görünümü.

Bou, Cofrades ve Jiménez-Colmenero (2014) chia yağı, ayçiçek yağı, zeytinyağı veya işlenmiş domuz sırt yağı kullanımının gıda sınıfı W/O/W tipi çift katlı emülsiyonların fizikokimyasal özellikleri ve riboflavin enkapsülasyonunda kullanımı üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada, yağ çeşitleri arasında doymamış yağ içeriğine daha fazla sahip olan chia yağı ile oluşturulan emülsiyonların en düşük başlangıç damlacık boyutuna ve en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Fakat düşük viskozite nedeniyle bu emülsiyonun iyi bir stabilite sergileyememiştir. En yüksek stabilite en yüksek viskoziteye sahip domuz sırt yağı kullanımı ile sağlanmıştır (Bou, Cofrades ve Jiménez-Colmenero, 2014). Aditya ve diğerleri (2015) kurkumin ve kateşinin W/O/W ile enkapsülasyonunda ayçiçek yağı, zeytinyağı, orta zincirli trigliserit ve soya fasulyesi yağlarının etkisini incelemiştir. Çalışmada, uzun zincirli trigliseritler içeren, zeytinyağı, soya ve ayçiçek yağı ile üretilen emülsiyonların viskozitesinin, orta zincirli trigliseritler (MCT) içerenlerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak, emülsiyon stabilitesi açısından

yağ tipleri arasında anlamlı bir farklılık belirlenememiştir (Aditya ve diğerleri, 2015). Bir başka çalışmada soya fasulyesi yağı ve orta zincirli bir trigliserit karşılaştırılmış soya fasulyesi yağı ile oluşturulan birincil emülsiyonların daha küçük damlacık boyutuna ve daha gelişmiş stabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir (Mutaliyeva ve diğerleri, 2017). Bir başka çalışmada daha yüksek çözünürlüğü ve/veya daha yüksek dağılıbilirliği nedeniyle, uzun zincirli trigliserit içeren yağa kıyasla, orta zincirli trigliserit içeren yağ kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonlarda, dış faza amino asit taşınımının çok daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır (Kocaman, Rabiti, Murillo Moreno, Can Karaca ve Van der Meeren, 2022).

Çift katlı emülsiyonlarda kullanılan emülgatörler

Su metalik olmayan bileşikler arasında kohezyon kuvveti en yüksek sıvıdır. Apolar bileşikler, polar bileşikler ile etkileşime geçebilecek bir grup barındırmazlar. Su molekülleri, yığın su fazında komşuları ile nispeten güçlü hidrojen bağları oluşturabilirken; yağ molekülleri, yığın yağ fazında yalnızca zayıf van der Waals bağları oluşturabilir. Su molekülü, bir oksijen atomuna kovalent olarak bağlanmış iki hidrojen atomundan oluşur. Bu, hidrojen atomlarının her biri üzerinde bir kısmi pozitif yük (δ^+) ve oksijen atomu üzerindeki yalnız elektron çiftlerinin her biri üzerinde bir kısmi negatif yük (δ^-) bırakır. Tek bir su molekülü üzerindeki kısmi yüklerin tetrahedral düzenlemesi, en yakın komşuları ile hidrojen bağları oluşturabileceği anlamına gelir. Bu bağ dipol-dipol, van der Waals, sterik ve kısmi yük transferi gibi daha temel etkileşimlerin bir bileşimidir. Yağ-su arayüzünde, yağ molekülleri, su molekülleri ile yalnızca zayıf van der Waals bağları oluşturabilir, çünkü hidrojen bağları oluşturmalarını sağlayacak polar gruplara sahip değildir. Yağ gibi apolar bir molekül suya eklendiğinde, yakın çevresindeki su moleküllerinin kendilerini yeniden düzenlemelerine neden olur, bu da sistemin hem etkileşim enerjisini hem de entropisini değiştirir. Genel olarak, bu değişiklikler termodinamik olarak elverişsizdir ve bu nedenle sistem polar ve apolar gruplar arasındaki teması en aza indirmeye çalışır (McClements, 2016).

Emülgatörler, arayüzey aktivitesi gösteren, hem polar hem de apolar gruplar içeren amfifilik bileşiklerdir. Amfifilik maddeler yüzeyde birikme eğilimindedir ve bu yüzden hava-su veya yağ-su arayüzlerine doğru yönelirler. Arayüzeye adsorbe edilmiş durumun, adsorbe edilmemiş durumdan daha düşük serbest enerjiye sahip olmasından dolayı, yağ ve su fazlarını birbirinden ayırır. Böylece, akışkan arayüzlerinin arayüzey geriliminin azalmasına sağlarlar (

McClements, 2016; McClements ve Gumus, 2016; Narkiewicz-Michalek, Szymula, Losada-Barreiro ve Bravo-Diaz, 2019).

Literatürde emülgatörler için evrensel olarak tanınan bir sınıflandırma mevcut değildir. Bununla birlikte genel olarak 3 sınıfa ayrılmaktadırlar (Berton-carabin ve Schroe, 2019):

- (i) Düşük moleküler ağırlıklı emülgatörler (sürfaktanlar, monomerik emülgatörler),
- (ii) Amfifilik biyopolimerler,
- (iii) Katı veya koloidal parçacıklar.

Düşük moleküler ağırlıklı emülgatörler

Düşük moleküler ağırlıklı emülgatörler hidrofilik bir baş ve hidrofobik bir kuyruktan oluşur. Polar fonksiyonel gruplar, anyonik, katyonik, amfoterik veya iyonik olmayan karaktere sahip olabilirler. Kuyruk grubu genellikle zincir başına 10-20 karbon atomuna sahip bir veya daha fazla hidrokarbon zincirinden oluşur. Bu zincirler doymuş veya doymamış, doğrusal veya dallanmış olabilir. Fakat genellikle 16 veya daha fazla karbon atomlu yağ asidinden türetilir (Berton-carabin ve Schroe, 2019; Cox, Sandall, Smith, Rossi ve Whelan, 2020; Kralova ve Sjöblom, 2009).

Düşük molekül ağırlıklı emülgatörlerde Hidrofil-Lipofil Dengesi (HLB), kritik misel konsantrasyonu, bulutlanma noktası ve paketleme parametresi gibi bir dizi parametre önemlidir ve bu parametreler dikkate alınarak, amaca uygun özellikteki emülgatörün seçilmesi, üretilecek emülsiyonun karakteri üzerinde belirleyicidir. HLB kavramı, monomerik emülgatörleri sınıflandırmak için yaygın olarak kullanılan yarı deneysel bir yöntemdir. HLB, emülgatörün moleküler özelliklerine bağlıdır ve emülgatörün yağ ile su fazlarına yönelik göreceli ilgisini gösteren bir sayı ile tanımlanır. Bu nedenle her emülgatörün kimyasal yapısına, yani baş grubu ve kuyruk grubu yapısına göre bir HLB numarası atanır. Bir emülgatörün HLB sayısı, yağ ve/veya su fazlarında çözünürlüğünün yararlı bir göstergesidir ve bir emülgatör tarafından oluşturulacak emülsiyon tipini tahmin etmek için kullanılabilir. Düşük HLB sayısına (3–6) sahip emülgatörler ağırlıklı olarak hidrofobiktir, tercihen yağda çözünür, W/O emülsiyonlarını stabilize eder ve yağda ters miseller oluştururlar. Yüksek HLB sayısına (10–18) sahip emülgatörler ise ağırlıklı olarak hidrofiliktir, tercihen suda çözünür, O/W

emülsiyonlarını stabilize eder ve suda miseller oluştururlar. Orta HLB numarası (7-9) olan emülgatörlerin yağ veya su için özel bir tercihi yoktur ve iyi bir "ıslatma ajanı" oldukları kabul edilir. HLB sayıları 3'ün altında (çok hidrofobik) ve 18'in üzerinde (çok hidrofilik) olan moleküller, bir yağ-su arayüzünden ziyade tercihen yığın yağda veya suda birikme eğiliminde olduklarından, genellikle yüzey aktif değildirler. Bir diğer önemli husus kritik misel konsantrasyonudur. Bir emülgatörün sistemdeki miktarı kritik misel konsantrasyonu veya CMC olarak bilinen belirli bir seviyeyi aştığında emülgatör çözelti içinde miseller oluşturur. CMC'nin altında, emülgatör molekülleri ağırlıklı olarak monomerler olarak dağılır, ancak CMC aşıldığında herhangi bir ek emülgatör molekülü miseller oluşturur ve monomer konsantrasyonu sabit kalır. Ayrıca, emülgatör çözeltisi, bulutlanma noktası olarak bilinen belirli bir sıcaklığın üzerine ısıtıldığında bulanık hale gelir. Bunun nedeni, emülgatör moleküllerinin hidrofilik baş gruplarının sıcaklık yükseldikçe aşamalı olarak susuz kalması, bu durumun moleküler geometrilerini değiştirmesi ve aralarındaki hidrasyon itme gücünü azaltmasıdır. Paketleme parametresi bir emülgatörün hidrofobik kuyruğunun hacminin, kuyruğun boyuna ve hidrofilik baş kısmının enine kesit alanına bölümü ile elde edilen bir orandır. Bu değer (p) emülgatörün moleküler geometrisi hakkında bilgi vermektedir. Örnek vermek gerekirse, $p=1$ için, sıfır eğrilığe sahip tek tabakalar oluşacağı; $p<1$ için, optimum eğrilik dışbükey olacağı ve $p>1$ için optimum eğrilik içbükey olacağı öngörülmektedir. Yani, emülgatör 1'den büyük p değerlerinde, hidrofilik baş gruplarının içte (yağdan uzakta) bulunduğu ve hidrofobik kuyruk gruplarının dışarıda (yağ ile temas halinde) bulunduğu ters miseller oluşturur. Bir emülgatör çözeltisinin bir miselden ters misel sistemine dönüştüğü veya bir O/W emülsiyonunun bir W/O emülsiyonuna dönüştüğü sıcaklık, faz ters çevirme sıcaklığı (PIT) olarak bilinir. Sıcaklık yükseldikçe, emülgatör moleküllerinin hidrofilik baş grupları giderek dehidre hale gelir ve bu da p 'nin 1'e doğru artmasına neden olur. Böylece emülsiyon damlacıkları koelesansa daha yatkın hale gelir ve misellerin boyutları büyür. Faz ters çevirme sıcaklığında ($p=1$) emülsiyon bozulur çünkü damlacıklar çok düşük bir arayüzey gerilimine sahiptir ve bu nedenle birbirleriyle kolayca birleşirler (McClements, 2016).

Çift katlı emülsiyonların üç fazı vardır ve bu nedenle iki arayüzü stabilize etmek için hem hidrofilik hem de hidrofobik tipte emülgatörlerin kullanılması gerekir. Literatürde çeşitli gıda sınıfı düşük molekül ağırlığına sahip emülgatörlerden yararlanılmıştır (Nissim Garti, 1997b;

Lamba ve diğerkleri, 2015; Muschiolik ve Dickinson, 2017). Aşğıda çift katlı emülsiyonlarda sıklıkla kullanılan bazı emülgatör grupları detaylı şekilde anlatılmıştır.

Bu emülgatörlerden lesitin, 1846'da Fransız kimyager Maurice Gobley tarafından yumurta sarısından izole edilmiştir. Bunun önemli bir özelliğı, organik olarak lipid tipi bir yapıya bağı fosfor içermesidir. Zaman içerisinde, izole edilmiş bileşenlerin tek tip bir kimyasal yapıya sahip olmadıkları, günümüzde fosfolipidler veya fosfatidler olarak sınıflandırılan açıkça farklı bileşenler olduğı keşfedilmiştir. Daha sonra bitki, hayvan veya insan kaynaklı tüm organik dokularda mevcut olduğı ve yumurta sarısı dışında en yüksek konsantrasyonlarının soya, ayçiçeğı gibi yağlı tohumlarda bulunduğı belirlenmiştir. Bu karışımlardan izole edilen ilk maddelerden biri, kolin içeren bir fosfolipiddir. Bu tanımlanabilen ilk ve temel bileşen olduğundan, bu bileşiğe lesitin (bazen kolin lesitin) adı verilmiştir. Daha sonra, Kephalin (bazen ayrıca kolamin lesitin) olarak adlandırılan etanolamin içeren bir bileşik de izole edilmiştir. Bilimsel literatürde, 'lesitin' genellikle kolin içeren tekil bileşeni anlatırken, ticari olarak fosfolipidlerin karışımını ifade etmektedir (Bueschelberger, Tirok, Stoffrls ve Schoeppe, 2014).

Bir diğerk sık karşılaşılan emülgatör grubu olan, mono- ve digliseritler genellikle triağılglicerollerin gliserol ile interesterifikasyonu ile üretilir ve GRAS statüsündedir. Yağ asitlerinin mono- ve digliseritlerinin asit esterleri, yağ asitlerinin mono- ve digliseritlerinin serbest hidroksilik gruplarının diğerk kısa zincirli organik asitler ile esterleştirilmesi ile meydana gelir. Gliserolün asetik ve yağ asidi esterleri ile gliserolün laktik ve yağ asidi esterleri iyonik değılken; gliserolün diasetiltartarik ve yağ asidi esterleri ile gliserolün sitrik ve yağ asidi esterleri anyonik yüzey aktif maddelerdir (McClements, 2016; Moonen ve Bas, 2014).

Yağ asitlerinin sorbitan esterleri ve polisorbitatlar bir diğerk önemli emülgatör grubunu oluşturmaktadırlar. Span ve Tween, sırasıyla sorbitan esterler ve polisorbitatlar için kullanılan tescilli ticari isimlerdir, ancak bu ticari isimler kullanım yaygınlığı açısından bilimsel isimlerin önüne geçmiştir. Bir patlayıcı üreticisi olan Atlas Powder Company nitratlı mannitolü, patlayıcı kapakları için kullanmaktaydı. 1930'larda, küçük miktarlarda doğal

olarak oluşan mannitolün, şekerin elektroliziyle daha verimli bir şekilde sentezlenebileceği saptanmıştır ve bu sentez sũrecinde esas ũrũn olan mannitolũn dũrt katı kadar oluşan izomeri (sorbitol) için kullanım alanı aranmaya başlanmıştır. Sorbitol, gliserole benzer birçok ȳzellięe sahip olduğundan, kısa sũre sonra alternatif olarak doğrudan gıda ve kozmetik uygulamalarına dahil edilmiştir. 1938'de Atlas Powder Company, "Span" ticari adı altında ticari sorbitan yağ asidi esterlerini piyasaya sũrũlmũřtur. Yağ asitlerinin sorbitan esterleri, iyonik olmayan, daha lipofilik karakterli emũlgatȳrlerdir ve bunların hidrofilik/lipofilik ȳzellikleri, esterlenen yağ asidinin derecesine ve tipine bağlıdır. Daha sonrasında, etilen oksit ve aktif hidrojen atomları ile reaktivitesi hakkındaki bilgi ve ticari olarak bulunabilirliği birleştirilerek, polioksietilenden tũretilen emũlgatȳrler ortaya çıktılar. 1942'de polioksietilen (20) sorbitan esterler veya polisorbitatlar "Tween" ticari adı altında ticarileştirildi (Cottrell ve van Peij, 2014). Polisorbitatlar, uzun polioksietilen zinciri nedeniyle gıdalarda izin verilen en hidrofilik emũlgatȳrler arasındadır. Etilen oksit zincir uzunluğu ũrũnler arasında değişmediğinden, her polisorbitatın nitelikleri, kullanılan yağ asidine bağlıdır (Cottrell ve van Peij, 2014; Hartel, 2016; McClements, 2016).

Poligliserol ester gliserolũn geliştirilmesi ile ortaya çıkmıştır. Gliserolũn oligomerizasyonu, polar baş grubunun boyutunu bũyũtũlmesine izin verir. Emũlgatȳrũn hidrofilik kısmını oluşturan poligliserol, gliserolũn bir dizi oligomerik hidroksi eterinden oluşan bir bileşiktir. PGPR, risinoleik asidin bir poligliserol esteridir ve yağ asitlerinin kaynağı nedeniyle kendi kategorisine aittir. Risinoleik asit (12-hidroksi-9-cis-oktadekenoik asit), Europhorbiaceae familyasından *Ricinus communis* L. (Hint yağı) bitkisinden ve tohumunun yağından tũretilen bir hidroksi ve mono-doymamış yağ asididir. PGPR, diğer poligliserol esterlerle karşılaştırıldığında daha yũksek lipofilik karaktere sahip iyonik olmayan bir emũlgatȳrdür (Christiansen, 2014).

Son olarak, amonyum fosfatid, mono- ve digliseritlerin amonyak ile nȳtralize edilmiş fosforik esterleri olan gıda emũlgatȳrũdũr. Emũlgatȳr, çeşitli fosfatidlerin amonyum tuzlarının bir karışımıdır. Amonyum fosfatidin gelişimi, bundan 50 yılı aşkın bir sũre ȳncesine dayanmaktadır ve İngiliz ikolata ũreticisi Cadbury tarafından geliştirilmiştir. Çikolata

sanayindeki soya lesitini kullanımına bağılı mikrobiyolojik kontaminasyon ile kötü tat problemlerine alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Norn, 2014).

Amfifilik biyopolimerler

Amfifilik biyopolimerler, proteinler ve polisakkaritler gibi bileşiklerdir. Birçok protein, yağ-su arayüzünde adsorbe olma ve emülsiyon stabilitesini artırma yeteneklerinden dolayı emülgatör görevi görebilir. Polisakkaritlerin çoğu, sürekli fazda viskoziteyi arttırarak, hatta kimi durumlarda jelleşmeye neden olarak, emülsiyon stabilitesini destekler. Sadece birkaç polisakkarit türevi, yağ-su arayüzünde etkilidir (Bouyer, Mekhloufi, Rosilio, Grossiord ve Agnely, 2012).

Proteinler, genellikle düşük moleköl ağırlıklı emülgatörlere göre daha düşük düzeylerde arayüzey aktivitesi gösterirler. Proteinlerin arayüzey gerilimini sınırlı düzeylerde düşürebilmesi, onların karmaşık yapısal özellikleri ile ilgilidir. Proteinler, birincil yapılarında hidrofilik ve hidrofobik gruplar içermelerine rağmen, lesitinde olduğu gibi belirgin şekilde birer hidrofilik başa ve hidrofobik kuyruğa sahip değildir. Bu gruplar, proteinlerin birincil yapısının her yerine rastgele dağılmıştır ve üçüncül katlanmış yapıda, bazıları protein molekölünün yüzeyinde ayrılmış belirli bölgelerde yoğunlaşmış olarak bulunur. Yağ-su veya hava-su arayüzünde, protein adsorpsiyonu üç ana aşamada ilerler: yağ-su arayüzeyinin çevresine difüzyon, adsorpsiyon ve adsorplanan proteinin yeniden düzenlenmesi. Fakat, bir protein molekölü yağ-su arayüzüne adsorbe olduğunda, hidrofobik kalıntıların sadece bir kısmı yağ fazına bakan arayüzde konumlanır ve protein molekölünün büyük çoğunluğu, sürekli su fazında bulunur (Bouyer ve diğerleri, 2012). Arayüzdeki hidrofilik ve hidrofobik grupları düzgün bir şekilde yönlendirmek için konformasyonel kısıtlamalar nedeniyle proteinler arayüzey gerilimini büyük ölçüde azaltamazlar. Yani, yağ su arayüzünün tek tabakalı proteinde doyduğu durumda bile, arayüzey bölgesindeki suyun büyük bir kısmı yüksek serbest enerji durumunda kalır (Damodaran, 2005). Bununla birlikte, proteinler termodinamik ve kinetik olarak daha kararlı emülsiyonlara yol açar (Dickinson, 2019).

Proteinlerin ve polisakaritlerin uygun koşullar altında birleştirilmesi, emülsiyon stabilitesini geliştirmek için değerli bir strateji olabilir. Çoğu polisakkarit bir arayüze sıkıca

bağlandığında, hidrofilik karakterleri ve büyük moleküler boyutları nedeniyle mükemmel sterik stabilizatörler olarak işlev görürler. Bu nedenle, herhangi bir proteini daha etkili bir stabilite ajanı haline getirmenin en basit yolu protein moleküler yapısını bir polisakaritinkine daha çok benzeyecek şekilde değiştirmektir (Dickinson, 2019).

Proteinler ve polisakkaritler çekici elektrostatik etkileşimler yoluyla kompleksler oluşturabilir. Bu durumda, çok katmanlı "zarlar" elde etmek için yağ küreciklerinin etrafında zıt yüklü biyopolimerlerin alternatif katmanları oluşturulabilir. Bu katmanlar, hem elektrostatik hem de sterik stabilizasyon sağlar ve böylece dış koşullara karşı direnci geliştirir (Bouyer ve diğerleri, 2012).

Protein polisakkarit komplekslerinin oluşturulmasında bir diğer yol ise bu bileşiklerin birbirlerine kovalent bağlarla bağlanmasıdır. Burada amaç kompozit bir kopolimer dengeleyici madde gibi işlev gören makromoleküler eşlenik tasarlamaktır. Kopolimerin amfifilik karakteri, proteinin hidrofobik bölgesi yoluyla yağ-su arayüzüne güçlü bir şekilde bağlanmasına izin verir. Bir kez oraya yerleştirildikten sonra, hacimli hidrofilik polisakarit, ara yüzeyden hacimli sulu faza doğru uzanır, böylece etkili sterik stabilizasyon için ideal koşullar sağlar. Protein-polisakkarit konjugatlarının üretilmesinin en yaygın yöntemi, proteinlerin amino grupları ile polisakkaritlerin karboksilik grupları arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonudur (Dickinson, 2019). Genel olarak Maillard reaksiyonu, kuru ısıtma, ıslak ısıtma ve ultrason, mikrodalga ve darbeleri elektrik teknolojileri gibi diğer yardımcı yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Kuru ısıtma yönteminde, önce protein ve polisakkarit karıştırılır ve sulu bir çözeltide belirli bir oranda çözündürülür, ardından kurutulur. Kurutulmuş karışım protein ve polisakkaridin yapısına bağlı olarak hafif sıcaklıkta (40–60 °C), kontrollü sürede ve bağıl nemde (%65–%80) inkübe edilebilir. Islak ısıtma yönteminde ise ilk olarak bu iki madde sulu bir çözeltide belirli bir oranda çözündürülür ve ardından pH ayarı yapılır. Daha sonra reaksiyon, uygun sıcaklıkta (50–100 °C) belirli bir süre boyunca gerçekleştirilir ve sonrasında hızlıca soğutularak durdurulur (Zhang ve diğerleri, 2023). Maillard reaksiyonun yanı sıra enzimlerin yardımı ile de protein-polisakkarit konjugatının üretimi mümkündür. Konjugasyon reaksiyonunda kullanılan transglutaminaz, lakkaz ve peroksidaz olmak üzere başlıca üç enzim vardır. Bu enzimler, farklı katalitik çapraz bağlama modlarına sahiptirler

(Wu, Liu ve Hu, 2022). Konjugatların proteinlere kıyasla çift katlı emülsiyonları daha iyi stabilize ettikleri bilinmektedir (Lamba ve diğerleri, 2015).

Katı veya koloidal parçacıklar

Düşük moleküler ağırlıklı emülgatörlere ve biyopolimerlere ek olarak emülsiyonlar, Pickering stabilizasyonu olarak bilinen katı parçacıklarla da stabilize edilebilir. Pickering stabilizasyonu için, yağ-su arayüzüne adsorbe edilen parçacıklar, sterik itme yoluyla arayüz etkileşimlerini ve damlacık temasını önleyen bariyerler oluşturur (Luo ve Wei, 2023).

Çift katlı emülsiyonlarda kullanılan emülgatörlerin kıyaslanması

Çift katlı emülsiyonların üretiminde genellikle hidrofilik ve hidrofobik emülgatörlerin bir kombinasyonu kullanılır. Şu ana kadar çift katlı emülsiyonların oluşturulması sırasında kullanılan gıda sınıfı emülgatörlerin etkinlikleri sıklıkla karşılaştırılmıştır.

Protein hidrolizatlarının emülsiyonlarında, serbest -SH grupları gibi açıkta kalan reaktif bölgeler vardır. Bu durum proteinlerin emülgatör olarak kullanılması durumunda yağ-su arayüzünde disülfid köprüleri yoluyla protein-peptit etkileşimlerini destekleyip, yağ aglomerasyonu yolu ile emülsiyonları kararsızlaştırabilir ve böylece faz ayırmasına yol açabilir. Bu durumdan kaçınmak için protein olmayan, düşük moleküler ağırlıklı emülgatörler gibi emülgatörlerin kullanılması uygundur. Bu emülgatörler genellikle homojenizasyon sırasında emülsiyonlara eklenir ve yağ-su arayüzüne kolayca adsorbe olarak, küçük dağılmış faz damlacıklarının oluşmasını sağlar. Bu da ısıtma işleminin stabilitesinin iyileştirilmesine ve depolama sırasında yerçekimsel ayrımın azalmasına neden olur. Ayrıca yağ-su arayüzünde ve serum fazında adsorbe edilen proteinlerle etkileşime girerek serbest -SH gruplarının mevcudiyetini azaltır ve ısıtma sırasında yağ damlacıkları arasındaki etkileşimleri sınırlar (Girolodi ve diğerleri, 2021).

Birincil emülsiyonlar incelendiğinde yağ fazında PGPR kullanımı ile kararlı emülsiyonların oluşturulduğu göze çarpmaktadır. Aditya ve ark., (2015) kurkumin ve kateşinin W/O/W ile enkapsülasyonunda farklı lipofilik emülgatörlerin (PGPR, Span 80, soya lesitini ve Span 80-Tween 80 karışımı) etkisini incelemiştir. Span 80, Span 80 ve Tween 80'in bir

kombinasyonunu içeren emülsiyonlar, hazırlandıktan sonraki saatler içinde faz ayrımı gösterirken, PGPR ve soya lesitini ile üretilen birincil emülsiyonların 24 saat stabil kaldığı saptanmıştır. Yazarlar, PGPR ile stabilize edilmiş emülsiyonların, daha küçük ve tekdüze damlacık boyutlarına sahipken soya lesitini ile hazırlanmış emülsiyonların yüksek kıvamlı ve floküle olduğunu bildirmişlerdir (Aditya ve diğerleri, 2015). Benzer şekilde bir başka çalışmada PGPR, Span 80, PGPR ve lesitin karışımı lipofilik emülgatör olarak kullanılmıştır. Çalışmada, PGPR ile hazırlanan emülsiyonların Span 80 ile hazırlanan emülsiyonlara göre daha kararlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, lesitin ilavesi ile emülsiyon viskozitesinde bir artış yaşanmış ve bu da emülsiyon stabilitesini olumlu yönde etkilemiştir (Raviadaran, Ng, Manickam ve Chandran, 2019). Bir başka çalışma, PGPR'nin moleküler ağırlığının ve PGPR'nin Span 20 ve Span 80 ile karışım olarak kullanılmasının W/O emülsiyonu üzerine etkilerine yoğunlaşmıştır. Çalışma sonuçlarında düşük moleküler ağırlığa sahip PGPR kullanımının, daha küçük emülsiyon damlacık boyutu ve daha yüksek viskozite ve emülsiyon stabilitesi sağladığı ve arayüzey gerilimini daha iyi bir şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. Yağ fazında Span 20 ve Span 80'nin tek başına kullanılması stabil emülsiyonlar ile sonuçlanmamıştır. Bununla birlikte, bu emülgatörler PGPR ile karıştırılarak kullanıldığında küçük damlacıkların üretilmesine ve depolama kararlılığının gelişmesine katkı sunmuştur (Paximada ve diğerleri, 2021). Silva, Anh Bui, Dharmadana, Zisu ve Chandrapala (2020) çift katlı emülsiyonlarda PGPR ve lesitinin birlikte ve ayrı kullanımının birincil emülsiyonun özellikleri üzerine etkisini incelemiştir. Yazarlar dış su fazında hidrofilik emülgatör olarak farklı oranlarda kazein ve WPI (peynir altı suyu proteini izolatu) (60:40, 50:50 ve 40:60) karışımı kullanmışlardır. Çalışmada PGPR en etkili lipofilik emülgatör olarak belirlenmiştir. Ek olarak, dış su fazındaki WPI oranındaki artış ile enkapsülasyon etkinliği artmıştır (Silva, Anh Bui, Dharmadana, Zisu ve Chandrapala, 2020). PGPR ve lesitin karıştırıldığı bir başka ilginç çalışmada emülsiyonlar farklı su ve yağ fazı oranlarında hazırlanmıştır. Çalışmada PGPR'nin tüm denemelerde yağ içinde su emülsiyonları ürettiği saptanmıştır. Ancak lesitin yüksek su içeren formülasyonlarda su içinde yağ emülsiyonları ürettiği tespit edilmiştir (Altuntas, Sumnu ve Sahin, 2017). Balcaen, Vermeir ve Van der Meeren (2017) çift katlı emülsiyonların içerdiği lipofilik ve hidrofilik emülgatör tipinin emülsiyon özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla, lipofilik emülgatör olarak PGPR, AMP ve sükroz ester hidrofilik emülgatör olarak ise sodyum kazeinat ve WPI seçilmiştir. Her bir lipofilik ve

hidrofilik emülgatör birbiri ile kullanılmış toplam 6 çeşit emülsiyon oluşturulmuştur. Yazarlar, PGPR kullanılarak stabilize edilen emülsiyonlar dışındaki birincil emülsiyonların floküle olduğunu ve bu emülsiyonların viskozitelerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, bu flokülasyon davranışı PGPR'nin hidrofobik yan zincirinin polimerik, diğer emülgatörlerinin yan zincirlerinin ise monomerik olması ile açıklanmıştır. Ayçiçek yağında bulunan uzun zincirli trigliseritlerin varlığı, AMP ve sükroz ester kullanılarak stabilize edilen W/O emülsiyonlarının flokülasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Hidrofilik emülgatör olarak sodyum kazeinat kullanıldığı durumlarda, enkapsüle edilebilmiş suyun hacminin, lipofilik emülgatöre güçlü bir şekilde bağlı olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, WPI kullanıldığında, kullanılan lipofilik emülgatörden bağımsız olarak yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir (Balcaen, Vermeir ve Van der Meeren, 2017). Bir başka çalışmada yağ fazında PGPR, PGPR ve lesitin karışımı kullanımının etkisi incelenmiş PGPR ve lesitin bir arada kullanımının emülsiyon kararlılığını arttırdığı belirlenmiştir (Tekin Pulatsü, Sahin ve Sumnu, 2018).

Birinci aşamada kullanılan lipofilik karakterli emülgatör ile ilgili literatür bilgileri daha net iken ikinci aşamada kullanılacak hidrofilik emülgatörler ile ilgili sonuçlar dağınıktır. Genel eğilim ise sentetik olarak üretilen emülgatörlerin kullanımının yerine biyopolimerlerin kullanım olanaklarının arttırılmasına odaklanmıştır. Yıldırım, Sumnu ve Sahin, (2017) çift katlı emülsiyonlarda dış su fazına ilave edilen hidrofilik emülgatör türlerinin (sodyum kazeinat, ksantan gamı, lesitin-WPC (peynir altı suyu konsantratu) karışımı) etkisini incelemiştir. Çalışmada, lipofilik emülgatör olarak PGPR kullanılmıştır. Çalışma sonuçları sodyum kazeinat ile hazırlanan çift katlı emülsiyonların monodispers bir boyut dağılımına sahip olduğunu göstermiştir. Ksantan gamı ile hazırlanan emülsiyonların Sauter ortalama çapının en yüksek olduğu ve bu emülsiyonların diğerlerine oranla daha polidispers olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerde birincil emülsiyon damlacıklarının yoğun ağ yapılaraya dahil edildiği bildirilmiştir. Çalışmada en iyi stabilite özelliklerini sodyum kazeinat ile oluşturulmuş çift katlı emülsiyonlar sergilemiştir. Bunun aksine en yüksek enkapsülasyon etkinliği ksantan gam ile oluşturulmuş emülsiyonlarda belirlenmiştir (Yıldırım, Sumnu ve Sahin, 2017). Bir başka çalışmada dış su fazında Tween 80, WPI ve sodyum kazeinat kullanılmıştır. Araştırmacılar, sodyum kazeinat ile oluşturulan emülsiyonların WPI ve Tween

80 ile oluşturulan emülsiyonlardan daha gelişmiş kinetik stabilite gösterdiğini saptamıştır. Sodyum kazeinat daha küçük damlacıkların oluşumunu destekleyen ve iç su damlacıklarının dış faza geçişini sınırlayan, arayüzde hızla adsorbe olabilen ve yeniden düzenlenebilen daha esnek ve katlanmamış bir proteindir. Daha küçük damlacıklara ek olarak, dış su fazına ilavesinin, viskozitede artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Chevalier, Gomes ve Cunha, 2022). Gharehbeglou, Jafari, Hamishekar, Homayouni ve Mirzaei (2019) gallik asit yüklü çift katlı emülsiyonların oluşturulması sırasında lipofilik emülgatör olarak PGPR ve hidrofilik emülgatör olarak pektin-WPC kompleksi veya Tween 80 kullanmıştır. Sonuçlar, pektin-WPC kompleksinin sedimentasyon ve kremleşmeye karşı Tween 80 ile aynı direnç sahip olduğunu ortaya koymuştur. Tween 80 ile üretilen emülsiyonların, pektin-WPC kompleksi kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonlara göre daha az polidispers bir damlacık boyut dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, Pektin-WPC ile hazırlanan emülsiyonların zeta potansiyeli -30 mV'den daha negatif bulunmuştur bu nedenle uzun süreli depolama sırasında daha kararlı olacakları düşünülmektedir. Mevcut çalışma, pektin-WPC kompleksinin çift katlı emülsiyonları stabilize etmek için Tween 80 yerine kullanılabileceğini göstermiştir (Gharehbeglou, Jafari, Hamishekar, Homayouni ve Mirzaei, 2019). Bir başka çalışmada Tween 80, kitosan ve bunların karışımı dış su fazına ilave edilmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği kitosanın tek başına kullanımı ile elde edilmiştir (Choi, Choi, Lee ve Jo, 2020). Yine bir diğer çalışmada, çift katlı emülsiyonların dış su fazı Tween 80, lesitin, kitosan, pektin ilavesi ile oluşturulmuştur. Çalışma sonuçları Tween 80 ile stabilize edilen emülsiyonları, faz ayrımı olmadan en iyi damlacık stabilitesini ve en yüksek enkapsülasyon verimliliğine sahip olduğunu göstermiştir (Jo, Karbstein ve Van Der Schaaf, 2019). Demir bisglisinat yüklü çift katlı emülsiyonların hazırlanmasında dış su fazına WPC ile gam arabik, mesquite gamı veya düşük metoksil pektin kompleksleri 2:1 oranında eklenmiştir. Çalışmada, peynir altı suyu proteini:mesquite gamı kompleksi ile elde edilen emülsiyonların daha küçük damlacık boyutlarına, daha düşük damlacık birleşme hızına, daha düşük demir bisglisinat oksidasyonuna ve yavaş salım hızına sahip olduğu saptanmıştır (Jiménez-Alvarado, Beristain, Medina-Torres, Román-Guerrero ve Vernon-Carter, 2009). Dias, Züge, Santos ve Scheer (2018) çift katlı emülsiyonların iç su fazında ağırlıkça %3 veya 4 jelatin yağ fazında ise avakado yağında çözündürülmüş ağırlıkça %5 veya 6 PGPR kullanmışlardır. Dış su fazına ise ağırlıkça %2 Tween 40 veya Tween 80 ilave edilmiştir. Çalışma sonuçları Tween 40 içeren

emülsiyonların, Tween 80 içerenlere göre daha yüksek stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmada 4°C'de 20 gün depolamanın ardından en yüksek enkapsülasyon verimliliği, %6 PGPR, %3 jelatin ve %2 Tween 40 içeren emülsiyonlarda elde edilmiştir (Dias, Züge, Santos ve Scheer, 2018). Tamnak ve diğerleri (2016) çift katlı emülsiyonların dış su fazında Tween 80 kullanımına potansiyel bir alternatif olarak yeni bir hibrit polimerin etkinliğini araştırmışlardır. Bu amaçla farklı oranlarda hidrofilik emülgatör olarak Tween 80, doğal pektin ve pektin-bezelye protein izolatu konjugatu ve lipofilik emülgatör olarak PGPR kullanılmıştır. Çalışma sonuçları pektin-bezelye protein izolatu konjugatu ile stabilize edilen çift katlı emülsiyonların, doğal pektin ve Tween 80 içeren diğer emülsiyonlardan çoğu durumda daha güçlü enkapsülasyon özelliği, daha küçük damlacıklar ve daha yüksek zeta potansiyeli sağladığını bildirmiştir (Tamnak ve diğerleri, 2016) Bir başka çalışmada, B12 vitamini içeren çift katlı emülsiyonların hazırlanmasında lipofilik emülgatör olarak farklı miktarlarda PGPR ve hidrofilik emülgatör olarak tek başına sodyum kazeinat veya sodyum kazeinat-dekstran (250,000 veya 500,000 g/mol) konjugatları kullanılmıştır. Çalışma sonuçları çift katlı emülsiyonlarda saf protein yerine konjugat kullanılmasının, daha küçük yağ damlacıklarının oluşmasına ve daha dar bir partikül boyutu dağılımına yol açtığını ortaya koymuştur. Ayrıca, konjugat kullanımı asidik koşullar altında agregasyona ve birleşmeye karşı iyileştirilmiş kararlılık göstermiştir. Konjugat kullanımı ile daha düşük lipofilik emülgatör konsantrasyonlarında geliştirilmiş enkapsülasyon etkinliğine sahip emülsiyonlar üretilmiştir (Fechner, Knoth, Scherze ve Muschiolik, 2007). O'Regan ve Mulvihill (2010) B 12 içeren çift katlı emülsiyonları dış su fazında sodyum kazeinat ve sodyum kazeinat-maltodekstrin konjugatlarını ilave ederek hazırlamıştır. Çalışma bulguları konjugatla stabilize edilmiş emülsiyonların, sodyum kazeinat ile stabilize edilmiş emülsiyonlardan daha iyi enkapsülasyon etkinliği ve emülsiyon stabilitesi sergilediğini göstermiştir (O'Regan ve Mulvihill, 2010). Han ve diğerleri, (2022) yaptıkları çalışmada insülin (hidrofilik) ve kersetin (hidrofobik) içeren çift katlı emülsiyonları konjugat kullanımı ile stabilize etmiştir. Bu çalışmada, siyah fasulye proteini-sodyum aljinat Maillard konjugatu ile stabilize edilmiş çift katlı emülsiyon jelleri, üç farklı indükleyici (CaCl_2 , glukolakton hem de glutamin transaminaz) kullanılarak üretilmiştir. Çalışma bulguları indükleyicinin eklenmesinin, emülsiyon jelinin su tutma kapasitesini, enkapsülasyon etkinliğini ve dokusal özelliklerini

önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Bunlar arasında transglutaminaz kaynaklı çift katlı emülsiyon jelinin tüm bu parametreler için öne çıktığı bildirilmiştir (Han ve diğerleri, 2022).

Çift katlı emülsiyonlarda kullanılan diğer bileşenler ve etkileri

Çift katlı emülsiyonun kararlılığı, iç ve dış faz arasındaki ozmotik gradyan kontrolü kullanılarak da iyileştirilebilir. Tuz ve şeker gibi suda çözünen bileşenler ozmotik gradyanı kontrol etmekte kullanılmaktadır (Lamba ve diğerleri, 2015). Martins ve diğerleri, (2020) gallik asit yüklü çift katlı emülsiyonların hazırlanması sırasında birincil emülsiyonun iç su fazına 0.100 mol/L konsantrasyonda sodyum klorür (NaCl), kalsiyum klorür (CaCl_2), magnezyum sülfat (MgSO_4) ve glikoz ilavesinin etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, CaCl_2 , MgSO_4 ve glikoz içeren emülsiyonda 24 saatte faz ayrımı meydana gelirken, NaCl içeren emülsiyonların stabilitesinin daha iyi ve faz ayrımının daha az belirgin olduğu bulunmuştur. Çalışmada ayrıca sodyum asetat tamponunun pH'sının etkisi incelenmiştir. 24 saat sonra numuneler (pH 3, 5 ve 7) faz ayrımı göstermişlerdir. Çalışmada tampon sisteminin pH'sı 7 iken, emülsiyondaki faz ayrımı azalsa da, yüksek pH değerlerinde, gallik asit atmosferik oksijen tarafından hızla oksitlendiğinden kararsızlaşmış ve bu nedenle pH 5 kullanımına karar verilmiştir (Martins ve diğerleri, 2020). Chevalier ve diğerleri (2022) iç su fazına sodyum klorür (%0,2 a/a), gallik asit (%0,5 a/a) veya bir gallik asit/NaCl karışımı (%0,5:%0,2 a/a) ilavesinin çift katlı emülsiyonların özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. İç su fazında NaCl içeren tüm W/O/W sistemleri, 7 günlük depolama boyunca daha yüksek kinetik stabilite sergilemiştir. Gallik asit ilavesi, NaCl ile karşılaştırıldığında çift emülsiyonları stabilize etmede daha az etkili olmasına rağmen, bu fenolik bileşik, daha küçük çaplı damlacıkların oluşumunu destekleyerek, arayüzey gerilimini azaltmıştır. Bununla birlikte, gam arabik ile sodyum klorür karışımının kullanılması, W/O/W ikili emülsiyonların stabilitesini ve fonksiyonelliğini iyileştirmiştir (Chevalier ve diğerleri, 2022). Bir başka çalışmada, iç su fazına NaCl ilavesinin, birincil emülsiyonların D(90) değerlerinde küçülmeye neden olduğu saptanmıştır. NaCl ilavesi, arayüzey gerilimi üzerinde ise yalnızca küçük etkiler göstermiştir (Jo ve diğerleri, 2019). Zhang ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada, elektrolit tipinin çift katlı emülsiyonların oluşumu ve tipi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla farklı katyon ve anyon türlerini ayrı ayrı kullanmışlardır. Katyonların etkisini incelemek için NaCl, MgCl_2 ve CaCl_2 , anyonların etkisini araştırmak için

NaCl, Na₂SO₄ ve Na₃PO₄ kullanılmıştır. Çalışma sonuçları, elektrolitlerin emülsiyonların konformasyonunda belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmada farklı tipte çift katlı emülsiyonlar elde edilmiştir. Farklı türdeki katyonların hepsi, yağ damlacığı içinde tek bir su damlası içeren A tipi çift katlı emülsiyonlar üretmişlerdir. Bununla birlikte, farklı türdeki anyonların emülsiyon türleri üzerinde belirgin bir etkisi olmuştur. Na₂SO₄ ile bir yağ damlacığı içinde birkaç su damlacığının olduğu B tipi çift katlı emülsiyonlar üretilirken ve Na₃PO₄ ile yağ küreciğinde çok daha fazla sayıda su damlacığı olan bir C tipi çift katlı emülsiyon elde edilmiştir. Negatif yükün artmasıyla, yağ damlacığı içinde daha fazla su damlacığının dağıldığı ve çift katlı emülsiyonların tipinin A'dan C tipine dönmesine sebep olduğu görülmüştür (Zhang ve diğerleri, 2014).

Çift katlı emülsiyonlarda faz oranları ve etkileri

Çift katlı emülsiyonlarda kullanılan fazların oranı, emülsiyonların tipini, stabilitesini, damlacık boyutunu ve akış özelliklerini etkiler. Yıldırım ve diğerleri (2017) farklı W:O oranlarının (2:8 ve 4:6) ve (W/O):W oranlarının (2:8 ve 4:6) çift katlı emülsiyon özellikleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, çift katlı emülsiyonun yağ bileşimi arttıkça damlacıkların partikül boyutunun azaldığı sonucuna varılmıştır. Birincil emülsiyonun sürekli su fazına (ikinci su fazı) oranı aynı olan çift katlı emülsiyonların benzer damlacık boyutuna sahip olduğu saptanmıştır. Çift katlı emülsiyonların dağılmış faz içeriği arttıkça, çift katlı emülsiyonun kararlılığının arttığı belirlenmiştir ve bu durum artan viskozite ile açıklanmıştır. Artan çift katlı emülsiyon damlacık boyutu ile ise enkapsülasyon etkinliği artmıştır. Bunun gerekçesi olarak, yağ damlacığının damlacık boyutu küçüldükçe O/W arayüzündeki toplam alanın büyümesi ve bu artışla toplam temas/transfer alanının artması gösterilmiştir. Daha küçük yağ damlacıkları için, iç su fazın yağ-su arayüzü ile temas olasılığı, daha büyük damlacık boyutuna kıyasla daha yüksektir (Yıldırım ve diğerleri, 2017). Bir başka çalışmada, farklı W₁:O ve (W/O):W oranları ile çift katlı emülsiyonlar oluşturulmuştur. Birincil emülsiyonların viskozite, D(90) ve span değerlerinin W₁'deki artışla birlikte arttığı belirlenmiştir. W/O/W emülsiyonlarının D(90) değerleri ise W₂'deki artışla artarken, enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı saptanmıştır. 90 günlük depolamanın ardından, enkapsülasyon etkinliğinin, artan W₂ ile daha da belirgin bir azalma eğilimi gösterdiği saptanmıştır. Emülsiyonlarının viskozitesinin de W₂ arttıkça azaldığı belirlenmiştir (Jo ve

diğerleri, 2019). Bir diğer çalışmada, birincil W/O emülsiyon konsantrasyonunun W/O/W emülsiyonlarının stabilitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Ghasemi, Darjani, Mazloomi ve Mozaffari, 2020). Damlacık boyut dağılımı analiz sonuçları ile viskozite ölçümleri ve bunlarla birlikte W/O/W emülsiyonlarının mikroskop görüntüleri değerlendirilmiştir. Daha yüksek birincil W/O emülsiyon yüzdesine sahip emülsiyonun (%50 a/a) düşük yüzdeye sahip örneklerle (%40 ve %25 a/a) kıyasla birleşmeye karşı daha dirençli olduğu belirlenmiş, daha dar damlacık boyutu dağılımına ve daha düşük kremleşme indeksine sahip olduğu saptanmıştır. Viskozitedeki artışın, bu emülsiyondaki birleşme ve kararsızlaştırma kinetiklerini yavaşlatarak emülsiyon kararlılığını arttırdığı yorumlanmıştır (Ghasemi ve diğerleri, 2020). Niknam, Escudero ve Benito (2020) yaptıkları çalışmada yanıt yüzey yöntemi kullanılarak W:O (%4-20 a/a) ve W/O:W (%10-40 a/a) oranlarını optimize etmişlerdir. Çalışmada yanıt olarak damlacık boyutu ve polidisperslik indeksi kullanılmıştır. Yazarlar optimum koşulun % 20,3 (a/a) iç su fazı içeriği ve % 9,8 (a/a) birincil emülsiyon içeriği ile hazırlanan formülasyon olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada faktörlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi hakkında bilgi verilmemiştir (Niknam, Escudero ve Benito, 2020).

2.2.1.2. Çift katlı emülsiyonların hazırlanmasında kullanılan homojenizatörler

Emülsiyon, birbiri içerisinde karışmayan iki sıvının, aralarında bir arayüz oluşturularak birbiri içerisinde dağıtılmış halidir. Birbiri içerisinde karışmayan bu iki sıvının düşük enerjili ve kararlı hali, karışmamış halidir. Bundan dolayı, birbiri içerisinde karışmayan bu iki sıvının birbiri içerisine karıştırılması için, dışarıdan belirli düzeyde bir enerjinin aktarılması enerji düzeyinin öncelikle yükseltilmesi ve takiben arayüzeyde oluşan katmanla beraber daha düşük enerjili, yarı-kararlı bir form olan emülsiyonun oluşması gereklidir. Enerji düzeyinin yükseltilmesine dayanan ve mekanik etkilerle enerjinin aktarıldığı işleme ise homojenizasyon denilmektedir (Leal-Calderon ve diğerleri, 2007; McClements, 2016).

Emülsifikasyon esas olarak kullanılan emülgatör tipine ve konsantrasyonuna, dağılmış/sürekli fazların nispi viskozitelerine ve karıştırma cihazının hidrodinamik koşullarına bağlıdır. Laminer akışta, damlacıklar deforme olur ve basit kayma akışı veya uzunlamasına

(elongational) akış tarafından kırılır. Her iki durumda da damlacıkların uzamadan ayrılması ve uç akışı veya sürüklenmesi ile sonuçlanır. Akış rejimi türbülanslı olduğunda, damlacık bozulması ya kavitasyondan ya da kaymadan kaynaklanır. Kayma kuvvetinden kaynaklı damlacık kırılması ya da bozulması, Kolmogoro ve Hinze teorisi ile açıklanmaktadır. Burada iki tip damlacık parçalanması tanımlanmıştır: türbülanslı atalet (durgun) ve türbülanslı viskoz. Türbülanslı atalet kırılması, damlacık deformasyonunun sistemdeki en küçük ölçekli girdaplardan kaynaklandığı ve bu nedenle damlacıkların girdap boyutuyla aynı büyüklükte olduğu olaydır. Türbülanslı viskoz kırılma rejiminde, girdaplar içinde oluşan kayma kuvvetlerinden damlacık boyutları sistemdeki en küçük girdapların boyutunun altına düşürülür. Türbülanslı viskoz akışta damlacık deformasyonu ve parçalanması mekanik olarak laminere benzer ve tipik olarak 0.1-5 (dağılmış fazın viskozitesi/sürekli fazın viskozite) viskozite oranları arasında meydana gelir (Lee, Niknafs, Hancocks ve Norton, 2013).

Damlacık deformasyonuna direnç, damlacığın iç basıncından (ΔP) kaynaklanmaktadır. Buna bağlı olarak, daha küçük damlacıkların üretimini sağlayacak damlacık deformasyonu ve parçalanmasını oluşturmak için daha yüksek miktarda enerji gerekmektedir. Damlacık parçalanması birkaç aşamada gerçekleşir, ilk olarak damlacık deformasyonu ile parçalanması gerçekleşir; ardından üretilen yeni ara yüz, emülgatörlerin adsorpsiyonu ile stabil hale gelir. Arayüz, başka bir damlacık onunla çarpışmadan önce stabilize olmazsa, damlacıklar birleşebilir ve daha büyük bir damlacık oluşturabilir (Lee ve diğerleri, 2013).

Yüksek enerjili yaklaşımların yanı sıra, düşük enerjili yöntemlerle de emülsiyonların oluşturulması mümkündür. Fakat bu yaklaşımlara çift katlı emülsiyonların üretiminde daha az rastlanmaktadır. Bu yöntemlere göre, bileşimler veya ortamlar kontrollü bir şekilde değiştirildiğinde, yüzey aktif madde-yağ-su karışımlarında yağ damlacıkları kendiliğinden oluşur. Bunun yanı sıra, yüksek kayma ve faz ters çevirme yöntemleri ise düşük enerjili emülsifikasyon yöntemleri olarak sınıflandırılır (McClements, 2016; Taha ve diğerleri, 2020). Spontan emülsifikasyon yöntemleri lipofilik aktif maddeleri içeren bir yağ ve hidrofilik emülgatör karışımının, sürekli karıştırılan bir su fazına titrasyonuna dayanır. Hidrofilik emülgatör molekülleri yağ fazından su fazına geçerken, yağ-su ara yüzeyinde küçük yağ damlacıkları oluşur. Emülsiyon inversiyon noktası yöntemleri spontan emülsifikasyon

yöntemlerinin tam tersidir ve suyun sürekli karıştırılan bir yağ ve hidrofilik emülgatör karışımına titrasyonunu içerir. Sisteme artan miktarlarda su eklendikçe öncelikle W/O emülsiyonu, ardından O/W/O emülsiyonu ve son olarak bir O/W emülsiyonu oluşur. Lipofilik aktif bileşenler, titrasyondan önce emülgatör-yağ karışımına dahil edilir. Faz ters çevirme sıcaklığı (PIT) yöntemleri bir S/O/W karışımını faz ters çevirme sıcaklığının biraz üzerinde ısıtmaya ve ardından sürekli karıştırarak hızlı soğutmaya dayanır. PIT yöntemi, ısıtıldıklarında iyonik olmayan emülgatörlerin optimum eğriliğindeki ve çözünürlüğündeki değişikliklere dayanır. Emülgatör moleküllerinin baş grubu, düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara ısıtıldıkça giderek dehidre olurlar. Bu durum paketleme özelliklerini ve bağlı çözünürlüklerini değiştirir. PIT'in üzerinde, emülgatör yağ fazında daha fazla çözünür ve W/O emülsiyonlarını destekleyen bir eğriliğe sahip olur. PIT'de, yüzey aktif madde her iki fazda da çözünür ve bire yakın bir optimum eğriliğe sahiptir, bu da çift sürekli (bicontinuous) bir mikroemülsiyon oluşumunu destekler. PIT'in altında, sürfaktan molekülü su fazında daha fazla çözünür ve O/W emülsiyonlarını destekleyen bir eğriliğe sahiptir. Bu sistemde lipofilik aktif bileşenler, SOW karışımı ısıtılmadan önce yağ fazı ile karıştırılır (McClements, 2016; Taha ve diğerleri, 2020).

Kararlı çift katlı emülsiyonların oluşturulması için çeşitli emülsifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar genel olarak iki kategoriye ayrılabilir: yüksek kayma kuvvetine sahip cihazlar ve membran emülsifikasyonu. Çift katlı emülsiyon hazırlama için kullanılan yüksek kayma kuvvetine sahip cihazlar arasında: ultrases homojenizatör, yüksek basınç homojenizatör, rotor-statörler ve mikroakışkanlaştırıcılar sayılabilmektedir. Tüm bu cihazlar, kavitasyon, çarpışma ve türbülans tarafından üretilen, damlacıkların parçalanmasına ve dağılmış fazın düzgün dağılımına neden olan yüksek kayma kuvvetinin üretimine dayanan prensiplerle çalışır. Yüksek kayma kuvveti üreten cihazlar tarafından üretilen kaymanın derecesi, çift katlı emülsiyonun kararlılığını belirler. Birincil emülsiyonun oluşumu için yüksek kayma hızı gerekirken, ikincil homojenizasyonda düşük kayma kuvveti kullanılır. Homojenizatörün tipi ayrıca çift emülsiyonun parçacık boyutu üzerinde büyük etkiye sahiptir, bu da enkapsülasyon verimini ve emülsiyon stabilitesini etkiler. Parçacık boyutu, çift katlı emülsiyon uygulamasına karar vermede çok önemli bir parametredir. Nano boyutlu birincil emülsiyonlar, dağıtım sistemleri için en uygun olanlarıdır. Fakat unutulmamalıdır ki, yüksek

kayma gerilimi, daha küçük parçacık boyutu oluşturma'nın yanı sıra, parçacıkların (yüksek yüzey alanı nedeniyle) polidispers bir emülsiyon oluşturarak (geniş parçacık boyutu aralığına sahip) birleşmesine de neden olabilir. Bu durum homojenizasyon sürecinin optimizasyonunu önemli kılmaktadır (Lamba ve diğerleri, 2015).

Kolloid değirmenleri gıda endüstrisinde orta ve yüksek viskoziteli sıvıların homojenizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak çeşitli kolloid değirmen tasarımları mevcuttur, fakat bunlar oldukça benzer çalışma prensibine sahiptir. Bir kolloid değirmen genellikle iki disk içerir: bir rotor (dönen bir disk) ve bir statör (statik bir disk) (McClements, 2016). Rotor-statör sistemlerinde, bir rotor ile sabit bir düz, pürüzlü veya yivli yüzey arasında yüksek bir kayma kuvveti oluşturulur. Burada türbülans, damlacıkların oluşumuna yol açan sıvı bozulmasının birincil nedenidir (Van Der Graaf, Schroën ve Boom, 2005). Homojenize edilecek sıvılar genellikle ayrı fazlar halinde değil, kaba bir emülsiyon formunda sistemin merkezine beslenir. Çünkü bu sistemler, hali hazırda bir emülsiyondaki damlacıkların boyutunu küçültmede (ikincil homojenizasyon), iki ayrı fazın emülsifikasyonuna (birincil homojenizasyon) göre çok daha etkilidir. Rotorun bir kolloid değirmeni içinde hızlı dönüşü, boşlukta daha büyük damlacıkların daha küçük damlacıklara bölünmesine neden olan bir kayma gerilimi ve bir merkezkaç kuvveti oluşturur. Bu merkezkaç kuvveti sıvının disklerin merkezinden çevresine doğru hareket etmesine neden olur (McClements, 2016).

Kayma gerilmelerinin yoğunluğu ve dolayısıyla damlacık parçalama kuvvetleri, rotor ve statör arasındaki boşluğun kalınlığı ve dönüş hızı değiştirilerek değiştirilebilir. Damlacık bozulması, emülsiyonun sistemde geçirdiği süreyi artırarak, akış hızını azaltarak veya emülsiyonu cihazdan birkaç kez geçirerek de geliştirilebilir. Ayrıca, pürüzlü yüzeyleri veya birbirine kenetlenen dişleri olan disklerin kullanılmasının kayma geriliminin yoğunluğuna etkisi bulunmaktadır. Rotor ve statörün yüzeyleri pürüzsüz olduğunda, baskın damlacık parçalama mekanizması laminar kayma akışıdır, ancak yüzeyler pürüzlü veya dişli olduğunda akış karakteri türbülanstır (McClements, 2016).

Yüksek basınç homojenizatörleri gıda endüstrisinde emülsiyonların üretilmesinde kullanılan en yaygın araçlardan biridir. Kolloid değirmenler gibi, doğrudan iki sıvıdan bir

emülsiyon oluşturmaktansa, önceden var olan bir emülsiyondaki damlacıkların boyutunu küçültmede daha etkilidirler. Kaba bir emülsiyon genellikle bir karıştırıcı kullanılarak üretilir ve daha sonra doğrudan yüksek basınç homojenizatör girişine beslenir. Bu sistemler, kaba emülsiyonu öncelikle hazneye çeken ve daha sonra haznenin ucundaki dar bir valf içinden zorlayan bir pompaya sahiptir. Kaba emülsiyon valften geçerken, daha büyük damlacıkların daha küçük damlacıklara parçalanmasına neden olan yoğun bozucu kuvvetlerin bir kombinasyonuna maruz kalır (McClements, 2016). Bu işlemdeki emülsifikasyon, oluşan türbülans ve kavitasyon etkilerine dayanır ve yüksek enerjili bir işlemdir (Van Der Graaf ve diğerleri, 2005). Belirli bir yüksek basınç homojenizatördeki etkinliği, karışımın özelliklerine (örn. viskozite), homojenizatör boyutuna ve nozul tasarımına bağlıdır. Farklı uygulamalar için farklı tipte nozullar mevcuttur. Baskın damlacık bozma mekanizması, standart nozul ve mikroakışkanlaştırıcı nozullar için türbülanslı akışta atalet kuvvetleri iken, jet dağıtıcı ve orifis valfleri için laminer uzunlamasına akışta kayma kuvvetleridir. Bazı ticari cihazlar, emülsiyonun birbirini takip eden iki valften geçirildiği "iki aşamalı" bir homojenleştirme işlemi kullanır (McClements, 2016). Yüksek basınç homojenizatör yöntemleri bazı dezavantajlara sahiptir. Birincisi, damlacık boyutu ve damlacık boyutu dağılımı (kolayca) kontrol edilemez. İkinci olarak, tekrar üretilebilirlik genellikle zayıftır ve ürünün kalitesi, aynı üretim ölçeğinde parti başına değişiklik gösterebilir (Van Der Graaf ve diğerleri, 2005). Bu sistemler, düşük ve orta viskoziteli karışımlarda küçük damlacık boyutu eldesi için uygundur. Yağ ve sulu fazlar homojenizasyon öncesinde karıştırılmışlarsa, bu sistemler ile tek bir geçiş ile mikron altı damlacıklara sahip bir emülsiyon oluşturmak genellikle mümkündür. Bu sistemler kullanılarak çok küçük damlacıklara sahip bir emülsiyon üretimi amaçlanıyor ise, genellikle emülsiyonun cihazdan birkaç kez geçirilmesi gereklidir. Çapları 0,1 µm kadar damlacıklarının üretimi, oluşan yağ-su arayüzünü tamamen kaplamak için yeterli emülgatör bulunması, emülgatörün homojenizasyon içinde damlacık birleşmesini önleyecek kadar hızlı adsorbe olması ve viskozite oranı ile arayüzey geriliminin uygun bir aralıkta olması ile mümkündür. Bu sistemlerde sıcaklık artışı genellikle oldukça küçüktür, ancak emülsiyon birkaç kez yeniden sirküle edilirse veya yüksek basınçlar kullanılırsa kayda değer hale gelebilir. Bu durumlarda, su ceketli soğutucu sistemlerin kullanılması gerekli olabilir (McClements, 2016).

Mikroakışkanlaştırma, çok küçük damlacıklarla emülsiyonlar oluşturmanın oldukça verimli bir yöntemidir. Bu tür sistemler genellikle bir sıvı girişinden, bir tür pompadan ve sıvıların içinden akıp birbirleriyle etkileşime girdiği iki kanal içeren bir etkileşim odasından oluşur. Sıvılar sisteme beslenir, dar kanallar içinde yüksek bir hıza ulaştırılır ve ardından aynı anda katı bir yüzey üzerinde birbirine çarpması sağlanır. İki sıvı akışı birbiriyle çarpıştığında, sıvıların birbirine karışmasına ve daha büyük damlacıkların bozulmasına neden olan yoğun bozucu kuvvetler üretilir. Mikroakışkanlaştırıcı cihazlar, tek veya çift girişlidir. Tek girişli mikroakışkanlaştırıcılar, kaba bir emülsiyonun farklı bölümlerinin iki farklı kanaldan akmasına neden olarak önceden var olan bir emülsiyondaki damlacıkların boyutunu azaltmak için kullanılır. Çift girişli mikroakışkanlaştırıcılar, iki fazın homojenizasyonu için farklı girişlere sahiptir ve doğrudan tek tek yağ ve sulu fazlardan emülsiyonlar oluşturabilir (McClements, 2016).

Homojenizasyonda kullanılabilen bir diğer teknik ise ultrases homojenizasyondur. Ultrases, 20 kHz'den daha yüksek frekanslardaki ses dalgalarıdır. Ultrases, yüksek enerjili (10–1000 W/cm²) ve düşük enerjili (<1 W/cm²) ultrases olarak ikiye ayrılabilir. Kılcal yüzey dalgaları, akustik kavitasyon ve sıvı mikrojetleri gibi ultrases işleminin fiziksel etkileri, emülsiyondaki damlacıkların bozularak, boyutunun küçülmesini sağlayabilmektedir. Sonikasyon sırasındaki kavitasyon verimliliği, emülsifikasyon sürecini etkileyebilir. Ultrases frekansı, gücü, sıcaklık ve ortamın yüzey gerilimi veya ürünün viskozitesi gibi birçok faktör kavitasyon verimini etkileyebilir. Örneğin; frekans artırılırsa, benzer miktarda kavitasyonel aktiviteyi sürdürmek için gücün artırılması gerekir. Daha yüksek frekanslarda (MHz bölgesi), sıkıştırma ve seyrelme döngüleri daha kısa olduğundan sıvıda kavitasyon oluşturmak oldukça zorlaşır. Bu sebeple, emülsiyon giderme (demulsification) işlemi için çok yüksek frekanslar kullanılırken, düşük frekans aralığı kararlı emülsiyonlar oluşturmak için faydalı bulunmuştur. Ayrıca, sonikasyon gücünün arttırılması, mekanik etkilerin de artmasına neden olur. Aynı koşullar altında, akustik güç arttıkça, ortalama kabarcık boyutu ve kabarcık miktarında artış meydana gelir. Bu durum, kabarcıkların patlaması veya çökmesi sırasında oluşan kayma kuvvetlerini artırarak yağ veya su damlacıklarının parçalanmasını kolaylaştırabilmektedir. Yüksek enerjili ultrases işlemi, geleneksel emülsifikasyon yöntemlerine göre yüksek enerji verimliliği,

yüksek emülsiyon kararlılığı, kullanım kolaylığı gibi birçok avantaj sunduğundan son yıllarda kullanımı yaygınlaşmaktadır (Taha ve diğerleri, 2020).

Membran ve mikrokanal homojenizatörleri genellikle araştırma laboratuvarlarında iyi tanımlanmış boyutlara ve yapılara sahip partiküller üretmek için kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, nispeten düşük kapasiteleri nedeniyle endüstriyel kullanımları yaygın değildir. Membran homojenizatörler, emülsifikasyon sürecinde iki farklı şekilde kullanılabilir. Bunlardan ilki, doğrudan homojenleştirmedir ve uygun bir emülgatör varlığında ayrı ayrı beslenen yağ ile su fazlarından bir emülsiyonu doğrudan oluşturmaya dayanır. Burada, dağılmış faz küçük gözenekler içeren katı bir membrandan sürekli faz içine dikey kuvvet uygulanarak basılır ve sürekli fazın yatay akışı ile oluşturduğu sürüklenme kuvvetiyle dağılmış faz damlacıkları koparak sürekli içinde dağılır. İkinci şekil ise bir ön karışımın homojenizasyonudur, işlem mevcut kaba emülsiyonda bulunan damlacıkların boyutunun küçültülmesini içerir. Ulaşılan damlacık boyutu, membran gözenek boyutuna, yağ-su arayüzey gerilimine, uygulanan basınca, sürekli fazın akış profiline ve kullanılan emülgatörün tipine ve miktarına bağlıdır. Farklı gözenek boyutunda membranlar kullanılabilir ve böylece farklı damlacık boyutlarına sahip emülsiyonlar üretilmektedir. Bazı membranlar, homojen gözenekler içerirken, diğerleri daha az spesifik gözeneklere sahiptir ve bu da üretilen emülsiyon damlacıklarının polidispersitesi üzerinde etkilidir. Bunun yanı sıra, membranın polaritesi oluşacak emülsiyonların tipi üzerine etkili olduğundan dikkatli bir şekilde seçilmelidir: yağ içinde su emülsiyonları üretmek için hidrofobik membranlara ihtiyaç duyulurken, su içinde yağ emülsiyonları üretmek için hidrofilik membranlara ihtiyaç vardır. Mikrokanal homojenizatörler de membran homojenizatörlere benzer bir prensip ile çalışır. Burada dağılmış faz damlacıkları oluşturmak için iyi tanımlanmış geometrilere sahip mikrokanailler boyunca dağılmış faza kuvvet uygulanır. Bu teknik, özellikle çok küçük parçacık boyutu dağılımlarına ve çekirdek-kabuk veya dispersiyon yapıları gibi iyi tanımlanmış yapılara sahip emülsiyon damlacıklarının üretilmesi için yararlıdır (McClements, 2016).

Literatürde hangi yöntemin çift katlı emülsiyonların oluşturulmasında en etkili yöntem olduğuna yönelik bir uzlaşma yoktur. Her emülsifikasyon yönteminin kendi avantajları ve dezavantajları vardır. Uygun emülsifikasyon cihazının seçimi, emülsiyonun bir fabrikada mı,

yoksa laboratuvarda mı hazırlandığına, başlangıç karışımının hacmine, doğasına, nihai emülsiyonun istenen fizikokimyasal özelliklerine ve emülsifikasyon işleminin maliyetine bağlıdır (McClements, 2016; Taha ve diğerleri, 2020).

Altuntas ve diğerleri (2017) iki aşamalı çift katlı emülsiyonların üretiminde birincil emülsiyonun üretimi için rotor-statör (18.000 rpm'de 7 dakika), ultrases (160 W güçte, 20 kHz frekansta, 15 dakika, %50 darbe) ve mikroakışkanlaştırıcı (1 döngü 103 MPa) kullanımını kıyaslamıştır. Çalışmada birincil emülsiyonu rotor-statör ile üretilen emülsiyonun stabilite değeri 48 saat için %94 iken, diğer yöntemlerle üretilen emülsiyonların bu değeri %85'in altında olduğu ve en küçük damlacık boyutunun da yine rotor-statör ile üretilen emülsiyonlarda elde edildiği belirtilmiştir (Altuntas ve diğerleri, 2017). Benzer bir çalışma Yıldırım ve diğerleri (2017) tarafından da gerçekleştirilmiştir. Yazarlar iki aşamalı çift katlı emülsiyonların üretiminde birincil emülsiyonun üretimi için rotor-statör (16.000 rpm'de 10 dakika), ultrases (120 kHz frekansta, 10 dakika, %50 darbe) kullanımı arasında enkapsülasyon etkinliği açısından istatistiksel olarak fark bulamamışken, damlacık boyutunun rotor-statör ile üretilen emülsiyonlarda daha düşük olduğunu saptamışlardır (Yıldırım ve diğerleri, 2017). García, Muñoz, Alfaro ve Franco, (2016) tek adımlı emülsifikasyon ile oluşturulan çift katlı emülsiyonların üretiminde rotor-statör ve bunun ardında uygulanan mikroakışkanlaştırıcının basıncının emülsiyonların fiziksel stabilitesi ve mikroyapısı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Burada ön emülsiyon rotor-statörle (4000 rpm, 150 s) elde edilmiş daha sonra mikroakışkanlaştırıcıdan (500, 550, 600, 700, 800 bar) geçirilmiştir. Çalışmadaki iki aşamalı işlemin (rotor-statör sonrası emülsiyonun mikroakışkanlaştırıcıdan geçirilmesi), kremleşmeyi önemli ölçüde geciktirdiği saptanmıştır. 500 ve 550 bar'lık orta basınçlarda elde edilen emülsiyonlar, rotor-statör ile elde edilen emülsiyona göre önemli ölçüde daha düşük ortalama damlacık boyutlarına sahip olduğu, ancak daha fazla polidispersite sergilediği belirtilmiştir. Basıncın artması, aşırı işlemenin neden olduğu globüllerin yeniden birleşmesinin bir sonucu olarak hem ortalama damlacık boyutunu hem de polidispersiteyi yükseltmiştir (García, Muñoz, Alfaro ve Franco, 2016). Bamba ve diğerleri (2018) yaban mersini posasının ekstraktınının çift katlı emülsiyon sistemi ile enkapsülasyonunda farklı homojenizasyon koşullarının etkisini incelemiştir. Yazarlar toplam 12 farklı emülsiyon denemesi gerçekleştirmiştir. Çalışmada birincil emülsiyonun hazırlanmasında rotor-statör kullanılmış,

karıştırma hızı 10.000 rpm’de sabitlenmiş işlem süresi 2 ile 10 dk arasında değiştirilmiştir. İkinci homojenizasyon adımında ise öncelikle rotor-statör ile homojenize edilen emülsiyon daha sonra mikroakışkanlaştırıcı ile homojenize edilmiştir. Rotor-statör parametreleri 3.000 rpm’de 15 dk, 12.000 rpm’de 15 dk, 6.000 rpm’de 10 dk ve 6.000 rpm’de 20 dk iken, mikroakışkanlaştırıcı parametreleri 50 ila 200 MPa arasında değişken basınçta bir döngüdür. Yazarlar birincil emülsifikasyon aşamasında artan işlem süresi ve hızının enkapsülasyonu arttıran bir etkisinin olduğunu, fakat ikincil emülsifikasyon sırasında artan basınç veya karıştırma hızı ve süresinin enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğünü belirtmişlerdir (Bamba ve diğerleri, 2018). Cardoso-Ugarte ve diğerleri (2021) iki aşamalı emülsifikasyon yöntemi ile çift katlı emülsiyon üretimi sırasında birincil ve ikincil homojenizasyon adımının emülsiyon özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada birinci emülsiyonun oluşturulması rotor-statör yardımıyla 0,5 °C’de, 11.000 rpm ve 8 dakikada ya da yüksek basınç homojenizatör kullanarak 5000 psi 1 geçiş ile hazırlanmıştır. İkinci homojenizasyon adımı için ise rotor-statör parametresi olarak 4 dk 2900 veya 5800 rpm seçilmiştir. Yazarlar en düşük stabiliteye sahip emülsiyonun yüksek basınç homojenizatör ile oluşturulan olduğunu ve ikinci aşamada 5800 rpm kullanımının en küçük damlacık boyutunu ve en kararlı emülsiyonları oluşturduğunu bildirmişlerdir (Cardoso-Ugarte ve diğerleri, 2021). Choi ve diğerleri (2020) çift katlı emülsiyonların üretiminde iki aşamalı üretim tekniğini kullanmış ve ikinci homojenizasyon adımının etkisini incelemişlerdir. Bu adımda sırası ile tek başına rotor-statör (15000 rpm, 3 dk), ultrases (%20 genlik, 3 dk) mikroakışkanlaştırıcı (50 MPa/1 döngü) kullanımı ve son ikisinin rotor-statörle aynı koşullarda kombinasyon halde kullanımı incelenmiştir. Çalışma sonucunda küçük damlacık boyutuna ve dar dağılıma, depolama sırasında en iyi damlacık kararlılığına sahip çift katlı emülsiyonların, rotor-statör mikroakışkanlaştırıcı ile elde edildiği belirtilmiştir. Yazarlar enkapsülasyon etkinliği ile ilgili bir yorumda bulunmamışlardır (Choi ve diğerleri, 2020). Ultrases homojenizasyonun, düşük miktarda yüzey aktif madde kullanılarak çift katlı emülsiyonların oluşturulabileceği basit, hızlı ve etkili bir protokol sunduğu literatürde belirtilmektedir (Leong, Zhou, Kuan, Ashokkumar ve Martin, 2017). Leong ve diğerleri (2017) iki aşamalı emülsifikasyon tekniğinde ilk ve ikinci adımda uygulanan 20 kHz ultrases işleminin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, ikinci aşamada %10 (2 W), %20 (6 W), %30 (10 W), %40 (18 W), %50 (26 W) ultrases işlemi 5 sn uygulanmıştır. Yazarlar ultrases gücünün artırılması ile emülsiyon

damlacıklarının daha fazla bozulmasına ve enkapsüle edilmiş iç su fazı damlacıklarının tutulmasının azalmasına yol açıldığını belirtmişlerdir. Çalışmada ortalama çapın ($D[4,3]$) 2W'da 12-18 μm 'den 26 W'ta 2-4 μm arasına düştüğü belirtilmiştir (Leong ve diğerleri, 2017). Li ve diğerleri (2023) farklı ultrasonikasyon güçlerinin çift katlı emülsiyonların stabilitesi üzerindeki etkilerini ve düşük molekül ağırlıklı istiridye peptitlerinin balık kokusunu maskeleyen yeteneğini araştırmıştır. Yazarlar birinci homojenizasyon adımı 13000 rpm'de 2 dk rotor-statör uygulaması kullanmıştır. İkinci aşamada ise ön emülsifikasyon rotor-statör ile 7000 rpm 2 dakikada gerçekleştirildikten sonra ultrases işlemine tabi tutulmuştur. Ultrases işlemi 5 dakika boyunca 50, 75, 100, 125 ve 150 W giriş gücü ile gerçekleştirilmiş, 6 mm çapındaki ultrason probu, emülsiyonun tabanından 1 cm uzağa yerleştirilmiştir. İşlem, 20 kHz'lik bir frekansa ve 6 s'lik bir darbe periyoduna (4 s açık ve 2 s kapalı) ve %10-%70 genlik aralığında gerçekleştirilmiştir. Yazarlar 125 W kadar yükselişin damlacık boyutunu düşürerek monodispersliği arttırdığını fakat 150 W damlacık boyutlarında ve polidisperslikte aşırı işleme sebebiyle artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, 125 W ultrasonik güç, emülsifikasyon özelliklerinin iyileştirilmesinde, çift katlı emülsiyonların damlacık boyutunun azaltılmasında, yağ oksidasyonunun hafifletilmesinde ve geliştirilmiş beyazlık ve azaltılmış viskozite gibi duyu kabul edilebilirliğin iyileştirilmesinde etkili olduğu bulunmuştur (Li ve diğerleri, 2023).

Raviadaran ve diğerleri (2019) rotor-statörle elde ettikleri kaba W/O emülsiyonlarını farklı koşullarda ultrases ve mikroakışkanlaştırıcı koşulları ile homojenize etmiş ve emülsiyon özelliklerini karşılaştırmıştır. Ultrases işlemi farklı genliklerde (%20, 30, 40 ve 50) farklı sürelerde (10, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 220 ve 240 s) gerçekleştirilmiştir. Farklı mikroakışkanlaştırıcı basınçlarında (150, 250, 350 ve 450 bar) ve farklı döngü sayılarında (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 12) uygulanmıştır. Yazarlar, ortalama damlacık çapının, genlik ve işlem süresindeki artışla birlikte giderek azaldığını ancak azalmanın 180 s %40'lık genliğin (optimum) ötesinde durduğunu belirtmişlerdir. Benzer sonuçlar mikroakışkanlaştırıcı için de elde edilmiştir. En düşük ortalama damlacık boyutu 350 bar'lık bir çalışma basıncı ve 6 geçiş olan optimum koşullarda elde edilmiştir. İki optimum nokta karşılaştırıldığında benzer emülsiyon özelliklerine ulaşılmış olsa da yazarlar bu durumda ultrasesin mikroakışkanlaştırıcıya oranla 9 kat daha az enerji tükettiğini ve daha yüksek enerji

verimliliğine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Raviadaran ve diğerleri, 2019). Aynı yazarlar bir başka çalışmalarında, çift katlı emülsiyon üretiminde ikinci aşamadaki homojenizasyonun etkisini incelemek için farklı koşullarda ultrases ve mikroakışkanlaştırıcı koşullarını incelemişlerdir. Bu çalışmada da ultases işlemleri farklı genliklerde (%20, 30, 40 ve 50) farklı sürelerde (10, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 220 ve 240 s) gerçekleştirilmiştir. İşlem farklı mikroakışkanlaştırıcı basınçlarında (150, 250, 350 ve 450 bar) farklı döngü sayılarında (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 12) uygulanmıştır. Yazarlar benzer şekilde, artan genlik ve süre ile bir noktaya kadar ortalama damlacık boyutunda ve polidispersitede azalma saptamıştır. Çalışmaya göre, %50 genlikte 150 s'de küçük damlacık boyutu üretilebilmiştir. Fakat sürenin artması ile damlacık boyutunda artış gözlenmiştir. Benzer şekilde mikroakışkanlaştırıcı kullanımında ise 350 bar 8 döngü sonrasında damlacık boyutundaki azalmanın durduğu gözlemlenmiştir. Yine optimum noktadaki enerji tüketimi karşılaştırıldığında benzer damlacık boyutlarına sahip çift katlı emülsiyonların ultrases yardımı ile 12 kat daha az enerji ile elde edildiği belirtilmiştir (Raviadaran, Manickam ve Chandran, 2020). Ghasemi ve diğerleri (2020) iki aşamalı yöntem ile ürettikleri çift katlı emülsiyonlarda homojenizatör seçiminin etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla iki tip çift katlı emülsiyon üretilmiştir. Birincisinde birinci ve ikinci aşamada 700 W ultrases sırası ile 30 dk ve 15 dk uygulanmıştır. İkincisinde ise birinci ve ikinci aşamada rotor-statör ve yüksek basınç homojenizatör aynı işlem koşulunda uygulanmıştır ve bu işlem koşulları sırası ile 15.000 rpm 3 dk ve 1.000 bar 8 döngüdür. Çalışma sonucunda yüksek basınç homojenizatörün kullanılmasının emülsiyon stabilitesini ve damlacık boyutu dağılımını olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Bu emülsiyon hızlı kremleşme ve önemli ölçüde faz ayrımı göstermiştir (Ghasemi ve diğerleri, 2020). Niknam ve diğerleri (2020) zeytin değirmeni atık suyundan fenolik bakımından zengin iç sulu faz ile yüklenmiş çift katlı emülsiyonların iki aşamalı teknikle hazırlanması sırasında ikinci aşamadaki homojenizasyon adımını yanıt yüzey yöntemi ile optimize etmişlerdir. Seçilen faktörler, rotor-statör için dönüş hızı (11.000–29.000 rpm) ve süre (5–15 dk), ultrases için sonikasyon süresi (5–15 dk) ve genlik (%20–60) (5 s kapalı ve 5 s açık) mikroakışkanlaştırıcı için ise döngü sayısı (1–11) ve basınçtır (50–150 MPa). Yanıt olarak polidispersite indeksini ve damlacık boyutunu kullanmışlardır ve bu değerlerin düşük olması hedeflenmiştir. Çalışmada belirlenen optimum noktalar sırası ile rotor-statör için 20.000 rpm 11 dk, ultrases için %20 genlik 10 dk ve mikroakışkanlaştırıcı için 148 MPa 7 döngü olarak tahmin

edilmiştir. Çalışmada elde edilen optimum noktalar kıyaslandığında, rotor-statör ve ultrases ile elde edilen emülsiyonlar birkaç gün sonrasında kremleşme gösterirken, mikroakışkanlaştırıcı ile elde edilen emülsiyonlarda 25 °C'de 35 günlük depolamanın ardından damlacık boyutunda büyüme gözlenmemiştir. Fakat yazarlar yapının çift katlı olduğunu doğrulayacak mikroskobik bir gözlemde bulunmamıştır (Niknam ve diğerleri, 2020).

Matos, Guti rrez, Iglesias, Coca ve Pazos (2015) *trans*-resveratrol veya B12 vitamini içeren gıda sınıfı çift katlı emülsiyonlarının hazırlanmasında geleneksel (yüksek kayma etkili karıştırma) homojenizasyon metodunu ve membran emülsifikasyonu karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, mekanik karıştırmanın, polidispers emülsiyonlara yol a tıldığını, membran em lsifikasyonun ise düşük damlacık boyutlarına sahip monodispers emülsiyonlar ürettiğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, enkapsülasyon etkinliği membran emülsifikasyon ile üretilen emülsiyonlarda daha yüksek bulunmuştur (Matos, Guti rrez, Iglesias, Coca ve Pazos, 2015). Schuch, Wrenger ve Schuchmann (2014) W/O/W ikili emülsiyonların üretimi için rotor-statör cihazları (kolloid değirmeni ve dişli çember dağıtma makinesi), yüksek basınç homojenizasyon (standart ve modifiye edilmiş proses) ve dönen bir membran sistemi kullanmıştır. Çalışmada, çift katlı emülsiyonlardaki enkapsülasyon etkinliğinin, her bir emülsifikasyon cihazı için çift katlı emülsiyonlardaki yağ damlasının boyutuna doğrudan bağlı olduğu saptanmıştır. Yağ damlası ne kadar büyük olursa, enkapsülasyon verimliliği o kadar yüksek bulunmuştur. Farklı cihazlarla üretilen karşılaştırılabilir yağ damlacık boyutlarına sahip çift katlı emülsiyonlar benzer enkapsülasyon etkinlikleri göstermişlerdir. Yazarlar, geleneksel yüksek kayma etkili cihazlarının, çift katlı emülsiyonların üretimi için membran prosesleri kadar uygun olduğunun altını çizmiştir (Schuch, Wrenger ve Schuchmann, 2014).

2.2.2. Çift katlı emülsiyonların kurutulması

 nceki bölümlerde de bahsedildiği üzere, bir hidrofilik aktif maddenin enkapsülasyonu için W/O emülsiyonlarının kullanımı önemli bir seçenektir. Ancak, W/O emülsiyonu gıda işlemede çok önemli bir özellik olan suda çözünme ve/veya dağılma özelliğine sahip değildir.

W/O emülsiyonu suda çözünür hale getirmenin temel yolu, onu su ortamında emülsifiye ederek W/O/W çift katlı emülsiyonuna dönüştürmektir. Ancak, akışkan haldeki bu emülsiyon da doğası gereği kararsızdır. Çift katlı emülsiyonların yukarıda belirtildiği gibi formülasyonları modifiye edilerek stabilitenin arttırılmasına yönelik pek çok çaba mevcuttur. Buna rağmen üretilen çözümlerin etkinliği sınırlıdır ve endüstriyel uygulamalara geçirilmesinde önemli güçlükler bulunmaktadır (Muschiolik ve Dickinson, 2017).

Bu sorunun çözümünde önemli bir yaklaşım ise bu emülsiyonların toz ürünlere dönüştürülmesidir. Bu hem ikinci bir enkapsülasyon sağlar ve yeni bir mikro yapı oluşturur, hem de toz ürünlerin kendilerine özgü avantajlarından dolayı ilgi çekicidir (Choi ve diğerleri, 2007). Kurutma, herhangi bir enzimatik bozulmaya, bozulma reaksiyonlarına veya mikrobiyal büyümeye neden olacak mevcut su miktarını azaltır ve böylece bozulma oranını önemli ölçüde azaltır. Toz ürünler düşük su aktiviteleri nedeniyle mikrobiyolojik açıdan güvenlidir. Bu nedenle toza dönüştürülmüş emülsiyonların depolanması, nakliyesi ve dağıtımı sırasında soğutma/soğutma sistemlerine olan ihtiyaç ortadan kalkar. Bunun yanı sıra, suyun uzaklaştırılması ile ürün hacmi ve kütlesi azalır, bu da taşıma ve depolama maliyetlerini azaltır. Ayrıca, bu işlemle birlikte ürünün lezzeti ve dokusu hedefe göre modifiye edilebilir (Bhandari, Patel ve Xiao, 2009).

Literatür incelendiğinde, çift katlı emülsiyonların kurutulmasında dondurarak kurutma (liyofilizasyon) ve püskürtmeli kurutma kullanılmıştır (Choi ve diğerleri, 2007). Genel olarak dondurarak kurutma ile yüksek kaliteli ürün eldesi gerçekleşir. Fakat dondurarak kurutma, nispeten yüksek maliyeti nedeniyle sınırlı kullanım alanına sahiptir. Bu teknik ilk olarak 1890'da organ parçalarının kurutulması için Altmann tarafından uygulanmıştır. 1905'te ise Benedict ve Manning, ilk dondurarak kurutucuyu tasarlamışlardır. 1927'de donmuş malzemeleri vakum altında kurutmak için liyofilizasyona ilişkin ilk patent alınmıştır. Ticarileşmedeki önemli adım ise ikinci dünya savaşı sırasında gerçekleşmiştir. Liyofilize kan plazması, II. Dünya Savaşı sırasında yoğun kullanım için pazarlanmıştır. 1960'lardan bu yana, ticari olarak dondurarak kurutma yöntemi ile 400'den fazla farklı çeşitte dondurularak kurutulmuş gıda üretilmiştir. Dondurarak kurutma, donmuş bir ürünün buz fraksiyonunun süblimleşmesiyle dehidrasyona dayanır. Üç farklı aşaması vardır; dondurma, birincil kurutma aşaması (süblimasyon) ve ikincil kurutma aşaması (desorpsiyon). Birincil kurutma

aşamasında serbest su uzaklaştırılır ve toplam suyun önemli bir bölümünü oluşturan büyük miktardaki bu serbest suyun uzaklaştırılmasında kuruma hızı görece yüksektir. Süblimleşme ile suyun uzaklaşması sürecinde, gözenekli bir doku oluşur. İkincil kurutma aşamasında ise bağlı suyun uzaklaştırılması gerekir ve büyük oranda sıvı formda bulunan bu suyun uzaklaştırılmasında kuruma hızı oldukça düşüktür (Morais ve diğerleri, 2016; Orrego, Salgado ve Sarmiento, 2023).

Choi ve diğerleri (2007) kriyoprotektan ve dondurarak kurutma işleminin W/O/W emülsiyonlarının stabilitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmada düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektan olarak glikoz ve trehaloz ve yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektan olarak karragenan ve hidroksietil nişasta kullanılmıştır. Kurutma iki farklı donma hızında (0,55 °C/dk ve 1,25 °C/dk) ve iki farklı süblimasyon sıcaklığında (-10 °C ve -20 °C) gerçekleştirilmiştir. Çalışmada dondurarak kurutma sırasında çift katlı emülsiyondaki iç su fazının dış su fazına sızması, yapının kararsızlaşmasının bir göstergesi olarak ölçülmüştür. Stabilizasyon kriyoprotektanının doğasından ve dondurarak kurutma işleminin koşullarından etkilenmiştir. Partikül boyutları, karragenan'ın bir kriyoprotektan olarak kullanıldığı durumlar dışında, kurutmadan sonra küçülmüştür. İşlem koşullarından bağımsız olarak, dondurarak kurutmadan sonra partiküller kümelenmiş hale konumlanmıştır. Çalışma sonucunda yüksek kuruma hızı ve düşük süblimleşme sıcaklığı uygulandığında (1,25 °C/dk, -10 °C) stabilitenin daha iyi korunduğu belirtilmiştir. Yazarlar iç fazdan dış sulu faza su transferinin çift katlı emülsiyonda damlacık boyutunun küçülmesine neden olduğunu bildirmişlerdir (Choi ve diğerleri, 2007). Marefati, Sjöo, Timgren, Dejmek ve Rayner (2015) Pickering tipi çift katlı emülsiyonların kurutulması için dondurarak kurutma yönteminden yararlanmıştır. Çalışmada rekonstitüye edilmiş emülsiyonların enkapsülasyon etkinliklerinin %97'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca rekonstitüye tozlarda, bireysel damlaların birleşmesinden ziyade agregasyona bağlı olarak genel boyut dağılımında bir artış olduğunu gözlemlemiştir (Marefati, Sjöo, Timgren, Dejmek ve Rayner, 2015). Bir başka çalışmada istiridye peptitlerini içeren çift katlı emülsiyonlar dondurarak kurutma yöntemi ile kurutulmuştur. Bu amaçla dış su fazına %0,2, %0,4, %0,6 veya %0,8 (a/a) sodyum aljinat ilave edilmiştir. Dış su fazındaki sodyum aljinat içeriği düşük olduğunda (<%0,6 a/a), yeterli duvar malzemelerinin bulunmaması nedeniyle, dondurarak kurutma işlemi sonucunda kuru bir örnek elde

edilememiştir. Liyofilize ürünler rekonstitüye edildiğinde emülsiyonun mikro yapısının çift katlı emülsiyon yapısını koruduğu fakat damlacık boyutunun arttığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, e-burun analizleri sonucu, liyofilize örneklerde kötü kokunun maskelendiğini belirlemiştir (Yang ve diğerleri, 2021).

Püskürtmeli kurutma sıvı emülsiyonların toz ürünlere dönüştürülmesinde en yaygın kullanılan kurutma yöntemidir. Püskürtmeli kurutma kavramı ilk kez 1872'de Samuel Perry tarafından patentlenmiştir. Bu işlem 1920'lerde ticari amaçlarla kullanılmaya başlanmış ve 1980'lere gelindiğinde ise büyük ölçekte kullanımı tam anlamıyla yaygınlaşmıştır. Günümüzde, püskürtmeli kurutma, gıda ve özellikle süt endüstrisinde (püskürtmeli kurutmanın en yaygın kullanıldığı sektör) toz ürün üretimi için yaygın kullanılmaktadır (Erbay, Salum ve Bolat, 2023). Bunların yanı sıra ilaç, zirai ilaç, hafif ve ağır kimyasallar, deterjan, pigment, biyoteknoloji ve seramik gibi diğer birçok endüstri kolu da püskürtmeli kurutmadan yararlanmaktadır (Bhandari ve diğerleri, 2009).

Püskürtmeli kurutma işleminin öne çıkan avantajları şu şekildedir;

- Önceden belirlenmiş tiplerde (ince tozlar, granüller, aglomeratlar vb.), önceden belirlenen özelliklere (boyut, yoğunluk, nem içeriği, besin içeriği vb.) ve sahip kurutulmuş ürünler üretilebilir.
- Toz kalitesi, kurutma koşulları sabit tutulduğunda tüm üretim süreci boyunca sabit kalır.
- Tanecik boyut dağılımı dar bir aralıkta değişen tozlar elde edilebilir.
- Kurutulmuş ürünler paketlenmeye hazırdır, ek bir öğütme işlemi gerektirmez.
- Hem ısıya duyarlı hem de ısıya dayanıklı sıvı ürünler, ürüne önemli bir zarar vermeden işlenebilir.
- Her ne kadar sıcak hava ile kurutma işlemi gerçekleştiriliyor olsa da, damlacıklar halinde ürün püskürtüldüğünden çok yüksek yüzey alanı elde edilir ve hızlı kuruma gerçekleşir. Kuruma sırasındaki buharlaşmaya bağlı soğuma etkisinin de yardımıyla, ürünün ısıya maruz kalma süresi azalır ve pratikte ürün yüksek sıcaklıklara ulaşmadan kurutulur.
- Hijyenik üretim gerçekleşir.

- Enkapsülasyon işlemine kolaylıkla adapte edilebilir.
- Aynı ekipman farklı türdeki malzemeleri kurutmak için kullanılabilir.
- Yüksek kapasiteli, sürekli ve tam otomatik ekipmanlar tasarlanabilir.
- Çeşitli matematiksel modeller ve hesaplama araçları kullanılarak püskürtmeli kurutmanın tasarımı konusunda önemli bir bilgi birikimi oluşturulmuştur (Bhandari ve diğerleri, 2009).

Püskürtmeli kurutmanın temel prensibi, yığın sıvıdan öncelikle damlacıkların oluşumunu ve ardından sıvı damlacıklardan nemin uzaklaştırılmasını içerir. Her türlü akışkan ürün püskürtmeli kurutucu ile kurutulabilir. Sisteme beslenecek akışkanın pompalanabilir ve atomize edilebilir olması yeterlidir. Beslemenin kuru madde içeriğinin artması ile ürün kalitesi ve veriminde önemli gelişmeler sağlanabilmekte, konsantrasyon artışına bağlı olarak beslemenin viskozitesinin artması ise akışkanın sisteme beslenebilmesini ve atomize edilebilmesini güçleştirir ve bunun sonucunda ürün kalitesi ve verimini olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle, püskürtmeli kurutma için besleme özellikleri önemlidir ve genellikle yüksek konsantrasyonlu ve pompalanabilecek/atomize edilebilecek düşüklükteki viskozitede beslemeler tercih edilir. Pompa ile sisteme beslenen akışkan, küçük damlacıklar halinde atomizasyon sistemi vasıtasıyla sıcak hava akışının olduğu kurutma kabinine/bölmesine/kulesine aktarılır. Atomizasyonda döner diskli atomizörler, basınçlı nozul atomizörler veya pnömatik nozullar kullanılmaktadır (Erbay ve diğerleri, 2023; O’Sullivan, Norwood, O’Mahony ve Kelly, 2019). Püskürtmeli kurutma işlemlerinde kullanılan atomizasyon sistemleri genellikle kurutma kabininin üst merkezinde konumlandırılır. Atomizasyon, besleme damlacıklarının yüzey alanında büyük bir artışa neden olur, artan yüzey alanı ile ısı ve kütle transferi süreçleri çok hızlanır ve bu da çok kısa sürede ürünün kurumasına olanak verir. Damlacıkların kurutulması, istenen parçacık özellikleri elde edilene kadar kurutma odası içinde devam eder. Nihai kurutulmuş ürün, küçük ile orta ölçekli kurutma işlemlerinde tek aşamalı bir kurutma işlemi kullanılarak üretilir. Kurutulmuş parçacıkların kurutma havasından ayrılarak toplanması, siklonlar ve/veya torbalı filtre gibi harici ekipmanlarda gerçekleşir. Modern büyük-ölçekli püskürtmeli kurutucularda, tanecikli malzemelerin ikinci aşamada kurutulması, soğutulması, aglomerasyonu, granülasyonu

ve/veya kaplanması için kullanılabilen dahili ve/veya harici akışkan yataklar bulunur (Bhandari ve diğerleri, 2009)

Püskürtmeli kurutma aynı zamanda bir hava nemlendirme işlemi olarak da düşünülebilir. İdeal adyabatik koşullarda (ısı kaybı olmadığı varsayıldığında), nemin buharlaşması sırasında kuru havanın sıcaklığı düşecek ancak havanın ısı içeriği (kuru hava + buhar) sabit kalacaktır. Bununla birlikte, kurutulmuş ürünün hedeflenen su aktivitesi değerinin elde edilebilmesi için, çıkış hava bağıl neminin belirli bir değerin üstüne çıkmaması gerekmektedir. Örneğin; çıkış hava nemi %15 olursa, ürünün çıkıştaki su aktivitesi değerinin 0,2 düzeylerinde olması beklenir. Benzer şekilde, çıkıştaki havanın sıcaklığı da toz ürünün ulaştığı en yüksek sıcaklıktan biraz daha yüksek olur. Özetle, püskürtmeli kurutmanın sonunda, kurutma havası ile kurutulmuş ürün belirli bir denge durumuna yaklaşır. Bundan dolayı, toz ürünün özelliklerinin ayarlanmasında çıkış sıcaklığı önemli bir parametre olarak değerlendirilir (Bhandari ve diğerleri, 2009).

Edris ve Bergnstahl (2001) O₁/W/O₂ emülsiyonunu tekrar bir su fazında dağıttıktan sonra püskürterek kurutmuşlardır. Çalışmada O₁ portakal yağı, W su ve O₂ bitkisel yağ, en dıştaki su fazı ise laktoz monohidrat ve sodyum kazeinat içeren bir çözeltiden oluşmuştur. Kurutma işlemi 180±8 °C giriş sıcaklığı, 79–80 °C çıkış sıcaklığı, 10 mL/dk emülsiyon besleme debisi ile gerçekleştirilmiştir. Yazarlar tozların buruşuk yüzeylere (çukurların varlığı) sahip olduğunu ve bunun kurutma işleminin erken aşamalarında sıvı emülsiyon damlacıklarının hızlı bir şekilde büzüşmesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra yazarlar emülsiyon yapısının korunup korunmadığını kontrol etmek için tozları suda çözmüş ve mikroskop yardımı ile incelemişlerdir. Rekonstitüye tozların morfolojisinin kurutmadan önceki emülsiyon yapısına benzer olduğunu gözlemlemişlerdir (Edris ve Bergnstahl, 2001).

Vernon-Carter, Ponce-Palafox, Arredondo-Figueroa ve Pedroza-Islas (2001) yağ ve suda çözünür pigmentlerin enkapsüle edildiği W/O/W emülsiyonunu püskürterek kurutmuştur. Bu amaçla dış su fazında duvar materyali olarak mesquite gamı veya gam arabik kullanmıştır. Kurutma iki akışkanlı nozul ile 170 °C giriş sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Yazarlar,

mesquite sakızının gam arabığe göre daha üstün koruma sağladığı belirtilmiştir (Vernon-Carter, Ponce-Palafox, Arredondo-Figueroa ve Pedroza-Islas, 2001).

Rodriguez-Huezo, Pedroza-Islas, Prado-Barragan, Beristain ve Vernon-Carter (2004) biyopolimer karışımı ile stabilize edilmiş W/O/W emülsiyonlarının püskürtülerek kurutulmasıyla suda ve yağda çözünen karotenoidler içeren mikrokapsüller elde etmeyi amaçladıkları çalışmada, farklı kuru madde içeriklerinin ve biyopolimer karışımının etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada püskürtmeli kurutma işlemi 20 mL/dk besleme hızı, 2,8 bar hava basıncı, 170 ± 5 °C giriş havası sıcaklığı ve 80 ± 3 °C çıkış sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. %25 ve %35 katı içeriğine sahip W/O/W emülsiyonları, 3.9:1, 2.6:1 ve 1.4:1 duvar materyali birincil emülsiyon oranlarına ve %0.25 (a/a) teorik karotenoid konsantrasyonuna sahip mikrokapsüller üretilerek püskürtülerek kurutulmuştur. Duvar materyali olarak gam arabik (%17) mesquite gamı (%66) ve maltodekstrin (DE 10, %17) karışımı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda yüksek katı içerikli W/O/W emülsiyonlarının püskürtülerek kurutulmasıyla elde edilen mikrokapsüllerin görece iyi morfolojiyi, yüksek mikrokapsülleme verimini ve yüksek toplam karotenoid korunumunu verdiği görülmüştür. Birincil emülsiyon oranına göre yüksek oranda biyopolimer karışımı ilavesi de, benzer şekilde yüksek mikrokapsüllasyon verimliliği ile sonuçlanmıştır (Rodriguez-Huezo, Pedroza-Islas, Prado-Barragan, Beristain ve Vernon-Carter, 2004).

Bruckner ve diğerleri (2007) 3-metilbutiraldehit (3-mba) yüklü çift katlı emülsiyonları (W/O/W) püskürtmeli kurutma işlemi kullanılarak stabilize etmiştir. Kurutma 190 °C hava giriş sıcaklığı ve 85 °C çıkış sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada WPC, sodyum kazeinat (CSS), yağsız süt tozu (SMP), soya proteini (SP), gam arabik (GA), iki adet oktenil süksinatla modifiye edilmiş nişasta (MN1 ve MN2) ve maltodekstrin ayrı ayrı dış su fazına duvar materyali olarak eklenmiştir. Bunlar arasından WPC, MN1, maltodekstrin ve GA dışındaki duvar materyalleri ile uygun sonuçlar elde edilememiştir. Enkapsüle edilmiş 3-mba miktarının, WPC, MN1 ve maltodekstrin kullanılarak hazırlanan mikroenkapsüllerde katı içeriğin artması ile arttığı saptanmıştır. GA ile hazırlanan örneklerde ise mikrokapsüller, %45 katı maddede maksimum enkapsülasyon verimine ulaşmışlardır. 11 günlük depolamadan sonra, 3-mba tutumu şu şekilde bulunmuştur; GA>MN1>WPC~maltodekstrin. Çalışmada son

olarak duvar materyali kütlesi, birincil emülsiyon oranı ve besleme sıcaklığı değişkenleri yanıt yüzey yöntemi kullanarak optimize edilmiştir. Optimum tozlar MN1 ile 40 °C'lik besleme sıcaklığı, %60 KM ve %40'lık birincil emülsiyon oranı kullanılarak elde edilmiştir (Bruckner ve diğerleri, 2007).

Bir başka çalışmada Premiks membran emülsifikasyonu ile üretilen prosiyanidin yüklü çift katlı emülsiyonlarının püskürtülerek kurutulması ile prosiyanidin içeren mikroenkapsüller üretilmiştir (Berendsen, Güell ve Ferrando, 2015). Burada dış su fazına kurutma yardımcısı olarak maltodekstrin, emülgatör olarak WPI, WPI-karboksilmetil selüloz, WPI-arap zamkı veya WPI-kitosan kompleksleri ilave edilmiştir. Kurutma 170 °C hava giriş sıcaklığı ve 80-90 °C arasında çıkış sıcaklığı ve 8–15 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Yazarlar polisakkarit varlığının kuruma davranışını etkilediğini belirtmişlerdir. WPI-polisakkarit ile stabilize edilmiş emülsiyonlardan elde edilen tozların (0,26 ile 0,29 arasında), WPI ile stabilize edilmiş emülsiyonlardan elde edilen tozlardan (0,34) biraz daha düşük su aktivitesi değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Fakat emülgatör tipinin tozların enkapsülasyon etkinlikleri üzerine anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Çalışmada, WPI- karboksilmetil selüloz ile stabilize edilmiş çift katlı emülsiyonlardan rekonstitüye edildiğinde, başlangıç damlacık boyut dağılımını koruduğu belirlenmiştir (Berendsen ve diğerleri, 2015).

Toledo-Madrid, Gallardo-Velázquez ve Osorio-Revilla (2018) meyve ekstraktını çift katlı emülsiyon eldesinden sonra ve herhangi bir emülsifikasyon işlemi yapmaksızın doğrudan püskürterek kurutmuştur. Duvar materyali olarak maltodekstrin kullanılmıştır. Püskürtmeli kurutma yarı pilot ölçekli bir püskürtmeli kurutucu yardımı ile gerçekleştirilmiş giriş ve çıkış sıcaklıkları sırası ile şu şekilde ayarlanmıştır: 160–70, 160–80, 180–70 ve 180–80 °C. Çalışmada, iki yöntem içinde fenolik içeriğinin en iyi korunduğu sıcaklıkların, girişte 160 °C ve çıkışta 80 °C olduğu belirlenmiştir. İki yöntem arasında fenolik içeriğin korunumu açısından doğrudan kurutma, çift katlı emülsiyonların kurutulmasına göre (%107 ve %78) daha yüksek verim göstermişken, antioksidan içeriğin korunması (%100 ve %103) açısından farklılık saptanmamıştır (Toledo-Madrid, Gallardo-Velázquez ve Osorio-Revilla, 2018).

Bir başka çalışmada bir stearik asit matrisine yüklenmiş metiltestosteron çift katlı emülsiyonları püskürtmeli kurutma ile toza dönüştürülmüştür (Mlalila, Swai, Kalombo ve Hilonga, 2014). Çalışmada etil asetat ve suyun uzaklaştırılması ve toz ürünün elde edilmesi için farklı giriş sıcaklıklarının (70, 80, 90 veya 100 °C) ve pompa hızlarının (%1, %2 veya %3) etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçları yüksek pompa hızı kullanıldığında sıcaklıktan bağımsız olarak daha küçük partikül boyutlu tozlar ürettiğini görülmüştür (Mlalila ve diğerleri, 2014).

Lane, Brennan ve Corrigan (2010) plazmid DNA yüklü çift katlı emülsiyonları dondurarak kurutma ve püskürtmeli kurutma işlemleri ile kurutmuştur. Çalışma sonucunda püskürterek kurutma ile üretilen partiküllerin dondurarak kurutma yöntemi ile üretilenlere göre daha çeşitli partikül şekline ve boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, püskürtmeli kurutma ile üretilen tozların daha yüksek plazmid DNA enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu belirtilmiştir (Lane, Brennan ve Corrigan, 2010).

Bir başka çalışmada çift katlı emülsiyonlar dondurarak kurutma ve püskürtmeli kurutmalı yöntemleri ile kurutulmuş ve özellikleri incelenmiştir (Ying ve diğerleri, 2021). Püskürtmeli kurutma işlemi %100 aspirasyon oranı, 15–20 mL/dk emülsiyon besleme debisi ve 150 °C giriş sıcaklığında yapılırken, liyofilizasyon işlemi 48 saat 0,1-1 kPa basınçta ve -30 °C kondenser sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada üretilen tozların, çift katlı emülsiyonlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu saptanmıştır. Dondurularak kurutulmuş tozların, püskürtmeli kurutma ile üretilenlere kıyasla daha yüksek enkapsülasyon etkinliği gösterdiği belirtilmiştir (Ying ve diğerleri, 2021).

2.2.3. Protein ve türevlerinin çift katlı emülsiyonlar ile enkapsülasyonuna yönelik çalışmalar

Protein, peptit ve aminoasitlerin enkapsülasyonu çalışmalarında W/O/W çift katlı emülsiyon yapılarının kullanımı, görece basit prosesleri, proses parametrelerinin kontrol edilmesindeki kolaylıkları ve görece pahalı olmayan cihazlarla üretilebilmeleri gibi nedenlerle tercih edilmiştir (Girolodi ve diğerleri, 2021; Ye, Kim ve Park, 2010). Literatürü incelediğimizde bu

amaca dönük yapılmış çalışmaların genellikle iki tip çift katlı emülsiyon hazırlama prosedürü ile gerçekleştirildiğini görmekteyiz. 2015 yılından önce yapılmış çalışmalar büyük çoğunlukla farmasötik uygulamalara dönükken, son yıllarda gıda uygulamalarına dönük uygulama denemeleri de gerçekleştirilmeye başlanmıştır.

Genel olarak farmasötik çalışmalarda daha çok organik çözümlerde çözündürülmüş biyoparçalanabilir polimerler kullanımı tercih edilmiş ve çift katlı emülsiyonların mikropartikülleri çözücü buharlaştırma yöntemiyle elde edilmiştir (Yuan, Wu, Guo ve Jin, 2009). Bu yöntemde, suda çözündürülmüş protein, peptit veya amino asitler, bir birincil W/O emülsiyonu oluşturmak için biyobozunur bir polimerin (örneğin poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)) çözündüğü organik çözümler (örneğin diklorometan, etil asetat) içinde dağıtılır. Daha sonra birincil emülsiyon, W/O/W oluşturmak için poli(vinil alkol) gibi bir emülgatör içeren bir dış su fazında yeniden dağıtılır. Daha sonrasında ise organik çözümlünün polimer fazından uzaklaştırılmasıyla sertleştirilmiş mikropartiküller elde edilir. Burada, organik çözümlü, çözümlü ekstraksiyonu veya çözümlü buharlaştırma yoluyla uzaklaştırılabilir. Çözümlü ekstraksiyonunda, W/O/W çift katlı emülsiyonu büyük miktarda suya veya sulu banyoya eklenen aseton veya alkol gibi bir yardımcı çözümlü maruz bırakılır. Çözümlünün buharlaştırılması için sıcaklık, genellikle azaltılmış basınç altında artırılır (Ye ve diğerleri, 2010).

Gıda uygulamalarında kullanımı için üretilen, protein, peptit ve aminoasitlerle yüklenmiş çift katlı emülsiyonların bileşimi, gıda sınıfı bileşenlerden oluşmalıdır ve bundan dolayı organik çözümlerle çalışmak uygun değildir. Bunun sonucu olarak, çift katlı emülsiyon eldesinde iki aşamalı emülsifikasyon yöntemi yaygın olarak tercih edilmektedir. Gıda sınıfı çift katlı emülsiyonların su fazında sıklıkla deiyonize su kullanılır. Osmotik basıncı dengeleyebilen elektrolitler, çift katlı emülsiyonların iç ve dış su fazlarına ilave edilebilirler. Ayrıca, su fazının pH'sını korumak için tamponlar da kullanılabilir. Çift katlı emülsiyonlardaki diğer faz olan yağ fazı da bileşimde oldukça önemlidir. Gıda sınıfı çift katlı emülsiyonlarda mineral yağların kullanımı tercih edilmemektedir ve genellikle farklı bitkisel yağlardan faydalanılmaktadır (Luo ve Wei, 2023b).

2.2.3.1. *Farmasötik alanındaki çalışmalar*

Shimizu ve Nakane, (1995) yaptıkları çalışmada, çeşitli protein ve antikorların (IgY, Tavşan IgG, IX-amilaz ve lizozim) oral uygulamadaki stabilitesini geliştirmek için W/O/W emülsiyonunu kullanmıştır. Sırasıyla birincil ve ikincil emülsiyonlarda emülgatör olarak poligliseril yoğunlaştırılmış risinolat ve dekstran-kazein konjugatı, yağ fazı olarak ise soya fasulyesi yağı kullanılmıştır. Çalışmada IgY antikorunun aktivitesinin enkapsülasyon sonrası %20'nin altına düştüğü saptanmıştır. Yazarlar bu durumu, yağ/su arayüzünde IgY'nin denatürasyonunun/inaktivasyonunun meydana gelmiş olabileceği ile yorumlamışlardır. Tavşan IgG'nin, IX-amilazın ve lizozimin de enkapsülasyondan sonra aktivitelerini kaybettiği, ancak inaktivasyon oranlarının Ig Y'ninkinden daha düşük olduğunu saptanmışlardır. Bu proteinlerin moleküler karakterizasyonu, kapsüllemeden sonraki inaktivasyon oranının her bir proteinin yüzey hidrofobikliğine ve moleküler stabilitesine bağlı olabileceği düşündürmektedir (Shimizu ve Nakane, 1995).

Maa ve Hsu (1997) yayınladıkları çalışmada, protein olarak sığır serum albüminini (BSA) hidrofobik poli(metil metakrilat) ile yapılmış mikrokürelere dahil etmiştir. Bu kapsamda mikrokürelere çift katlı emülsiyonların (W/O/W) oluşturulması ve toz haline getirilmiş bir BSA'nın bir hidrofobik poli(metil metakrilat) çözeltisi içinde dağıtılması ve emülsifikasyonu (S/O/W) yoluyla oluşturulmuştur. Çalışmada, her iki süreçteki ilk adımlarda, mikrokürelere boyutuna ve proteinle yüklenmesi üzerindeki etkisine odaklanılmıştır. W/O emülsiyonu, rotor-statör homojenizasyonu kullanılarak kontrol edilen emülsiyon damlacık boyutunun küçüklük derecesine göre karakterize edilmiştir. S/O ise protein tozu boyutuna ve şekline göre karakterize edilmiştir. Farklı toz hazırlama yöntemleri kullanılarak farklı boyut ve şekillerde protein tozları üretilmiştir. Her iki emülsifikasyon prosesinde de mikrokürelere üreten ikinci emülsifikasyon aşaması, ya sürekli karıştırılan bir tank reaktöründe ya da statik bir karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemde de sürekli faz olarak, sulu bir polivinil alkol (PVA) çözeltisi kullanılmıştır. Emülsifikasyondan sonra mikrokürelere, ikincil emülsiyondan en az on kat fazla bir hacme sahip deiyonize su içeren bir sertleştirme tankında sertleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan mikrokürelere boyutunun, S/O/W sisteminde protein tozunun boyutunun artmasıyla arttığı, ancak W/O/W sisteminde sıvı emülsiyon damlacıklarının boyutunun azalmasıyla arttığı saptanmıştır. Ek olarak, mikrokürelere

protein miktarı, damlacık boyutu veya protein tozu boyutundaki artışlara göre azalmıştır. Protein tozu şeklinin rolünün ise, protein tozu boyutu 5 µm'ye kadar önemli olmadığı saptanmıştır. Düzensiz şekilli protein tozlarını kullanımı ile küresel şekilli protein tozlarından daha düşük enkapsülasyon verimliliği sonuçlarının elde edildiği belirtilmiştir (Maa ve Hsu, 1997).

Zambaux, Bonneaux, Gref, Dellacherie ve Vigneron (1999) bir plazma inhibitörü olan protein C'yi benzer bir metot ile enkapsüle etmiştir. Yazarlar protein C yüklü W/O/W emülsiyonlarını hazırlarken polimer olarak poli(laktik asit) (PLA), organik çözücü olarak metilen klorür ve yüzey aktif madde olarak PVA veya insan serum albümini kullanmışlardır. Bu çalışmada çözgen vakum altında buharlaştırılmıştır, distile su ile yıkandıktan sonra liyofilize edilmiştir. Ek olarak, ikincil emülsifikasyon aşamasında kullanılan ultrasonik homojenizasyonun işlem koşullarının ve kullanılan organik çözgenin etkileri de incelemiştir. Çalışmada kısa süreli sonikasyonun yanı sıra, metilen klorüre (1/1) aseton ilavesinin protein C aktivite kaybını sınırladığı bulunmuştur. Yazarlar, PLA'nın hidrofilik karakteri ile, yani molekül ağırlığının azalmasıyla, protein C'nin salımının arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca, emülgatör olarak insan serum albümininin kullanılması, protein C'nin yakalanma etkinliğinin arttırmış, ancak salımını engellemiştir (Zambaux, Bonneaux, Gref, Dellacherie ve Vigneron, 1999).

Hildebrand ve Tack, (2000) yaptıkları çalışmada insülinin, BSA'nın ve insan serum albümininin enkapsülasyonu için "uyarılmış faz ayırma yöntemi" adını verdikleri bir üretim yöntemi uygulamışlardır. Çalışmada polimer olarak RG 752, RG 858 (poli-laktit-ko-glikolit), organik çözücü olarak alkil asetatlar, alkil formatlar ve ketonlar, emülgatör olarak ise Tween 80, Synperonic F68, Synperonic F127 ve T-707 kullanılmıştır. En uygun formülasyonu bulmak için uygun organik çözgenleri ve uygun yüzey aktif maddeleri birleştiren bir matris oluşturulmaya çalışılmıştır. Yazarlar protein çözeltisini, organik polimer çözeltisi ile yoğun bir şekilde karıştırmıştır. Suda çözündürülmüş emülgatörler, W/O emülsiyonuna yavaş yavaş ilave edilmiştir. Daha sonra elde edilen W/O/W emülsiyonu, kısmi vakum koşulları altında organik çözgen uzaklaşana kadar karıştırılmış, yıkanmış ve liyofilize edilmiştir. Yazarlar analiz sonuçlarını ayrıntılı bir şekilde paylaşmamışlarsa da tüm çözücü ve emülgatör

kombinasyonları ile mikrokapsüllerin elde edildiğini ve mikrokapsüllerinin boyutunun, kullanılan çözeltilerin viskozitesine ve karıştırma işlemlerinin hızına bağlı olduğunu bildirmişlerdir (Hildebrand ve Tack, 2000).

Kim ve Bae (2004) BSA'nın sürekli ve tam salımı için (AB)_n tipi amfifilik multiblok kopolimerler kullanarak mikroküreler içinde enkapsüle etmiştir. Bu amaçla mikroküreler poli(etilen glikol) (PEG) ve poli(α -ester), poli(ϵ - kaprolakton) (PCL) veya poli(l-laktik asit) amfifilik multiblok kopolimerler kullanılarak modifiye edilmiş W/O/W çift katlı emülsiyonları hazırlanmıştır. Bu çalışmada çözen olarak metilen klorür tercih edilmiş, dış su fazında PVA ve %0,5 (a/h) NaCl kullanılmıştır. Çözen 35 °C'de 4 saatlik karıştırma ve ardından santrifüjleme ile uzaklaştırılmıştır. Ardından mikroküreler yıkanmış ve liyofilize edilmiştir. Yazarlar mikrokürelerin boyutunun ve enkapsülasyon etkinliğinin, kullanılan kopolimer bileşiminden belirgin şekilde etkilenmediğini saptamışlardır. BSA, matris erozyonu ve BSA'nın difüzyonu yoluyla PEG/poli(l-laktik asit) ile hazırlanmış mikrokürelerden tamamen salınırken, PEG/PCL ile hazırlanan mikrokürelerde salımın yalnızca difüzyon işlemi yoluyla gerçekleştiği ve bu salımın %60 oranında olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, PEG/PCL ile üretilmiş mikrokürelerden BSA salımının 30 dakika süreyle 50 °C'de ısı muamelesinden önemli ölçüde arttığı ve 10 günde %100 salıma ulaştığı belirtilmiştir (Kim ve Bae, 2004).

Lee ve Yoo, (2008), sıcaklığa duyarlı mikroküreler içerisinde BSA'nın enkapsülasyonunu sağlamak için W/O/W çift katlı emülsiyon tekniğinden yararlanmıştır. Bu amaçla, sıcaklığa duyarlı polimer olan Pluronic, iki farklı zincir uzunluğunda poli(ϵ -kaprolakton) ile poli(ϵ - kaprolakton)-Pluronic'in blok kopolimerleri halinde sentezlenmiştir. Çeşitli karışım oranlarında PCL-Pluronic blok kopolimerleri ve PCL karışımı ile mikrokürelerin hazırlanmasında çözen olarak diklorometan, dış fazda ise PVA çözeltisi kullanılmıştır. Bu çalışmada, kalan organik çözeni buharlaştırmak için 4 saatlik hafif bir karıştırma sonrası santrifüj, ardından liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve son ürün elde edilmiştir. Üretilen mikrokürelerin yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu ile incelendiğinde diblok kopolimerleri olan mikrokürelerin, Pluronic blokların hidrofilikliği nedeniyle gözenekli yapılara sahip olduğu saptanmıştır. Mikroküreler 37 °C'de 7 gün inkübe edildikten sonra,

sıcaklığa duyarlı protein salımı, 20 ve 37 °C arasında değişen sıcaklıklarda izlenmiştir. Mikroküre 20 °C'de inkübe edildiğinde protein salımının zayıf olduğu, ancak salım hızının 37 °C'de tekrar arttığı saptanmıştır. Bu şekilde, sıcaklık değişikliklerine göre değişken salım hızının varlığı doğrulanmış ve proteinin salım oranının, Pluronic'e bağlı poli(ε -kaprolakton) bloklarının uzunluğuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Lee ve Yoo, 2008).

Ho ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada, BSA içeren PLGA'yı biyolojik olarak parçalanabilir polimer olarak kullanarak hazırladıkları mikrokürelerdeki salımın kontrolü için alkalın hidroksiapatit etkisini incelemişlerdir. Çalışmada tercih edilen kontrollü salım stratejisi, PLGA mikroküresinin çekirdeğine hapsolan olan alkalın hidroksiapatit'in absorpsiyon yeteneğine dayanmaktadır. Çalışmada çözügen olarak diklorometan tercih edilirken dış su fazında PVA kullanılmıştır. Bu çalışmada da diğer çalışmalara benzer şekilde, kalan organik çözügenin karıştırılarak buharlaştırılması, santrifüjü ve ardından liyofilizasyonu yolu ile son ürün elde edilmiştir. Çalışma sonuçları, alkalın hidroksiapatit partiküllerinin birincil emülsiyonun su fazında iyi bir şekilde dağıldığını ve son üründe iyi enkapsülasyon verimliliği değerlerinin elde edilebildiğini (%90'ın üzerinde) göstermiştir. Çalışmada, en az 3 hafta sürekli salım elde edilmiş ve mikron boyutlu hidroksiapatit partiküllerinin kullanılmasıyla düşük hızlı bir patlamalı salım sağlanmıştır. Salım hızı sistematik olarak hidroksiapatit ilavesiyle düşürülebileceği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, test edilen emilebilir biyopolimer mikroküreler arasında, 8 mg alkalın hidroksiapatit ile PLGA (65/35) kullanılarak üretilen mikrokürelerin tatmin edici biyoyumrluluk gösterdiği sonucuna varmışlardır (Ho ve diğerleri, 2008).

Rojas, Staton, John ve Papadopoulos (2008) kozmetik formülasyonlarla aynı şekilde cilde uygulanacak, krem benzeri bir dağıtım aracında enkapsüle edilmiş proteinin kontrollü salımını incelemeye odaklanmışlardır. Bu amaçla yazarlar floresan etiketli sığır serum albüminini yüklü çift katlı emülsiyonları iki aşamalı bir emülsifikasyon prosedürü ile hazırlamışlardır. Ardından, çift katlı emülsiyonun sulu fazlarının sıvı olarak kalacağı, ancak yağ fazının donmasına ve çözülmesine neden olan sıcaklık değişikliklerine tabi tutmuştur. Yağ fazı olarak n-hekzadekan kullanılmıştır. Çalışmada 18 °C'nin altındaki sıcaklıklarda (n-hekzadekan model yağın donma noktası) depolanan emülsiyonlarda hiçbir faz ayrımı

meydana gelmezken, yağın çözülmesi kararsızlığa neden olmuştur. Yazarlar bunun sebebinin yağ fazının donması ve çözülmesiyle tetiklenen ana iç su fazındaki birleşme olduğunu düşünmektedir. Çalışmada, BSA'nın yaklaşık %90'ının, sadece bir donma-çözülme döngüsünün ardından salındığı ortaya konulmuştur (Rojas, Staton, John ve Papadopoulos, 2008).

Yuan ve diğerleri (2009) sığır serum albimüni S/O/O/W adı verilen çok katlı emülsiyon tekniği ile enkapsüle etmiştir. Bu yöntemde, protein yüklü dekstran camsı mikropartikülleri (protein yüklü AqueSpheres olarak adlandırılır), PLGA mikroküreleriyle birleştirilerek protein için sürekli salım sağlayan bir sistem oluşturmuştur. Bu amaçla, protein molekülleri dekstran camsı parçacıkları içinde kapsüllenmiş ve PLGA mikroküreleri içinde dağıtılmıştır. Bu kapsamda, protein yüklü dekstran mikropartikülleri (AqueSpheres), donma kaynaklı faz ayrımı kullanılarak hazırlanmıştır. Protein, dekstran ve polietilen glikol içeren bir ko-solüsyon hazırlandıktan sonra dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Dondurma işlemi sırasında dekstran, proteinin tercihen bölündüğü, stabilize edilmiş dağılmış bir faz oluşturmak üzere ayrılmıştır. Liyofilize tozlar, PEG sürekli fazını çözmek için diklorometan içinde yeniden süspanse edilmiş, ardından PEG'i uzaklaştırmak için santrifüjlenmiştir. Daha sonra peletler vakumlu kurutucu kullanılarak kurutulmuştur. Ortaya çıkan bileşik mikroküreler, normal bir boyut dağılımına sahip olup, pürüzsüz bir yüzeye sahip küresel bir şekil sergilemiştir. Bu yöntem, proteinler ve yağ/su arayüzleri ile hidrofobik PLGA arasındaki doğrudan temastan kaçınarak, protein agregasyonunu ve düşük salımını azaltmıştır. Dekstran camsı parçacıklarının, PLGA matrisi içindeki proteinleri etkili bir şekilde stabilize ettiği bildirilmiştir (Yuan ve diğerleri, 2009).

(Xie, Wang, Zhu, Wang ve Zhou, 2009) tarafından yapılan çalışmada, farklı laktik/glikolik asit oranlarının (90/10, 75/25, 50/50) kullanımının, PLGA'nın emülsifiye edici aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, protein olarak sığır serum albümini, çözgen olarak kloroform ve polimer olarak PLGA kullanılmıştır. Dış su fazı ise diğer çalışmalara benzer şekilde PVA içermektedir. Çalışmada çözgen vakum altında buharlaştırılmış, yıkama ve santrifüjleme işlemi sonrasındaki liyofilizasyon aşamasıyla son ürün elde edilmiştir. Yazarlar, glikolik asit monomer oranının, PLGA'nın emülsifiye edici aktivitesini önemli

ölçüde etkilediğini göstermiştir. Glikolik asit monomer oranının arttırılması, kararlı emülsiyonları üretmek için gereken minimum PLGA içeriğini azaltırken, stabilizasyonu geliştirdiği gözlemlenmiştir (Xie ve diğerleri, 2009).

Pessi ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada BSA içeren mikrokapsül formülasyonlarını geliştirmek için mikroakışkan teknolojisini kullanmıştır. Bu kapsamda, dış faz olarak su içinde PVA, orta faz olarak etil asetat içinde polikaprolakton ve iç faz olarak su içinde polietilen glikol, PVA ve BSA kullanılmıştır. Çalışmada, mikrokapsüller, ultra ince kabuklu W/O/W emülsiyon damlacıkları oluşturmak için bifazik bir akışla üretilmiştir. Üretilen mikrokapsüllerin gözeneksiz bir yapıyla monodispers bir dağılıma sahip olduğu ve 4 haftaya kadar kararlı kaldığı belirtilmiştir. Bu yöntemle araştırmacılar BSA'nın enkapsülasyon etkinliğinin %84 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, üretilen mikrokapsüllerin içerdiği BSA'nın %30'unun, pH 7,2 fosfat tamponunda 37 °C'de 400 rpm karıştırma etkisi ile 168 saat içinde serbest bırakıldığı belirtilmiştir (Pessi ve diğerleri, 2014).

Hoppel, Juric, Reznicek, Wirth ve Valenta, (2015) asetil heksapeptid-8 peptidinin deri yoluyla iletilmesi için çift katlı emülsiyon tekniğini kullanmıştır. Çalışmada, avokado, buğday tohumu ve zeytinyağı gibi farklı bitki kaynaklı yağların emülsiyon oluşumu ve özellikleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Ayrıca, çift katlı emülsiyonlardan asetil heksapeptid-8'in *in-vitro* cilt geçirgenliği, domuz derisi ile Franz tipi difüzyon hücreleri tarafından incelenmiştir. Emülsiyonlar tek aşamalı emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu amaçla emülgatör olarak Span 80 ve Tween 80, 40 °C'de karıştırılarak ilgili yağ fazında çözündürülmüştür. Daha sonra, aynı sıcaklıktaki asetil heksapeptid-8 içeren su fazı, yağ fazına damla damla ilave edilmiştir. Kıvam arttırıcı ilave edildikten sonra elde edilen emülsiyon, oda sıcaklığında 20 dakika daha karıştırılmıştır. Araştırmacılar, zeytinyağının kullanımının, diğerlerine kıyasla gelişmiş cilt geçirgenliğine ve kararlı çift katlı emülsiyonların üretimine olanak sağladığı belirlenmiştir. Ek olarak, asetil heksapeptid-8'in fizyolojik koşullarla karşılaştırıldığında asidik ortamda önemli ölçüde artan deri geçirgenliğine sahip olduğu görülmüş; asetil heksapeptid-8 geçirgenliğinin seçilen pH değerine güçlü bir şekilde bağlı olduğu vurgulanmıştır (Hoppel, Juric, Reznicek, Wirth ve Valenta, 2015).

Agrawal, Joshi ve Gupta, (2021) biyoaktif peptit yüklü Eudragit S100 mikroküreleri çift katlı emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak geliştirilmiştir. Bu kapsamda, farklı bağımlı değişkenleri (verim, parçacık boyutu ve enkapsülasyon etkinliği) incelemek için iki bağımsız değişkenli (peptit ve polimer miktarı) bir merkezi kompozit döneel tasarım kullanılmıştır. Polimer olarak Eudragit S100 kullanılmıştır, biyoaktif peptit olarak ise inci darı proteini hidrolizatından tanımlanan biyoaktif peptit (Dizi: SDRDLLGPNNQYLPK (SK-15), moleküler ağırlık 1729.2 Da) sentezlenerek üretilmiştir. Çalışmada iç su fazına polisorbata 20 ilave edilmiş, organik faz olarak izopropil alkol-etanol-diklorometan (4:6:5) kullanılmıştır. Dış su fazı ise PVA içermektedir. Çalışmada çözgen, oda sıcaklığında karıştırma ile uzaklaştırılmış, yıkama ve santrifüjleme sonrasındaki liyofilizasyon işlemi ile son ürün elde edilmiştir. Çalışma sonucunda, 9,00 mg ve 58,58 mg'lık peptit ve polimer konsantrasyonuna sahip optimum formülasyon ile iyi verim (%88,07) ve yüksek enkapsülasyon etkinliği (%88,22) elde edilmiştir. Optimize edilmiş formülasyonun *in vitro* salım profili, pH>6'daki ince bağırsak fazında maksimum peptit salımını (%89) göstermiştir (Agrawal, Joshi ve Gupta, 2021).

2.2.3.2. Gıda alanındaki çalışmalar

Giroux ve diğerleri (2016) azokazeinin hidrolizi ile üretilen boya etiketli peptitleri W/O/W emülsiyonları ile enkapsüle etmiştir. Yazarlar bu çalışmada, hidroliz derecesinin (%0, %3,5 veya %7) ve yağ fazı bileşiminin (sadeyağ, keten tohumu yağı veya mineral yağ), emülsiyon özellikleri ve simüle gastrointestinal sindirim sırasında peptit salım kinetiği üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada iki aşamalı emülsifikasyon tekniği kullanılmıştır. İç ve dış su fazında 0,1 mol/L NaCl içeren 0,001 mol/L fosfat tamponu (pH 7) kullanılmıştır. Çalışmada lipofilik emülgatör olarak PGPR, hidrofilik emülgatör olarak ise sodyum kazeinat kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, keten tohumu yağı ve sadeyağ ile yapılan ikili emülsiyonların, mineral yağdan yapılan ikili emülsiyona göre daha küçük damlacık boyutuna, daha düşük viskoziteye ve daha yüksek kremleşme kararlılığına sahip olduğu belirtilmiştir. Mineral yağ en düşük yoğunluğa sahip olması ve en yüksek faz ayrışmasını göstermesiyle ilişkilendirilmiştir. Enkapsülasyon verimliliği, azokazein hidroliz derecesinden veya depolama süresinden önemli ölçüde etkilenmezken, yağ fazı bileşiminden anlamlı düzeyde

etkilenmiştir. Bununla birlikte, enkapsülasyon etkinliğinin, tüm emülsiyonlar için %93'ten yüksek olduğu saptanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği, mineral yağ kullanılan çift katlı emülsiyonda, sadeyağ ve keten tohumu yağı ile yapılan çift katlı emülsiyonlara göre biraz daha yüksek bulunmuştur. Bu mineral yağın yüksek viskozitesi ve daha büyük emülsiyon damlacıkları oluşumuna olanak sağlaması ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada ayrıca, mide fazının sonunda peptit salımının incelendiğinde salım yüzdesinin %4 ile %42 arasında değiştiği saptanmıştır. İnce bağırsak fazında ise sadeyağ ve keten tohumu yağı lipazlar tarafından sindirilmiş ve bu sebeple peptit salımı kademeli olarak %80'in üzerine çıkmıştır. Fakat mineral yağı sindirilememiş ve peptit salımı %18'in altında kalmıştır. Ek olarak, hidrolize azokazein salımı, sindirimin her iki fazında da hidrolize olmamış azokazein salımından daha hızlı gerçekleşmiştir. Yazarlar, bu salım davranışının, yağ fazının hidrofobikliğinin yanı sıra bileşiminden de güçlü bir şekilde etkilendiğini belirtmişlerdir (Giroux ve diğerleri, 2016).

Giroux ve diğerleri (2019) yaptıkları bir diğer çalışmada, β -laktoglobulin hidrolizatının W/O/W emülsiyonlarında sindirilebilir (keten tohumu) ve sindirilemeyen (jojoba ve mineral) yağ fazlarının, gastrointestinal koşullarda emülsiyon özellikleri ve peptit salımı üzerindeki etkilerini karşılaştırmıştır. Bu amaçla, peptit salımı, lipaz yokluğunda mide pH'sında (pH 3,0) ve bağırsak pH'sında (pH 7,0); ve lipaz varlığında bağırsak pH'sında (pH 7,0) incelenmiştir. Emülsiyon hazırlama aşaması için bir önceki çalışmaya benzer bir yöntem kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, üç emülsiyonun enkapsülasyon verimliliğinin %90'ın üzerinde olduğu belirtilmiştir. Bir önceki çalışmalarına benzer şekilde, en büyük damlacık boyutuna sahip emülsiyonun mineral yağından üretilen W/O/W emülsiyonu olduğu bulunmuştur. Lipaz yokluğunda, 4 saatlik karıştırma (37 °C) sonrası gastrik pH'da salınan peptitlerin oranları (%4,1-18,8), bağırsak pH'sında salınan oranlara göre (%10,6-35,3) daha düşük bulunmuştur. Peptit salımı sıralandığında; mineral yağ<keten tohumu yağı<jojoba yağı şeklinde bir sıra elde edilmiştir. Yazarlar, peptit salımının, yağ viskozitesi ile ters orantılı bir şekilde değiştiğini ve peptit hidrofobikliği ile de arttığını belirtmişlerdir. Lipaz varlığında ise keten tohumu yağı, bağırsak ortamında parçalanmış ve peptit salımı %100'e ulaşmıştır. Fakat jojoba ve mineral yağları lipaz tarafından parçalanamamıştır ve salınan peptitlerin oranı, lipaz yokluğunda saptanan değerlere benzer bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, gastrointestinal

ortamda difüzyon yoluyla peptit salımının yağ fazı viskozitesi tarafından kontrol edildiğini ve emülsiyonun lipolitik bozunması ile peptit salımının yağ sindirilebilirliği tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Gastrointestinal sistemdeki peptitlerin bozulmasını engellemek önemli olmakla birlikte, biyoaktif peptitler, hedef bölgelerine ulaştıktan sonra salınmalıdır. Bu çalışma, peptitlerin sindirilemeyen yağdan yapılmış çift katlı emülsiyonlarla enkapsülasyonunun, biyoyararlanımlarını ciddi şekilde azaltabileceğine dikkat çekmektedir (Giroux ve diğerleri, 2019).

Jo ve diğerleri (2019) yürüttükleri çalışmada, kolajen peptiti yüklü çift katlı emülsiyonları iki aşamalı emülsiyon hazırlama prosedürü ile üretmiştir. Bu kapsamda araştırmacılar peptit konsantrasyonunun (%0-20), tuz varlığının (%0 veya %1 NaCl), farklı hidrofilik emülgatörlerin (Tween 80, lesitin, kitosan, pektin) ve iç/dış su fraksiyonlarının (%20–50 iç su, %50–80 dış su) kullanılmasının depolama sırasında emülsiyonlarının damlacık stabilitesi üzerinde etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada yağ fazı olarak %5 PGPR içeren kanola yağı kullanılmıştır. Hidrofilik emülgatörler ise dış su fazına %1 oranında eklenmiştir. Araştırmacılar Tween 80 ile stabilize edilmiş W/O/W emülsiyonlarının, faz ayrımı olmadan en iyi damlacık stabilitesini ve en yüksek kollajen peptit tutulumunu (enkapsülasyon verimliliği>%90) gösterdiğini, pektinle stabilize edilmiş emülsiyonların ise en düşük enkapsülasyon etkinliğine (%28,5) sahip olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar yüksek enkapsülasyon etkinliği için gerekli olan küçük W/O emülsiyon damlacıklarının, düşük iç su fraksiyonu ve iç su fazında NaCl ilavesi ile ürtildiğini belirtmişlerdir. Çalışmada Tween 80 ile hazırlanan emülsiyonlarının enkapsülasyon etkinliğinin peptit konsantrasyonundan bağımsız olarak>%80 değerine sahip olduğu belirtilmiştir. Uzun süreli depolama sırasında, kollajen peptitlerinin, iç su fazından dış su fazına difüzyonuna bağlı olarak, önemli damlacık boyutu değişiklikleri olmadan W/O/W emülsiyon sisteminden salındığının altı çizilmiştir (Jo ve diğerleri, 2019).

Jamshidi, Antequera, Solomando ve Perez-Palacios (2020) yaptıkları çalışmada, NaCl ile balık protein hidrolizatı içeren iç su fazına, PGPR ile balık yağı içeren yağ fazına ve WPC ile inülin kompleksi kullanımı ile oluşturulmuş dış su fazına sahip W/O/W çift katlı emülsiyonları üzerine yüksek basınç homojenizasyon işleminin etkilerini araştırmışlardır.

Emülsiyonlar iki aşamalı emülsifikasyon yöntemi ile üretilmiştir. Her iki aşamada da emülsiyonların ön karıştırma işlemleri rotor-statör kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada yüksek basınç homojenizasyon koşullarını optimize etmek için yanıt yüzey yöntemi kullanılmıştır. İlk ve ikinci aşamadaki homojenizasyon koşullarının optimizasyonunda deneysel tasarım olarak merkezi karma tasarımdan yararlanılmıştır. Çalışmada bağımsız değişken olarak, yüksek basınç homojenizasyonun birincil emülsifikasyondaki (700–1500 bar) ve ikincil emülsifikasyondaki (700–1500 bar) kullanılan basınç değerleri seçilmiştir. Optimizasyonda, son ürün olan çift katlı emülsiyonun kremleşme indeksi, mikrokapsülasyon verimliliği ve oksidasyon düzeyi yanıt olarak belirlenmiştir. Daha sonra üretilen çift katlı emülsiyonlar laboratuvar ölçekli bir püskürtmeli kurutucu ile kurutulmuştur. Kurutma esnasında 0,5 mm’lik nozzle kullanılmış, aspirasyon hızı %80, besleme hızı 1 L/h, giriş sıcaklığı 180 °C ve çıkış sıcaklığı 85–90 °C olarak ayarlanmıştır. Çalışmada elde edilen optimum homojenizasyon basınçları W/O ve W/O/W’de sırasıyla 1000 (1 geçiş) ve 1100 bardır (3 geçiş). Fakat çalışmada, üretilen toz ürünlere dönük ayrıntılı sonuçlar paylaşılmamış, sadece nem değerlerinin ürüne uygulanan homojenizasyon işleminden etkilenmediği belirtilmiştir (Jamshidi, Antequera, Solomando ve Perez-Palacios, 2020).

Kocaman ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışmada, amino asitlerin hidrofobikliğinin, amino asit salımı üzerine etkilerini belirlemişlerdir. Bu amaçla, farklı çözünürlük özelliklerine sahip amino asitler kullanmışlardır. Emülsiyonlar, iki aşamalı emülsifikasyon metodu ile hazırlanmıştır. Yağ fazında oleik asit içeriği yüksek ayçiçeği yağı ve PGPR kullanılmıştır. Dış su fazında ise hidrofilik emülgatör olarak Tween 80 tercih edilmiştir. İç ve dış su fazları ayrıca elektrolit olarak KCl, koruyucu olarak NaN₃ içermektedir. Buna ek olarak, lipofilik emülgatörün amino asit salımındaki rolünü değerlendirmek için amino asit olarak valin kullanılmış ve %2 ile %5 konsantrasyonda PGPR içeren çift katlı emülsiyonlar hazırlanmıştır. Amino asitlerin, en az %80’lik verimlilikle iç su fazı içinde tutuldukları belirlenmiştir. Amino asitlerin salımının ise hem sıcaklıktan hem de amino asitin hidrofobikliğinden önemli ölçüde etkilendiği saptanmıştır. En hızlı salım, çalışılan en yüksek sıcaklıkta (37 °C) gözlemlenmiştir. Amino asitin yağ fazında daha yüksek çözünürlüğü sahip olması ile daha hızlı difüze olmasının buna neden olduğu yorumlanmıştır. Hidrofobiklik arttıkça, salınan amino asit konsantrasyonu da artmıştır. Büyük hidrokarbon yan zinciri nedeniyle L-lösinin bu

araştırmada kullanılan en hidrofobik amino asit olduğu ve nispeten yüksek hidrofobikliği nedeniyle çalışılan tüm sıcaklıklarda incelenen tüm amino asitler içerisinde en hızlı salımı gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada salım üzerinde araştırılan pH aralığının (pH 7-10) önemli bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. PGPR konsantrasyonunun ise salımda anlamlı bir etkisinin olduğu belirlenmiş, ancak bu etkinin amino asit tipinin veya sıcaklığın etkisine kıyasla çok daha küçük olduğu görülmüştür. Ayrıca, çift katlı emülsiyonlardaki amino asitlerin ana salım mekanizmasının, iç su fazından dış su fazına doğrudan difüzyon olduğu belirtilmiştir (Kocaman ve diğerleri, 2020).

Choi ve diğerleri (2020) balık kolajeni peptitlerini içeren, W/O/W emülsiyonlarını iki aşamalı emülsifikasyon yöntemi kullanarak oluşturmuşlardır. Çalışmada ozmolit olarak NaCl koruyucu olarak ise NaN_3 kullanılmıştır. Yağ fazı ise kanola yağında çözündürülmüş PGPR içermektedir. Çalışmada, mekanik emülsifikasyon cihazlarının tipinin (rotor-statör, ultrases homojenizatör, mikroakışkanlaştırıcı ve rotor-statörün ultrases homojenizatör veya mikroakışkanlaştırıcı ile kombinasyonları), kullanılan peptit konsantrasyonlarının (%0-20) ve hidrofilik emülgatörlerin (Tween 80, kitosan ve Tween 80-kitosan karışımı) üretilen çift katlı emülsiyonların stabilitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, rotor-statör ile mikroakışkanlaştırıcı kombinasyonu uygulanarak üretilen ve %5 peptit konsantrasyonuna sahip emülsiyonların, küçük damlacık boyutu ile yüksek enkapsülasyon verimliliğine sahip olduğu, aynı zamanda iyi bir depolama stabilitesi gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, Tween 80 ile stabilize edilen çift katlı emülsiyonların, faz ayrımı olmaksızın yüksek fiziksel stabilite sergilediği de ifade edilmiştir (Choi ve diğerleri, 2020).

Jo ve van der Schaaf (2021) hidrolize balık kolajeni/polisakarit kompleksleri içeren gıda sınıfı çift katlı emülsiyonlar geliştirmişlerdir ve bunların farklı sıcaklıklarda ısıl kararlılıklarını incelemişlerdir. Araştırmacılar çift katlı emülsiyonları iki aşamalı emülsifikasyon tekniği kullanarak oluşturmuşlardır. Bu amaçla, üç farklı iç su fazı (NaCl ilavesiz kolojen hidrolizati, NaCl ilaveli kolojen hidrolizati ve kolojen hidrolizati ile polisakkarit kompleksi içeren) ile emülsiyonlar hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan balık kolojeni hidrolizati/polisakarit kompleksleri, elektrostatik etkileşimler yoluyla oluşturulmuştur. Yağ fazını ise, 3 farklı yağ (kanola, orta zincirli trigliserit ve hindistancevizi yağı) içerisinde çözündürülmüş PGPR ile

oluşturmuşlardır. Hidrofilik emülgatör olarak ise Tween 80 tercih edilmiştir. Çalışma sonucunda tüm emülsiyonların depolama sırasında sıcaklık artışı ile kararsızlıklarında artış gözlemlenmiştir. Balık kolojeni hidrolizatı/polisakarit kompleksi ile yüklü çift katlı emülsiyonlar, zaman içinde daha yüksek ısı kararlılık ve daha düşük peptit salımı (45 °C'de <%1, 65 °C'de <%30) göstermiştir. 85 °C'de çift katlı emülsiyonlardaki iç su fazındaki damlacıkların arasında damlacık birleşmesinin hızlandığı görülmüş ve bu durum tüm peptitin salınmasına sebep olmuştur. Ancak 25, 45 ve 65 °C'deki çift katlı emülsiyonlarda, emülsiyon yapılarında herhangi bir değişiklik olmamış, ancak iç su fazındaki bileşenlerin moleküler difüzyon ile dış su fazına sızdığı belirlenmiştir. Ayrıca, çift katlı emülsiyonlardan salınan peptit miktarının yağ tipi ile değişimi; orta zincirli trigliserit>hindistancevizi>kanola yağı şeklindedir. Çalışmada, NaCl içeren çift katlı emülsiyonların (%76,10-86,39), NaCl içermeyenlere (%91,23-95,80) göre daha düşük enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur (Jo ve van der Schaaf, 2021).

Yang ve diğerleri (2021) istiridye peptitleri yüklü çift katlı emülsiyonları iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle hazırlamış, daha sonra aljinat ilave edip liyofilize etmiştir. Çalışmadaki yağ fazı, soya fasulyesi yağında farklı lipofilik emülgatörlerin (Span 40, Span 60, PGPR ve soya fasulyesi lesitini) çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Daha sonra lipofilik emülgatör oranının etkisini gözlemlemek için %1, %3, %5 ve %7 (ağırlık/ağırlık) gibi farklı oranlarda PGPR ile yağ fazı yeniden hazırlanmıştır. Yazarlar daha sonra farklı su fazı:yağ fazı oranlarının (5:5, 6:4, 7:3, 8:2 ve 9:1) etkisini incelemiştir. Daha sonra, farklı kayma kuvvetlerinin birincil emülsiyon oluşumunda etkisinin gözlemlenmesi için, emülsiyonlar rotor-statör ile 12.000 rpm 2 dakika, 10.000 rpm 3 dakika, 8.000 rpm 4 dakika, 6.000 rpm 5 dakika ve 4.000 rpm 6 dakika kayma kuvveti uygulanarak hazırlanmıştır. Daha sonra, dış su fazında kullanılacak hidrofilik emülgatörün belirlenmesi için monogliserit süksinat, moleküler olarak damıtılmış monogliserit, sodyum kazeinat, Tween 20 ve Tween 80 ile çift katlı emülsiyonlar hazırlanmıştır. Uygun emülgatörün (Tween 80) kullanım oranını belirlemek için bir sonraki aşamada çift katlı emülsiyonlar farklı emülgatör konsantrasyonları (%0,2, %0,4, %0,6, %0,8 veya %1 (a/a)) ile hazırlanmıştır. Son olarak mikrojel eldesi için dış su fazına eklenecek sodyum aljinat konsantrasyonu (%0,2, %0,4, %0,6 veya %0,8 (a/a)) belirlenmiştir. Çalışma sonucunda uygun lipofilik emülgatör olarak %5 (yağ fazında ağırlıkça) PGPR

seçilmiştir. Birincil emülsiyonların hazırlanmasında O:W = 6:4 oranının ve 12.000 rpm'de 2 dakika süreyle kayma kuvveti uygulanmasının en uygun yöntem olduğuna karar verilmiştir. Uygun çift katlı emülsiyonların %0,8 (a/a) Tween 80 ilavesi ile elde edildiği görülmüştür. Birincil emülsiyon:dış su fazı oranının 5:5 olarak seçilmesinin en uygunu olduğu saptanmıştır. Duvar materyali olarak ise %0.6 sodyum aljinat kullanımına karar verilmiştir. Araştırma sonunda üretilen liyofilize ürünün, sulandırma sonrası çift katlı emülsiyon yapısını koruduğu ve iyi bir çözünürlüğe sahip olduğu belirtilmiştir. Elektronik burun sonuçları ise istiridye peptit çözeltisinin kendine özgü istenmeyen kokusunun çift katlı emülsiyon yapısı ile belirli bir oranda maskelenebildiğini göstermiştir (Yang ve diğerleri, 2021).

Ying ve diğerleri (2021) soya peptitlerini, iki aşamalı bir emülsifikasyon tekniği ile çift katlı emülsiyon yapısı içerisinde enkapsüle etmiştir. Araştırmacılar, yağ fazı olarak orta zincirli trigliserit yağı kullanmış, 3 farklı lipofilik emülgatörün (Span60, lesitin ve PGPR) birincil emülsiyonların özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Daha sonra, emülgatör konsantrasyonunun etkisini gözlemek için %2-8 aralığında PGPR ilave ederek birincil emülsiyonları tekrar üretilmişlerdir. Araştırmacılar, dış su fazında duvar materyali olarak oktenil süksinik anhidriti, modifiye nişastayı ve maltodekstrini 4:1 oranında kullanmıştır. Ayrıca, birincil emülsiyonun dış su fazına oranının etkisini incelemek için 2:8, 3:7 ve 4 birincil emülsiyon:dış su fazı oranında çift katlı emülsiyonlar üretmişlerdir. Sonrasında iç fazdaki hidrolizat oranına karar vermek üzere iç su fazına farklı oranlarda soya peptit çözeltisi (%20, 30 ve %40, ağırlık/ağırlık) ilave edilerek tekrar emülsiyonlar üretilmiştir. Çalışmada ikinci homojenizasyonun etkilerini incelemek adına da üç ayrı deneme gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda; (i) rotor-statör ile 3 dakika 10.000 rpm; (ii) rotor-statör ile 15 dakika 10.000 rpm ve (iii) rotor-statör ile 3 dakika 10.000 rpm, ardından iki aşamalı bir yüksek basınç homojenizatör ile 3 geçişli 100 bar basınçta işlem yapılmıştır. Daha sonra, üretilen bu emülsiyonlar püskürtmeli kurutma ve liyofilizasyon ile kurutulmuştur. Emülsiyonların püskürtülerek kurutulması laboratuvar tipi bir püskürtmeli kurutucu ile %100 aspirasyon oranı, 15–20 mL/dak emülsiyon besleme debisi ve 150 °C giriş sıcaklığı ile 80–85 °C çıkış sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Liyofilizasyon ise 0,1 ila 1 kPa basınçta, 48 saatlik bir işlemle yapılmıştır. Çalışma sonucunda PGPR kullanımının kararlı birincil emülsiyonu üretiminde Span 60 ve lesitine kıyasla daha etkili olduğu belirlenmiştir. W₁/O

emülsiyonlarındaki PGPR konsantrasyonu %4'ten (w/w) fazla olduğunda, damlacık boyutu ve viskozite açısından anlamlı değişiklikler saptanamamıştır. Yazarlar, W/O/W emülsiyonunun damlacık boyutu ve enkapsülasyon etkinliğinin, W:O oranına, iç su fazındaki peptit konsantrasyonuna ve ikincil emülsifikasyon adımının parametrelerine bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada en yüksek enkapsülasyon etkinliğine (>%80) sahip çift katlı emülsiyonun %40 (a/a) soya peptit çözeltisi kullanılarak, 3:7 W:O faz oranında ve 10.000 rpm'de 3 dakikalık bir rotor-statör işlemiyle homojenize edilen emülsiyonla ulaşıldığı görülmüştür. Liyofilize tozlarda ise püskürtmeli kurutma ile üretilen tozlara kıyasla daha yüksek enkapsülasyon verimliliği değerleri (>%70) saptanmıştır (Ying ve diğerleri, 2021).

Kocaman ve diğerleri (2022) yürüttükleri çalışmada farklı hidrofobikliğe sahip amino asitlerin ve di-peptitlerin W/O/W emülsiyonlarından salımını araştırmışlardır. Çalışma kapsamında yağ fazı bileşiminin etkisini araştırmak için oleik asit içeriği yüksek olan ayçiçeği yağı (uzun zincirli trigliserit) ve Miglyol 812N (orta zincirli trigliserid) kullanılmıştır. Lipofilik emülgatör olarak PGPR ilave edilmiştir. İç ve dış su fazında ozmolit olarak KCl, dış su fazında hidrofilik emülgatör olarak Tween 80 kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, amino asitlerin ve di-peptitlerin salımı üzerine hidrofobik özelliklerin ve ortam pH'sının önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Hidrofobik karakteri daha fazla olan amino asitlerin ve di-peptitlerin nötr pH'daki yağ fazında çözünürlüğü daha yüksek olduğundan, salımları da asidik pH'ya oranlar daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, midenin düşük pH'sı midede erken salımı sınırlamaktadır ve bu kontrollü salım için önemli bir bulgudur. Daha yüksek çözünürlüğü ve/veya daha yüksek difüzivite özellikleri nedeniyle uzun zincirli trigliserit yağına kıyasla, orta zincirli trigliserit yağında amino asit salımının hızlı olduğu gözlemlenmiştir (Kocaman ve diğerleri, 2022).

Luo ve diğerleri (2022), nisin, *Lactobacillus plantarum* ve momordica charantia ekstraktını çift katlı emülsiyonlar ile enkapsüle etmiş ve bu mikroenkapsülleri erişte üretiminde kullanılan unlara ilave etmiştir. Çalışmada kullanılan yağ fazı span 80 ve mısır yağından oluşmaktadır. Dış su fazı ise farklı oranlarda kaya fasulyesi proteini ve gam arabik (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:3 (h/h)) kullanılarak oluşturulmuştur. Çalışmada optimum çift katlı emülsiyonlar 1:1 kaya fasulyesi proteini/gam arabik oranı ile elde edilmiştir. Bu emülsiyonların düşük

gluten içerikli una ağırlıkça %2 eklenmesi ile, uygun reolojik özelliklere ve optimum pişirme kaybına ve su emilimine sahip hamurlar üretilmiştir. Üretilen eriştelerin raf ömürleri incelendiğinde, ağırlıkça %3 çift katlı emülsiyon ilavesinin bakteri ve küf gelişimini geciktirdiği saptanmıştır (Luo ve diğerleri, 2022).

Patange ve diğerleri (2022) Hindistan'a özgü Gir sığırlarından sağılan sütün α -laktalbümin hidrolizi sonucu oluştuğu saptanan ve amino asit dizilimi deşifre edilen, dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV) inhibe edici peptitlerinin enkapsülasyonu için çift katlı emülsiyonları iki aşamalı emülsifikasyon tekniğinden yararlanarak enkapsüle etmişlerdir. Birincil emülsiyonun iç su fazı, farklı NaCl konsantrasyonları (%0, 1, 2 ve 3) ile hazırlanmıştır. Yağ fazı, pirinç kepeği yağı ve PGPR içermektedir. Dış su fazı ise farklı pektin konsantrasyonları (% 1, 2, 3 ve 4 (a/a)) kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmada ikincil emülsifikasyon için 3 farklı rotor-statör hızı (9.000, 12.000 ve 15.000 rpm'de 2 dakika) denenmiştir. Çalışmada enkapsülasyon etkinliği, %2 tuz konsantrasyonuna kadar tuz konsantrasyonundaki artışla artmış, %3'de ve sonrasında ise azalmıştır. Çalışma sonuçları, üç homojenizasyon koşulunun tamamında pektin konsantrasyonundaki artışla parçacık boyutunun azaldığını göstermiştir. Ayrıca, emülgatör konsantrasyonundan bağımsız olarak, artan homojenizasyon hızı ile damlacık boyutunun da önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Çalışmada dış su fazının %4 pektin içeriği ve 12.000 rpm'de homojenizasyonla, maksimum enkapsülasyon etkinliğine ve daha iyi fiziksel kararlılığa ulaşıldığı belirtilmiştir. Salım özellikleri incelendiğinde *in vitro* sindirim simülasyonunda kullanılan gastrointestinal sıvılardaki salımın %25,48 (ağız), %29,21 (mide) ve %94,55 (ince bağırsak) olduğu bildirilmiştir. Ek olarak yazarlar, enkapsüle edilmiş peptitlerin, *in vitro* sindirimden sonra enkapsüle edilmemiş peptitlerden ~4 kat daha iyi DPP-IV engelleme aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır (Patange ve diğerleri, 2022).



3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kazein hidrolizati üretimi

Kazein hidrolizati üretimi, 120O763 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında çalışılan yöntemle üretilmiş olan asit kazeinden, yine aynı projede bu tez çalışmasına paralel olarak yürüten bir diğer doktora tezi kapsamında optimize edilen bir enzimatik hidroliz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Kazein eldesi için kullanılan süt, Adana'daki Sarıçam Ali Baba'nın Çiftliği Süt ve Süt Ürünleri Firmasından yağsız çiğ inek sütü olarak temin edilmiştir. Santrifüj ayırıcılarda yağı ayrılan çiğ süt, laboratuvar ortamında ısıtmalı-sirkülasyonlu su banyosu ile (IKA, ICC Basic Eco 8, Almanya) 75 °C'de pastörize edilmiş, sonrasında ise hızla 40 °C'ye soğutulmuştur. Asit kazein üretiminde Sarode, Sawale, Khedkar, Kalyankar, Pawshe (2015)'de açıklanan yöntemden yararlanılmıştır (Sarode, Sawale, Khedkar, Kalyankar, Pawshe, 2015). Buna göre soğutulan sütlere, yavaş bir şekilde 0.1 M asetik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Süt pH'sı 4.6'ya gelene kadar asit ilavesi sürdürülmüştür. Daha sonrasında herhangi bir süzme işlemi gerçekleştirilmeden, karışım 50 °C'ye ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir. Sonrasında peyniraltı suyu uzaklaştırılmış ve pıhtı 50 °C'de saf su ilavesi ile ısıtmalı manyetik karıştırıcıda (IKA C-MAG HS 10, Almanya) 15 dakika boyunca yıkanmıştır. Bu yıkama sonrası yıkama suyu uzaklaştırılmış ve aynı yıkama işlemi önce 40 °C'de, sonra 35 °C'de saf su ile tekrarlanmıştır. Her yıkama sonrasında, peynir süzme bezi kullanılarak kazein pıhtısından su uzaklaştırılmıştır. Son yıkama işlemi sonrasında süzme bezi asılmış ve 20 dakika askıda bekletilmiştir. Sonrasında bezdeki kazein pıhtısı sıkıştırılarak kalan suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Pastörize yağsız süttten 120O763 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında üretilen kazein, aynı projede belirlenen yöntemle hidroliz edilmiştir. Asit kazein hidrolizati eldesinde kullanılan proteolitik enzimler Novozymes (Bagsvaerd, Danimarka) tarafından sağlanmıştır. Çalışmada, endopeptidaz olarak Neutrase® 0.8 L, ekzopeptidaz olarak ise Flavourzyme® ve Protana™ Prime enzimleri kullanılmıştır. Kazein hidrolizati eldesi için, üretilmiş olan kazein

fosfat tamponunda eritme peyniri üretim tekniğinden yararlanılarak çözündürülmüş ve %7,5 kazein içeriğinde kazein çözeltisi elde edilmiştir. Çözündürme işleminde Thermomix TM31 (Vorwerk, Wuppertal, Almanya) cihazından ve Bas, Kendirci, Salum, Govce ve Erbay (2019) çalışmasında uygulanan yöntemden yararlanılmıştır (Bas, Kendirci, Salum, Govce ve Erbay, 2019). Elde edilen çözelti %65 genlikte, kırık buz içerisinde 30 dakika boyunca kesikli (1 saniye çalış, 1 saniye dur) bir ultrases (US) ön işlemine tabi tutulmuştur (T103 problu, Sonoplus, Bandelin, Almanya). Kazein çözeltisi içerisine kazein bazında %1,25 Neutrase®, %0,5 Flavourzyme® ve %0,5 Protana Prime enzimleri ilave edilmiş ve 45 °C’de 200 rpm karıştırma hızında 20 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Enzimatik reaksiyon, 90 °C’de su banyosunda 15 dakikalık bir ısıl işlemle sonlandırılmıştır ve sonrasında elde edilen hidrolizat 8.000 rpm’de oda sıcaklığında 10 dakikalık bir santrifüj işlemine tabi tutulmuştur (Nüve, NF800, Ankara, Türkiye). Santrifüj sonrası üst faz toplanmıştır. Toplanan üst faz 1:1 oranında tuzsuz fosfat tamponu (pH 8.0) ile seyreltilmiş ve bu çözelti birincil emülsiyonun iç fazı olarak kullanılmıştır.

3.2. Mikroskop destekli dijital görüntü analizi ile damlacık boyut dağılımının belirlenmesi: Damlacık Boyut Dağılımlarının Belirlenmesi İçin Protokol Oluşturulması ve Bu Protokolün Etkinliğinin Saptanması

Tez çalışmasında yağ içinde su emülsiyonların damlacık boyut dağılımlarının belirlenmesi için mikroskop destekli dijital görüntü analizi yöntemi geliştirilmiştir. Bu kapsamda emülsiyon mikrograflarının segmentasyonu için “Trainable Weka Segmentation (ver.3.2.35)” (“Eğitilebilir Weka Segmentasyonu (EWS)”) sınıflandırıcısı kullanılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, emülsiyon mikrograflarının dijital görüntü analizinde, emülsiyon damlacıklarının arka plandan ayrılması için Eğitilebilir Weka Segmentasyonu (EWS) kullanımı, literatürde ilk kez bu çalışmada denenmiştir. Protokolün etkinliği, sıklıkla kullanılan lazer kırınımı kullanarak parçacık boyutunu belirleyen bir partikül boyut ölçer cihazı (Malvern Mastersizer 3000) sonuçları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Çalışma kapsamında lazer kırınım parçacık boyutu analizörü ve mikroskop destekli dijital görüntü analizi ile emülsiyonların damlacık boyutu dağılımı eş zamanlı belirlenmiş ve birbirleriyle uyumluluğu incelenmiştir. Ayrıca damlacık boyutundaki değişim ile emülsiyonların bulanıklık ve viskozite sonuçları arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bu ön çalışmada deney tasarımı farklı damlacık boyutlarında O/W emülsiyonları elde edilecek şekilde oluşturulmuştur. Emülsiyonlar Tablo 3.1'de verilen şekilde farklı Yağ:Su oraları ve homojenizasyon sürelerinde üretilmiştir. Emülgatör olarak Polisorbit 80 kullanılmış olup, emülgatör oranı tüm emülsiyonlarda %2 olarak sabit tutulmuştur. Polisorbit 80 (Crill™ 4), Croda International Plc (Snaith, Birleşik Krallık) tarafından sağlanmıştır. Her bir emülsiyonun toplam ağırlığı 30 g olarak ayarlanmıştır. Emülsiyonda yağ fazı olarak, yerel marketten satın alınan ticari bir ayçiçek yağı kullanılmıştır. Su fazı, 50 mL'lik bir Falcon tüpünde Crillet™ 4 ve distile su ile hazırlanmıştır. Vortex aracılığıyla emülgatör su içerisinde çözündürülmüş ve ardından ayçiçek yağı eklenmiştir. Karışım, Ultra-Turrax (IKA T-18, Staufen, Almanya) ile 10.000 rpm'de farklı sürelerde işlenmiş ve emülsiyonlar elde edilmiştir. Emülsiyon örneklerinin damlacık boyutlarının mikroskop ile ölçümü sonucu elde edilen değerlerle, lazer kırınım cihazı ile elde edilen veriler ve diğer emülsiyon özellikleri arasındaki ilişki iki değişkenli korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Analizlerde SPSS istatistiksel paket programı (SPSS ver. 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılmıştır ve Pearson korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Tablo 3.1. Ön çalışma için kullanılan emülsiyonların formülasyonları.

Örnek No*	Yağ (% w:w)	Homojenizasyon Süresi (dk)
1	5	3
2		3
3	10	6
4		9
5	20	3
6		3
7	30	6
8		9
9	40	3
10	50	3

*2, 2, 4, 6, 7, 8 no'lu örneklerin damlacık boyutları bir gün sonra tekrar analiz edilmiştir.

3.3. Çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ile biyoaktif gıda katkı maddesi olarak mikroenkapsüle kazein hidrolizati üretim aşamaları

3.3.1. İç su fazında kazein hidrolizati bulunan kararlı W₁/O birincil emülsiyonu için uygun formülasyonun belirlenmesi

İç su fazında kazein hidrolizati bulunan kararlı W₁/O birincil emülsiyon üretimi için formülasyon ön denemelerinde kullanılmak üzere 5 çeşit monomerik emülgatör numunesi temin edilmiştir. Bu emülgatörler ve özellikleri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Emülsiyonların üretiminde, dağılmış faz oranı yükseldikçe ve emülgatör konsantrasyonu düştükçe emülsiyon oluşumu zorlaşır. Bu nedenle çalışmada sınır olarak kabul edilecek en yüksek dağılmış faz oranı ve en düşük emülgatör konsantrasyonuna karar vermek için ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle dağılmış faz olarak kullanılacak kazein hidrolizati üretilmiş daha sonra aşağıdaki akışa uygun şekilde emülsiyonlar üretilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan lipofilik emülgatörler ve HLB değerleri.

Kısaltma	Ticari isim	Genel adı	HLB	Üretici firma
C1	Crill™ 1	Sorbitan monolaurat	8.6	Croda Chemicals, İngiltere
C3	Crill™ 3	Sorbitan monostearat	4.7	Croda Chemicals, İngiltere
C4	Crill™ 4	Sorbitan monooleat	4.3	Croda Chemicals, İngiltere
AMP	AMP 4455	Amonyum fosfatit	-	Palsgaard A/S, Danimarka
PGPR	PGPR 4150	Polirisinoleikasidin poligliserol esteri	4.3	Palsgaard A/S, Danimarka

Uygun miktarda emülgatör tartıldıktan sonra üzerine formülasyona uygun miktarda Ayçiçek yağı tartılmıştır. Karışım (Crill™ 3 dışındakiler) bir cam bir çubuk ile karıştırılmıştır ve emülgatör çözündürülmüştür. Yağ fazının üzerine uygun miktarda hidrolizat eklenmiştir. Daha sonra karışım, rotor-stator ile (Ultra-Turrax, T18, IKA, Almanya) homojenize edilmiştir. Üretim esnasında kayma kuvveti aşamalı şekilde arttırılmıştır; önce 5000 rpm’de 30 sn, 10.000 rpm’de 30 sn ve son olarak 15.000 rpm’de 5 dk uygulanmıştır. Crill™ 3 ile emülsiyon hazırlanmasında ise emülgatörün çözündürülmesi için uygun miktarda Crill™ 3 ve yağ tartıldıktan sonra karışım 55 °C’ye getirilip, bir balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda

karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Crill™ 3 ile hazırlanan örneklerde hidrolizat 50 °C'ye ısıtıldıktan sonra ilave edilmiştir ve diğer emülsiyonlarda olan teknikle homojenize edilmiştir. Emülsiyonlar üretildikten hemen sonra emülsiyonların sıcaklıkları kaydedilmiş ve deneme planına uygun şekilde üretimin hemen sonrasında emülsiyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Ön denemeler sonrası, Crill™ 1, Crill™ 4, PGPR 4150 içeren emülsiyonlar 3 farklı konsantrasyonda (%3, %5 ve %7) ve 3 farklı W:O oranında (%10, %25 ve %40) oranı içerecek şekilde 50 mL üretilmiştir. AMP 4455 örneklerinin özellikle %25 dağılmış faz oranlarında emülsiyon viskozitesinin çok yüksek olması nedeniyle, bu emülgatörde %1, %2 ve %3 şeklinde uygulanmıştır (Tablo 3.3). Karışım rotor-stator (Ultra-Turrax, T18, IKA, Almanya) ile homojenize edilmiştir. Üretim esnasında kayma kuvveti aşamalı şekilde arttırılmıştır; 5000 rpm-30 sn, 10.000-30 sn, 15.000-5 dk. İncelenen dört ayrı emülgatör ile dokuz ayrı koşulda toplam 36 emülsiyon üretilmiştir. Her üretim iki kez tekrarlanmıştır. Emülsiyonlar üretildikten hemen sonra sıcaklıkları kaydedilmiş ve deneme planına uygun şekilde beklenmeden analiz edilmiştir.

Emülsiyonların hazırlanmasında kullanılan emülgatörlerin kısaltması Tablo 3.2'de, üretim koduları ise Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Birincil emülsiyon formülasyonunun belirlenmesinde kullanılan emülsiyon üretim koşulları.

	Emülgatör konsantrasyonu %3 w/w (AMP'de %1 w/w)	Emülgatör konsantrasyonu %5 w/w (AMP'de %2 w/w)	Emülgatör konsantrasyonu %7 w/w (AMP'de %3 w/w)
Dağılmış faz oranı %10 w/w	1	4	7
Dağılmış faz oranı %25 w/w	2	5	8
Dağılmış faz oranı %40 w/w	3	6	9

Üretilen emülsiyonların damlacık boyut dağılımları, akış özellikleri, elektriksel iletkenlik, pH değerleri ve türbiditeleri belirlenmiştir. Buna ek olarak emülsiyonların stabilitesi incelenmiştir. Tezin bu aşamasında; farklı formülasyonlarla yapılan emülsiyon üretimleri

sonucunda elde edilen en kararlı emülsiyonun belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, üretilen 36 farklı emülsiyon farklı analiz aşamalarında elenmiş, son olarak özellikleri genel olarak birbirine yakın 9 emülsiyon belirlenmiştir. Bu noktada, hedeflenen özelliklere en uygun olan emülsiyon formülasyonunun saptanmasında, çok kriterli karar verme durumlarında kullanılan istatistiksel yöntemlerden birisi, bir çeşit çok faktörlü optimizasyon tekniği olan İdeal Sonuç Odaklı Çok Ölçütlü Karar Verme (Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution, TOPSIS) yöntemi kullanılmıştır. Tez kapsamında üretilen emülsiyonların viskozite ve damlacık boyutu analizleri sonucunda elde edilen değerlerin minimum, formülasyonda kullanılan emülgatör konsantrasyonunun minimum ve iç faz (hidrolizat) oranının maksimum olması hedeflenmiştir. Bu amaçla, emülsiyon özelliklerinin %30'ar, formülasyon özelliklerinin ise %20'şer ağırlıkla analize alınmasına karar verilmiştir.

3.3.2. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı W₁/O birincil emülsiyonu için uygun emülsifikasyon yöntem ve optimum işlem koşullarının belirlenmesi

Tezin bu aşamasında birincil homojenizasyon aşaması optimize edilmiş ve uygun homojenizatöre karar verilmiştir. Belirlenmiş olan formülasyonla, üç farklı emülsifikasyon tekniği kullanılarak emülsiyonlar üretilerek ve işlem koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla homojenizasyon için rotor-statör (RS) (Ultra-Turrax, IKA, T-18, Almanya), ultrases (US) (T103 problu, Sonoplus, Bandelin, Almanya) ve yüksek basınç homojenizatörü (HPH) (APV Lab2000, SPX Flow, Soeborg, Danimarka) ayrı ayrı kullanılmıştır. Her birisinde kullanılacak toplam miktar ön denemelerle belirlenmiştir (Tablo 3.4). Hazırlanan emülsiyonlar tezin bir önceki aşamasında karar verilen formülasyona bağlı kalınarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. Hazırlanan birincil emülsiyonların formülasyonları.

Bileşen	Rotor-Statör Homojenizatör	Ultrases Homojenizatör	Yüksek Basınç Homojenizatör
Emülgatör (g)	1,88	1,31	3,76
Yağ (g)	35,62	24,94	71,24
Hidrolizat (g)	12,50	8,75	25,00
Toplam (g)	50	35	100

Bu optimizasyon çalışmalarında belirlenen işlem faktörleri ile yanıtlar arasındaki ilişki bilinmediğinden ikinci dereceden polinomiyal bir modelle en uygun yanıt fonksiyonuna ulaşılabileceği varsayılmıştır. Seçilen 2 faktörü Merkezi Kompozit Dönel Tasarım (Central Composite Rotatable Design, CCRD) deneme planına göre 2 düzeyli 2 faktörlü (2^2) faktöriyel deneme tasarımından gelen 4 deneme noktası, deneysel ve incelenmeyen faktörlerin etkilerini saptamak amacıyla 5 adet merkez deneme noktası ve değişimlerdeki eğriliği saptamak üzere 4 adet eksenel deneme noktası ($\lambda=1.41421$) kullanılarak, toplam 13 deneme noktası belirlenmiştir. Bu deneme noktaları doğrultusunda hazırlanan deneme planı Tablo 3.5’de verilmiştir. Optimizasyonda, modellenen yanıtlarla ilgili belirlenen hedefler doğrultusunda, her bir yanıt için belirlenen modellerin eş zamanlı çözümüne dayanan “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” yöntemi kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşulun deneysel doğrulaması, belirlenen koşulda yapılacak üretim ve analizlerle yapılmıştır. Optimizasyonda hedef; emülsiyon kararlılığının maksimum, partikül boyut dağılımının ve viskozitenin minimum olduğu işlem koşulunun saptanmasıdır.

Tablo 3.5. Rotor-statör (RS), ultrases (US) ve yüksek basınç homojenizatörü (HPH) optimizasyonda kullanılan Merkezi Karma Dönel Tasarım deneme planları.

No	RS*		US		HPH**	
	Dönüş hızı (rpm)	Süre (sn)	Genlik (%)	Süre (s)	Basınç (bar)	Süre (s)
1	17.800 (+1)	530 (+1)	50 (0)	330 (0)	1.000 (0)	60 (-1,41)
2	12.500 (0)	360 (0)	39 (-1)	140 (-1)	1.000 (0)	330 (0)
3	20.000 (+1,41)	360 (0)	50 (0)	330 (0)	1.000 (0)	330 (0)
4	12.500 (0)	360 (0)	35 (-1,41)	330 (0)	1.495 (+1)	520 (+1)
5	17.800 (+1)	190 (-1)	50 (0)	60 (-1,41)	1.700 (+1,41)	330 (0)
6	12.500 (0)	360 (0)	50 (0)	330 (0)	1.000 (0)	600 (+1,41)
7	12.500 (0)	360 (0)	50 (0)	330 (0)	1.000 (0)	330 (0)
8	12.500 (0)	600 (+1,41)	50 (0)	330 (0)	505 (-1)	520 (+1)
9	7.200 (-1)	190 (-1)	50 (0)	600 (+1,41)	1.000 (0)	330 (0)
10	12.500 (0)	360 (0)	61 (+1)	520 (+1)	1.000 (0)	330 (0)
11	5.000 (-1,41)	360 (0)	39 (-1)	520 (+1)	1.495 (+1)	140 (-1)
12	7.200 (-1)	530 (+1)	65 (+1,41)	330 (0)	300 (-1,41)	330 (0)
13	12.500 (0)	120 (-1,41)	61 (+1)	140 (-1)	505 (-1)	140 (-1)

* Her üretime 5000 rpm 60 sn ön karıştırma uygulanmıştır. **Her üretime 300 bar, 1 tur ön karıştırma uygulanmıştır. Düşük basınç değerleri, yüksek basınç değerlerinin %20’sine ayarlanmıştır.

3.3.3. İç su fazında kazein hidrolizati bulunan kararlı W₁/O/W₂ çift katlı emülsiyonu için uygun formülasyonun belirlenmesi

Çalışmada W/O/W emülsiyonu üretiminde sürekli faz su olduğundan, HLB değeri yüksek olan emülgatörlerden 3 tanesi belirlenmiş ve Croda Chemicals (İngiltere) firmasından tedarik edilmiştir. Tedarik edilen emülgatörlerin temel özellikleri ve çalışmada kullanılan kodları Tablo 3.6’de verilmiştir.

Tablo 3.6. Dış su fazında kullanılan emülgatörler.

Kod	Ticari isim	Yaygın ismi	Genel adı	HLB	Üretici firma
T20	Crillet™ 1	Tween 20	Polisorbat 20	16,7	Croda Chemicals, İngiltere
T60	Crillet™ 3	Tween 60	Polisorbat 60	14,9	Croda Chemicals, İngiltere
T80	Crillet™ 4	Tween 80	Polisorbat 80	15,0	Croda Chemicals, İngiltere

İkincil emülsiyonların hazırlanmasında Tablo 3.6’deki formülasyonlar kullanılmıştır. Bu kapsamda uygun miktarda emülgatör tartıldıktan sonra üzerine formülasyona uygun miktarda distile su tartılmıştır. Karışım (Crillet™ 3 -T60- dışındakiler) manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır ve emülgatör çözündürülmüştür. Crillet™ 3 (T60) ile emülsiyon hazırlanmasında ise emülgatörün çözündürülmesi, uygun miktarda Crill™ 3 ve distile su tartıldıktan sonra karışım 50 °C’ye getirilip, bir balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Dış su fazı hazırlandıktan sonra 50 mL’lik falkon tüpüne aktarılmış üzerine uygun miktarda birincil emülsiyon eklenmiştir. Karışım ultrases yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon %40 genlik uygulaması ile 140 s’de gerçekleştirilmiştir. Emülsiyonlar üretildikten hemen sonra emülsiyonların sıcaklıkları kaydedilmiş ve deneme planına uygun şekilde üretimin hemen sonrasında emülsiyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 3 emülgatörle (T20, T60 ve T80) araştırılmış ve her bir emülgatör için Tablo 3.7’de belirtilen 9 koşulda çift katlı emülsiyonlar üretilmiştir. Üretilen emülsiyonların damlacık boyut dağılımları, akış özellikleri, elektriksel iletkenlik, pH değerleri, türbiditeleri ve iç faz tutulma etkinlikleri belirlenmiştir. Bu noktada, hedeflenen özelliklere en uygun olan emülsiyon formülasyonunun belirlenmesinde, çok kriterli karar verme durumlarında kullanılan istatistiksel yöntemlerden birisi, bir çeşit çok faktörlü optimizasyon tekniği olan İdeal Sonuç Odaklı Çok Ölçütlü Karar Verme (Technique for Order Preference by Similarity

to Ideal Solution, TOPSIS) yöntemi kullanılmıştır. Tez kapsamında üretilen emülsiyonların bulanıklık ve iç faz tutulma etkinliği analizleri sonucunda elde edilen değerlerin eşit ağırlıklar ile ağırlıklandırılmış iki değer de maksimum olması istenmiştir.

Tablo 3.7. Çift katlı emülsiyon formülasyonunun belirlenmesinde kullanılan formülasyonlar.

Emülgatör	Dağılmış Faz Oranı (%)	Emülgatör Konsantrasyonu (%)	Üretim Kodu
Crillet™ 1 (Tween 20)	%10	%0,25	T20-1
		%1,00	T20-2
		%1,75	T20-3
	%20	%0,25	T20-4
		%1,00	T20-5
		%1,75	T20-6
	%30	%0,25	T20-7
		%1,00	T20-8
		%1,75	T20-9
Crillet™ 3 (Tween 60)	%10	%0,25	T60-1
		%1,00	T60-2
		%1,75	T60-3
	%20	%0,25	T60-4
		%1,00	T60-5
		%1,75	T60-6
	%30	%0,25	T60-7
		%1,00	T60-8
		%1,75	T60-9
Crillet™ 4 (Tween 80)	%10	%0,25	T80-1
		%1,00	T80-2
		%1,75	T80-3
	%20	%0,25	T80-4
		%1,00	T80-5
		%1,75	T80-6
	%30	%0,25	T80-7
		%1,00	T80-8
		%1,75	T80-9

3.3.4. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonu için optimum emülsifikasyon işlem koşullarının belirlenmesi

W/O/W çift katlı emülsiyonu hazırlanırken belirlenmiş formülasyon ve işlem koşulları ile birincil emülsiyon üretilmiş ve ikincil emülsiyon formülasyonu kullanılmıştır. İkincil emülsiyonun üretilmesinde kullanılmasına karar verilen US işlem koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çift katlı emülsiyonun hazırlanmasında kullanılan US işlem koşulları ise bu çalışmada optimize edilmiştir. Bir önceki aşamada US işleminin şiddetinin artırılması ile (işlem süresi ve genlik) daha kararlı emülsiyon eldesinin indikatörü olan küçük damlacık

boyutu ve bulanıklık gibi değerler elde edilirken, iç fazda tutulan hidrolizatın dış su fazına sızdığını gösteren şekilde emülsiyonun elektriksel iletkenliğinde artışlar saptanmıştır. Bu gözlemlerden hareketle, hem kararlı hem de iç faz tutulma etkinliği yüksek bir emülsiyon elde etmek için US işlem koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için, US işlem süresi ile genlik parametreleri optimizasyonda bağımsız değişken yani faktör olarak seçilmiş ve bu faktörlerin optimizasyonda kullanılacak düzeyleri de ön denemelerde belirlenmiştir. Optimizasyonda yanıt yüzey yönteminden yararlanılmış ve deneme planı “Merkezi Karma Dönel Tasarım” (Central Composite Rotatable Design, CCRD) yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu optimizasyon çalışmalarında belirlenen işlem faktörleri ile yanıtlar arasındaki ilişki bilinmediğinden ikinci dereceden polinomiyal bir modelle en uygun yanıt fonksiyonuna ulaşılabacağı varsayılmıştır. Seçilen 2 faktörü CCRD deneme planına göre 2 düzeyli 2 faktörlü (2^2) faktöriyel deneme tasarımından gelen 4 deneme noktası, deneysel ve incelenmeyen faktörlerin etkilerini saptamak amacıyla 5 adet merkez deneme noktası ve değişimlerdeki eğriliği saptamak üzere 4 adet eksenel deneme noktası ($\lambda=1.41421$) kullanılarak, toplam 13 deneme noktası belirlenmiştir. Bu deneme noktaları doğrultusunda hazırlanan deneme planı Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8. Çift katlı W/O/W emülsiyonunun üretiminin ikinci aşamasındaki US işleminin optimizasyonunda kullanılan Merkezi Karma Dönel Tasarım (CCRD) deneme planı.

Üretim Kodu	Genlik (%)	Süre (s)
1	54 (+1)	157 (+1)
2	60 (+1,414)	100 (0)
3	20 (-1,414)	100 (0)
4	40 (0)	100 (0)
5	40 (0)	180 (+1,414)
6	40 (0)	100 (0)
7	40 (0)	20 (-1,414)
8	54 (+1)	43 (-1)
9	40 (0)	100 (0)
10	40 (0)	100 (0)
11	26 (-1)	157 (+1)
12	40 (0)	100 (0)
13	26 (-1)	43 (-1)

Optimizasyonda hedef; iç faz tutulma etkinliğinin maksimum (ağırlıkça % 50), partikül boyutlarının (D (90) ve D [4,3]) minimum olduğu işlem koşulunun saptanmasıdır.

3.3.5. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonunun püskürtmeli kurutulmasında kullanılacak uygun duvar materyallerinin belirlenmesi

Tezin bu aşamasında uygun duvar materyali bileşiminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, yapılan ön denemelerle polimerik çözelti konsantrasyonu ve formülasyonlar netleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan proteinlerden sodyum kazeinat Sigma-Aldrich (Missouri, ABD) firmasından ve peynir altı suyu konsantresi (WPC-35) Egeova Süt ve Süt Ürünleri'nden (Konya, Türkiye) sağlanmıştır. Polisakkarit olarak seçilen laktoz ZAG Kimya (İstanbul, Türkiye), maltodekstrin (DE 18) Sunar mısır (Adana, Türkiye) ve gam arabik Tito Kimya'dan (İzmir, Türkiye) temin edilmiştir. Konjugatların üretimi için karbonhidrat protein kombinasyonları, 4:1 karbonhidrat-protein oranı ile 2 saat karıştırılarak çözündürülmüştür. Bu karışımlar daha sonra tam hidrasyon sağlamak için gece boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır. Sonrasında karışımlar, 170 °C giriş sıcaklığı, %100 aspirasyon oranı ve 80 °C çıkış sıcaklığı ile laboratuvar tipi püskürtmeli kurutucu (Unopex B15 Mini) kullanılarak toz haline getirilmiştir. Besleme akışı 10-15 mL/dk arasında ayarlanmıştır. Bu tozlar %50 bağıl nem (RH) ve 60 °C ortam sıcaklığında 8 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. %50 RH ortamını oluşturmak için sodyum bromür (NaBr) doymuş çözeltileri kullanılmıştır.

Ön deneme üretimlerinde Tablo 3.9'da verilen 12 duvar materyali kombinasyonu ile üretimler yapılmıştır. Ön denemelerde izlenen yol sonuçlarla bütünlük içerisinde olduğundan bulgular kısmına eklenmiştir. Yapılan ön üretim denemeleri sonucunda, 6 farklı duvar materyali bileşimi ile çalışılmasına karar verilmiştir. Buna göre, öncelikle dış su fazında farklı polimerik çözeltiler bulunan çift katlı emülsiyonlar üretilmiş, sonrasında ise bu emülsiyonlar püskürtmeli kurutucuya beslenerek mikrokapsüle toz ürünler elde edilmiştir.

Tablo 3.9. Polimerik çözeltilerde kullanılan protein ve karbonhidrat çeşitleri ve üretilen örneklerin kısaltmaları.

Protein	Karbonhidrat	Kısaltmalar	
		Kombine Kullanım	Konjugasyon
Sodyum kazeinat	Laktoz	NaC-Lac	NaC-Lac-K
Sodyum kazeinat	Maltodekstrin	NaC-MD	NaC-MD-K
Sodyum kazeinat	Gam arabik	NaC-GA	NaC-GA-K
Peynir altı suyu protein konsantresi	Laktoz	WPC-Lac	WPC-Lac-K
Peynir altı suyu protein konsantresi	Maltodekstrin	WPC-MD	WPC-MD-K
Peynir altı suyu protein konsantresi	Gam Arabik	WPC-GA	WPC-GA-K

Kurutma için üretilen beslemenin üretimi şu şekildedir. Tezin bir önceki aşamalarında belirlenen koşullarda üretilen bu birincil emülsiyon (W_1/O), çift katlı emülsiyonun ($W_1/O/W_2$) dağılmış fazı olarak kullanılmıştır. İkincil emülsiyon üretiminde sürekli faz olarak ise (W_2) farklı polimerik sulu çözeltiler kullanılmıştır. Ön üretim denemeleri sonuçlarından hareketle, polimerik çözelti formülasyonunda NaC-Lac, NaC-MD, WPC-GA, NaC-Lac-K, NaC-MD-K ve WPC-GA-K kullanılmıştır. Protein ve karbonhidratların kombinasyon halinde kullanılacakları formülasyonlarda (NaC-Lac, NaC-MD ve WPC-GA) protein:karbonhidrat oranı 1:4 olarak belirlenmiş ve sulu çözeltideki konsantrasyonu %30 olacak şekilde protein ve karbonhidrat bileşenleri tartılmıştır. Tartılan bileşenler, manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan suya yavaş yavaş ilave edilerek sulu çözeltiler hazırlanmıştır. Protein ve karbonhidratların konjugat halinde kullanılacakları formülasyonlarda ise (NaC-Lac-K, NaC-MD-K ve WPC-GA-K) bu kısmın ilk bölümünde ayrıntılı şekilde açıklandığı üzere, öncelikle konjugatlar üretilmiş, sonrasında ise bu konjugatlar sulu çözeltideki konsantrasyonu %30 olacak şekilde manyetik karıştırıcı üzerindeki suya yavaş yavaş ilave edilmiş ve karıştırılarak sulu çözeltiler hazırlanmıştır. Tüm sulu çözeltiler, hazırlandıktan sonra 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve emülsiyonda kullanılmadan önce içerisine %1 oranında emülgatör (Crillet™ 1) ilave edilerek çözündürülmüştür. Bu şekilde hazırlanmış olan polimerik sulu çözeltiler çift katlı emülsiyonun sürekli fazı olarak (W_2) ikincil emülsiyon üretim aşamasında kullanılmıştır. İkincil emülsiyon üretiminde, hazırlanmış olan %30 duvar materyali ve %1 emülgatör içeren polimerik sulu çözeltinin üzerine dağılmış faz oranı %20 olarak şekilde birincil emülsiyon ilave edilmiştir. Sonikatör kullanılarak %54 genlik değerinde 66 saniyelik bir ultrases işlemiyle çift katlı emülsiyonlar hazırlanmıştır. Çift katlı emülsiyon üretimleri 30 mL'lik son ürün elde edecek şekilde düzenlenmiştir. Püskürtmeli

kurutucuya beslenecek her bir 90 mL’lik besleme için seri halde 3 üretim gerçekleştirilmiştir. Üretilen çift katlı emülsiyonlar ısıtmalı bir manyetik karıştırıcıda karıştırma ile 45 °C’ye getirilmiş ve laboratuvar tipi bir püskürtmeli kurutucuya (Unopex, B-15 Mini, Türkiye) beslenmiştir. Beslemenin kurutma kabinine atomizasyonu amacıyla kullanılan nozulun delik çapı 0,4 mm ve nozul hava debisi ise 12’dir. Püskürtmeli kurutma giriş hava sıcaklığı 163 °C ve aspirasyon oranı %80 olarak sabitlenmiş ve bu koşullarda püskürtmeli kurutucu çıkış hava sıcaklığı 70 °C olacak şekilde besleme debisi ayarlanmıştır. Püskürtmeli kurutma işlemleri 90 mL’lik çift katlı emülsiyonlarla gerçekleştirilmiştir. Üretilen tozlar oda sıcaklığında 3 katmanlı BOPET/Metalize PET/PE ambalajlara yerleştirilmiş, havası alınmış ve ısıtılarak yapıştırıldıktan sonra oda koşullarında analiz edilene kadar karanlıkta depolanmıştır.

Bunun yanı sıra, *in vitro* sindirimde duvar materyalinin etkisini elemine etmek için iç faz olarak hidrolizat çözeltisi yerine tampon çözelti içeren kontrol tozları yukarıda anlatılan şekilde üretilmiştir. Hidrolizat içeren örneklerin sonuçları kontrol örnekleri sonuçları ile kıyaslanmış farkın anlamlılığı iki kuyruklu *t*-testi ($p < 0,05$) yardımı ile belirlenmiştir.

3.3.6. İç su fazında kazein hidrolizatı bulunan kararlı $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonunun püskürtmeli kurutulmasında kullanılacak duvar materyallerinin oranının optimizasyonu

Tezin bu aşamasında bir önceki iş paketinde belirlenen en uygun duvar materyali çeşidi olan sodyum kazeinat: maltodekstrin karışımı ile üretilmiş tozların özelliklikleri protein:karbonhidrat oranı ve duvar materyali değişkenlerine bağlı olarak optimize edilmiştir. Optimizasyonda yanıt yüzey yönteminden yararlanılmış ve deneme planı “Merkezi Karma Dönel Tasarım” (Central Composite Rotatable Design, CCRD) yöntemiyle hazırlanmıştır. Buna göre belirlenen faktörler ile yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen düzeyleri, CCRD deneme planında kullanılan kodlanmış değerler halinde Tablo 3.10’da verilmiştir. Dizaynın içerdiği 13 noktanın yanı sıra aksiyel noktalardaki üretimler tekrar edilmiştir. Belirlenen formülasyonlarla çift katlı emülsiyonlar üretilmiş, üretilen emülsiyonların özellikleri analiz edilmiş, üretilen emülsiyonlar püskürtmeli kurutucuya beslenerek toza dönüştürülmüş, toz ürünlerin fiziksel özellikleri belirlenmiş, mikroenkapsülasyon verimi hesaplanmış ve tozlar *in vitro* sindirimden geçirildikten sonra biyoaktivite özelliklerinin

analizlerine geçilmiştir. *In vitro* sindirimde duvar materyalinin etkisini elemine etmek için iç faz olarak hidrolizat değil tampon çözeltisi içeren kontrol tozları üretilmiştir. Hidrolizat içeren örneklerin sonuçları kontrol örnekleri sonuçları ile kıyaslanmış farkın anlamlılığı iki kuyruklu *t*-testi yardımı ile belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu kapsamda, çift katlı emülsiyonların üretim basamakları ve püskürtmeli kurutma işlem koşulları bir önceki kısımda verilen basamak ve parametreler ile aynıdır.

Optimizasyonda hedef; maksimum kurutma verimliliği, maksimum enkapsülasyon etkinliği, minimum yüzey yağı, *in-vitro* sindirim sonrası maksimum ACE inhibisyonu ve maksimum radikal süpürme aktivitesi olarak belirlenmiştir. Ağırlıklar sırası ile 5, 5, 2, 5, 2 olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.10. Toz üretiminde kullanılacak duvar materyallerinin oranının optimizasyonunda kullanılan Merkezi Karma Dönel Tasarım (CCRD) deneme planı.

Üretim Kodu	Maltodekstrin:Sodyum kazeinat	Duvar materyali (%)
1	4,0 (0)	30,0 (0)
2	6,0 (+1,414)	30,0 (0)
3	4,0 (0)	30,0 (0)
4	4,0 (0)	30,0 (0)
5	5,4 (+1)	26,5(-1)
6	2,6(-1)	26,5 (-1)
7	4,0 (0)	30,0 (0)
8	2,0 (-1,414)	30,0 (0)
9	4,0 (0)	25,0 (-1,414)
10	2,6(-1)	33,5 (+1)
11	4,0 (0)	35,0 (+1,414)
12	4,0 (0)	30,0 (0)
13	5,4 (+1)	33,5 (+1)

3.4. Analiz yöntemleri

Her bir tez aşamalarında gerçekleştirilen analizler Tablo 3.11’ da özetlenmiştir.

Tablo 3.11. Tez kapsamında yürütülen iş paketlerinde gerçekleştirilen analizler*.

Analizler		Bölüm (4.X)						
		1	2	3	4	5	6	7
Damlacık/Partükül boyut dağılımı	Mikroskop destekli görüntü analizi	x	x	x				
Akış özellikleri	Lazer kırınımı ile	x			x	x	x	x
Elektiriksel iletkenlik /pH		x	x	x	x	x	x	x
Emülsiyon stabilitesi		x	x	x	x	x		
Bulanıklık (Türbidite)		x			x	x		
Emulsion - Rekonstitüye toz morfolojisi			x	x	x	x	x	x
Enkapsülasyon etkinliği/İç fazının tutulma etkinliğinin				x	x	x	x	x
Nem miktarı							x	x
Yüzey yağı							x	x
Su aktivitesi							x	x
Kurutma randımanı							x	x
In-vitro sindirim	TPM						x	x
	SRGA						x	x
	ACE inhibisyonu						x	x
	α -Amilaz inhibisyonu						x	
	α -Glukozidaz inhibisyonu						x	

* ACE, anjiyotensin dönüştürücü enzim; SRGA, Serbest radikal giderme aktivitesi (ABTS); TPM, toplam peptit miktarı.

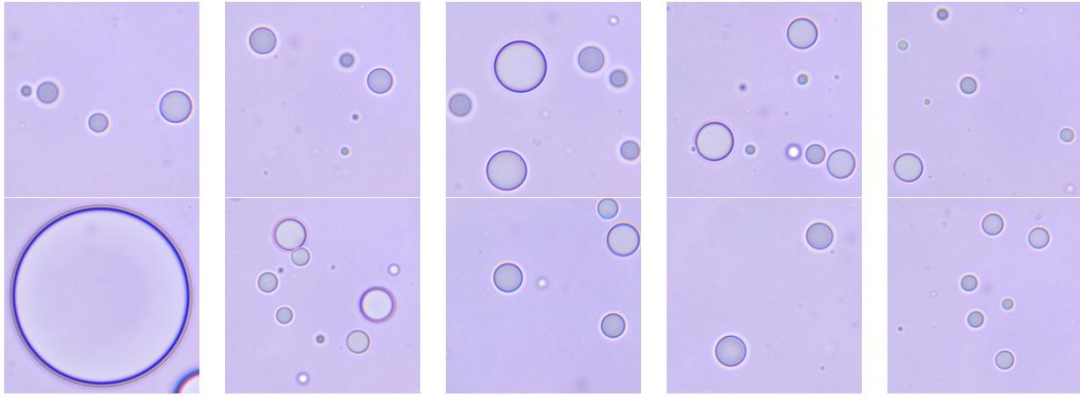
3.4.1. Emülsiyonların ve tozların partikül (damlacık) boyut dağılımlarının belirlenmesi

3.4.1.1. Damlacık boyut dağılımlarının mikroskop destekli görüntü analizi yardımı ile belirlenmesi

Tez kapsamında üretilen yağ içinde su emülsiyonlarının damlacık boyutları mikroskop destekli görüntü analizi yardımı ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında üretilen emülsiyonların mikrografları, bir ışık mikroskobuna (Omax, M83EZ, OMAX Microscopes, ABD) bağlı 5 Megapiksel CMOS kamera (OMAX A3550U, OMAX Microscopes, ABD) ile elde edilmiştir. Çalışmada 100x/1,25 oil, 160/0,17 objektif lens kullanılmıştır. Bu kapsamda öncelikle, lam üzerine 50 μ L dış faz (su ya da yağ) damlatılmış ve sonrasında bu damlanın üzerine şırınga iğnesi yardımıyla 5 μ L emülsiyon eklenmiştir. Sonrasında örneğin üzeri bir lamel ile dikkatlice kapatılmış ve bu lamelin üzerine immersiyon yağı damlatılmıştır. Her emülsiyon için 5 ayrı lamdan en az 100 görüntü alınmıştır ve görüntü Tagged Image File Format Biçimi (TIFF) ile bilgisayara kaydedilmiştir. Elde edilen mikrograflara herhangi bir

onarım işlemi (kontrast, beyaz dengesi vb.) uygulanmamıştır. Sonrasında bu görüntüler ImageJ/Fiji (ver.1.53c.) programı yardımı ile işlenmiştir.

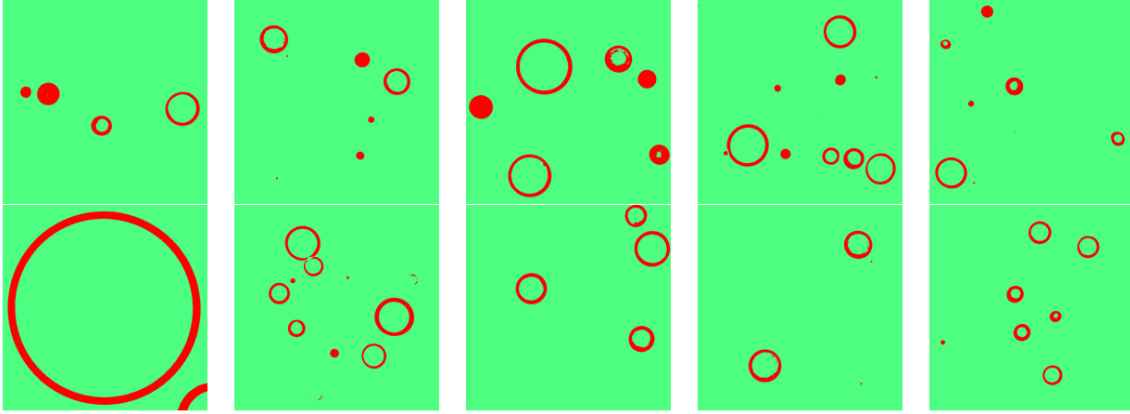
Analizlerde kullanılan WEKA sınıflandırıcısının eğitimi için üretilmiş emülsiyon mikrograflarından 10 adedi ayrılmıştır (Şekil 3.1). Bu mikrograflar eş zamanlı olarak ImageJ/Fiji programında açılmıştır. Daha sonra hepsi tek bir yığın (stack) haline getirilmiştir (Image>Stacks>Images to Stack). Bu yığının merkez bölgesindeki 800x800 piksellik alan kesilip eğitimde kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Daha sonra EWS eklentisi çalıştırılmıştır (Plugins> Segmentation>Trainable Weka Segmentation). İyi odaklanmış damlacıklar bir sınıf olarak makina öğrenme arayüzüne tanıtılmış, diğer sınıf olarak ise arka plan, kötü odaklı damlacıklar ve varsa diğer yabancı cisimler tanıtılmıştır. Daha sonra eğitilen sınıflandırıcı kaydedilmiştir (Salum, Güven, Aydemir ve Erbay, 2022).



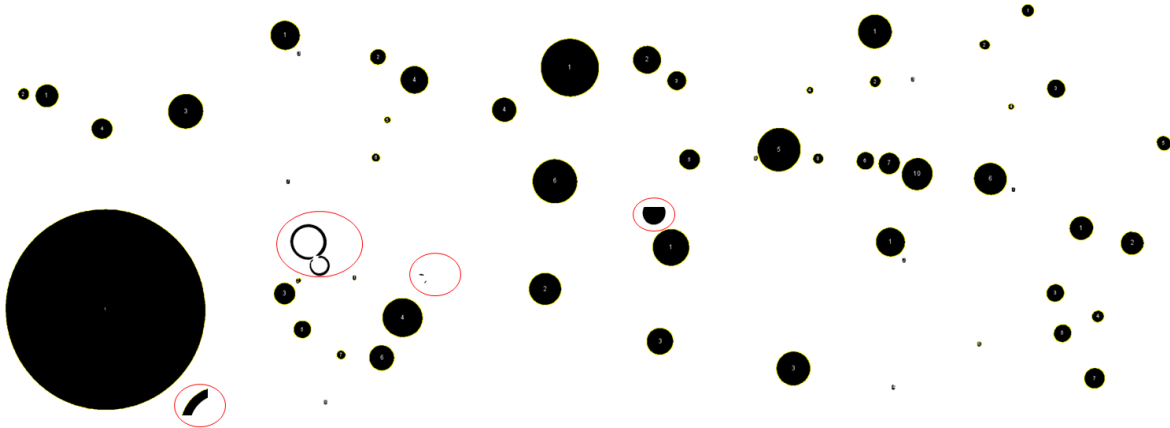
Şekil 3.1. Eğitimde kullanılan mikrogramlar.

Mikrografların segmentasyonu eğitilmiş Weka sınıflandırıcısı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Öncelikle Trainable Weka Segmentation eklentisi çalıştırılmıştır. Önceden eğitilmiş sınıflandırıcı “Load Classifier” komutu ile yüklenmiştir. Yüklenen eğitim bu mikrograflara uygulanmıştır ve sınıflandırılmış görüntüler tek bir yığın haline getirilmiştir. Bu katmanlı görüntü 8 bite ve ardından ikili (binary) formata dönüştürülmüştür. İçi boş olan damlacıklar “Fillholes” komutu ile doldurulmuş, ardından damlacık dışı piksellerden arındırmak için “open” komutu uygulanmıştır. Sonra görüntülerin parçacık boyutu analizi gerçekleştirilmiştir. Birleşmiş ya da yarım damlacık görüntülerinin hesaba katılmaması için 0,85 yuvarlaklık

değerinin üzerine hesaplama uygulanmıştır. Bu durum Şekil 3.3’de kırmızı ile işaretli bölgelerde görülebilir. Lensin kalibrasyonu için kalibrasyon slaytının (1 mm/100x0,1 mm) üzerine bir lamel yerleştirilmiş ve sonrasında bu lamelin üzerine immersiyon yağı damlatılmıştır. Kalibrasyon için skala 24.000 piksel/mm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Eğitim sonucu sınıflandırılmış görüntüler.



Şekil 3.3. Sınıflandırılmış görüntülere örnek bir partükül boyut analizi uygulaması.

Daha sonra hesaplanan alanlardan parçacık boyutu ölçümlerinde kullanılan ϕ değerleri ve hacimsel yüzdelere hesaplanmıştır. Bu amaçla $D(10)$, $D(50)$, $D(90)$, Span, $D[3,2]$ ve $D[4,3]$ değerleri hesaplanmıştır. $D(10)$ örnek hacminin %10'unun küçük olduğu damlacık boyutunu belirtirken, $D(50)$ %50'sinin küçük olduğu damlacık boyutunu belirtir, $D(90)$ %90'ının küçük olduğu damlacık boyutunu gösterir. $D[3,2]$ ve $D[4,3]$ değerleri sırasıyla alan ve hacim

ağırlıklı ortalama çapı temsil etmektedir (Jillavenkatesa, Dapkunas ve Lum, 2001; Salum ve diğerleri, 2022).

Span değeri ise dağılımın simetrisi hakkında bilgi verir. Span değeri 1’de dağılım monodisperstir. Span aşağıdaki denkleme göre hesaplanır (Denklem 3.1);

$$Span = \frac{D(10)-D(90)}{D(50)} \quad (3.1)$$

3.4.1.2. Damlacık boyut dağılımlarının lazer kırınımı yardımı ile belirlenmesi

Tez kapsamında üretilen su içinde yağ içinde su emülsiyonlarının ise damlacık boyutları lazer kırınımı tekniği ile çalışan Mastersizer 3000 (Malvern, Worcestershire, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Analiz sırasında yağ ve saf suyun kırılma indisi değerleri sırasıyla 1,472 ve 1,333 olacak şekilde ayarlanmıştır. Damlacık boyutu ölçülecek olan emülsiyondan birkaç damla (yaklaşık 50-100 µL), 500 mL saf suyun içerisine, lazer opaklık (obscuration) değeri %10-14 aralığında olana kadar ilave edilmiştir. Bu esnada örnek alma haznesinde 2.100 rpm’lik bir karıştırma hızı uygulanmıştır (Himmetagaoglu, Erbay ve Cam, 2018).

3.4.1.3. Toz partikül boyut dağılımlarının lazer kırınımı yardımı ile belirlenmesi

Çalışma kapsamında hazırlanan tozların ise partikül boyutu dağılımı toz besleme ünitesine (Aero M, Malvern Instruments Ltd.) bağlı lazer kırınımı partikül boyutu analiz cihazı (Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, İngiltere) gerçekleştirilmiştir. Ölçüm koşulları şu şekilde ayarlanmıştır: 1,54 kırılma indisi, 4 bar hava basıncı ve %100 besleme hızı (Langrish, Marquez ve Kota, 2006; Fournaise ve diğerleri, 2020).

3.4.2. Emülsiyonların akış özelliklerinin belirlenmesi

Emülsiyon örneklerinin akış özelliklerini belirlemek için viskozite analizinden yararlanılmıştır. Farklı bileşimlerde ve homojenizasyon sürelerinde hazırlanan emülsiyonların viskozitelerini belirlemek amacıyla viskozimetre cihazı (DV-II+ Pro, Brookfield Engineering, ABD) kullanılmış, örneklerin viskozite değerleri 45 °C’de ölçülmüştür. Örneklerin sıcaklıklarının ayarlaması için sirkülatörlü su banyosundan (ICC Basic Eco 8, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya) ve Small Sample Adaptor (Brookfield Engineering,

ABD) aksesuarından yararlanılmış, ölçümlerde mil (spindle) olarak SC4-18/22/25(Brookfield Engineering, ABD) kullanılmıştır.

Ölçülen emülsiyonların akış özelliklerini belirlemek için, farklı kayma hızlarında (γ , s^{-1}) yapılan ölçümlerle elde edilen kayma gerilimi (τ , Pa) değerleri “Power Law” tipi bir denkleme (Denklem 3.2) benzetilerek modellenmiş ve akış davranış indeksi (n) ile kıvam katsayısı (K , Pa.sn) değerleri saptanmıştır (Balcaen, Steyls, Schoeppe, Nelis ve Van der Meeren, 2021).

$$\tau = K \times \gamma^n \quad (3.2)$$

3.4.3. Elektriksel iletkenlik /pH değerlerinin belirlenmesi

Emülsiyonların elektriksel iletkenlik ve pH değerleri elektriksel iletkenlik probuna sahip çoklu ölçüm cihazı/pH metre (MW 180Max, Milwaukee Instruments, ABD) yardımı ile gerçekleştirilmiştir (Salum ve diğerleri, 2023).

3.4.4. Emülsiyonların stabilite indekslerinin belirlenmesi

Emülsiyonların stabilite indeksleri Azarikia, Abbasi, Scanlon ve McClements (2017) kullandığı yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir (Azarikia, Abbasi, Scanlon ve McClements, 2017). 7 mL emülsiyon dibi küt 15 mL’lik bir tüpe aktarılmış 30 gün oda sıcaklığında depolanmıştır. Emülsiyonlar 0. ve 30.günde fotoğraflanmıştır. Fotoğraflar olası iç ayrılmaları görebilmek için arkadan 5 V led ışık verilerek cep telefonu kamerası ile çekilmiştir. 30.günde ayrılan yağ ve hidrolizat yükseklikleri ve toplam emülsiyon yüksekliği ImageJ/Fiji (ver.1.53c.) programı yardımı ile ölçülmüştür.

$$\text{Stabilite indeksi (\%)}: \frac{h_t - (h_y + h_h)}{h_t} * 100 \quad (3.3)$$

Burada (3.3) h_t toplam yükseklik, h_y sızan yağın yüksekliği, h_h serum fazı yüksekliğidir.

3.4.5. Emülsiyonların bulanıklık (türbidite) değerlerinin belirlenmesi

Emülsiyonların bulanıklığı, taşınabilir bir türbidimetre (MI 415, Milwaukee Instruments, ABD) yardımı ile belirlenmiştir. Bu amaçla 100 µL emülsiyon 15 mL saf su ile seyreltilmiştir. Karışım çalkalanarak homojen hale getirilmiş ve hızlı bir şekilde analiz edilmiştir. Analiz öncesinde cihazın kalibrasyonu, üretici tarafından sağlanan 10 ve 500 Formazin Nefelometrik Birim (FNU) standartları ile yapılmıştır. Tez kapsamındaki çalışmalardan sadece Bölüm 4.1'dekiler için bulanıklık türbidimetrenin yanı sıra ayrıca UV-Spektrofotometre (Agilent Carry 60, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) ile de ölçülmüştür. Bulanıklığın spektrofotometrik tayini için ise 450 ve 800 nm dalga boylarında ölçümler alınmıştır (Salum ve diğerleri, 2022).

3.4.6. Emülsiyonların ve rekonstitüye tozların morfolojisinin incelenmesi

Çalışma kapsamında üretilen emülsiyonların mikrografları, bir ışık mikroskobuna (SOIF, BK5000, Çin) bağlı 5 Megapiksel CMOS kamera (M-shot MD50, Çin) ile elde edilmiştir. Bu kapsamda öncelikle, lam üzerine 50 µL distile su damlatılmış ve sonrasında bu damlanın üzerine şırınga iğnesi yardımıyla 5 µL emülsiyon eklenmiştir. Çalışma kapsamında üretilen tozlar 1:19 oranında distile su ile rekonstitüye edilmiştir ve daha sonra lamda damlatılmıştır. Sonrasında örneğin üzeri bir lamel ile dikkatlice kapatılmıştır. 100x/1,25 oil, 160/0,17 ya da 100x 1,25 Oil ∞/0,17 sonsuza dönüşlü IOS plan akromat objektif objektifin kullanıldığı noktalarda lamelin üzerine immersiyon yağı damlatılmıştır. Görüntüler Tagged Image File Format Biçimi (TIFF) ile bilgisayara kaydedilmiştir. Elde edilen mikrograflar ImageJ/Fiji (ver.1.53c.) programı yardımı ile işlenmiştir.

Buna ek olarak emülsiyonlar tabanı düz cam tüplere aktarılmış, bu cam tüplerde aralıklar fotoğraflanmıştır. Fotoğraf çekimi işlemi, iç yüzeyi siyah bez ile kaplanmış, dışarıdan ışık girişi engellenmiş bir kutu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kontrast oluşturmak için, test tüplerinin arkasına 7 W'lık led ışık (gün ışığı) yerleştirilmiştir.

3.4.7. Emülsiyonların iç fazının tutulma etkinliğinin belirlenmesi

Çalışmada üretilen $W_1/O/W_2$ emülsiyonunun merkezindeki en iç fazda (W_1) kazein hidrolizati bulunmaktadır. Bu faz emülsiyon yağ fazının (O) içerisindedir ve en dışta bir su fazı

bulunmaktadır (W₂). Çift katlı emülsiyon üretilmesinde amaç, içteki kazein hidrolizatı fazının yağ tarafından sarılmış halde muhafazasının sağlanırken, dıştaki su fazının içerisinde kararlı şekilde emülsifiye edilmesidir. Ancak, çift katlı emülsiyonlarda kararlılık önemli bir sorunken, iç fazın (W₁) emülsifikasyon sırasında dış faza (W₂) salınması da çok önemli bir sorundur. Yukarıdaki bölümlerde de ifade edildiği üzere, içteki kazein hidrolizatı fazı ise, dıştaki emülgatör çözündürülmüş distile su fazı arasında belirgin bir elektriksel iletkenlik farkı olduğu görülmüş ve emülsiyona uygulanan mekanik etkinin artışı ile damlacık boyutunun küçüldüğü ancak elektriksel iletkenliğin arttığı fark edilmiştir. Bu durumdan hareketle, iç fazın salım oranının veya hedef ile ilişkilendirerek iç fazın tutulma etkinliğinin elektriksel iletkenlik ölçümleriyle saptanabileceği düşünülmüştür. Benzer eğilimlere literatürde de rastlanmıştır (Kim, Kang, Suh ve Oh, 2003; Paula, de Oliveira, de Carvalho Teixeira, Soares ve Ramos, 2018). Bu doğrultuda, formülasyonda bulunan tüm iç fazın dış faza ilave edilerek elektriksel iletkenlik ölçümleri yapılmış ve tüm iç fazın salınması durumu bu değerlerle ifade edilmiştir.

Şekil Ek A17.verilen ölçümlerde belirlenen elektriksel iletkenlik değerleri maksimum salım değeri olarak kabul edilerek, hazırlanan çift katlı emülsiyonların elektriksel iletkenlik değerleri ölçülmüş ve bu değerlerin kullanılmasıyla “iç fazın tutulma etkinliği” değeri yüzde olarak belirlenmiştir (Denklem 3.4). Bu parametre çift katlı emülsiyon eldesinde önemli bir ölçüt olarak kullanılmıştır.

$$\text{İç Faz Tutulma Etkinliği (\%)} = \frac{(E_{i_{max,salim}} - E_{i_{emulsiyon}})}{E_{i_{max,salim}}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.4.8. Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Emülsiyon ve toz örneklerde mikroenkapsülasyon verimi, Ying ve diğerleri (2021) kullandıkları yöntem modifiye edilerek hesaplanmıştır. Bu kapsamda her bir örnekten iki paralel olacak şekilde 5'er g emülsiyon ve 1'er g toz 15 mL'lik falkon tüplerine tartılmıştır. Emülsiyon örnekleri 1:1 (w/w), toz örnekler ise 1:19 (w/w) oranında saf su ile seyreltilmiştir. Daha sonra örnekler 4 °C 9.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası aradaki serum fazı bir şırınga yardımı ile bir başka falkon tüpüne aktarılmış ve 4 °C'de, 5.000 rpm'de 30 dakikalık bir ek santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası serum fazı 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilip yağısızlaştırılmıştır. Maksimum salınabilecek hidrolizat miktarının

belirlenmesi için ise emülsiyon üretiminde kullanılan bileşenler, homojenizasyon işlemine sokulmadan bir araya getirilmiş ve sonrasında yukarıda sayılan tüm işlem basamaklarına tabi tutulmuştur.

Mikroenkapsülasyon veriminin belirlenmesi için ise elde edilen süzüntülerdeki toplam peptit miktarı (TPM), OPA türevlendirmesini takiben spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Church, Swaisgood, Porter ve Catignani, 1983). Buna göre aşağıda ayrıntıları verildiği şekilde her bir örneğin tripton eşdeğeri olarak TPM değeri hesaplanmıştır. Elde edilen TPM değerleri ile aşağıdaki denkleme göre örneklerin mikroenkapsülasyon verimi değerleri hesaplanmıştır:

$$MV = \frac{(TPM_m - TPM_\delta)}{TPM_m} \times 100 \quad (3.5)$$

TPM_m değeri maksimum salınabilecek toplam peptit miktarını, TPM_δ değeri ise örnekte saptanan toplam peptit miktarını göstermektedir (Denklem 3.5).

3.4.9. Tozların nem miktarının belirlenmesi

Üretilen toz örneklerin nem içeriği gravimetrik yöntem ile belirlenmiştir (AOAC, 2012). Bu amaçla, 0,5 g toz örnek, darası alınmış metal petri kapları, desikatör ve etüv (Nüve FN055, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır.

3.4.10. Tozların yüzey yağ miktarlarının belirlenmesi

Toz partiküllerinin yüzeyinde bulunan ve serbest formdaki yağın miktarı, gerçekleştirilen enkapsülasyon işleminin etkinliğine dair fikir vermektedir. Bu amaçla, toz yüzeyinde bulunan yağ miktarı analiz edilmeye çalışılmış ve Kim, Chen ve Pearce (2005)'de açıklanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (Kim, Chen ve Pearce, 2005). Analiz için kaba filtre kağıdı ile filtrasyon düzenekleri hazırlanmış ve 1 g toz tartılarak, filtre kağıdının içerisine yerleştirilmiştir. Sonrasında toz örnek 4 kez, 5'er mL petrol eteri ile yıkanmış ve filtrat darası bilinen metal petrilere toplanmıştır. Daha sonra ise filtratların kuru madde içerikleri gravimetrik olarak belirlenmiştir. Hesaplanan değer yüzey yağ yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.4.11. Tozların su aktivitesinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında üretilen tozların su aktivitesi değerleri, su aktivitesi ölçüm probu (AquaLab, Series 3 TE, DecagonDevices, Pullman, WA, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

3.4.12. Kuruma veriminin hesaplanması

Toplama haznesinden toplanan tozun kuru madde içeriğinin hazırlanan emülsiyonun kuru madde içeriğine bölünmesi ile kurutma verimi hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir (Salum ve ark 2020).

3.4.13. Tozların *in vitro* sindirimi

Toz örneklerin *in vitro* sindirim uygulaması INFOGEST tarafından tanımlanan yöntemle yapılmıştır (Brodkorb ve diğerleri, 2019). Buna göre mikroenkapsüle edilmiş toz örnekler tükürük sıvısı ortamında hızla çözündürülüp analize alınmıştır. Sıvı örnekleri analizinde yöntemde belirtildiği üzere ağız ortamı sadece bir çözücü olarak kullanılmış, 1 g toz örnek 1 mL simüle tükürük sıvısı (K^+ : 18,8 mmol/L, Na^+ : 13,6 mmol/L, Cl^- : 19,5 mmol/L, $H_2PO_4^-$: 3,7 mmol/L, HCO_3^- ve CO_3^{2-} : 13,7 mmol/L, Mg^{2+} : 0,15 mmol/L, NH_4^+ : 0,12 mmol/L, Ca^{2+} : 1,5 mmol/L) içerisinde 2 dakika boyunca pH 7,0'de 37 °C'de karıştırılmıştır. Ağız fazı kabul edilen bu koşul sonrası mide fazı sindirimine geçilmiştir. Burada da ağız fazı sindiriminden çıkan örneklerin üzerine 1:1 oranında simüle mide sıvısı (K^+ : 7,8 mmol/L, Na^+ : 72,2 mmol/L, Cl^- : 70,2 mmol/L, $H_2PO_4^-$: 0,9 mmol/L, HCO_3^- ve CO_3^{2-} : 25,5 mmol/L, Mg^{2+} : 0,1 mmol/L, NH_4^+ : 1,0 mmol/L, Ca^{2+} : 0,15 mmol/L) ve pepsin (2.000 U/mL) karışımı ilave edilmiştir. Karışım 2 saat boyunca pH 3,0'de çalkalamalı inkübatörde sindirime uğratılmıştır. Ardından ince bağırsak fazı bölümüne geçilmiş ve mide aşamasından çıkan örneklerin üzerine 1:1 oranında simüle ince bağırsak sıvısı (K^+ : 7,6 mmol/L, Na^+ : 123,4 mmol/L, Cl^- : 55,5 mmol/L, $H_2PO_4^-$: 0,8 mmol/L, HCO_3^- ve CO_3^{2-} : 85 mmol/L, Mg^{2+} : 0,33 mmol/L, Ca^{2+} : 0,6 mmol/L) ve enzim ekstraktı (100 U/mL pankreatin ve 10 mmol/L safra) karışımı ilave edilmiş, bu karışım çalkalamalı inkübatörde 2 saat boyunca pH 7,0'de sindirime uğratılmıştır. İşlem sonrasında ortama 1 mmol/L AEBSF proteaz inhibitörü ilave edilerek enzimatik reaksiyonlar sonlandırılmıştır. pH ayarlamalarında NaOH ve HCl çözeltileri kullanılmıştır. Sindirilmiş ve enzimatik reaksiyonları durdurulmuş örnekler porsiyonlanarak hızla dondurulmuş ve biyoaktivite analizleri gerçekleştirilinceye kadar -18 °C'de tutulmuştur. Biyoaktivite analizleri

öncesinde bu dondurulmuş örnekler çözündürülmüş, spektrofotometrik analizlere uygun hale getirmek için santrifüj edilmiş ve analizlerde kullanılmıştır.

Çalışmanın amacı, yüksek biyoaktiviteye sahip kazein hidrolizatlarının çift katlı emülsiyonlar içerisinde tutulup, püskürtmeli kurutma ile enkapsüle edilmesine dayanmaktadır. Bu anlamda, tozların üretim amacı içerisinde bulunan kazein hidrolizatının biyoaktif özelliklerini korumaktır. Daha spesifik hedef ise, kazein hidrolizatlarının biyoaktivitesini sindirim sürecinde korumaktır. Bu amaçla, üretilen tozların biyoaktif özellikleri *in vitro* sindirim sürecinden geçirildikten sonra incelenmiştir.

3.4.13.1. Toplam peptit miktarının hesaplanması

TPM, OPA türevlendirmesini takiben spektrofotometrik yöntemle göre belirlenmiştir (Church ve diğerleri, 1983) . Buna göre, 50 mL'lik balonjojeye 25 mL 100 mM sodyum tetraborat çözeltisi ve 2,5 mL %20'lik sodyum dodesil sülfat çözeltisi eklenmiştir. Üzerine 1 mL metanolde çözündürülmüş 40 mg OPA ve 100 µL β-merkaptoetanol ilave edilmiştir. Balonjoje içeriği saf su ile tamamlanmıştır. Analiz edilecek örnekten 50 µL spektrofotometre küvetine alınmış ve üzerine 1 mL OPA çözeltisi konulup, oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Örnek absorbansı 340 nm'de ölçülmüştür. Kör çözeltisi örnek yerine saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Tez çalışmasında, sonuçlar tripton eşdeğeri TPM olarak ifade edilmiştir. Ölçümler görünür ve UV bölgede ölçüm yapabilen bir spektrofotometre (Agilent, Carry 60) ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.13.2. Serbest radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesi

Örneklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için serbest radikal giderme aktivitesi analiz edilmiştir. Örneklerin serbest radikal giderme aktivitelerinin ölçümleri troloks eşleniği antioksidan kapasite yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde örneklerin ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit)) radikallerini nötralize etme yetenekleri ölçülmüştür (Re ve diğerleri, 1999). ABTS serbest radikallerinin bağlanma aktivitelerinin ölçülmesi 0,1 mL örnek çözeltisi ile 1,9 mL 7 mmol/L ABTS radikal çözeltisinin (2,5 mmol/L potasyum persülfat içerisinde hazırlanmış) verdiği reaksiyonun 6 dakika boyunca kinetik

olarak 734 nm'deki absorbans değeri meydana gelen değişimin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Sonuçlar trolox eşdeği olarak ifade edilmiştir.

3.4.13.3. Anjiyotensin dönüştürücü Enzim İnhibisyonunun belirlenmesi

Örneklerin antihipertansif aktivitelerinin belirlenmesi için, anjiyotensin dönüştürücü enzimi (angiotensin converting enzyme, ACE) inhibe etme özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla, Shalaby, Zakora ve Otte (2006)'de açıklanan yöntem ile analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 40 µL örnek çözeltisi Eppendorf tüplerine alınmış ve üzerine 0,01 M tuzlu fosfat tamponu (pH: 7,0, NaCl konsantrasyonu: 0,5 M) içerisinde hazırlanmış olan 20 µL 0,1 ünite/mL ACE ilave edilmiştir. Karışım 15 dakika 37 °C'de inkübe edilmiş ve ardından tuzlu fosfat tamponunda hazırlanmış 740 µL 0,75 mM substrat çözeltisi (FAPGG, N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Phe-Gly-Gly) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. ACE enziminin substratı olan FAPGG'nin parçalanma düzeyi, FAPGG'nin yüksek absorbans gösterdiği 340 nm'de ölçülerek belirlenmiştir. Bu amaçla, ilk olarak FAPGG absorbansı ölçülmüş burada enzim ve örnek yerine tampon çözelti kullanılmıştır. Sonrasında FAPGG'nin enzimle reaksiyona sokulduktan sonra absorbansı ölçülmüştür, burada örnek yerine tampon çözelti kullanılmıştır. Daha sonrasında örneklerle beraber enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bu aktivitedeki azalma oranına bağlı olarak ACE inhibisyonu belirlenmiştir. Sonuçlar Kaptopril eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır.

3.4.13.4. α-Amilaz inhibisyonunun belirlenmesi

Çalışmada α-amilaz enziminin inhibisyonu Kim, Wang ve Rhee (2004)'de açıklanan yöntemle gerçekleştirilmiştir. Yöntemde, α-amilaz enzimi içeren ağız benzeri bir ortam hazırlanmış ve bu ortama substrat olarak nişasta ilave edilerek nişasta parçalanma ürünlerinin miktarı belirlenmeye çalışılmıştır (Çam ve İçyer, 2015). Nişasta parçalanma ürünleri kapsamında belirlenen ise indirgen şekerlerdir. Bunun için indirgen şekerlerin ölçülmesinde yaygın kullanılan bir yöntem olan 3,5-Dinitrosalicylic asit (DNS) kolorimetrik yöntemi kullanılır. Yöntem, alkali koşullar ve ısı uygulaması ile şekerlerin fonksiyonel gruplarının (serbest halde bulunan karbonil gruplarının) oksidasyonu ve DNS'in indirgenerek 3-amino-5-nitrosalicylic aside dönüşümüne dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan 3-amino-5-nitrosalicylic asit 540 nm'de ışığı absorbe eder ve absorpsiyonun belirlenmesi ile ortamda oluşan indirgen

şeker miktarı arasında ilişki kurulur. Özetle, α -amilaz etkinliği ile nişasta parçalanır, indirgen şekerler açığa çıkar ve indirgen şekerlerle DNS arasındaki reaksiyon sonucu 540 nm’de absorpsiyon veren bileşikler oluşur. Bu bileşiklerin oluşumu azalır, enzim aktivitesinin inhibe edildiği sonucuna varılır. Bu kapsamda, 10 unite/mL’lik α -amilaz enziminden 100 μ L bir Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 100 μ L örnek ilave edilmiştir. Bu karışım 5 dakika 37 °C’de ön inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın üzerine 250 μ L %1’lik nişasta çözeltisinden ilave edilmiş ve enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 5 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, karışımın üzerine 200 μ L DNS çözeltisi ilave edilmiş ve karışım 95 °C’de 10 dakika bekletilip, ardından karışıma 1 mL saf su ilave edilip oda sıcaklığına hızla gelmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen çözeltide oluşan renk, spektrofotometrik olarak 540 nm’de ölçülmüştür. Örnek içermeyen (yani enzim ve substrat içeren) koşullarda yapılan ölçümlerle enzim aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca, örnek ve substrat içermeyen şekilde (sadece enzim içeren) çözeltiler hazırlanıp, ölçüm yapılarak kaydedilmiştir (enzim körü). Burada hacimler tampon çözelti ile eşitlenmiştir. Enzim aktivitesindeki azalma hesaplanmış, sonuçlar akarboz eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir.

3.4.13.5. α -Glukozidaz inhibisyonunun belirlenmesi

Örneklerin α -glukosidaz enzimini inhibe etme yeteneği Kim ve diğrleri (2004)’de belirtilen yöntemle ölçülmüştür. Yöntem, α -glukosidaz enziminin 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside bileşiğinin parçalanmasını sağlaması ve bu parçalanma reaksiyonu sonucu oluşan *p*-nitrophenol bileşiğinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Oluşan *p*-nitrophenol bileşiği 400 nm’de absorbans vermektedir ve bu bileşiğin konsantrasyonu ile enzim aktivitesi arasında ilişki tanımlanmaktadır. Bu bileşiğin oluşumu azalır, enzim aktivitesinin inhibe edildiği sonucuna varılır. Bu amaçla, tuzsuz fosfat tamponunda hazırlanmış olan α -glukosidaz enziminden (0,1 ünite/mL) 50 μ L bir Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 50 μ L örnek ilave edilmiştir. Bu karışım 10 dakika 37 °C’de ön inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın üzerine 50 μ L 10 mM’lık substrat çözeltisinden (pNPG) ilave edilmiş, enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 60 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, karışımın üzerine 1 mL 0,1 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiş ve enzimatik reaksiyon durdurulmuştur. Çözeltide oluşan renk spektrofotometrik olarak 400 nm’de ölçülmüştür. Örnek içermeyen (yani enzim ve substrat içeren) koşullarda yapılan ölçümlerle enzim

aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca, örnek ve substrat içermeyen şekilde (sadece enzim içeren) çözeltiler hazırlanıp, ölçüm yapılarak kaydedilmiştir (enzim körü). Burada hacimler tampon çözelti ile eşitlenmiştir. Enzim aktivitesindeki azalma hesaplanmış, sonuçlar akarboz eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir.

3.4.14. İstatistiksel değerlendirme

3.4.14.1. Örnekler arasındaki korelasyonun belirlenmesi

Mikroskobik ölçümler, lazer kırınımı parçacık boyutu ölçümleri ve diğer emülsiyon kararlılık testlerinin sonuçları arasındaki doğrusal ilişkiler, iki değişkenli korelasyon ile incelenmiştir. Bu amaçla SPSS istatistik paket programı (SPSS ver. 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmış ve Pearson korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Ayrıca, Bölüm 4.2’de örneklerin damlacık boyut analiz sonuçları ve kıvam sabiti değerleri Temel Bileşenler Analizi PCA (Principal Component Analysis) ile yorumlanmıştır. Bu anlamda, XLSTAT (Addinsoft, NewYork, NY, ABD) kullanılarak PCA analizi gerçekleştirilmiştir. Analizde, sonuç üzerindeki yüksek varyanslı değişkenlerin etkisinden kaçınmak için paket programının sunduğu verileri otomatik olarak standartlaştıran veya normalleştiren Pearson tipi PCA kullanılmıştır.

3.4.14.2. İdeal Sonuç Odaklı Çok Ölçütlü Karar Verme (TOPSIS)

İdeal Sonuç Odaklı Çok Ölçütlü Karar Verme (Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution, TOPSIS) yöntemin avantajı kompleks algoritmalar ve karmaşık matematiksel modeller içermemesi ve uygulanmasındaki kolaylıklardır. Yöntemin özünde, en ideal (pozitif ideal) ve idealden en uzak değerlerin (negatif ideal) deneysel verilerden elde edilmiş sonuçlar matrisinden hareketle tanımlanması ve analiz edilen örneklerin bu pozitif ve negatif ideal noktalarına olan geometrik uzaklıklarının oranlarının değerlendirilmesi bulunmaktadır(Himmetagaoglu ve diğerleri, 2018). TOPSIS yönteminin uygulanması ile tüm örnekler için bir “görelî yakınlık” değeri elde edilmektedir. Bu değer, 0 ile 1 arasında bir değerdir ve 1’e yakın olması tercih edilmektedir.

3.4.14.3. Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon

Tez çalışması kapsamında farklı aşamalarda optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda yanıt yüzey yönteminden yararlanılmış ve deneme planı “Merkezi Karma Dönel Tasarım” (Central Composite Rotatable Design, CCRD) yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu optimizasyon çalışmalarında belirlenen işlem faktörleri ile yanıtlar arasındaki ilişki bilinmediğinden ikinci dereceden polinomiyal bir modelle en uygun yanıt fonksiyonuna ulaşılabacağı varsayılmıştır. Kullanılan deneme tasarımı Design Expert (Ver. 7.0.0) ile oluşturulmuştur.

Uygulanan deneme deseni doğrultusunda belirlenen yanıtlar ve bu doğrultuda elde edilmiş olan deneysel veri, çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş ve her bir yanıt için işlem değişkenlerine bağlı ikinci dereceden denklemler oluşturulmuştur. Oluşturulan modellerin deneysel verilerle uyumu için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bu analiz ile her bir faktörün yanıtlar üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, önemsiz faktör ve terimler modelden çıkarılmış ve son modelin uygunluğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (Mayers, Montgomery ve Anderson Cook, 2009). Model uyumluluğu sağlandıktan sonra, istatistiksel hesaplamalarla ANOVA’da kullanılan kabullerin doğrulaması gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyonda, modellenen yanıtlarla ilgili belirlenen hedefler doğrultusunda, her bir yanıt için belirlenen modellerin eş zamanlı çözümüne dayanan “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” yöntemi kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşulun deneysel doğrulaması, belirlenen koşulda yapılacak üretim ve analizlerle yapılmıştır.

3.4.14.4. Örneklerin kıyaslanması

Çalışmanın çeşitli aşamalarında, üretimlerden veya formülasyonlardan kaynaklı olan değişimlerin, ürün özellikleri üzerindeki etkilerinin anlamlı farklılıklar yaratıp yaratmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla, uygulanan işlemin veya formülasyonun, ürün özellikleri üzerinde değişiminin önemliliği, tek değişkenli varyans analizi ile yapılmış, belirlenen önemlilik derecelerine göre örneklerin gruplandırılmasında ise Duncan testinden yararlanılmıştır. Örneklerin kontrol örnekleri ile kıyaslanmasında ise *t*-testinden (iki kuyruklu) yararlanılmıştır. Bu analizler SPSS 22 paket programı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ile biyoaktif gıda katkı maddesi olarak mikroenkapsüle kazein hidrolizatı üretimi altı aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalarda elde edilen bulgular ve tartışmalar tek tek alt başlıklarda sunulmuştur.

Bu kapsamda, ilk aşama olarak kazein yüklü çift katlı emülsiyonlarda kullanılmak üzere uygun birincil emülsiyon formülasyonu belirlenmiş (bkz: Bölüm 4.2), daha sonra birincil emülsiyonun üretimi aşamasındaki homojenizasyon adımı optimize edilmiştir (bkz: Bölüm 4.3). Daha sonra, Bölüm 4.2'ye benzer şekilde, çift katlı emülsiyonların formülasyonları kararlaştırılmış (bkz: Bölüm 4.4) ve ikinci homojenizasyon adımı optimize edilmiştir (bkz: Bölüm 4.5). Sonrasında ise üretilen çift katlı emülsiyonların kurutulması için uygun duvar materyali kombinasyonuna karar verilmiş (bkz: Bölüm 4.6) ve karar verilen kombinasyon için formülasyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (bkz: Bölüm 4.7). Tüm bunların ek olarak ve çalışmanın en başında, tez kapsamında incelenen birincil emülsiyonların damlacık boyutlarının belirlenebilmesi için bir analiz prosedürü oluşturulmuştur (bkz: Bölüm 4.1).

4.1. Mikroskop destekli dijital görüntü analizi ile damlacık boyut dağılımının belirlenmesi: Damlacık boyut dağılımlarının belirlenmesi için protokol oluşturulması ve bu protokolün etkinliğinin saptanması

Günümüze dek, emülsiyonların damlacık boyut dağılımı hakkında bilgi elde etmek için çeşitli analitik teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklere ışık saçılması, elektriksel iletkenlik, akustik/elektroakustik, yakın kızılötesi spektroskopisi, nükleer manyetik rezonans ve çeşitli mikroskobik ölçümlere (optik mikroskop, geçirimli elektron mikroskobu ve taramalı elektron mikroskopu) dayanan ölçüm yöntemleri sayılabilir. Günümüzde ticari olarak çeşitli parçacık boyut analiz cihazları mevcuttur ve bu cihazlar ışığın saçılması, parçacıkların bir alandaki hızı, ses dalgalarının saçılması veya Emilimi gibi fiziksel prensiplere dayalı olarak parçacık boyut dağılımını belirlemektedirler (McClements, 1996; McClements, 2007). Genel olarak, bu cihazlar otomatik, hızlı ve güvenilir sistemler olsalar da çok yüksek kurulum maliyetlerine sahiptirler. Öte yandan, mikroskop ile gerçekleştirilen ölçümler, damlacıkların boyutlarının doğrudan ölçümüne dayandığından diğer ölçüm tekniklerinden ayrılır (Moradi, Alvarado ve

Huzurbazar, 2011). Mikroskopik yöntemler arasında, ışık mikroskopunun boyut ölçümlerinde kullanımı, bu cihazın çoğu laboratuvarında mevcut olan, ucuz ve kullanımı kolay bir cihaz olması nedenleriyle özel olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, mikroskop ile damlacık boyutunun belirlenmesi genellikle zaman alıcı ve zahmetli bir işlemdir (Fieber, Hafner ve Normand, 2011; Hu, Ting, Hu ve Hsieh, 2017; McClements, 1996; Moradi ve diğerleri, 2011; Tyuftin ve diğerleri, 2021). Bu yöntemleri zaman alıcı ve zahmetli kılan yan, tanecik boyut dağılımının ortaya konulması için, bütünü temsil edecek düzeylerde büyük sayılarda görüntünün incelenmesinin gerekmesi ve mikroskopta bunların tek tek hesaplanmasının güçlüğüdür. Mikroskopik analiz tekniklerinin bu dezavantajı, emülsiyon örneklerindeki damlacık boyut dağılımının analizinde anlamlı sonuçlar elde etmek için binlerce damlacığı gözlemlemenin ve boyutlarını ölçmenin gerekliliği düşünüldüğünde özellikle belirginleşir. Bununla beraber, mikroskoplar bir kamera ile birleştirilebilir ve bu şekilde görüntüler kaydedilebilir ve dijitalleştirilebilir. Bu dijitalleştirilmiş verilerin, görüntü işleme teknikleri yardımıyla işlenmesi analiz için gereken zamanı ve iş yükünü azaltmayı mümkün kılabilir (Jokela, Fletcher, Aveyard ve Lu, 1990).

Mikroskop yardımıyla dijital görüntü analizi dört temel adımdan oluşur: (i) görüntü elde etme, (ii) görüntünün restorasyonu, (iii) segmentasyon ve filtreleme, (iv) ölçüm (Merkus, 2009). İlk olarak, uygun görüntü mikroskoptan bilgisayara görüntü vericisi ve bir Yük bağlaşımlı cihaz veya Tamamlayıcı Metal-Oksit-Yarı İletken kamera aracılığıyla aktarılır. Bu adımda, damlacıkların üst üste binen yapılara sahip olmaması, analizde uygulanan adımların herhangi bir bozulmaya neden olmaması ve uygun odaklanma çok önemlidir (Moradi ve diğerleri, 2011). Görüntü alımından sonra, görüntüleme kusurları, gürültü veya bozulmalar azaltılabilir ve görüntülerin parlaklığı ve kontrastı ayarlanabilir. Daha sonra segmentasyon ve filtreleme işlemleri gerçekleştirilir (Merkus, 2009). Segmentasyon tamamlandıktan ve görüntüler ikili forma dönüştürüldükten sonra parçacık boyutu analizi yapılır.

Literatürde, mikroskop ve görüntü işleme teknikleri, emülsiyonların damlacık boyutu dağılımını belirlemek için bir arada kullanılmıştır (Alade, Mahmoud, Al Shehri ve Sultan, 2021; Jokela ve diğerleri, 1990; Maaref ve Ayatollahi, 2018; Moradi ve diğerleri, 2011; Tripathi, Bhattacharya, Singh ve Tabor, 2017). Fakat, anlamlı bir istatistiksel analiz yapmak

için sistemi temsil eden yeterli sayıda damlacık gereklidir. Moradi ve diğerleri (2011), dağılımın yakınsamasını garanti eden güvenilir sonuçların 2.000 veya daha fazla damlacık ile üretildiğini bildirmiştir. Ayrıca, numuneyi yansıtan tekrarlanabilir, objektif ve doğru sonuçların elde edilmesi için otomatik veya yarı otomatik bir protokol oluşturulması gerekir. Diğer bir zorluk, özel olarak emülsiyonlarda damlacık boyutu ölçümünde karşılaşılan bir zorluktur ve bunun temelinde, emülsiyon görüntülerinde bileşenler ve fazlar arasındaki kontrastın zayıf olması yatar. Hu ve diğerleri (2017), bu durumun, emülsiyonların iki ana bileşeni olan su ve yağın yakın kırılma indekslerinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu, görüntü analizi sırasında damlacıkların arka plandan ayırt edilmesinde yani segmentasyonda zorluklara neden olabilmektedir (Hu ve diğerleri, 2017). Boyaların kullanımı ile su ve yağ fazlarının görsel olarak ayrılması mümkün olsa da, bu boyaların arayüzey aktivitesi gösterebilmeleri ve emülsiyon karakteri üzerinde etkili bazı fiziksel özellikleri (pH, elektrik iletkenliği, yoğunluk vb.) değiştirmeleri gibi dezavantajları, bu boyaların kullanımını sınırlamaktadır (McClements, 2007, 2016).

Çoğu geleneksel segmentasyon yöntemi, piksellerin yoğunluğuna ve uzamsal ilişkilerine veya piksel tabanlı, kenar tabanlı, doku tabanlı veya bölge tabanlı yöntemler gibi kısıtlı kalıplara dayanır. Bu yöntemlerin en büyük dezavantajı, her bir işlemede elde edilen verilerin veri setine uygunluğunun, ancak eşiğin uygun şekilde belirlenmesiyle sağlanabiliyor olmasıdır. Sonuç olarak, bu tekniklerin uygulanması her durum için uygun değildir. Bununla birlikte, makine öğrenimi teknikleri, belirli bir eğitim görüntüsü setine optimizasyon teknikleri uygulayarak parametrelerin manuel kalibrasyonuna dayalı olarak sorunun üstesinden gelebilmektedir (Wang ve diğerleri, 2021). Bu nedenle son yıllarda daha dinamik ve doğru sonuçların elde edilmesini sağlayan eğitilebilir makine öğrenmesi yöntemlerinin kullanımı ön plana çıkmıştır (Arganda-Carreras ve diğerleri, 2017; Lormand ve diğerleri, 2018).

Eğitilebilir Weka Segmentasyonu (TWS), ImageJ tabanlı açık kaynaklı bir görüntü işleme paketi olan Fiji'nin eklentilerinden biridir (Arganda-Carreras ve diğerleri, 2017; Schindelin ve diğerleri, 2009). Bu eklentide veri madenciliği görevleri için Yeni Zelanda'daki Waikato Üniversitesi'nde geliştirilen "Bilgi Analizi için Waikato Ortamı (Weka)" kullanılmaktadır (Arganda-Carreras ve diğerleri, 2017; Hall ve diğerleri, 2009). Görüntü bölütleme ve makine

öğrenimi algoritmalarının bir kombinasyonudur (Lormand ve diğerleri, 2018). Tezin bu bölümünde, segmentasyon adımı için TWS kullanılarak mikroskop destekli bir dijital görüntü analiz tekniği ile emülsiyon damlacık boyutlarının belirlenmesi için bir protokol geliştirmiştir. Bu amaçla farklı yağ/su fazı oranlarında ve homojenizasyon sürelerinde emülsiyonlar (O/W) hazırlanmış ve damlacık boyut dağılımı belirlenmiştir. Yöntemin doğrulanması için aynı emülsiyon numunelerinin damlacık boyut dağılımları lazer kırınım yöntemi ile ölçülmüş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Ayrıca emülsiyonların damlacık boyutu ile fiziksel özellikleri (bulanıklık ve viskozite) arasındaki ilişkiler de incelenmiştir.

Damlacık boyutu açısından pek çok parametre ölçülmekte ve analizde hedeflenen özelliklere göre kimi değerler daha ön planda değerlendirilmektedir. “D” değeri örnek hacminin belirli bir oranının küçük olduğu ortalama damlacık boyutunu ifade etmektedir. Örneğin; D(90) değeri örnek hacminin %90’ının küçük olduğu ortalama damlacık boyutunu ifade ederken D(10) değeri örnek hacminin %10’unun küçük olduğu ortalama damlacık boyutunu anlatır ve D(100) değeri en büyük damlacığın boyutunu gösterir. D[3,2] değeri yüzey alanı olarak ortalama damlacık boyutunu, D[4,3] değeri ise hacimce ortalama damlacık boyutunu belirtmektedir. Spesifik yüzey alanı, deneysel sonuçlardan hareketle teorik olarak hesaplanan toplam yüzey alanını gösterirken, Span değeri ise, damlacık boyut dağılımının niteliğine dair fikir elde etmek için üretilmiş ve D(10), D(50) ile D(90) değerleri ile hesaplanan bir parametredir. Bu anlamda Span değerinin 1’e yakın olması dağılımın normal dağılışa yakın olduğuna dair fikir verir (Jillavenkatesa ve diğerleri, 2001).

Çalışmada farklı formülasyon ve/veya homojenizasyon sürelerine sahip 10 adet emülsiyon hazırlanmıştır (Tablo 3.2.1). Bu emülsiyonların üretilmesinin hemen ardından lazer kırınım tekniği ile damlacık boyut dağılımı analizleri yapılmış ve eş zamanlı olarak emülsiyonların mikroskop görüntüleri alınmıştır. Mikroskop görüntüleri TWS yardımıyla işlenmiştir. Ayrıca aynı analizler bir günlük depolamanın ardından altı emülsiyon için tekrarlanmıştır. Emülsiyonlardaki damlacık boyutu dağılımının gerçekçi bir değerlendirmesi için, mümkün olan en fazla sayıda damlacık analiz edilmelidir. Bu çalışmada, her bir emülsiyon numunesi için 2.000’den fazla damlacık (3.836-7.850 arası damlacık) analiz edilmiştir. Damlacık boyut dağılımı için iki farklı yöntemle yapılan analizlerin sonuçları Tablo Ek A1’de gösterilmiştir.

Damlacık boyut analizlerine ek olarak eş zamanlı şekilde emülsiyonların viskozite ve bulanıklık değerleri de belirlenmiş ve bu sonuçlar Tablo Ek A2’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar arasındaki ilişkiyi belirlemek için ise Pearson korelasyon testi kullanılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, her iki damlacık boyutu dağılımı analizinin sonuçlarının benzer eğilimler gösterdiği yönündedir (Tablo 4.1). Sonuçlara göre mikroskopi destekli dijital görüntü analizi ile belirlenen damlacık boyutu verileri ile lazer kırınımı ile belirlenen damla boyutu analizi tüm parametrelerde pozitif korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). Özellikle, D[4,3], D[3,2] ve D(90) değerleri daha yüksek pozitif korelasyonlara sahiptir ($p<0,01$). Lazer kırınım tekniğinde D(90) değerinin D(10) ve D(50) gibi diğer partikül boyutu parametrelerine göre opaklık (obscuration) oranından daha az etkilendiği ve daha kararlı sonuçlar verdiği bilinmektedir. Literatürde, D[4,3]’ün bir emülsiyon sistemindeki büyük partiküllerin varlığına diğer parametrelere göre daha duyarlı olduğu bildirilmektedir ve D[4,3] ile D[3,2] arasındaki farklar genellikle şunu göstermektedir: geniş veya çok modlu bir parçacık boyut dağılımı. Bununla birlikte, mikroskop destekli dijital görüntü analizi ile hesaplanan nominal değerler, lazer kırınımı ile elde edilen değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Lazer kırınım parçacık boyutu analizörü ile alınan ölçümlerden elde edilen nominal değerler üzerinde ölçüm koşullarının (numune seyreltmesi, karıştırma hızı, ultrason uygulaması vb.) önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Seyreltme ve karıştırma işlemleri flokların bozulmasına ve daha küçük parçacık boyutu değerlerine neden olabilir (Kim, Decker ve McClements, 2004; Merkus, 2009). Ayrıca, mikroskopik ölçümlerden hesaplanan parametrelerin tümü, emülsiyon stabilitesi ve viskozite sonuçları ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur. Bu ilişkiler, lazer kırınım ölçümleri ile emülsiyon özellikleri arasındaki ilişkilerden bile daha güçlüdür (Tablo 4.1). Bulanıklık sonuçlarıyla (hem türbidimetre hem de spektrofotometre ile yapılan ölçümler) sonucunda küçük damlacık boyutuna sahip numunelerde bulanıklık değerleri yüksektir. Bu durum literatür ile uyumludur (Alade ve diğerleri, 2021).

Tablo 4.1. Mikroskop ölçümleri ile belirlenen damlacık boyut özellikleri ile lazer kırınımı tekniği ile belirlenen damlacık boyut özelliklerinin ve diğer emülsiyon özelliklerinin ilişkisi.

Özellik		İstatistiksel değerlendirme	Mikroskobik ölçüm					
			D(10)	D(90)	Span	D[3,2]	D[4,3]	
			(µm)	(µm)		(µm)	(µm)	
Lazer Kırınımı Partikül Boyut Analizi	D(10)	Pearson korelasyon katsayısı	0,580*	0,731**	-0,578*	-0,661*	0,778**	
	(µm)	Önemlilik (2-yönlü)	0,048	0,007	0,049	0,019	0,003	
	D(90)	Pearson korelasyon katsayısı	0,611*	0,715**	-0,644*	0,715**	0,867**	
	(µm)	Önemlilik (2-yönlü)	0,036	0,009	0,024	0,009	0,000	
	Span	Pearson korelasyon katsayısı	-0,531	-0,684*	0,641*	-0,655*	0,851**	
		Önemlilik (2-yönlü)	0,076	0,017	0,025	0,021	0,000	
	D[3,2]	Pearson korelasyon katsayısı	0,590*	0,715**	-0,593*	0,670*	0,795**	
	(µm)	Önemlilik (2-yönlü)	0,043	0,009	0,042	0,017	0,002	
	D[4,3]	Pearson korelasyon katsayısı	0,606*	0,731**	-0,628*	0,701*	0,846**	
	(µm)	Önemlilik (2-yönlü)	0,037	0,007	0,136	0,011	0,001	
	Diğer analizler	Bulanıklık	Pearson korelasyon katsayısı	0,409	0,607*	-0,444	0,480	0,626*
			Önemlilik (2-yönlü)	0,186	0,036	0,149	0,114	0,030
Spektrofotometrik ölçüm (450 nm)		Pearson korelasyon katsayısı	0,392	0,472	-0,418	0,440	0,549	
		Önemlilik (2-yönlü)	0,207	0,121	0,176	0,152	0,064	
Spektrofotometrik ölçüm (850 nm)		Pearson korelasyon katsayısı	0,450	0,575	-0,460	0,508	0,633*	
		Önemlilik (2-yönlü)	0,142	0,051	0,132	0,092	0,027	
Viskozite (cP)		Pearson korelasyon katsayısı	0,611*	0,716**	-0,584*	0,686*	0,786**	
		Önemlilik (2-yönlü)	0,035	0,009	0,046	0,014	0,002	

* Korelasyon katsayısı $p < 0,05$ (iki yönlü).

** Korelasyon katsayısı önemliliği $p < 0,01$ (iki yönlü).

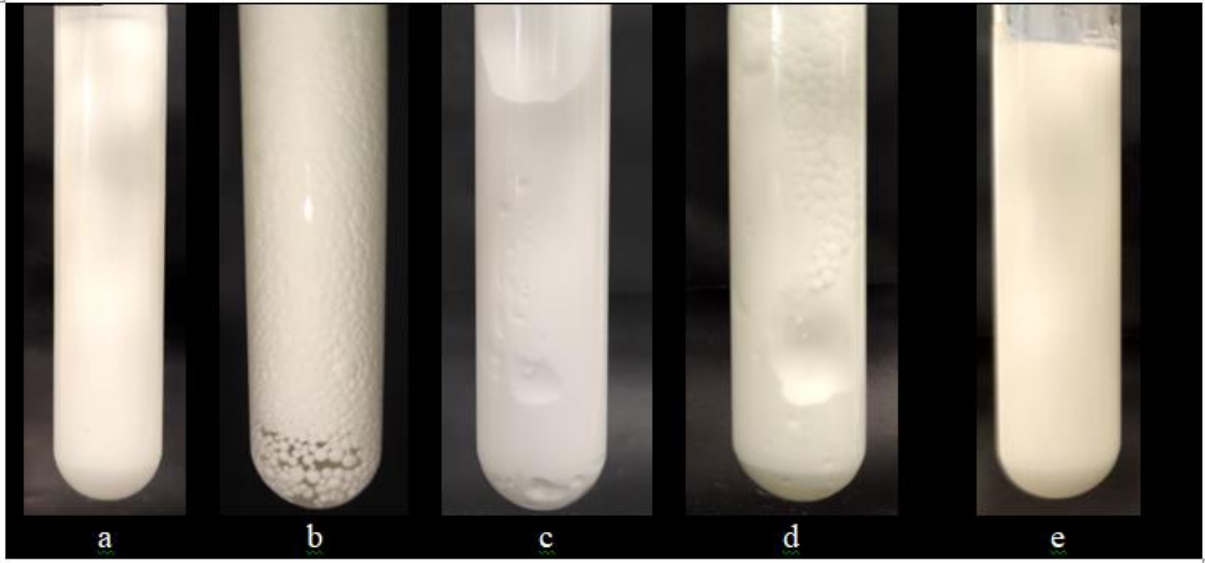
Bu çalışmanın sonuçları, emülsiyonlarda parçacık boyutunun belirlenmesi için mikroskop destekli dijital görüntü analizi ve lazer kırınım parçacık boyutu analizörü ile aynı eğilimlerin elde edildiğini göstermiştir. Lazer kırınım parçacık boyutu analizörü kurulum maliyetleri göz

önüne alındığında, mikroskop destekli dijital görüntü analizi kullanışlı ve etkili bir alternatif gibi görünmektedir. Ayrıca emülsiyonların fiziksel özellikleri ile korelasyon gösteren D(90), D[3,2] ve D[4,3] için karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiştir.

4.2. Kazein yüklü çift katlı emülsiyon üretiminde kullanılacak olan birincil emülsiyonun (W/O) formülasyonunun belirlenmesi

4.2.1. Ön denemeler

İç su fazında kazein hidrolizati bulunan kararlı W/O birincil emülsiyon üretimi için formülasyon ön denemeleri kapsamında ilk olarak %50 dağılmış faz ve %2 PGPR içeren bir emülsiyon hazırlanmıştır. Dağılmış faz olarak bu denemede distile su kullanılmıştır. Bu işlem sonucunda uygun bir emülsiyon elde edilmiştir (Şekil 4.1a). Daha sonra aynı üretim tekniği ile, dağılmış faz olarak distile su yerine kazein hidrolizati kullanılarak emülsiyon üretimi tekrarlanmıştır. Bu üretim sonucunda tam anlamı ile bir O/W emülsiyonu üretilenmemiştir (Şekil 4.1b). Bu durum, peptitlerin yüzey aktivitelerinden ve/veya tampon çözeltinin neden olduğu ozmotik basınçtaki değişimden kaynaklanabilir. Literatürde, peptitlerin arayüzey aktivitesinin, W/O arayüzünde PGPR'ye etki edebileceği ve kararsız hale gelmiş emülsiyonlara yol açabileceği bildirilmiştir (Patange ve diğerleri, 2022). Tampon çözeltisinin etkisinin anlaşılması için, bir kez de iç faz olarak tampon çözeltisi kullanılarak emülsiyon hazırlanmıştır. Bu durumda, daha gelişmiş bir morfolojiye sahip olsa da tam anlamı ile bir emülsiyon elde edilememiştir (Şekil 4.1c). Tüm bunların ışığında, iç faz oranı %40'a düşürülmüş emülgatör olarak ise yine %2 oranında PGPR kullanılmıştır (Şekil 4.1d). Benzer şekilde tam anlamı ile bir W/O emülsiyonu üretilenmemiştir. Bir sonraki denemede %40 iç faz oranı kullanılırken emülgatör oranı %3'e yükseltilmiştir (Şekil 4.1e).

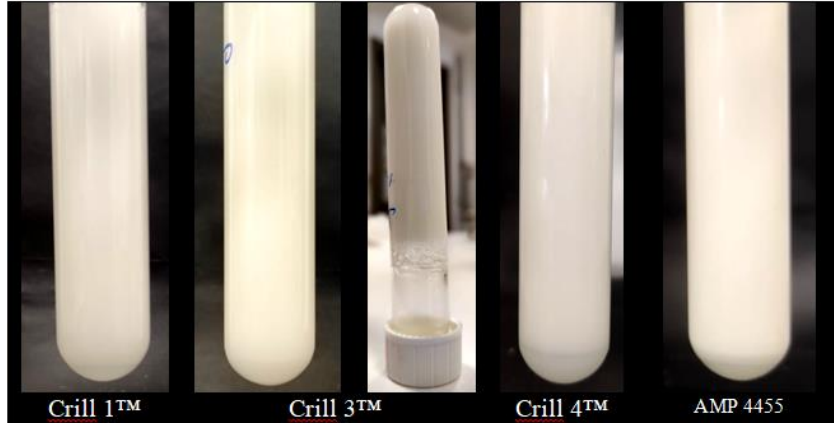


Şekil 4.1. PGPR emülgatörü ile hazırlanan farklı W/O emülsiyonları.

Bu formülasyonda emülsiyon üretilebilmiştir. Aynı koşul ve formülasyonda diğer emülgatörlerle de emülsiyonlar üretilmiştir (Şekil 4.2). Bu koşullarda bazıları stabil olmamakla beraber W/O emülsiyonları oluşturulabilmiştir. Şekil 4.2’de görüldüğü üzere Crill™ 3 ile üretilen emülsiyon, akışkan olmayan, jel görünümüne sahiptir. Bundan dolayı, Crill™ 3 ile üretilen emülsiyonların, tezde amaçlanan düşük viskozitede birincil emülsiyon üretimi hedefine uygun olmadığına karar verilmiştir. Aynı zamanda, katı bir emülgatör oluşu nedeniyle emülsiyon üretiminde uygulanacak prosedürde de farklılıklar bulunmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı çalışmaların ilerleyen aşamalarında Crill™ 3 kullanılmamıştır. Bunun dışında, yüksek kıvamlı emülsiyonlar üretilmesine neden olan bir diğer emülgatörün AMP 4455 olduğu görülmüştür. Kıvamı yüksek olmasına karşın üretilen emülsiyonun akışkan ve stabil görünümlü olması dolayısıyla bu emülgatörün çalışmalarda kullanılmasına, ancak kullanılacak emülgatör oranının diğerlerinden daha düşük tutulmasına karar verilmiştir.

4.2.2. Formülasyonun belirlenmesi

Çift katlı emülsiyon üretiminde kullanılan birincil emülsiyonların formülasyonunun belirlenmesi için, iç su fazında kazein hidrolizatı olan emülsiyonlar üretilmiştir. Bu emülsiyonların üretiminde dört farklı emülgatör (Crill™ 1, Crill™ 4, PGPR 4150, AMP 4455), üç farklı konsantrasyonda kullanılmış ve üç farklı W:O (%10, 25, 40) oranında emülsiyonlar formüle edilmiştir. Bu aşamada 36 çeşit emülsiyon üretilmiştir (Tablo 3.2).



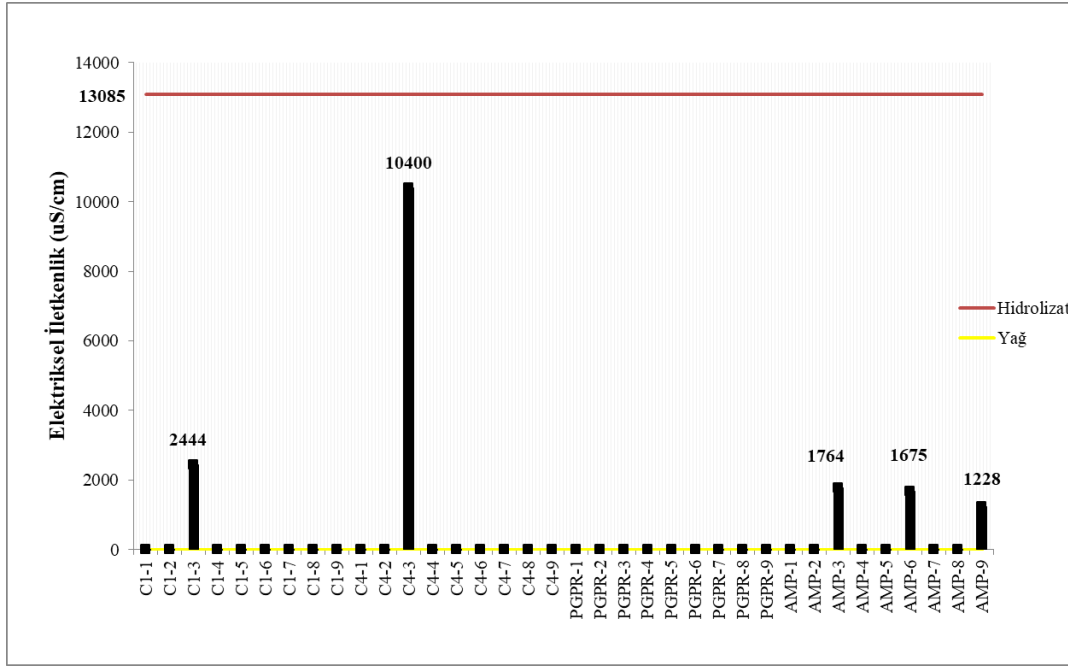
Şekil 4.2. Farklı emülgatörlerle ile hazırlanan W/O emülsiyonları.

Üretilen emülsiyonların ayrıntılı analizlerine geçmeden önce, uygun şekilde elde edilip edilmediği ve viskozite özellikleri açısından amaca uygun olup olmayacağı ön değerlendirmesine tabi tutulmuştur. Bu doğrultuda, W/O emülsiyonun uygun şekilde elde edilip edilmediğini belirlemek için elektriksel iletkenlik, akış özelliklerini belirlemek için ise viskozite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Elektriksel iletkenlik ölçümü, W/O emülsiyonlarının oluşumunu değerlendirmede çok yararlı bir yöntemdir. Sürekli/dış faz olan yağın elektriksel iletkenliği ihmal edilebilir düzeyde iken, dağılmış/iç su fazı (bu tez çalışmasında tamponda çözündürülmüş kazein hidrolizatı) önemli bir elektriksel iletkenlik göstermektedir. Emülsiyonun elektriksel iletkenliğine, emülsiyonun sürekli fazının hakim olması beklenir. Bu nedenle, uygun bir W/O emülsiyonunda, ihmal edilebilir bir elektriksel iletkenlik değerinin gözlenmesi beklenmelidir ve bir numunede belirgin bir elektriksel iletkenlik gözlenirse, bu, emülsiyonun oluşmadığı veya stabilitesini kaybettiği anlamına gelir (Lamba ve diğerleri, 2015; Schmidts, Dobler, Guldan, Paulus ve Runkel, 2010). Bundan dolayı, çalışma kapsamında hazırlanan emülsiyonların elektriksel iletkenlik değerleri emülsiyon hazırlandıktan hemen sonra kontrol edilmiştir.

Tez çalışmasında ayçiçek yağı için ölçülen elektriksel iletkenlik değeri $0,03 \pm 0,00 \mu\text{S}/\text{cm}$, tampon solüsyonda hazırlanan kazein hidrolizatı için ise bu değer $13.085 \pm 135 \mu\text{S}/\text{cm}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). 36 örneğin 31'inde elektriksel iletkenlik tespit edilememiştir. Elektriksel iletkenlik, C1 ve C4 ile üretilmiş emülsiyonlarda en yüksek iç faz en düşük

emülgatör oranı içeren 3 no'lu formülasyonlarda belirlenirken, AMP ile hazırlanan emülsiyonlarda %40 iç faz ile üretilen tüm formülasyonlarda saptanmıştır. Elektriksel iletkenlik ölçümlerinden hareketle, bu formülasyonlar ile tam bir emülsiyon yapısının elde edilemediği görülmüş ve bu formülasyonlar çalışmanın ilerleyen aşamalarında değerlendirmeye alınmamış, incelenen emülsiyon çeşidi sayısı 31'e inmiştir.



Şekil 4.3. Farklı emülgatörlerle ile hazırlanan W/O emülsiyonlarının ve kazein hidrolizatının elektriksel iletkenlik değerleri.

Emülsiyonların akış davranışı, emülsiyon stabilitesi ve özellikleri için önemli bir göstergedir. Tezin bu aşamasında yapılan viskozite analizleri sonrasında, emülsiyonların akış davranış indeksi ve kıvam sabiti değerleri hesaplanmış ve Tablo 4.2'de paylaşılmıştır. Akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler ise ekler kısmında sunulmuştur (Şekil Ek A1-4). Sonuçlara göre, daha yüksek dağılmış faz oranları, W/O emülsiyonları için genellikle viskozite artışı ile sonuçlanmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlu sistemlerdeki dağılmış faz, damlacıkların hidrodinamik ve kolloidal etkileşimlerin bir kombinasyonu şeklinde birbirleriyle etkileşime girer ve bu durum da viskozitede artışa neden olur (McClements, 2016).

Tablo 4.2. Çeşitli emülgatör konsantrasyonları ve dağılmış faz oranları ile farklı emülgatörler kullanılarak üretilen W/O emülsiyonlarının akış davranışları*.

Örnek	n (-)	K (Pa.s ⁿ)	Örnek	n (-)	K (Pa.s ⁿ)
Crill™ 1-1	0,98 ± 0,00 ^{b,y}	1,14 ± 0,00 ^{b,w}	Crill™ 4-1	0,96 ± 0,00 ^{b,xy}	1,30 ± 0,02 ^{b,w}
Crill™ 1-2	0,90 ± 0,00 ^{a,x}	1,37 ± 0,04 ^{a,w}	Crill™ 4-2	0,86 ± 0,00 ^{a,x}	1,37 ± 0,04 ^{a,w}
Crill™ 1-4	0,95 ± 0,00 ^{a,m,x}	1,18 ± 0,00 ^{c,k,w}	Crill™ 4-4	0,97 ± 0,01 ^{b,m,xy}	1,15 ± 0,03 ^{a,k,w}
Crill™ 1-5	0,85 ± 0,03 ^{a,l,x}	1,55 ± 0,17 ^{a,k,w}	Crill™ 4-5	0,86 ± 0,00 ^{a,l,x}	1,35 ± 0,01 ^{a,l,w}
Crill™ 1-6	0,63 ± 0,00 ^{k,w}	2,66 ± 0,07 ^{l,w}	Crill™ 4-6	0,63 ± 0,01 ^{k,w}	2,62 ± 0,04 ^{m,w}
Crill™ 1-7	0,95 ± 0,00 ^{a,l,y}	1,10 ± 0,01 ^{a,k,w}	Crill™ 4-7	0,88 ± 0,00 ^{a,l,x}	1,20 ± 0,03 ^{ab,k,w}
Crill™ 1-8	0,78 ± 0,07 ^{a,kl,x}	1,95 ± 0,44 ^{a,kl,w}	Crill™ 4-8	0,81 ± 0,02 ^{a,kl,x}	1,67 ± 0,17 ^{a,k,w}
Crill™ 1-9	0,70 ± 0,00 ^{k,w}	2,66 ± 0,07 ^{l,x}	Crill™ 4-9	0,71 ± 0,04 ^{k,w}	1,76 ± 0,26 ^{k,w}
PGPR-1	0,93 ± 0,00 ^{a,k,x}	1,04 ± 0,03 ^{a,k,w}	AMP-1	0,43 ± 0,01 ^{a,w}	11,4 ± 0,38 ^{a,x}
PGPR-2	1,04 ± 0,03 ^{a,l,y}	1,19 ± 0,11 ^{a,k,w}	AMP-2	0,28 ± 0,01 ^{b,w}	95,3 ± 4,08 ^{a,x}
PGPR-3	0,98 ± 0,00 ^{a,kl}	2,79 ± 0,03 ^{a,l}	AMP-4	0,45 ± 0,00 ^{ab,w}	10,1 ± 0,33 ^{a,x}
PGPR-4	0,99 ± 0,01 ^{b,k,y}	1,04 ± 0,04 ^{a,k,w}	AMP-5	0,21 ± 0,01 ^{a,w}	145,2 ± 9,25 ^{b,x}
PGPR-5	1,01 ± 0,01 ^{a,k,y}	1,36 ± 0,02 ^{a,l,w}	AMP-7	0,48 ± 0,01 ^{b,w}	9,5 ± 0,78 ^{a,x}
PGPR-6	0,98 ± 0,00 ^{b,k,x}	2,83 ± 0,01 ^{a,m,w}	AMP-8	0,31 ± 0,00 ^{b,w}	133,1 ± 4,62 ^{b,x}
PGPR-7	1,01 ± 0,00 ^{b,l,z}	1,02 ± 0,00 ^{a,k,w}			
PGPR-8	1,01 ± 0,01 ^{a,l,y}	1,40 ± 0,00 ^{a,l,w}			
PGPR-9	0,99 ± 0,00 ^{b,k,x}	2,84 ± 0,01 ^{a,m,x}			

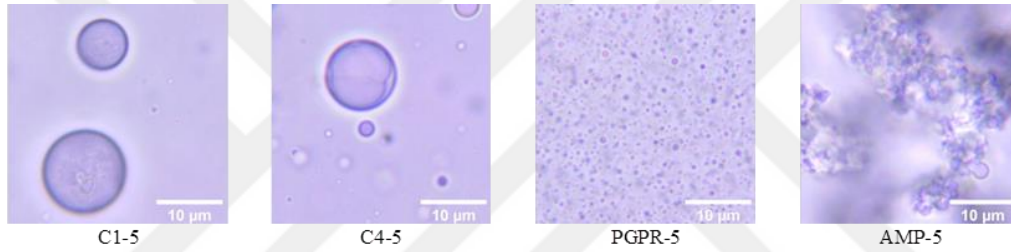
* Kısaltmalar şunlardır: n, akış davranış indeksi; K, tutarlılık katsayısı. Değerler, analiz sonuçlarının ortalama ± standart sapmasıdır ve aynı üst simge harfleri, farklı koşullarda üretilen numuneler arasında önemli bir fark olmadığını gösterir ($p>0,05$). Aynı dağılmış faz oranına sahip aynı emülgatör kullanılarak hazırlanan emülsiyonlarda emülgatör konsantrasyonun etkisi için a-c; aynı emülgatör konsantrasyonunda ve tipinde dağılmış faz oranının etkisi için k-m; aynı formülasyonda hazırlanan emülsiyonlarda emülgatör tipinin etkisini incelemek için w-z kullanılmıştır. Bu analiz üç ve üzerinde karşılaştırılacak örnek olması durumunda kullanılmıştır.

Viskozite analizlerinin sonuçları, emülgatör tipinin, emülsiyonların viskozitesi ve akış davranışı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. PGPR ile üretilen emülsiyonlar Newton tipi sıvı davranış sergilemiş ve dağılmış faz oranı ve emülgatör konsantrasyonu ile viskoziteleri artmıştır (Tablo 4.2). Benzer şekilde, Jo ve diğerleri (2019), PGPR kullanılarak hazırlanan kollajen peptit hidrolizatu yüklü birincil emülsiyonlarda

Newton akış özelliklerini belirlemiş ve ayrıca iç faz oranının artmasıyla viskozitenin arttığını belirtmişlerdir (Jo ve diğerleri, 2019). Sorbitan esterlerle hazırlanan emülsiyonlarda (hem Crill™ 1 hem de Crill™ 4), dağılmış faz oranı, emülsiyonların akış davranışına hakim olmuştur. İç faz oranı en yüksek olan (%40) numune 6 ve 9'un önemli ölçüde daha yüksek K değerlerine sahip olduğu ve Newton tipi davranıştan uzaklaştığı bulunmuştur. Hem W/O hem de O/W emülsiyonlarının Newton karakterinin değiştiği ve emülsiyonun, özellikle faz inversiyonundan önce, dağılmış faz oranının artmasıyla Newton tipi olmayan davranışlar sergilediği bildirilmektedir (Gaonkar, 1991; Mortensen ve diğerleri, 2016, 2017).

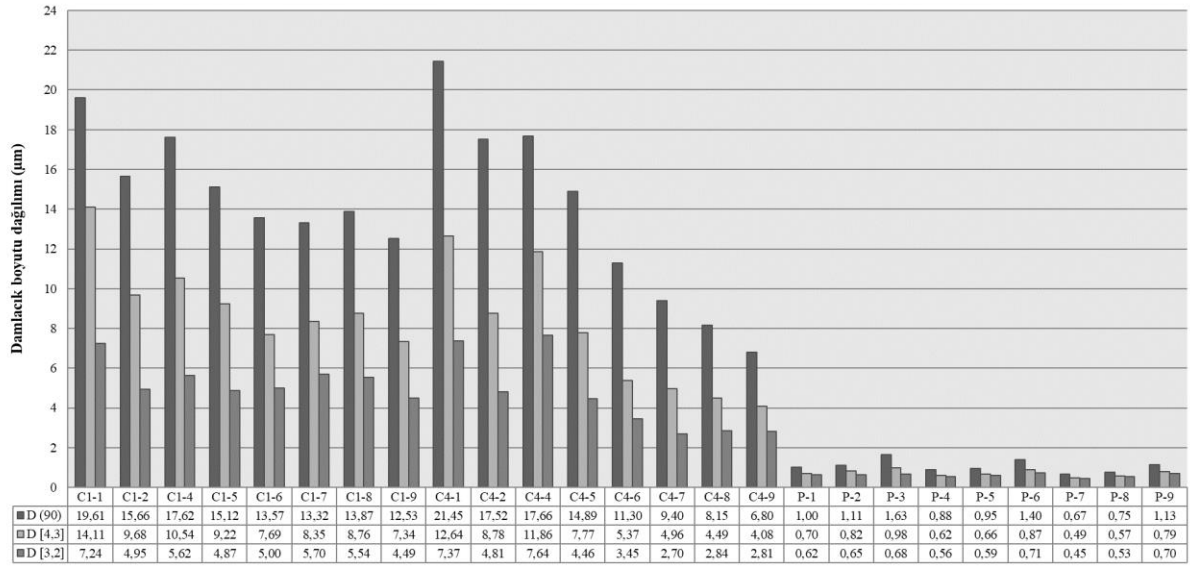
AMP ile hazırlanan örnekler akış davranış indeksi ve kıvam sabiti açısından diğerlerinden farklılık göstermiştir. AMP ile üretilen tüm formülasyonlar, bu emülgatörün diğerlerine kıyas ile daha düşük oranlarda kullanılmasına rağmen, önemli ölçüde daha yüksek K değerlerine sahip bulunmuştur ($p < 0,05$). Ayrıca, AMP ile hazırlanan emülsiyonlar, dağılmış faz oranından bağımsız olarak Newton tipi olmayan akış davranış özelliği göstermiştir (Tablo 4.2). AMP ile stabilize edilmiş W/O'nun kayma ile incelleme davranışı Rivas, Schneider ve Rohm (2016) tarafından da rapor edilmiştir (Rivas, Schneider ve Rohm, 2016). Bir başka çalışmada ise AMP ile stabilize edilmiş W/O'da PGPR ile stabilize edilmiş olanlardan daha yüksek viskozite değerleri elde edilmiştir (Hartel ve Firoozmand, 2016). Bu sonuçlar, tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Ek olarak, AMP ile hazırlanan emülsiyonların mikroyrafları incelendiğinde, damlacıkların tamamen dağılmamış ve floküle halde oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Balcaen ve diğerleri (2017) ve Rivas ve diğerleri (2016) ışık mikroskobu ile aynı eğilimleri saptamıştır. AMP kullanılarak hazırlanan emülsiyonlar yüksek oranda kümelenmiş sistemlerken, PGPR ile stabilize edilen emülsiyonların çok küçük ve bağımsız damlacıklara sahip olduğu gözlemlenmiştir (Balcaen ve diğerleri, 2017; Rivas ve diğerleri, 2016). Bu çalışmada hazırlanan emülsiyonlar, çift katlı emülsiyonların iç fazı olarak tasarlanmış ve düşük viskoziteli olmaları amaçlanmıştır. AMP ile üretilen emülsiyonların viskozitesi yüksek olduğundan bu emülgatör ile üretilen emülsiyonlara çalışmanın ilerleyen bölümlerinde yer verilmemiştir.

Emülsiyon stabilitesini belirlemek için emülsiyonlardaki yerçekimsel ayırım incelenmiştir. Bu kapsamda W/O emülsiyonları 5 günlük depolama süresince fotoğraflanmıştır (Şekil Ek A5-A7). Crill™ 1 ve Crill™ 4 ile stabilize edilmiş emülsiyonlarda 24 saat içerisinde faz ayrımı gözlenmiştir (Şekil Ek A5, A6). Ancak, 5 gün sonra bile PGPR ile stabilize edilmiş örneklerde hiçbir görsel faz ayrımı tespit edilememiştir (Şekil Ek A6). PGPR ile üretilen tüm formülasyonlarda diğerlerine kıyasla önemli ölçüde kararlı emülsiyonlar üretilmiştir. PGPR'nin W/O emülsiyonlarını stabilize etmede oldukça etkili olduğu, literatürde birçok yazar tarafından bildirilmiştir (Rivas ve diğerleri, 2016; Ying ve diğerleri, 2021; J. Zhang ve Reineccius, 2016). Ying ve diğerleri, (2021), PGPR ile stabilize edilmiş soya peptidi yüklü W/O emülsiyonunun, Span-60 ve lesitin ile stabilize edilmiş olanlardan daha iyi stabiliteye sahip olduğu belirlemiştir (Ying ve diğerleri, 2021).



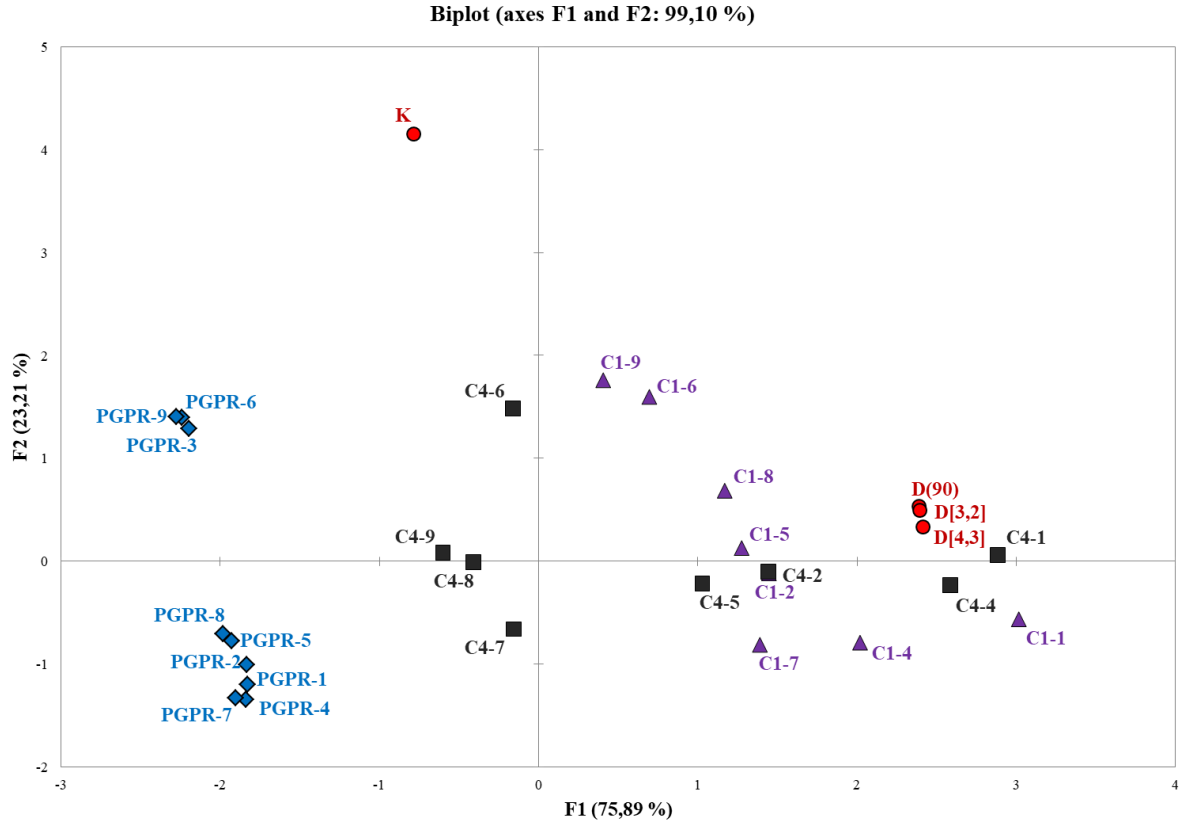
Şekil 4.4 Farklı emülgatörlerle ile hazırlanan W/O emülsiyonlarının mikrografları.

Damlacık boyutundaki artış, emülsiyonların flokülasyon, koalesans veya Oswald olgunlaşması yoluyla kararsız hale gelmesine yol açabileceğinden, emülsiyonlardaki damlacık boyutu dağılımı stabilite açısından önemlidir (David Julian McClements, 2016). Emülsiyonların damlacık boyut dağılımları, emülsifikasyon koşulları, emülgatörün türü, emülgatör miktarı, dağılmış ve sürekli fazların oranı gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak farklılık gösterebilir (Choi ve diğerleri, 2020). Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, Crill™ 1 ve Crill™ 4 ile stabilize edilmiş örneklerin damlacık boyutu, PGPR ile stabilize edilmiş örneklerin damlacık boyutlarından önemli ölçüde farklı bulunmuştur. PGPR ile stabilize edilen tüm emülsiyonlarda D(90) değerleri 2 µm'nin altında iken, D[4,3] ve D[3,2] değerleri 1 µm'nin altındadır. Aynı formülasyona sahip emülgatörlerin karşılaştırılmasında, Crill™ 1 ve Crill™ 4 kullanılarak stabilize edilen emülsiyonların D(90) değerleri, PGPR kullanılarak stabilize edilen emülsiyonlara göre sırasıyla 9,5-20,8 kat aralığında ve 6,7-21,4 kat aralığında daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, emülsiyon kararlılığı sonuçlarıyla uyumludur. Bu durum, aynı zamanda mikrograflarda da gözlemlenebilmektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Farklı formülasyonlar ile üretilmiş emülsiyonların D(90), D[4,3] ve D[3,2] değerleri.

Örneklerin damlacık boyutu değerlerinin viskozite özellikleri ile ilişkisini gözlemleyebilmek için PCA analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6). Belirlenen iki ana bileşenin (F1 ve F2) varyasyonun çok önemli bir bölümünü (%99,1) açıkladığı ve yalnızca x ekseninde gösterilen bileşen (F1) ile varyasyonun %78,9'unun açıklanabildiği hesaplanmıştır. PCA analizine göre, PGPR ile üretilen tüm örnekler, x eksenini boyuncu damlacık boyutu parametrelerinden uzakta konumlanmıştır. Bununla birlikte, %40 iç faz içeren PGPR ile hazırlanmış örnekler, kıvam katsayısı gibi pozitif F2'de konumlanırken, diğer PGPR ile hazırlanan örnekler, y ekseninin negatif tarafında konumlanmıştır. Ayrıca kıvam katsayısı ile damlacık boyutu parametreleri arasında F1'e göre negatif bir korelasyon bulunmuştur. Bu negatif korelasyon birkaç olası nedene bağlı olabilmektedir. Damlacık boyutu küçüldükçe, damlacıklar arasındaki ortalama mesafe de azalır ve bu durum, hidrodinamik etkileşim ile viskozitede artışa neden olur. Ayrıca, emülsiyonda dağılmış olan faz damlacıklarının ortalama boyutunun küçülmesiyle, dağılmış fazın emülsiyon içerisindeki yüzey alanı artar. Aynı zamanda, ortalama damlacık boyutuna göre yüzeyde adsorbe edilmiş yüzey aktif madde miktarı ve/veya tabaka kalınlığı da oransal olarak önem kazanır. Artan dağılmış faz yüzey alanı ile adsorbe olan yüzey aktif maddenin etkisi ile viskozitede artışlar mümkündür. Son olarak, polidispersitenin genellikle damlacık boyutundaki azalmayla azaldığı ve akış davranışlarını etkilediği bilinmektedir (Pal, 1996).



Şekil 4.6. Farklı formülasyonlar ile üretilmiş emülsiyonların D(90), D[4,3], D[3,2] ve kıvam katsayısı (K) değerleri ile oluşturulmuş PCA biplot diyagramı.

Tez çalışmasının bu aşamasında, PGPR ile hazırlanan tüm örneklerin küçük damlacık boyutuna ve yüksek emülsiyon stabilitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, birincil emülsiyon formülasyonunda PGPR kullanılmasına karar verilmiştir. Benzer bir sonucu Rivas ve diğerleri (2016) yaptıkları çalışmada saptamışlardır. Bahsi geçen çalışmada, PGPR emülsiyonlarının ağ oluşturma eğilimi olmaksızın, daha küçük damlacıklarla tek modlu damlacık boyutu dağılımına sahip olduğu, Newton tipi akış davranışı gösterdiği ve bu emülsiyonların faz ayırımına karşı çok daha yüksek kararlılığa sahip olduğu belirtilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle de birincil emülsiyon formülasyonunda kullanımı önerilmiştir (Rivas ve diğerleri, 2016).

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, birincil emülsiyonların hazırlanmasında PGPR kullanımının uygunluğunu açık şekilde göstermesine rağmen, hangi formülasyonun tercih edileceğinin belirlenmesi için ek analize ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, düşük emülgatör konsantrasyonları ve yüksek dağılmış faz oranı kullanılarak, düşük emülsiyon viskozitesi ve

küçük damlacık boyutunda hazırlanan en uygun PGPR ile stabilize edilen emülsiyonun belirlenmesi için TOPSIS analizi yapılmıştır. TOPSIS'te yanıt olarak dağılmış faz oranı, emülgatör konsantrasyonu, viskozite ve damlacık boyutu (D[4,3]) parametreleri kullanılmış ve ağırlıkları sırasıyla %20, %20, %30 ve %30 olarak belirlenmiştir. TOPSIS tarafından hesaplanan en yüksek “görelî yakınlık” değerine sahip emülsiyon formülasyonu seçilmiştir. Üç emülsiyon formülasyonunun (PGPR-1, PGPR-2 ve PGPR-5) 0,6'nın üzerinde çok yakın görelî yakınlık değerleri verdiği ve en yüksek değere PGPR-5'in (%25 dispers faz oranı ve %5 emülgatör konsantrasyonu) sahip olduğu hesaplanmıştır (0,621) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Birincil emülsiyonun formülasyonuna karar verilmesi için TOPSIS analizinde kullanılan deneysel veri ve elde edilen görelî yakınlık değerleri.

Örnek	İç faz oranı	Emülgatör oranı	Viskozite	D [4,3]	Görelî Yakınlık
PGPR-1	0,10	0,03	83,9	0,704	0,611
PGPR-2	0,25	0,03	132,5	0,822	0,616
PGPR-3	0,40	0,03	260,2	0,976	0,430
PGPR-4	0,10	0,05	93,4	0,618	0,591
PGPR-5	0,25	0,05	139,8	0,662	0,621
PGPR-6	0,40	0,05	271,9	0,873	0,396
PGPR-7	0,10	0,07	100,1	0,488	0,568
PGPR-8	0,25	0,07	146,0	0,575	0,572
PGPR-9	0,40	0,07	274,7	0,795	0,381

4.3. Birinci homojenizasyon aşamasının optimizasyonu ve homojenizatörlerin karşılaştırılması

4.3.1. Optimizasyon

Emülsiyonun yüksek stabilitesini sağlamak için bir diğer önemli unsur emülsifikasyon işlemidir. Emülsifikasyon işlemi sonunda yağ fazında küçük ve düzgün dağılmış su damlacıkları elde etmek gereklidir (Kumar ve diğerleri, 2022; McClements, 2016). Damlacık boyutunun küçültülmesi ve viskozitenin artırılmasıyla emülsiyon stabilitesinin geliştirildiği iyi bilinmektedir. Genel olarak, damlacık boyutunun küçültülmesi de viskozitenin artmasına neden olmaktadır (Pal, 2011; Yıldırım ve diğerleri, 2017). Ancak, çift katlı emülsiyonların iki aşamalı teknikle üretiminde, ikincil emülsifikasyon işlemi sırasında yüksek viskoziteye sahip birincil emülsiyonun dış su fazında etkin bir şekilde dağıtılmasında belirli zorluklar bulunmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında hem düşük viskoziteye hem de küçük

damlacık boyutuna sahip stabil bir W/O emülsiyonu üretimi amaçlanmıştır. Bu karşılık, optimizasyon ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır.

Bu bağlamda, W/O/W üretiminin ilk aşamasında, W/O'nun hazırlanması için yaygın olarak kullanılan homojenizatör tiplerinden üçü; rotor-statör, ultrases homojenizatör (sonikatör) ve yüksek basınç homojenizatör (Muschiolik ve Dickinson, 2017) seçilmiş ve birincil emülsiyonun hazırlanmasında kullanılacak işlem parametreleri her bir homojenizatör için ayrı ayrı optimize edilmiştir.

Optimizasyonda yanıt yüzey yönteminden yararlanılmış, deneme planları CCRD yöntemiyle hazırlanmış ve belirlenen faktörler ile yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen düzeyleri, CCRD deneme planında kullanılan kodlanmış değerler halinde Tablo 3.4'de verilmiştir. Belirlenen deneme deseni doğrultusunda rotor-statör kullanılarak üretilen emülsiyonların analiz sonuçları Tablo Ek A3'te; ultrases homojenizatör ile üretilen emülsiyonların analiz sonuçları Tablo Ek A4'de ve yüksek basınç homojenizatör ile üretilen emülsiyonların analiz sonuçları ise Tablo Ek A5'te verilmiştir. Farklı homojenizasyon yöntemleri kullanılarak üretilen emülsiyonların, üretimin hemen sonrasında ve 30 günlük depolama sonrasında stabilitelerini değerlendirmek için çekilen fotoğrafları Şekil Ek A8-A10'da toplu olarak gösterilmiştir. Ayrıca, analiz edilen viskozite özelliklerinin hesaplanmasında kullanılan grafikler Şekil Ek A11-A13'te sunulmuştur. Uygulanan deneme deseni doğrultusuna belirlenen yanıtlar ve bu doğrultuda elde edilen deneysel veri, çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş ve her bir yanıt için işlem değişkenlerine bağlı ikinci dereceden denklemler oluşturulmuştur. Oluşturulan modellerin deneysel verilerle uyumu için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bu süreçte, her üç optimizasyon sürecinde de uygun model veren (optimizasyon süreçlerinin kıyaslanabilir olmasına olanak veren) viskozite, 0. ve 30.günlerde D(90) değeri ile stabilite indeksi değerleri yanıt olarak seçilmiştir. Her bir yanıt için yapılan ANOVA analizi ile her bir faktörün yanıtlar üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Her bir faktörün yanıtlar üzerindeki doğrusal, ikinci dereceden ve interaksiyon etkilerinin önemi *F*-testi (Fischer testi) uygulanarak belirlenmiştir. Belirlenen 4 yanıt için her bir işlem değişkeninin her bir yanıtta doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden etkilerini gösteren ANOVA tabloları rotor-statör ile yapılan üretimler için Tablo Ek A6'da, ultrases ile yapılan

üretimler için Tablo Ek A7’de ve yüksek basınç homojenizasyon ile yapılan üretimler için Tablo Ek A8’de verilmiştir. Üretilen modellerin deneysel verilerle uyumluluğuna, model regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj- R^2), tahminlenmiş hata kareler toplamı (PRESS), tahminlenmiş çoklu regresyon katsayısı (Pre- R^2) ve yeterli kesinlik (Adeq.Precision) değerlerine bakılarak karar verilmiştir ($R^2>0,9$; |Adj- R^2 - Pre- R^2 |<0,2; max.PRESS ; Pre- $R^2>0,7$; Adeq.Precision>4). Bu aşamada Tablo Ek A6-8’de sonuçları verilen tüm regresyon modellerinin %90,6’nın üzerinde güven seviyesinde önemli olduğu görülmektedir. Ancak, diğer model istatistiklerine bakıldığında bazı uygunsuzluklar da görülmektedir. 3 farklı optimizasyonda dörder yanıt için toplam 12 model üretilmiş ve bu modellerin istatistikleri içerisinde bir modelin “lack of fit” değerlerinin 0,1’in altında ve önemli olduğu, 5 modelin ise Pred- R^2 değerlerinin %70’in altında olduğu görülmüştür. Bu veriler de model istatistiğinin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur ve bunun için modelde bulunan önemsiz terimlerin model hiyerarşisine uygun olarak çıkartılması gerekmektedir (Mayers ve diğerleri, 2009; Salum ve Erbay, 2019). Buna göre, p -değeri 0,1’den büyük olan model parametreleri istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiş ve model hiyerarşisine zarar vermeden modellerden çıkarılarak belirlenen modellerin etkinliği artırılmıştır. Ayrıca, rotor-statör homojenizatörle üretilen örneklerin D(90) değerlerinin incelenmesinde deneysel verinin dönüştürülmesinin modeli geliştirdiği görülmüştür. Bu doğrultuda, deneysel verinin ters karekökü alınarak (inverse square root) yeniden model oluşturulmuş ve model uyumu önemli ölçüde artırılmıştır.

Etkinliği artırılarak belirlenmiş olan son modellerin katsayılarının da bulunduğu ANOVA tabloları Tablo 4.4-4.6’da paylaşılmıştır. Rotor-statör ile yapılan emülsiyon üretimleri için elde edilen veriler Tablo 4.4’da, ultrases homojenizatör ile yapılan emülsiyon üretimleri için elde edilen veriler Tablo 4.5’te ve yüksek basınç homojenizasyon ile yapılan emülsiyon üretimleri için elde edilen veriler Tablo 4.6’da verilmiştir. Buna göre, tüm modellerin varyasyonun büyük bir kısmını açıkladığı görülmektedir ($R^2>0,90$). Aynı zamanda R^2 ile Adj- R^2 arasındaki farkın %5’in altında olması modelin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini gösterirken, Pred- R^2 değeri ile Adj- R^2 değerleri arasındaki farkın %20’nin altında olması (belirlenen modellerde %17,7’nin altında çıkmıştır), “*Lack of fit*” değerlerinin 0,1’in üzerinde olması (en düşük değer 0,142) ve Adeq.Precision değerinin 4’ten büyük

olması (belirlenen modellerde en düşük değer 14,375 olmuştur) belirlenmiş olan modellerin tahminleme açısından istatistiksel olarak uygun olduğunu göstermektedir. Elde edilen 12 modelden sadece birisinde tek faktörün etkili olduğu görülmüştür. Buna göre, ultrases ile emülsiyon üretiminde genlik faktörü, stabilite indeksi üzerinde önemli bir etkiye sahip bulunmamıştır. Elde edilen modellerle işlem değişkenlerinin yanıtlar üzerine etkisinin görsel olarak da belirlenebilmesi için yanıt yüzey grafikleri ve izohips eğrileri çizilmiştir. Ancak, bu eğriler, faktörlerin yanıtlara olan interaksiyon etkilerinin önemli olması durumunda anlamlı ve gerçekçi olarak çizilebilmektedir. Yukarıda da ifade edildiği üzere, türetilen 12 modelden 10'unda interaksiyon etkiler önemli bulunmuştur ve bu 10 etki için yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.7-4.9).

Tablo 4.4. W/O emülsiyon üretimi için rotor-statör homojenizatör kullanımının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamlı olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).

Kaynak*	Viskozite		D(90) / 0.Gün		Stabilite İndeksi		D(90) / 30.Gün	
	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı
Model	<0,0001	100,03	0,0002	0,91	0,0001	92,40	0,0004	0,96
x ₁	<0,0001	14,71	<0,0001	0,30	0,0001	9,62	<0,0001	0,34
x ₂	0,0103	6,55	0,0155	0,10	0,0067	5,08	0,0058	0,15
x ₁ x ₂	0,0015	-13,16	0,0626	-0,10	0,0053	-7,51	0,0916	-0,10
x ₁ ²	0,0002	-14,03	0,0623	-0,078	0,0006	-8,16	0,0654	-0,088
x ₂ ²							0,0371	-0,10
Lack of Fit	0,2600		0,1799		0,1424		0,3087	
R ²	0,9439		0,9240		0,9290		0,9414	
Adj-R ²	0,9159		0,8860		0,8935		0,8995	
Pred-R ²	0,7839		0,7367		0,7169		0,7274	
Adeq Precision	16,858		14,375		15,278		15,156	
PRESS	952,6		0,25		500,80		0,37	
C.V.	6,08		11,06		4,54		12,65	

* x₁, karıştırma hızı; x₂, işlem süresi.

Tablo 4.5. W/O emülsiyon üretimi için ultrases homojenizatör kullanımının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamalı olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).

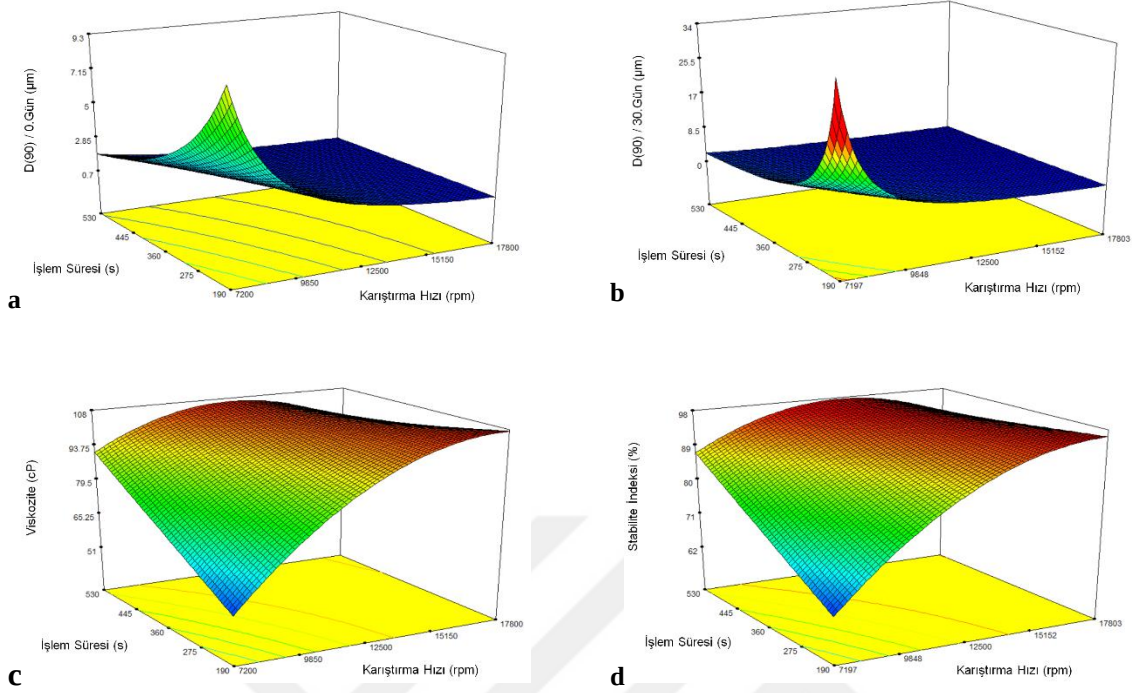
Kaynak*	Viskozite		D(90) / 0.Gün		Stabilite İndeksi		D(90) / 30.Gün	
	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı
Model	0,0002	101,85	< 0,0001	5,07	<0,0001	84,55	0,0001	12,81
x ₁	0,0073	-1,42	0,0001	1,12			0,0002	2,07
x ₂	0,0017	1,86	0,0003	1,04	<0,0001	-3,02	0,0136	0,94
x ₁ x ₂	0,0490	-1,28					0,0003	-2,66
x ₁ ²							0,0007	-1,75
x ₂ ²	0,0001	-3,02	0,0002	1,17	0,0007	1,72	0,0533	0,72
Lack of Fit	0,4044		0,6329		0,2300		0,7767	
R ²	0,9173		0,9246		0,9134		0,9560	
Adj-R ²	0,8759		0,8995		0,8961		0,9246	
Pred-R ²	0,7609		0,8333		0,7867		0,8787	
Adeq Precision	15,053		19,059		19,872		17,724	
PRESS	30,30		5,19		21,95		12,86	
C.V.	1,14		8,82		1,10		6,73	

* x₁, genlik; x₂, işlem süresi.

Tablo 4.6. W/O emülsiyon üretimi için yüksek basınç homojenizatör kullanımının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamalı olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).

Kaynak*	Viskozite		D(90) / 0.Gün		Stabilite İndeksi		D(90) / 30.Gün	
	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı
Model	0,0001	94,74	<0,0001	7,12	0,0004	85,22	<0,0001	13,37
x ₁	<0,0001	-3,86	0,0004	-1,72	0,0195	0,85	<0,0001	-3,19
x ₂	0,0002	-3,56	0,0002	-1,97	0,0010	1,48	0,0118	-0,32
x ₁ x ₂	0,0312	1,96	0,0069	-1,52	0,0011	2,05	<0,0001	-2,25
x ₁ ²	0,0997	1,05	0,0018	1,45	0,0026	1,34		
x ₂ ²							<0,0001	-0,89
Lack of Fit	0,6944		0,5583		0,7346		0,6908	
R ²	0,9313		0,9329		0,9056		0,9943	
Adj-R ²	0,8969		0,8994		0,8584		0,9915	
Pred-R ²	0,8070		0,7737		0,7529		0,9867	
Adeq Precision	16,620		17,418		15,186		64,770	
PRESS	50,30		19,02		14,34		1,45	
C.V.	1,57		10,48		0,96		2,16	

* x₁, basınç; x₂, işlem süresi.



Şekil 4.7. Rotor-statör homojenizatör ile hazırlanmış emülsiyonlarda karıştırma hızı ile işlem süresinin değişiminin (a) taze emülsiyonun D(90) değeri, (b) 30 gün depolanmış emülsiyonun D(90) değeri, (c) emülsiyon viskozitesi ve (d) stabilite indeksi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.

Rotor-statör homojenizatör kullanılarak üretilen örneklerle ilgili tüm yanıtlar için yanıt yüzey eğrileri çizilebilmiştir (Şekil 4.7). Şekil 4.7a ve 4.7b’de emülsiyon üretiminin hemen sonrasındaki ve üretimden 30 gün sonraki D(90) değerlerinin faktörlerle değişimi gösterilmiştir. Burada düşük karıştırma hızı ve işlem süresi koşullarında etkin bir emülsifikasyon gerçekleştirilemediğinden, büyük damlacık boyutu ölçülmüştür. Mekanik işlemin şiddetinin artışı ile damlacık boyutu küçülmüştür. Özellikle, 12.500 rpm’de 530 s’nin üzerindeki veya 15.500 rpm’de 190 s’nin üzerindeki işlemlerde çok küçük damlacık boyutları beklenmektedir. Grafikten de görüleceği üzere, çalışılan faktör düzeylerinin çok büyük bir bölümünde üretilen emülsiyonların 1 ay sonra bile küçük damlacık boyutuna sahip olmaları beklenmektedir. Sadece düşük mekanik etki ile üretilen örneklerde depolama sonrası büyük damlacık boyutları görülmesi beklenirken, 10.000 rpm’in üzerinde veya 300 s’nin üzerindeki koşullarda üretilen emülsiyonların 1 ay sonra da küçük D(90) değerlerine sahip olacağı model tarafından öngörülmektedir. Rotor-statör işlemi ile üretilen bir emülsiyonun damlacık boyutu, homojenizasyon enerjisini temsil eden karıştırma hızına bağlıdır. Emülsiyonun

homojenizasyonunda uygulanan enerji ne kadar yüksek olursa, genellikle üretilen damlacık boyutu da o kadar küçük olur (Khalid, Kobayashi, Neves, Uemura ve Nakajima, 2013). Yang ve diğerleri (2021) rotor-statörün karıştırma hızının ve süresinin istiridye peptiti içeren birincil emülsiyonların özellikleri üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında sırası ile şu hız ve süre değerlerini kullanmışlardır; 12.000 rpm'de 2 dk, 10.000 rpm'de 3 dk, 8.000 rpm'de 4 dk, 6.000 rpm'de 5 dk ve 4.000 rpm'de 6 dk. Çalışmada, artan karıştırma hızı ile birlikte sisteme giren ek enerji sonucunda, emülsiyon damlacık boyutunun küçüldüğü ve dağılımın tekdüze karakterinin arttığı bulunmuştur. Düşük karıştırma hızında üretilen örneklerin (10.000 rpm'den düşük karıştırma hızları), geniş bir parçacık boyutu dağılımına ve büyük ortalama damlacık çaplarına sahip emülsiyonlar olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmada, 4.000 rpm'de 6 dk ile elde edilen sonuçlar, düşük hızlı ve uzun süreli işlem koşullarının emülsiyon damlacık boyutunu azaltmaya yeterli olmadığını göstermiştir (Yang ve diğerleri, 2021).

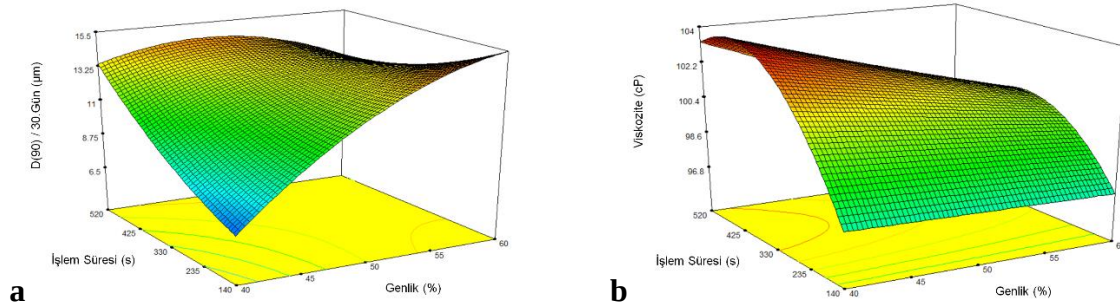
Şekil 4.2c ve 4.2d'de görüleceği üzere emülsiyon viskozite ve stabilite indeks değerleri için çizilen eğriler aynı trendi göstermektedir. Çalışmamızda emülsiyon viskozitesi belirli bir noktaya kadar yükselmiş daha sonra azalmaya başlamıştır. Bu sonuçlarının bir benzeri Santos, Calero ve Muñoz (2016) yaptıkları çalışmada da gözlemlenmiştir. Bu çalışmada rotor-statör ile üretimdeki karıştırma hızının 6.000 rpm'ye kadar artışı ile viskozitenin arttığı ve bu durumun damlacık boyutunun küçülmesi ile ilgili olduğu belirtilirken; 7.000 rpm'de bu eğilim sürmemiştir. 7.000 ve 6.000 rpm karıştırma hızlarında üretilen emülsiyonlar benzer damlacık boyut dağılımları göstermiş, fakat 7.000 rpm ile üretilmiş emülsiyonların viskozitesi daha düşük bulunmuştur (Santos, Calero ve Muñoz, 2016). Özellikle düşük karıştırma hızları ile işlem sürelerinde oldukça düşük viskozite değerleri elde edilmektedir. Bu düşük viskozite değerlerinde üretilen örneklerde hızlı faz ayrılması gözlemlenmiş ve bu örneklerin elektriksel iletkenlikleri de yüksek değerlerde ölçülmüştür. Bu örneklerde, yani çok düşük karıştırma hızı ve işlem süresi ile üretilmeye çalışılan örneklerde kararlı emülsiyonlar elde edilememiş, mekanik işlem yetersiz kalmıştır. Khalid ve diğerleri (2013) askorbik asit yüklü yağ içinde su emülsiyonlarının hazırlanmasında farklı rotor-statör karıştırma hızların etkisini inceledikleri çalışmada, 5.000 rpm'in altındaki değerlerle hazırlanan emülsiyonların stabil olmadığını, çok çabuk faz ayrılması gerçekleştiğini, bu durumun artan karıştırma hızlarında ise ortadan kalktığını belirtmişlerdir (Khalid ve diğerleri, 2013). Viskozite ve stabilite indeksi

değerlerinde belirli bir düzeye kadar gözlemlenen artış, damlacık boyutundaki azalma ile ilişkilendirilebilmektedir. Damlacık boyutunun küçülmesine bağlı olarak viskozitede gözlenen artış, birkaç olası nedene bağlı olabilir. Damlacık boyutunun küçülmesiyle, damlacıklar arasındaki ortalama mesafe kısalır ve bu da damlacıklar arasındaki hidrodinamik etkileşimin artması sebebi ile viskozitede artışa yol açar. Ayrıca, damlacık boyutunun küçülmesiyle dağılmış fazın yüzey alanı artar ve ortalama tanecik damlacık boyutuna göre yüzeyde adsorbe edilmiş yüzey aktif madde tabakasının kalınlığı da oransal olarak önemli hale gelir. Bu durumun da viskozitedeki artışın gerekçelerinden birisi olabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, partikül boyut dağılımının genişliği veya polidispersite, genellikle damlacık boyutunun küçülmesiyle azalır. İnce emülsiyonların daha monodispers yapı sergilediği bilinmektedir. Dağılmış fazın yüksek konsantrasyonlarında, polidispersitedeki düşüşün viskoziteyi artırması beklenir (Pal, 1996).

Bunun yanı sıra, küçük damlacıklar flokülasyona yatkındır. Artan flokülasyon eğiliminin iki temel nedeni olabileceği düşünülmektedir. Birincisi; küçük damlacıkların varlığı, damlacıklar arasındaki çarpışma ve dolayısıyla topaklanma olasılığını arttırır; çok küçük damlacıklar içeren emülsiyonlarda Brownian hareketi ön plana çıkar. İkincisi; damlacıklar van der Waals çekim kuvvetine tabidir ve damlacık boyutunun küçülmesiyle artan yüzey alanını kaplayacak miktarda yüzey aktif madde ortamda mevcut değilse, damlacıklar zayıf bir şekilde stabilize olabilir ve bu da süreçte flokülasyona neden olabilir (Pal, 1996). Bu sayılan mekanizmalar sonucu oluşan flokülasyon, üretilen emülsiyon örneklerindeki damlacık boyutu için ölçülen küçük D(90) değerlerine karşın, stabilite indeksi değerlerindeki göreceli düşmenin sebebi olabilir.

Ultrases homojenizatör ile üretilen emülsiyonların analizleri sonucunda, sadece viskozite ve depolama sonrası D(90) değerlerinde yanıt yüzey eğrileri çizilebilmiştir (Şekil 4.8). Burada işlem süresinin belirleyici olduğu görülmektedir. İşlem süresinin artışı ile viskozitenin yükselmesi açıkça beklenmektedir. Bunun yanı sıra, uzun işlem sürelerinde genliğin artışı ile viskozitenin azalacağı öngörülmüştür. Yüksek genlikte uzun işlem süresi koşullarında düşük damlacık boyutları beklenirken, çarpıcı olan sonuç, en küçük damlacık boyutlarının kısa işlem süresi ile düşük genlikte elde edilmesinin beklenmesidir. Genliğin artışının ve işlem süresinin

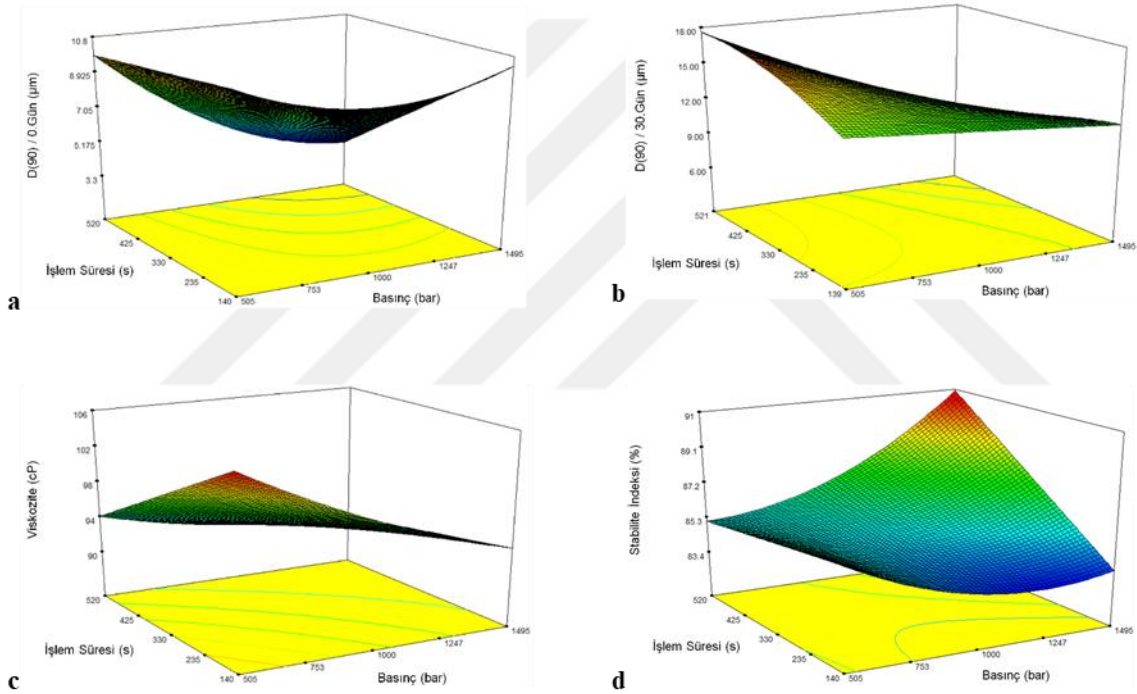
uzamasının mekanik etkiyi ve emülsifikasyon etkisini arttırması beklenirken, sonuçlardan hareketle, ultrases işlemi ile çok kısa sürelerde yeterli etkinin sağlandığı ve bu etkinin arttırılmasının damlacık boyutunda büyümelere neden olduğu söylenebilir. Bu durumun “aşırı işleme”den kaynaklanabileceği düşünülmektedir. “Aşırı işleme”, çok şiddetli mekanik etkiden kaynaklı olarak emülsiyon damlacıklarında görülen birleşmeler ve damlacık boyutunun artışı olarak tanımlanmaktadır. Mevcut durumda, uygulanan güç arttıkça ultrasonik kuvvetlerin (Birincil ve ikincil Bjerknes kuvvetleri) yoğunluğu artacaktır. İkincil Bjerknes kuvveti, emülsiyon damlacıklarını akustik alanın düğümlerine ve anti düğümlerine yönlendirecektir. Damlacıkların bu konumlara daha yakın olması, artan damlacık birleşmesine ve dolayısıyla gözlemlenen "aşırı işleme"ye neden olur. Ek olarak bu sistemde, yüksek güç seviyelerinde üretilen ışın verimi azalır. Bunun sebebi, güç yoğunluğu arttıkça probun altındaki alanda akustik kabarcıkların üretiminin artmasıdır. Bu kabarcık bulutu, çözeltinin geri kalanına ultrasonik enerji iletimini engeller ve dolayısıyla güç iletimi azalır (Kentish ve diğerleri, 2008). Kentish ve diğerleri (2008) yüksek enerji seviyelerinde daha büyük boyutlu damlacıklar elde edildiğini belirtmiştir (Kentish ve diğerleri, 2008). Yine diğer bir çalışmada, optimum noktanın üzerinde uygulanan sonikasyon gücü ve süresinin emülsiyon stabilitesini olumsuz etkilediği saptanmıştır (Hassanshahi, Hu, Lee ve Li, 2023).



Şekil 4.8. Ultrases homojenizatör ile hazırlanmış emülsiyonlarda karıştırma hızı ile işlem süresinin değişiminin (a) 30 gün depolanmış emülsiyonun D(90) değeri ve (b) emülsiyon viskozitesi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.

Yüksek basınç homojenizatör kullanılarak üretilen örneklerle ilgili tüm yanıtlar için yanıt yüzey eğrileri çizilebilmiştir (Şekil 4.9). Şekil 4.9a’da üretimin hemen sonrasında emülsiyonlardaki D(90) değerlerinin değişimi grafiğe yansıtılmıştır. Bu grafikte sonuç oldukça net şekilde görülmektedir ve D(90) değerinin düşürülmesi için yüksek mekanik etki

gerekmektedir. Literatürde basıncın artırılması ve işlem süresinin uzatılması ile damlacık boyutu küçüldüğü görülmektedir (Qian ve McClements, 2011; Tcholakova, Denkov, Sidzhakova, Ivanov ve Campbell, 2003). Lee, Hancocks, Noble ve Norton, (2014) O/W emülsiyonlarının hazırlanmasında kullanılan basıncın 50 MPa'dan 100 MPa'ya yükseltilmesi ile sağlanan yüksek enerji sonucu damlacık boyutunda azalma bildirilmiştir. Fakat aynı çalışmada, akışkanın homojenizatörden 5.kez geçirilmesi sonrasında damlacık boyutunda artışlar saptanmıştır. Yazarlar bunun çalışmada kullanılan cihazın sıcaklık kontrolüne sahip olmamasına ve beş geçişten sonra emülsiyon sıcaklığının başlangıç sıcaklığından yaklaşık 30 °C artmış olmasına bağlamışlardır (Lee, Hancocks, Noble ve Norton, 2014).



Şekil 4.9. Yüksek basınç homojenizatör ile hazırlanmış emülsiyonlarda karıştırma hızı ile işlem süresinin değişiminin (a) taze emülsiyonun D(90) değeri, (b) 30 gün depolanmış emülsiyonun D(90) değeri, (c) emülsiyon viskozitesi ve (d) stabilite indeksi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.

Şekil 4.9c’de verilen grafik ise viskozitenin basınç ve işlem süresine bağlı değişimine dair modelden elde edilen sonuçlardır. Rotor-statör ile elde edilen verilere kıyasla viskozite daha dar bir alanda değişim göstermiştir. Buna göre, basıncın ve işlem süresinin arttırılması ile

viskozite bir miktar azalmaktadır. Bu durum, mekanik etkinin artışı ile sistemdeki flokların azalmasının bir sonucu olabilir. Floküle edilmiş damlacıklar içeren bir emülsiyonlar daha yüksek bir viskoziteye sahiptir (McClements, 2016). Şekil 4.9d’de yüksek basınç homojenizasyonunda basınç ve işlem süresi ile stabilite indeksindeki değişim gösterilmiştir. Burada da yüksek basınç homojenizasyondaki diğer grafiklerde görülen durum saptanmıştır ve mekanik etkinin artışı ile (yüksek basınçta uzun süreli işlem) emülsiyonun kararlılığı artmaktadır. Bu durum 30.gün D(90) grafiği ile de uyumludur (Şekil 4.9b).

Kararlı ve düşük viskoziteli W/O emülsiyonların eldesinde kullanılacak emülsifikasyon işlem koşullarının optimizasyonu için rotor-statör homojenizatörde 5.000-20.000 rpm karıştırma hızı ile 120-600 s işlem süresi aralığında, ultrases homojenizatörde %35-65 genlik ile 60-600 s işlem süresi aralığında ve yüksek basınç homojenizatörde 300-1.700 bar basınç ile 60-600 s işlem süresi aralığında çalışılmıştır. Optimizasyonda, üretilen emülsiyonları viskozitesi, stabilite indeksi değerleri ile üretimin hemen sonrasında ve 30 günlük depolama sonrasında damlacık boyutlarına dair D(90) değerleri yanıt olarak alınmıştır. Optimizasyonda tüm yanıtların önem düzeyi ve ağırlığı eşit kabul edilmiştir. Bu yanıtlardan stabilite indeksi değerinin maksimize edilmesi hedeflenirken, diğer yanıtların minimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla her bir yanıt için sunulan modeller kullanılarak “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” yöntemi ile optimizasyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Optimum işlem koşulları ve istenilirlik fonksiyonu değerleri.

Yöntem	Optimum İşlem Koşulları	İstenilirlik Fonksiyonu Değeri
RS	Karıştırma Hızı: 17.800 rpm Süre: 530 s	0,641
US	Genlik: %39 Süre: 139 s	0,785
HPH	Basınç: 1475 bar Süre: 520 s	0,974

Optimizasyon ve bu amaçla yapılan istatistiksel analizlerde Design Expert Ver. 7.0.0 (Stat-Ease, 2005) kullanılmıştır. Buna göre, rotor-statörde 17.800 rpm karıştırma hızında 530 s emülsifikasyon işlemi, ultrases homojenizatörde %39 genlikte 139 s emülsifikasyon işlemi ve yüksek basınç homojenizatörde 1475 bar basınçta 520 s emülsifikasyon işlemi optimum koşul olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalarda istenilirlik fonksiyonu değerlerinin 0,641-0,974 aralığında değiştiği görülmüştür (Tablo 4.7). Daha sonrasında ise hesaplanan optimum

noktanın deneysel olarak doğrulamasının yapılması amacıyla, belirlenen optimum koşullarda ek üretimler yapılmış ve üretilen emülsiyonlar analiz edilmiştir. Optimizasyonda tahminlenen analiz sonuçları ile deneysel sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiş, karşılaştırmada *t*-testi'nden yararlanılmıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Üç farklı homojenizatör için belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulaması.

Örnek	Yanıt	Tahminlenen Değer	Deneysel Sonuçlar ^a	SH ^b	Fark	%Hata ^c	<i>p</i> -değeri
RS	Viskozite (cP)	94,08	93,13 ± 0,62	0,36	-0,96	1,03	0,117
	D(90) / 0. (µm)	0,77	0,67 ± 0,05	0,03	-0,10	14,61	0,083
	Stabilite indeksi (%)	91,44	93,77 ± 2,07	1,19	2,33	2,48	0,189
	D(90) / 30. (µm)	0,75	0,77 ± 0,04	0,02	0,02	3,17	0,347
US	Viskozite (cP)	97,10	97,52 ± 0,25	0,14	0,41	0,42	0,100
	D(90) / 0. (µm)	4,08	4,07 ± 0,37	0,21	-0,01	0,36	0,955
	Stabilite indeksi (%)	89,29	89,57 ± 1,10	0,64	0,28	0,31	0,703
	D(90) / 30. (µm)	6,09	5,97 ± 0,67	0,38	-0,12	1,95	0,790
HPH	Viskozite (cP)	90,33	90,29 ± 2,06	1,19	-0,04	0,04	0,977
	D(90) / 0. (µm)	3,37	3,55 ± 0,27	0,15	0,18	4,99	0,370
	Stabilite indeksi (%)	90,55	90,08 ± 1,10	0,63	-0,47	0,52	0,538
	D(90) / 30. (µm)	6,93	6,83 ± 1,21	0,70	-0,10	1,41	0,903

^a Ortalama deneysel değer ± standart sapma.

^b Ortalama standart hata.

^c %Hata = $\frac{|y_{deneysel} - y_{tahmin\ edilen}|}{y_{deneysel}} \times 100$

4.3.2. Optimum işlem koşullarında homojenizatörlerin karşılaştırılması

Her bir homojenizasyon yöntemi için ayrı ayrı belirlenmiş olan optimum işlem koşullarında üretilmiş olan emülsiyonların analizleri sonucu elde edilen deneysel sonuçlar Tablo Ek A9'da sunulmuştur. Farklı emülsifikasyon teknikleri ile üretilen emülsiyonların viskozite analizleri sonucunda elde edilen grafikler Şekil Ek A14'de gösterilmiştir. Farklı emülsifikasyon teknikleri ile üretilen emülsiyonların üretim sonrasında ve 30 gün depolama sonrasında elde edilen damlacık boyut dağılımını gösteren grafikler Şekil Ek A15-A16'da sunulmuştur. Rotor-statör ile çok büyük ölçüde monodispers bir dağılım gösteren ve büyük çoğunluğu nanometre düzeyinde olan damlacıklar elde edilmiştir. Bu emülsiyonlardaki damlacık boyut dağılımı da depolama süresince büyük oranda stabil kalmıştır (Tablo Ek A9). Rotor-statör ile üretim sırasında viskozitenin damlacık boyutu üzerinde majör bir etkisi vardır. Viskozitenin

arttırılması, daha verimli bir kuvvet geçişi nedeniyle damlacık parçalanmasını iyileştirebilir (Neumann, Wittstock, van der Schaaf ve Karbstein, 2018). Yüksek basınç homojenizatör ise homojen bir dağılım yakalamak için uygun bulunmuş, ancak damlacık boyutu yeterince azaltılamamıştır (Tablo Ek A9). Yüksek basınç homojenizatör kullanımında, oluşturulan damlacık alanını yeterince hızlı bir şekilde emülgatör ile stabilize edilemezse, damlacık birleşme hızı artar ve dolayısıyla adsorpsiyon kinetiğinin emülsiyon yapısı üzerindeki etkisi önemli hale gelir (Neumann ve diğerleri, 2018). Ultrases homojenizatörle 1 µm düzeylerinde damlacıklar elde edilebilirken, belirgin polidispers bir görünüm oluşmuştur. Bir başka ifadeyle, ultrases işlemi küçük damlacık boyutu üretme potansiyeli taşıyan bir teknik olmakla beraber, homojen boyut dağılımının sağlanması için geliştirilmeye ihtiyaı vardır. Leong ve diğerleri (2017) birincil emülsiyonların hazırlanmasında düşük frekanslı ultrases kullanmış ve benzer şekilde damlacıkların iki modlu bir damlacık boyut dağılımını sergilediğini belirlemiştir. Çalışmada, büyük damlacıklar toplam W_1/O hacminin %90'ından fazlasını oluştururken, daha küçük mikron altı damlacıklar %10'dan daha azını temsil etmiştir. Bu durum, sistem içinde güçlü kayma kuvvetlerinin varlığında boyut küçültme ile eşzamanlı olarak gelişen çarpışmaların sonucu oluşabilmektedir (Leong ve diğerleri, 2017). Bunun yanı sıra, çalışma sonuçlarında ultrases sisteminin diğer sistemlere oranla daha polidispers bir dağılım göstermesinin sebebinin, gücün her noktada homojen dağılamamasından kaynaklanabileceği de düşünülmektedir (Kabakci, Sumnu, Sahin ve Oztop, 2021). Kentish ve diğerleri, (2008) ise sürekli akış sistemine ultrases probu ile gerçekleştirdikleri homojenizasyonu inceledikleri çalışmalarında, akışkanın belirli bir kısmının probun ucundaki "sıcak bölgesi" ile herhangi bir etkileşime girmeden veya düşük düzeyde etkileşime girerek, prob'un etrafından aktığını saptamışlardır. Bu durum, sürekli akışta ultrases ile homojenizasyonda polidispers yapının oluşumunun nedeni olabileceği belirtilmiştir (Kentish ve diğerleri, 2008).

Her 3 teknikle de üretilen emülsiyonların Newton tipi bir akış davranışı gösterdiği görülmektedir (Tablo Ek A9). Viskozite değerleri birbirine yakın olsa da en yüksek viskozite değeri ultrases ile elde edilmiş birincil emülsiyonlarda belirlenmiştir. Emülsiyon stabilitesi göz önüne alındığında rotor-statör ile oluşturulan emülsiyonların stabilitelerinin diğer yöntemlerden daha iyi olduğu saptanmıştır (Tablo Ek A9). Benzer sonuçlar Altuntas ve diğerleri (2017) tarafından da saptanmıştır. Bu çalışmada ultrases, yüksek basınç homojenizatör (mikroakışkanlaştırıcı) ve rotor-statör birincil emülsiyonun oluşturulması için

kullanılmış ve en yüksek stabilite gösteren çift katlı emülsiyonlar rotor-statör ile elde edilmiştir. Bunu mikroakışkanlaştırıcı tipinde olan yüksek basınç homojenizatör ve ultrases takip etmiştir (Altuntas ve diğerleri, 2017).

Çift katlı emülsiyon üretiminde dağılmış faz olarak kullanılacak birincil W/O emülsiyonunun üretiminde uygulanacak emülsifikasyon tekniğinin belirlenmesinde çok kriterli karar verme durumlarında kullanılan istatistiksel yöntemlerden birisi olan, “Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution (TOPSIS)” kullanılmıştır. Deneysel doğrulaması gerçekleştirilmiş 3 farklı optimum işlem koşuluyla üretilmiş olan W/O emülsiyonlarının, optimizasyonda kullanılan hedefler doğrultusunda en uygunu TOPSIS analizi ile seçilmiştir. Kullanılan veri ve yapılan TOPSIS analizi sonucunda elde edilen “görelî yakınlık” değeri Tablo 4.9’da verilmiştir. Görelî yakınlık değeri 1’e çok yakın olan (0,9812) rotor-statör homojenizatörle çalışmaya devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

Tablo 4.9. Optimum koşullarda üretilen emülsiyonların TOPSIS analizinde kullanılan özellikleri ve hesaplanan görelî yakınlık değerleri*.

Örnek	Viskozite (cP)	0.Gün D(90) (µm)	Stabilite İndeksi (%)	30.Gün D(90) (µm)	Görelî Yakınlık (-)
RS	93,13	0,67	93,77	0,77	0,9812
US	97,52	4,07	89,57	5,97	0,1003
HPH	90,29	3,55	90,08	6,83	0,1102

* HPH, yüksek basınç homojenizatör ile optimum koşulda üretilen emülsiyon; RS, rotor-statör homojenizatör ile optimum koşulda üretilen emülsiyon; US, ultrases homojenizatör ile optimum koşulda üretilen emülsiyon.

4.4. Çift katlı emülsiyon üretimi için uygun formülasyonun belirlenmesi

Çift katlı emülsiyonlar Tablo 3.6’da sunulan 3 farklı emülgatör (Crillet™ 1 (T20), Crillet™ 3 (T60) ve Crillet™ 4 (T80)), 3 farklı konsantrasyonda (%0,25, %1 ve %1,75), 3 farklı dağılmış faz oranı ile (%10, %20 ve %30) üretilmiştir. Üretilen emülsiyonların üretim sonundaki bulanıklıkları, elektriksel iletkenlikleri, viskoziteleri ve damlacık boyutları ölçülmüştür. Ölçülen elektriksel iletkenlik değerleri ile “iç faz tutulma etkinliği” hesaplanırken, damlacık boyut dağılımı ölçümleri ile D(90), D[3,2], D[4,3] ve span parametreleri hesaplanmıştır. İç faz tutulma etkinliğinin hesaplanmasında kullanılan standart eğriler Şekil Ek A17’de verilmiştir. Tablo 4.10’da üretilen emülsiyonların analizleri sonucunda elde edilen bulanıklık, iç faz tutulma etkinliği, viskozite ve damlacık boyutu için de D(90), D[3,2], D[4,3], Span listelenmiştir.

Tablo 4.10. Emülsiyon örneklerinin sıcaklık, elektriksel iletkenlik, iç faz tutulma etkinliği, viskozite ve damlacık boyut analiz sonuçları.

Kod*	Bulanıklık (FNU)	İç Faz Tutulma Etkinliği (%)	Viskozite (cP, 200 rpm)	D(90) (µm)	D[3,2] (µm)	D[4,3] (µm)	Span (-)
T20-1	229,5 ± 4,9 ^{b,B}	56,82 ± 1,25 ^{b,A}	1,42 ± 0,02 ^{a,B}	7,64 ± 0,14 ^{cd,B}	2,32 ± 0,02 ^{a,B}	4,10 ± 0,06 ^{b,B}	1,784 ± 1,78 ^{c,d,A}
T20-2	202,5 ± 4,9 ^{a,A}	51,21 ± 2,19 ^{a,A}	1,61 ± 0,00 ^{b,C}	8,27 ± 0,21 ^{e,B}	2,42 ± 0,02 ^{b,C}	4,42 ± 0,09 ^{cd,B}	1,815 ± 0,01 ^{d,A}
T20-3	202,5 ± 0,7 ^{a,B}	53,59 ± 1,88 ^{ab,B}	1,78 ± 0,02 ^{c,C}	7,96 ± 0,07 ^{de,B}	2,63 ± 0,00 ^{d,C}	4,49 ± 0,03 ^{d,c}	1,578 ± 0,00 ^{a,A}
T20-4	407,0 ± 4,2 ^{c,B}	71,75 ± 1,49 ^{de,A}	2,18 ± 0,03 ^{d,B}	8,77 ± 0,20 ^{f,B}	2,76 ± 0,05 ^{e,B}	4,69 ± 0,11 ^{e,B}	1,769 ± 0,00 ^{c,B}
T20-5	446,0 ± 20,3 ^{d,A}	65,46 ± 1,89 ^{c,A}	2,47 ± 0,02 ^{e,C}	7,40 ± 0,07 ^{bc,A}	2,54 ± 0,01 ^{c,B}	4,14 ± 0,01 ^{b,B}	1,598 ± 0,00 ^{a,A}
T20-6	429,5 ± 12,0 ^{cd,A}	66,19 ± 2,19 ^{c,A}	2,71 ± 0,02 ^{f,C}	7,88 ± 0,04 ^{de,B}	2,66 ± 0,01 ^{d,C}	4,40 ± 0,01 ^{cd,C}	1,599 ± 0,01 ^{a,B}
T20-7	521,5 ± 2,1 ^{e,C}	76,78 ± 1,56 ^{e,A}	3,78 ± 0,11 ^{g,B}	7,75 ± 0,11 ^{cd,A}	2,61 ± 0,02 ^{cd,A}	4,27 ± 0,04 ^{bc,A}	1,659 ± 0,01 ^{b,A}
T20-8	674,0 ± 12,6 ^{f,A}	71,81 ± 0,72 ^{de,B}	3,96 ± 0,01 ^{h,C}	7,10 ± 0,09 ^{ab,B}	2,36 ± 0,00 ^{ab,B}	3,90 ± 0,04 ^{a,B}	1,681 ± 0,01 ^{b,A}
T20-9	670,0 ± 8,2 ^{f,A}	70,25 ± 0,83 ^{cd,A}	4,22 ± 0,07 ^{i,A}	6,88 ± 0,17 ^{a,A}	2,30 ± 0,02 ^{a,B}	3,79 ± 0,07 ^{a,B}	1,671 ± 0,03 ^{b,A}
T60-1	195,0 ± 7,1 ^{a,A}	53,68 ± 4,38 ^{b,A}	1,36 ± 0,02 ^{a,A}	5,94 ± 0,13 ^{ab,A}	1,74 ± 0,01 ^{c,A}	3,07 ± 0,04 ^{b,A}	1,924 ± 0,04 ^{b,B}
T60-2	202,0 ± 0,0 ^{a,A}	42,25 ± 3,91 ^{a,A}	1,45 ± 0,00 ^{b,A}	5,71 ± 0,11 ^{a,A}	1,52 ± 0,01 ^{a,A}	2,84 ± 0,04 ^{a,B}	2,094 ± 0,04 ^{c,B}
T60-3	189,5 ± 2,1 ^{a,A}	39,56 ± 4,24 ^{a,A}	1,51 ± 0,01 ^{b,A}	6,16 ± 0,10 ^{abc,A}	1,64 ± 0,01 ^{b,A}	3,09 ± 0,04 ^{b,A}	2,054 ± 0,03 ^{c,C}
T60-4	382,5 ± 9,2 ^{b,A}	66,72 ± 1,42 ^{c,A}	1,97 ± 0,00 ^{c,A}	8,84 ± 0,19 ^{f,B}	2,41 ± 0,05 ^{f,A}	4,41 ± 0,10 ^{e,AB}	2,111 ± 0,01 ^{c,C}
T60-5	425,5 ± 0,7 ^{c,A}	57,37 ± 2,71 ^{b,A}	2,10 ± 0,01 ^{d,A}	7,09 ± 0,16 ^{e,A}	2,29 ± 0,01 ^{e,A}	3,82 ± 0,06 ^{d,A}	1,758 ± 0,03 ^{a,B}
T60-6	436,0 ± 7,1 ^{cd,A}	60,03 ± 1,82 ^{bc,A}	2,31 ± 0,01 ^{e,A}	6,87 ± 0,20 ^{de,A}	2,04 ± 0,02 ^{d,A}	3,60 ± 0,08 ^{c,A}	1,896 ± 0,04 ^{b,B}
T60-7	450,0 ± 9,9 ^{d,A}	77,76 ± 0,10 ^{d,A}	3,28 ± 0,03 ^{f,A}	17,05 ± 0,25 ^{g,C}	2,89 ± 0,01 ^{g,B}	7,45 ± 0,09 ^{f,C}	2,988 ± 0,01 ^{d,C}
T60-8	660,5 ± 9,2 ^{e,A}	68,16 ± 0,97 ^{c,A}	3,71 ± 0,04 ^{g,A}	6,44 ± 0,05 ^{bcd,A}	2,08 ± 0,01 ^{d,A}	3,46 ± 0,02 ^{c,A}	1,779 ± 0,01 ^{a,B}
T60-9	672,0 ± 9,9 ^{e,A}	68,61 ± 1,04 ^{c,A}	4,06 ± 0,06 ^{h,A}	6,58 ± 0,06 ^{cd,A}	2,15 ± 0,00 ^{e,A}	3,56 ± 0,03 ^{c,A}	1,752 ± 0,01 ^{a,A}
T80-1	206,0 ± 2,8 ^{ab,A}	60,77 ± 0,07 ^{b,A}	1,43 ± 0,02 ^{a,B}	7,71 ± 0,10 ^{c,B}	2,49 ± 0,01 ^{e,C}	4,24 ± 0,04 ^{c,B}	1,682 ± 0,00 ^{a,A}
T80-2	215,0 ± 2,8 ^{b,B}	50,88 ± 1,28 ^{a,A}	1,55 ± 0,01 ^{b,B}	7,53 ± 0,26 ^{bc,B}	2,24 ± 0,04 ^{a,B}	4,02 ± 0,12 ^{ab,A}	1,803 ± 0,03 ^{b,A}
T80-3	193,7 ± 5,1 ^{a,A}	53,79 ± 1,10 ^{a,B}	1,67 ± 0,01 ^{c,B}	7,56 ± 0,21 ^{bc,B}	2,23 ± 0,02 ^{a,B}	4,04 ± 0,09 ^{bc,B}	1,792 ± 0,02 ^{b,B}
T80-4	372,0 ± 1,4 ^{c,A}	69,64 ± 1,71 ^{d,A}	2,13 ± 0,02 ^{d,B}	7,54 ± 0,04 ^{bc,A}	2,46 ± 0,02 ^{de,A}	4,09 ± 0,09 ^{bc,A}	1,720 ± 1,72 ^{a,A}
T80-5	440,7 ± 12,4 ^{e,A}	64,04 ± 0,08 ^{c,A}	2,32 ± 0,02 ^{e,B}	7,04 ± 0,14 ^{a,A}	2,27 ± 0,02 ^{ab,A}	3,82 ± 0,06 ^{a,A}	1,732 ± 0,02 ^{a,B}
T80-6	420,0 ± 8,5 ^{d,A}	65,59 ± 1,41 ^{c,A}	2,53 ± 0,00 ^{f,B}	7,63 ± 0,04 ^{bc,B}	2,33 ± 0,01 ^{bc,B}	4,08 ± 0,02 ^{bc,B}	1,797 ± 0,00 ^{b,A}
T80-7	498,0 ± 2,8 ^{e,B}	79,08 ± 0,26 ^{e,A}	3,52 ± 0,03 ^{g,AB}	10,30 ± 0,10 ^{d,B}	2,78 ± 0,04 ^{f,B}	5,17 ± 0,07 ^{d,B}	2,069 ± 0,02 ^{c,B}
T80-8	658,5 ± 14,8 ^{f,A}	71,54 ± 0,26 ^{d,B}	3,85 ± 0,02 ^{h,B}	7,23 ± 0,11 ^{ab,B}	2,40 ± 0,02 ^{cd,B}	3,94 ± 0,04 ^{ab,B}	1,709 ± 0,02 ^{a,A}
T80-9	685,0 ± 4,2 ^{g,A}	70,38 ± 1,05 ^{d,A}	4,22 ± 0,01 ^{i,A}	7,00 ± 0,05 ^{a,A}	2,30 ± 0,00 ^{ab,B}	3,81 ± 0,01 ^{a,B}	1,717 ± 0,02 ^{a,A}

* a-i: aynı harfler aynı emülgatörlerle farklı formülasyonlarda üretilen örnekler arasında fark olmadığını göstermektedir ($p>0,05$). A-C: aynı formülasyonlarla farklı emülgatörler kullanılarak üretilen örnekler arasında fark olmadığını göstermektedir ($p>0,05$). T20, Crillet™ 1; T60, Crillet™ 3; T80, Crillet™ 4.

Tablo 4.10'daki değerler incelendiğinde, çalışma kapsamında incelenen emülgatörlerin genel olarak birbirine yakın davranışlar gösterdiği görülmektedir. Tüm emülgatör ve iç faz oranlarında çift katlı emülsiyonlar başarı ile üretilmiştir. Yang ve diğerleri (2021) çift katlı emülsiyonun üretilmesinde farklı emülgatörlerin kullanımını denedikleri çalışmalarında,

Tween 20 ve Tween 80 ile benzer özelliklerde emülsiyonlar elde ettiklerini belirtmişlerdir (Yang ve diğerleri, 2021). Üretilen emülsiyonlara yapılan damlacık boyutu analizi sonucunda elde edilen damlacık boyut dağılımı grafikleri Şekil Ek A18-A20’de verilmiştir. Dağılım grafikleri incelendiğinde en dar dağılımın T20 ile üretilen emülsiyonlarda elde edildiği saptanmıştır. Bu durumu Span değerleri ile de desteklenmektedir (Tablo 4.10). T20 ile üretilen emülsiyonların genel olarak eşdeğer formülasyonlardaki diğer emülsiyonlardan daha düşük Span değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu durum emülgatör konsantrasyonunun azaldığı ve dağılmış faz oranının arttığı durumlarda daha da belirgindir. Özellikle %30 dağılmış faz ve %0,25 emülgatör konsantrasyonu koşulunda polidispersliğin belirginleşmesi ve temel piklerin yayvanlaşması T60 için çok belirginken, T80’de de gözlemlenmeye başlanmıştır (Şekil Ek A19, A20). Bu değişim Tablo 4.10’daki Span değerlerinden kısmen anlaşılabilmektedir. Özetle, T60 emülgatörü ile bir miktar daha küçük damlacık boyutuna sahip emülsiyonlar üretilebilirken, monodispers ve tekdüze karakter bozulmaktadır. Çoğunlukla, T60 ile üretilen emülsiyonlar eş değerlerinden daha düşük viskozite değerlerine sahipken, T20 ile üretilen emülsiyonlarda daha yüksek viskozite değerleri saptanmıştır (Tablo 4.10). Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi polidispersitedeki azalış viskoziteyi artırıcı bir unsur olabilmektedir (Pal, 1996).

Dağılmış faz konsantrasyonunun ve emülgatör konsantrasyonunun emülsiyon özellikleri üzerinde belirgin etkileri olduğu açıktır. Çalışmada %1 ve % 1,75 emülgatör kullanılan formülasyonlarda damlacık boyutunun, özellikle D(90) değerinin iç faz oranı arttıkça azaldığı saptanmıştır. Jo ve diğerleri (2019) kollajen peptit içeren stabil W/O/W üretmek için farklı emülgatörler ve dış su faz oranları kullandıkları çalışmalarında, D(90) değerlerinin dış su faz oranının artışıyla arttığını saptamışlardır (Jo ve diğerleri, 2019). Damlacık boyut dağılımındaki benzer bir değişim, bu tez çalışmasında da %1 ve %1,75 emülgatör kullanıldığı durumlardaki gözlemlenmiştir (Tablo 4.10).

Damlacık boyut dağılımları incelendiğinde %10 birincil emülsiyon içeren formülasyonlarda damlacık boyutunun en düşük olduğu örnekler en düşük emülgatör içeren 1 numaralı örneklerde saptanırken, T60 ile üretilen emülsiyonların T60-7 dışında aynı formülasyonlarla üretilen emülsiyonlara kıyasla daha düşük damlacık boyutu değerlerine sahip olduğu

belirlenmiştir. Tablo 4.10’da artan dağılmış faz oranı koşullarında ve düşük emülgatör konsantrasyonlarında kimi örneklerde damlacık boyutunda büyümeler görülmüştür. Tüm emülsiyonlardaki D(90) değerleri 2 örnek dışında 8,84 μm ’nin altındayken, T60-7 ve T80-7 örneklerinde sırasıyla 17,05 ve 10,30 μm D(90) değerleri görülmüştür. Bu örnekler emülgatör konsantrasyonunun %0,25 ve dağılmış faz oranının %30 olduğu emülsiyonlardır ve bu sonuçlar, bu koşullarda emülgatör miktarının yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Literatürde de bu gibi durumlarla karşılaşmıştır. Yağ damlacıklarının etrafını etkin şekilde saracak/kaplayacak yeterli emülgatör miktarının olmadığı düşük emülgatör konsantrasyonlarında, damlacıklar arasında birleşmelerin gerçekleşerek ortalama damlacık boyutunun büyümesi ile karşılaşılabilir (Patange ve diğerleri, 2022). Bu durum örneklerdeki polidispersliğin artması ile de uyumludur. Benzer şekilde Wang, Li, Wang ve Özkan, (2010) emülgatör konsantrasyonundaki yükselişle birlikte damlacıkların monomodal dağılımını bildirmiştir (Wang, Li, Wang ve Özkan, 2010).

İç faz tutulma etkinliğinin birincil emülsiyon oranının artması ve aynı formülasyonda genel olarak emülgatör miktarının azalması ile arttığı belirlenmiştir. Jo ve diğerleri (2019) artan dış su fazı oranı ile enkapsülasyon etkinliğinin azaldığını saptamıştır. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Yazarlar bu durumu şu kararsızlık mekanizmaları ile açıklamıştır: (a) dış su damlacıkların kaybına neden olan yağ filminin yırtılması; (b) su ve suda çözünür maddelerin her iki su fazı arasındaki yağ tabakasından geçişi. Bu fenomen, lipofilik emülgatör tarafından oluşturulan ters misel taşıma ve ozmotik farklılıklarla bağlantılı olarak yağ fazı boyunca basit difüzyon ile her iki su fazı arasında meydana gelebilir. Ayrıntılı olarak, peptit salımı, iç su fazı ve dış su fazı (başlangıçta %0) arasındaki peptit konsantrasyon gradyanının sonucu olabilir. Bu konsantrasyon gradyanını dengelemek için peptitler, yağ fazından dış su fazına yayılabilir. Bu yönlendirilmiş difüzyon, dış su fazında kritik bir peptit konsantrasyonuna ulaşıldığında sona erecektir. Dış su fazının oranı ne kadar yüksek olursa, bu kritik konsantrasyonu elde etmek için o kadar fazla peptit molekülü gerekir. Tersine, bu, daha fazla molekülün iç su fazından dışarı yayılması gerektiği anlamına gelir, dolayısıyla yüksek dış su fazı oranı, daha düşük enkapsülasyon etkinliğine sebep olacaktır (Jo ve diğerleri, 2019). Yang ve diğerleri (2021), istiridye peptit çözeltisi içeren birincil emülsiyonlarla farklı dağılmış:sürekli faz oranlarında çift katlı emülsiyonlar üretmişler ve en

iyi enkapsülasyon sonuçlarını en yüksek iç faz oranında belirlenmişlerdir (Yang ve diğerleri, 2021). Ying ve diğerleri (2021), soya peptitlerini çift katlı emülsiyonlarda enkapsüle etmişler ve farklı dağılımı:sürekli faz oranlarını çalışmışlardır. Yazarlar artan iç faz oranı ile artan damlacık boyutları elde etmişler, ancak bu tez çalışmasındaki bulguların aksine, nispeten daha düşük enkapsülasyon verimliliği belirlemişlerdir (Ying ve diğerleri, 2021). Çalışmada emülgatör olarak oktenil süksinat anhidrit modifiye nişasta ve maltodekstrin gibi esasen duvar materyali olarak kullanılan malzemelerle çalışılmış ve bu malzemelerin kullanımındaki konsantrasyon değişimleri çalışma kapsamında değerlendirilmemiştir. Bu durum, ilgili çalışmada elde edilen sonuçların, yüksek iç faz oranlarında emülgatör miktarının/konsantrasyonunun yetersiz kalmasından ve/veya emülgatör olarak kullanılan malzemelerin emülgatör niteliklerinin yetersiz olmasından/hiç bulunmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Yüksek iç faz oranında emülgatör miktarının artışı ile enkapsülasyon etkinliği azalmış damlacık boyutu artmıştır. En yüksek iç faz tutulma etkinliği %30 birincil emülsiyon ve %0,25 emülgatör oranı ile üretilen formülasyonlarda belirlenmiştir. Bu formülasyonlarda emülgatörler arasındaki iç faz tutulma etkinliği değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer sonuçların Matos, Gutiérrez, Coca ve Pazos (2014) altını çizmiştir. Bu çalışmada, Tween 20 konsantrasyonundaki artışın ortalama damlacık boyutunun küçülmesi nedeniyle başlangıç enkapsülasyon etkinliğinde düşüşe neden olduğunu belirlemiştir. Bu durum, yükselen konsantrasyonda hidrofilik emülgatörün yağ filminin yırtılmasına yol açması ve iç su damlacıklarının salımının kolaylaşması ile açıklanmıştır (Matos, Gutiérrez, Coca ve Pazos, 2014). Çalışmamızda artan damlacık boyutu ile enkapsülasyon etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun bir sebebi, daha büyük emülsiyon damlacıklarının, peptit transferi için gerekli yüzey alanını azaltması ve enkapsülasyon veriminin artmasına katkıda bulunmasıdır (Giroux ve diğerleri, 2016). Benzer sonuçlar azokazein ve kolojen peptit çözeltisinin çift katlı emülsiyon tekniği ile enkapsülasyonunda da saptanmıştır (Giroux ve diğerleri, 2016; Jo ve diğerleri, 2019).

Tüm örneklerde ise birincil emülsiyon oranının artması ile türbidite artmıştır. Damlacık boyutu, emülsiyonun bulanıklığını ve beyazlığını etkileyen en önemli faktörlerdendir ve daha yüksek bulanıklık, daha küçük emülsiyon damlacık boyutlarının sonucu olabilir (Li ve diğerleri, 2023; Linke ve Drusch, 2016). Li ve diğerleri (2023) düşük molekül ağırlıklı istiridye peptitleri yüklü çift katlı emülsiyonlarda küçük damlacık boyutuna sahip emülsiyonların daha yüksek bulanıklığa ve beyazlığa sahip olduğunu saptamıştır (Li ve diğerleri, 2023). Benzer sonuçlar, bu tez çalışmasında üretilen aynı birincil emülsiyon miktarı ile hazırlanmış örnekler için de geçerlidir. Özellikle 7 numaralı formülasyon ile üretilen emülsiyonlarda bariz bir şekilde gözlemlenmektedir. Bu emülsiyonlarda oldukça yüksek D(90) değerleri saptanırken, bulanıklık değerleri aynı iç faz oranına sahip diğer örneklerle kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktür. Şekil Ek A21’de üretilen çift katlı emülsiyonların mikroskop fotoğrafları verilmiştir. Özellikle mikroskopla elde edilen mikrograflar, damlacık boyut analiz sonuçlarını destekler niteliktedir.

Emülsiyonların viskozitelerinin birincil emülsiyon oranından emülgatör oranına göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir (Tablo 4.10). Jo ve diğerleri (2019), W/O/W emülsiyonlarının viskozitesinin iç veya dış su fazlarının hacim fraksiyonuna bağlı olduğunu göstermiştir (Jo ve diğerleri, 2019). Benzer şekilde, bu çalışmada da birincil emülsiyon oranının azalması ile viskozitede azalma saptanmıştır.

Sonuç olarak; elde edilen tüm bu veriler, damlacık boyut artışının enkapsülasyon etkinliğini arttırdığını, fakat damlacık boyutu artışı ile emülsiyon özelliklerinin kötü etkilendiğini göstermektedir. Bu sebeple, elde edilen verilerle ideal emülsiyon ve enkapsülasyon özelliklerine sahip, en uygun formülasyonun saptanması için TOPSIS yöntemi kullanılmıştır. Çalışma kapsamında üretilen 27 örnekle, belirlenen yanıtlar ve farklı ağırlıklarla 3 farklı TOPSIS değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir. İlk yapılan ve Tablo 4.11’de sunulan analizde, 27 emülsiyonun tamamı çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 4.11. Çift katlı emülsiyonların formülasyonlarının belirlenmesinde kullanılan deneysel veriler ve TOPSIS analizinde elde edilen göreceli yakınlık değerleri*.

Emülgatör	$\Phi W/O$ (%)	ΦE (%)	Kod	Bulanıklık (FNU)	Enkapsülasyon Verimi (%)	Göreceli Yakınlık (-)
Crillet™ 1 (Tween 20)	%10	%0,25	T20-1	229,5	56,82	0,208
		%1,00	T20-2	202,5	51,21	0,136
		%1,75	T20-3	202,5	53,59	0,161
	%20	%0,25	T20-4	407,0	71,75	0,525
		%1,00	T20-5	446,0	65,46	0,529
		%1,75	T20-6	429,5	66,19	0,528
	%30	%0,25	T20-7	521,5	76,78	0,719
		%1,00	T20-8	674,0	71,81	0,912
		%1,75	T20-9	670,0	70,25	0,885
Crillet™ 3 (Tween 60)	%10	%0,25	T60-1	195,0	53,68	0,129
		%1,00	T60-2	202,0	42,25	0,040
		%1,75	T60-3	189,5	39,56	0,000
	%20	%0,25	T60-4	382,5	66,72	0,462
		%1,00	T60-5	425,5	57,37	0,470
		%1,75	T60-6	436,0	60,03	0,502
	%30	%0,25	T60-7	450,0	77,76	0,613
		%1,00	T60-8	660,5	68,16	0,865
		%1,75	T60-9	672,0	68,61	0,876
Crillet™ 4 (Tween 80)	%10	%0,25	T80-1	206,0	60,77	0,231
		%1,00	T80-2	215,0	50,88	0,140
		%1,75	T80-3	193,7	53,79	0,160
	%20	%0,25	T80-4	372,0	69,64	0,465
		%1,00	T80-5	440,7	64,04	0,533
		%1,75	T80-6	420,0	65,59	0,511
	%30	%0,25	T80-7	498,0	79,08	0,689
		%1,00	T80-8	658,5	71,54	0,898
		%1,75	T80-9	685,0	70,38	0,899

* $\Phi W/O$, dağılmış faz:sürekli faz oranı; ΦE , emülgatör konsantrasyonu.

Bu analizde iç faz tutulma etkinliği değeri, çalışmanın devamındaki enkapsülasyon çalışmaları açısından temel teşkil ettiği için 0,5 ağırlıkla ve emülsiyon kararlılığını iyi temsil ettiğine karar verilen bulanıklık 0,5 ağırlıkla kullanılmıştır. Burada her iki değerinden maksimizasyonu hedeflenmiştir. 2.denemede (sonuçları verilmedi) ise tüm örneklerle çalışılırken, iç faz tutulma etkinliği 0,6 ağırlıkla, bulanıklık 0,2 ağırlıkla, D(90) değeri 0,15

ağırlıkla ve viskozite 0,05 ağırlıkla incelenmiştir. Ek olarak incelenen D(90) ve viskozite değerlerinin minimum olması hedeflenmiştir. Üçüncü denemede ise (sonuçlar verilmedi) yapılan analizler ve yorumlar doğrultusunda 6 emülsiyon örneği (T20-4, T20-7, T60-4, T60-7, T80-4, T80-7) TOPSIS değerlendirmesine, bulanıklık ve damlacık boyut dağılımı analizlerinden alınan sonuçlardan hareketle dahil edilmemiştir. Kalan 21 emülsiyon örneği ile hedeflenen özellikler açısından TOPSIS incelemesi yapılmıştır. Burada da iç faz tutulma etkinliği, bulanıklık, D(90) değeri ve viskozite sırasıyla 0,6, 0,2, 0,15 ve 0,05 ağırlıklarla analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen tüm TOPSIS analizlerinde T20-6 örneği en yüksek göreceli yakınlık değeri ile (analiz sırasıyla 0,912, 0,827 ve 0,872) seçilmiştir. Tablo 4.11’de sunulan TOPSIS göreceli yakınlık değerleri de, incelenen değişkenler içerisinde dağılmış faz oranının en belirleyici faktör olduğunu, onu emülgatör konsantrasyonunun izlediğini göstermiştir. Kullanılan emülgatörler birbirine yakın etkiler göstermekle beraber, görece daha fazla tekdüze damlacık boyutu oluşturan Crillet™ 1 (Tween 20) emülgatörünün diğerlerinden biraz daha fazla öne çıktığı belirlenmiştir. Sıvı formda çift katlı emülsiyonun üretilmesinde, %30 dağılmış faz oranının ve %1 Crillet™ 1 (Tween 20) konsantrasyonunun kullanılması ile kararlı ve iç faz tutulma etkinliği yüksek bir çift katlı emülsiyon elde edilmiştir.

4.5. İkinci homojenizasyon adımının optimizasyonu

İki aşamalı çift katlı emülsiyon hazırlama yöntemindeki ikinci emülsifikasyon adımı sırasında, dış damlacık kırılması ve birleşmesi, iç damlacıkların salımı, şişme veya büzüşme ve aşırı şişerek parçalanma gibi farklı fenomenler nedeniyle kararsızlık meydana gelebilir. Bu olgular, emülsifikasyon cihazının enerji dağılımı tarafından yönetilir. Bu nedenle, verimi arttırmak için ikinci aşamadaki homojenizasyon enerjisi ve süresi genellikle düşürülür, bu da iç damlacıklara kıyasla daha büyük dış damlacıklara yol açar. Bununla birlikte, ince dış damlacıklar, kremleşmeyi önlemek, böylece depolama sırasında stabiliteyi arttırmak veya nihai ürünün şeffaflığını arttırmak gibi başka avantajlara sahiptir. Bu nedenle enkapsülasyon oranını en üst düzeye çıkarmak ve aynı zamanda fiziksel stabilitesini sağlamak için bu aşamanın optimize edilmesi gerekmektedir (Khadem ve Sheibat-Othman, 2019). Buna rağmen literatürde bu ikinci emülsifikasyon yönteminin optimizasyonuna ya da parametrelerin etkisine yönelik sınırlı sayıda çalışmaya ulaşılabilmektedir (Bilati, Allémann ve Doelker, 2003; Jamshidi ve diğerleri, 2020; Khadem ve Sheibat-Othman, 2019; Li ve diğerleri, 2023).

Optimizasyon amacıyla CCRD deneme tasarımına göre 13 adet W/O/W üretilmiştir (Tablo 3.7). Emülsiyonların bulanıklık, elektriksel iletkenlik, iç faz tutulma oranı ve damlacık boyut parametreleri analiz edilmiştir. Aynı zamanda, kullanılan ultrases homojenizatörden elde edilen enerji tüketim değerleri ile üretilen emülsiyonların işlem sonu sıcaklıkları da kaydedilmiştir. Üretilen W/O/W emülsiyonlarının analizleri sonrasında elde edilen sonuçlar Tablo Ek A10 ve A11’de verilmiştir. Üretilen emülsiyonların damlacık boyut dağılım grafikleri ise Şekil Ek A22’de gösterilmiştir.

US işlem optimizasyonunun yapılmasının faydalı olacağı görüşünün oluşumuna neden olan, US işlem şiddetinin arttırılması ile emülsiyon kararlılığının arttığı, ancak iç faz tutulma etkinliğinin azaldığı şeklindeki deneysel gözlemimizdir. Bundan dolayı, emülsiyon kararlılığını temsil etmek üzere damlacık boyut dağılımı parametreleri (D(90) ve D[4,3] değerleri) ile iç faz tutulma etkinliği değeri optimizasyonda yanıt olarak alınmıştır. Bu üç parametre iki farklı değişimi temsil ettiğinden, emülsiyon kararlılığının ağırlığı ile iç faz tutulma etkinliğinin ağırlığı eşit alınmıştır. Çift katlı emülsiyon üretimindeki ikincil emülsiyonun oluşturulması aşamasında uygulanan US işlem koşullarının optimizasyonu için %20-60 genlik ile 20-180 s işlem süresi aralığında çalışılmıştır.

Uygulanan deneme deseni doğrultusunda belirlenen yanıtlar ve bu doğrultuda elde edilen deneysel veri, çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş ve her bir yanıt için işlem değişkenlerine bağlı ikinci dereceden denklemler oluşturulmuştur. Oluşturulan modellerin deneysel verilerle uyumu için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Her bir faktörün yanıtlar üzerindeki doğrusal, ikinci dereceden ve interaksiyon etkilerinin önemi *F*-testi (Fischer testi) uygulanarak belirlenmiştir. Belirlenen 3 yanıt için her bir işlem değişkeninin her bir yanıtta doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden etkilerini gösteren ANOVA tabloları Tablo Ek A12’de verilmiştir.

Elde edilen ve ANOVA tabloları Tablo Ek A12’de paylaşılan modellerin deneysel verilerle uyumluluğuna, model regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı ($Adj-R^2$), tahminlenmiş hata kareler toplamı (PRESS), tahminlenmiş çoklu regresyon katsayısı ($Pre-R^2$) ve yeterli kesinlik (Adeq.Precision) değerlerine bakılarak karar verilmiştir ($R^2 > 0,9$; $|Adj-R^2 -$

Pre- $R^2 < 0,2$; max.PRESS ; Pre- $R^2 > 0,7$; Adeq.Precision > 4). Bu aşamada Tablo Ek A12’de sonuçları verilen tüm regresyon modellerinin %94,4’ün üzerinde güven seviyesinde önemli olduğu görülmektedir. Ancak, diğer model istatistiklerine bakıldığında, 3 farklı model üretilmiş ve bu modellerin istatistikleri içerisinde iki modelin “*lack of fit*” değerlerinin 0,1’in altında ve önemli olduğu, 1 modelin ise Pred- R^2 değerlerinin %70’in altında olduğu görülmüştür. Bu veriler model istatistiğinin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır ve bunun için modelde bulunan önemsiz terimlerin model hiyerarşisine uygun olarak çıkartılması gerekmektedir (Mayers ve diğerleri, 2009; Salum, Erbay, Kelebek ve Selli, 2017). Buna göre, Tablo Ek A12’de p -değeri 0,1’den büyük olan model parametreleri istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiş ve model hiyerarşisine zarar vermeden modellerden çıkarılarak belirlenen modellerin etkinliği artırılmıştır.

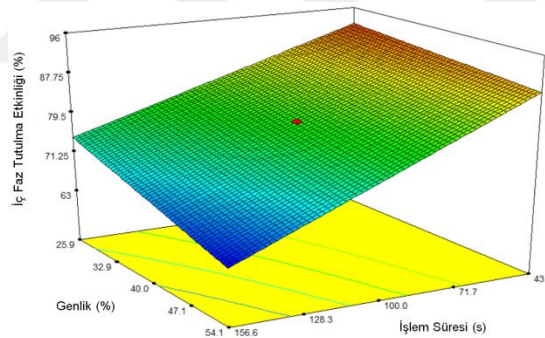
Etkinliği artırılarak belirlenmiş olan son modellerin katsayılarının da bulunduğu ANOVA sonuçları Tablo 4.12’de verilmiştir. Buna göre, tüm modellerin varyasyonun büyük bir kısmını açıkladığı görülmektedir ($R^2 > 0,94$). Aynı zamanda R^2 ile Adj- R^2 arasındaki farkın %2’nin altında olması modelin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini gösterirken, Pred- R^2 değeri ile Adj- R^2 değerleri arasındaki farkın %20’nin altında olması (belirlenen modellerde %12,5’in altında çıkmıştır), “*Lack of fit*” değerlerinin 0,1’in üzerinde olması (en düşük değer 0,129) ve Adeq.Precision değerinin 4’ten büyük olması (belirlenen modellerde en düşük değer 21,361 olmuştur) belirlenmiş olan modellerin tahminleme açısından istatistiksel olarak uygun olduğunu göstermektedir.

Elde edilen 3 modelin tamamında incelenen iki faktörün de doğrusal etkisinin önemli bulunmuştur. Bununla beraber, modellerden sadece birisinde (iç faz tutulma etkinliği) iki faktörün interaksiyon etkisinin model açısından önem taşıdığı belirlenmiştir. Faktörlerin interaksiyon etkisinin önemli olduğu “iç faz tutulma etkinliği” yanıtında, işlem değişkenlerinin yanıt üzerine etkisinin görsel olarak da belirlenebilmesi için yanıt yüzey grafiği çizilmiştir (Şekil 4.10).

Tablo 4.12. W/O/W emülsiyon üretimindeki US işlem koşullarının optimizasyonunda, her bir yanıt için belirlenmiş kodlanmış değerler için model katsayıları (anlamlı olmayan terimler modelden çıkartıldıktan sonra).

Kaynak*	İç Faz Tutulma Etkinliği (%)		D (90) (μm)		D [4,3] (μm)	
	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı	p-değeri	Katsayı
Model	<0,0001	79,87	<0,0001	8,03	<0,0001	4,48
x ₁	<0,0001	-10,81	<0,0001	-2,08	<0,0001	-1,09
x ₂	<0,0001	-3,63	0,0015	-0,90	0,0010	-0,48
x ₁ x ₂	0,0002	-1,81	-	-	-	-
x ₁ ²	-	-	0,0047	0,79	0,0161	0,32
x ₂ ²	-	-	-	-	-	-
Lack of Fit	0,2299		0,1293		0,1312	
R ²	0,9970		0,9407		0,9433	
Adj-R ²	0,9960		0,9209		0,9244	
Pred-R ²	0,9911		0,7962		0,8109	
Adeq Precision	95,345		21,361		21,708	
PRESS	9,44		9,95		2,43	
C.V.	0, 75		6,66		6,08	

* x₁, genlik (%); x₂, işlem süresi (s).



Şekil 4.10. Çift katlı emülsiyon hazırlanmasında kullanılan US genlik ve işlem süresi faktörlerinin değişiminin emülsiyonda iç faz tutulma etkinliği üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği.

Şekil 4.10'da da görüleceği üzere, çift katlı emülsiyon üretiminde kullanılan US işleminde, işlem süresinin ve genliğin azaltılması, iç faz tutulma etkinliğini artırmaktadır. Bu artışta, işlem süresinin daha belirgin bir etki gösterdiği, özellikle yüksek genlik koşullarında işlem süresinin artışının iç faz tutulma etkinliğini çok belirgin şekilde azalttığı görülmektedir. Çalışma kapsamında incelenen minimum US işlem süresinde, maksimum iç faz tutulma etkinliği elde edilirken, bu işlem süresinde genliğin değişiminin etkisi önemsiz düzeylerde

kalmaktadır. Yine de, genel anlamda maksimum iç faz tutulma etkinliği için minimum işlem süresi ile minimum genlik koşullarında çalışılması gerektiği Şekil 4.10'dan anlaşılmaktadır. Benzer şekilde Khadem ve Sheibat-Othman (2019) da enkapsülasyon etkinliğinin, sonikasyon süresi arttıkça azaldığını bildirmiştir (Khadem ve Sheibat-Othman, 2019). Li ve diğerleri (2023) yaptıkları çalışmada ise sadece ultrasonik gücün etkisini incelemişler ve gücün artmasıyla, çift katlı emülsiyonun emülsiyon aktivite indeks değerinin önce arttığının ve sonra düşme eğilimi gösterdiğini belirlemişlerdir (Li ve diğerleri, 2023).

Standart O/W veya W/O emülsiyonlarında, damlacık boyutunun büyümesi emülsiyon kararlılığını olumsuz etkilemektedir ve damlacık boyutunun küçültülebilmesi için temel yöntem emülsifikasyon için uygulanan mekanik etkinin şiddetinin artırılmasıdır. Tez çalışmasında üretilen model incelendiğinde, damlacık boyutunun işlem süresi ile doğrusal bir ilişkisinin olduğu ve bu ilişkinin negatif olduğu görülmektedir (Tablo 4.12). Uzayan sonikasyon süresi veya artan güç ile üretilen ikincil emülsiyonun damlacık boyutunun düştüğü daha önce de saptanmıştır (Bilati ve diğerleri, 2003; Li ve diğerleri, 2023). Ancak, çift katlı emülsiyon üretiminin ikinci aşamasındaki homojenizasyon işlemi sırasında artan şiddet uygulamaları ile iç fazın salımı artmakta, bu durum artan elektriksel iletkenlik ile gözlemlenmekte ve iç faz tutulma etkinliği düşmektedir. Ultrases homojenizasyonu, sıvı damlasının arayüzünde deformasyon kuvvetleri uygulayan farklı ölçeklerdeki türbülanslı girdaplar yaratmaktadır. Damla boyunca dinamik basınç farkı kohezyon kuvvetlerini aştığında, sıvı damlası parçalara ayrılır. Parçalanma, daha az viskoz olan (iç su damlacıkları içeren) zayıflatılan rotayı tercih eder. Parçalanma, kohesif ve dispersif kuvvetler dengeye ulaşana kadar devam edecektir. Peptit çözeltisinin birincil emülsiyonda süreksiz bölgeler oluşturması olasıdır. Bu süreksiz bölgeler sıvı damlasını zayıflatabilir ve bu nedenle parçalanma yolları iç su damlaları üzerinde olabilir. Bu süreç ikincil emülsifikasyon sırasında artan parçalanmaya yol açar. Parçalanma ikincil emülsifikasyon sırasında peptitlerin ortama sızmasına neden olarak daha düşük bir enkapsülasyon etkinliğine neden olabilir. Enkapsülasyon etkinliğini etkileyebilecek diğer bir faktör, birincil emülsiyon damlacığı ile ikincil emülsiyon damlacığı arasındaki boyut oranıdır. Oran arttıkça, parçalanma yolu boyunca iç su damlacıklarının bulunma olasılığı artar ve bu da daha büyük bir protein kaybına neden olur. Yüksek enkapsülasyon verimliliği sağlamak için, iki aşamalı emülsifikasyon

yöntemleri kullanıldığında, ikincil emülsiyonun damlacık boyutu birincil emülsiyon damlacıklarının boyutunun en az 10 katı olması istenmektedir (Maa ve Hsu, 1997).

Çalışmanın bu aşamasındaki optimizasyonda, üretilen emülsiyonlardaki iç faz tutulma etkinliği, $D(90)$ ve $D[4,3]$ değerleri yanıt olarak alınmıştır. Bu yanıtlardan iç faz tutulma etkinliği değerinin maksimize edilmesi hedeflenirken, $D(90)$ ve $D[4,3]$ değerlerinin minimizasyonu amaçlanmıştır. Optimizasyonda yanıtlar iki grup olarak ele alınmış ve ağırlıkları buna göre belirlenmiştir. Burada, iç faz tutulma etkinliği ile damlacık boyutu analiz sonuçlarının toplam ağırlıklarının eşit olması kurgulanmıştır. Bu doğrultuda, $D(90)$ ve $D[4,3]$ parametrelerinin ağırlığı eşit ve iç faz tutulma etkinliğinin bireysel ağırlığının yarısı olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu doğrultuda, katsayıları Tablo 4.12’de verilen model kullanılarak “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” yöntemi ile optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon ve bu amaçla yapılan istatistiksel analizlerde Design Expert Ver. 7.0.0 (Stat-Ease, 2005) kullanılmıştır. İstenilirlik fonksiyonu yöntemi ile her bir emülsifikasyon tekniğinde elde edilen optimum çalışma koşulları ile hesaplanan istenilirlik fonksiyonu değerleri Tablo 4.13’de verilmiştir. Buna göre, %54 genlikte 66 saniyelik bir US işlemi optimum koşul olarak hesaplanmıştır. Bu koşullardaki istenilirlik fonksiyonu değerleri ise 0,626 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.13. Çift katlı emülsiyon üretilmesindeki US uygulaması için optimum işlem koşulları ve istenilirlik fonksiyonu değeri.

Yöntem	Optimum İşlem Koşulları	İstenilirlik Fonksiyonu Değeri
US	Genlik: %54 Süre: 66 s	0,626

Daha sonrasında ise, hesaplanan optimum noktanın deneysel olarak doğrulamasının yapılması amacıyla, belirlenen teorik optimum koşullarda ek üretimler yapılmış ve üretilen emülsiyonlar analiz edilmiştir. Yapılan doğrulama üretim ve emülsiyon özellikleri analizleri ile elde edilen deneysel sonuçların istatistiksel analizleri Tablo 4.14’de paylaşılmıştır. Ayrıca doğrulama amacıyla üretilmiş olan 3 emülsiyonun damlacık boyut dağılımları grafik olarak da Şekil Ek A23’de verilmiştir.

Tablo 4.14. Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulanması.

Yanıt	Tahminlenen Değer	Deneysel Sonuçlar ^a	SH ^b	Fark	%Hata ^c	<i>p</i> -değeri
İç Faz Tutulma Etkinliği (%)	83,78	84,08 ± 0,14	0,09	0,30	0,35	0,09
D (90)	8,66	8,74 ± 0,35	0,20	0,08	0,92	0,73
D [4,3]	4,76	4,93 ± 0,21	0,12	0,17	3,43	0,29

^a Ortalama deneysel değer ± standart sapma.

^b Ortalama standart hata.

$$^c \%Hata = \frac{|y_{deneysel} - y_{tahmin\ edilen}|}{y_{deneysel}} \times 100$$

Doğrulama üretim ve analiz sonuçlarına göre, doğrulama üretimleri sonrasındaki analizler sonucunda elde edilen ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla, iç faz tutulma etkinliği için %84,08 ± 0,14, D(90) değeri 8,74 ± 0,35 µm ve D[4,3] değeri 4,93 ± 0,21 µm olarak bulunmuştur. Bu değerler, teorik optimizasyon sonucunda tahmin edilen değerlere oldukça yakın değerlerdir. Aynı zamanda, yapılan *t*-testi de tahmin edilen teorik değerlerle deneysel değerlerin istatistiksel olarak farklı olmadığını göstermektedir (*p*-değeri>0,05).

Sonuç olarak, çift katlı emülsiyon üretiminin ikinci basamağı olan ikincil emülsiyonların hazırlanmasında kullanılan US işleminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda yapılan optimizasyonla, %54 genlik değerinde 66 saniyelik bir US işlemiyle üretilen emülsiyonların iç faz tutulma etkinliğinin %71,8'den %84,1'e yükseldiği ve önemli ölçüde geliştiği görülmektedir. Buna karşın, belirlenen optimum işlem koşulunda D(90) değerinin 7,10 µm'den, 8,74 µm'ye, D[4,3] değerinin ise 3,90 µm'den 4,93 µm'ye yükseldiği belirlenmiştir. Emülsiyon hazırlanmasının gerekçesi biyoaktif kazein hidrolizatının enkapsülasyonu olması nedeniyle, iç faz tutulma etkinliğinin artırılması, işlemin uygulanma gerekçeleri açısından büyük önem taşımaktadır ve optimizasyonla beraber önemli bir ilerleme kaydedilebilmiştir.

4.6. Çift katlı emülsiyonların püskürtmeli kurutulmasında uygun duvar materyallerinin belirlenmesi.

4.6.1. Ön denemeler

Çift katlı emülsiyonların toza dönüştürülmesi amacıyla ilk olarak ön denemeler gerçekleştirilmiştir. W₁/O/W₂ yapısında oluşturulan çift katlı emülsiyonların dış su fazı olan

W₂ için farklı polimerik çözeltiler kullanılmış ve enkapsülasyonda bu polimerik çözelti bileşenlerinin duvar malzemesi olarak işlev görmesi beklenmiştir. Ön denemelerde kullanılan duvar materyalleri ve kısaltmaları Tablo 3.8’de verilmiştir. Polimerik çözeltide karbonhidrat:protein oranı konjugasyonda kullanılan oran ile aynı olması için 4:1 olarak seçilmiştir. Püskürtmeli kurutma işlem koşulları için bu aşamada sabit işlem koşulları kullanılmıştır. Beslenecek çift katlı emülsiyondan üretilmesi beklenen tozun, yüksek yağlı tozlar grubuna girecek olmasından ötürü, benzer şekilde yüksek yağ içeriğine sahip bir toz ürün olan mikroenkapsüle krema tozu üretimindeki optimum püskürtmeli kurutma işlem koşulları kullanılmıştır (Himmetagaoglu, Berktaş, Cam ve Erbay, 2020). Buna göre, püskürtmeli kurutucuya beslenecek olan örneğin besleme sıcaklığı 45 °C, püskürtmeli kurutma giriş hava sıcaklığı 163 °C, aspirasyon oranı %80 ve püskürtmeli kurutucu çıkış hava sıcaklığı 70 °C olarak belirlenmiştir. Bu işlem koşullarını sağlamak üzere besleme debisi her bir örnek için ayarlanmıştır.

Çalışma kapsamında püskürtmeli kurutucuda yapılan ön üretim denemeleri Tablo 4.15’de verilmiştir. Buna göre, öncelikle bir önceki aşamalarda belirlenen şekilde W₁/O birincil emülsiyon hazırlanmıştır. Çift katlı emülsiyon üretimlerinde W₁/O/W₂ yapısının dış su fazı olan W₂’nin yerine farklı polimerik çözeltiler ilave edilmiştir. Püskürtmeli kurutucuya beslenen çift katlı emülsiyon miktarı ise, yüksek miktarda ürün beslenmesinden kaynaklanabilecek olumsuzlukları ortadan kaldırmak için (emülsiyon üretimlerinde kullanılan hacimler de gözetilerek) sabitlenmiş ve 90 mL ile sınırlandırılmıştır.

Tablo 4.15’de gösterilen ön üretim denemesi No.1’de polimerik çözelti konsantrasyonu olarak %20 belirlenmiştir. Öncelikle, 12 farklı formülasyonla (NaC-Lac, NaC-MD, NaC-GA, WPC-Lac, WPC-MD, WPC-GA kombinasyon ve konjugat olarak) çift katlı emülsiyonlar hazırlanarak kurutma işlemleri denenmiştir. Ancak, bu formülasyon ve püskürtmeli kurutma işlem koşullarında herhangi bir toz eldesi gerçekleşmemiştir. Püskürtmeli kurutucunun gövde bölgesinde ıslaklık, hatta kurutma kabininin iç yüzeyinde kurutma esnasında ürünün sıvı halde akması ve çıkış sıcaklığının ölçüldüğü siklon giriş bölgesinde yapışmış halde (topak veya sakız formunda) ürün birikimi gözlemlenmiştir. Bu gözleme dair birer örnek görüntü Şekil 4.11’de sunulmuştur. Gıda tozlarında yapışmanın sorumlusu genellikle karbonhidratlar

olarak görülse de yüksek yağlı tozlarda yapışkanlık olgusu güçlü bir şekilde serbest yani enkapsüle edilememiş yağ içeriği ile ilgili olduğu bilinmektedir (Coumans, Kerkhof, Brink ve Otten, 1998; O’Callaghan ve Hogan, 2013). Karbonhidratlar ile ilişkili yapışkanlık, nem içeriği ve sıcaklıktan güçlü bir şekilde etkilenen lastiğimsi (devamında camsı) bir durumda sergilenirken, yağlarla ilişkili yapışkanlık türü genellikle erime davranışını içerir (O’Callaghan ve Hogan, 2013). Bu formülasyonla toz ürün elde edilmesi durumunda bile, tozun yağ oranının %57,4 gibi yüksek bir oran olması beklendiğinden, kurumada gözlemlenen sorunun yağ kaynaklı olabileceği varsayılmıştır. Bundan dolayı, beslemenin yağ içeriğini düşürmek üzere, ikincil emülsiyondaki dağılmış faz oranı azaltılarak çift katlı emülsiyonlar üretilmiş ve toza dönüştürülmeye çalışılmıştır (ön üretim denemesi No.2 ve No.3).

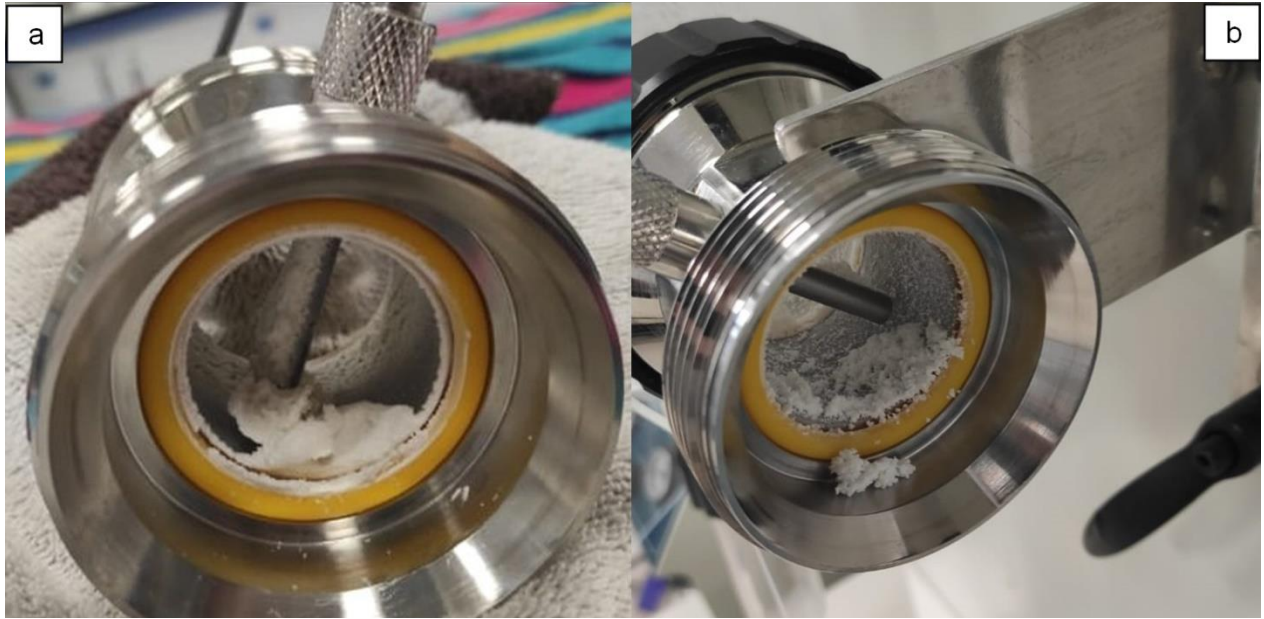
Tablo 4.15. Toz elde edilebilmesi amacıyla, çift katlı emülsiyonların kurutulması kapsamında yapılan ön deneme üretimleri*.

No	Kullanılan Polimerik Çözelti Bileşimi	Dağılmış Faz Oranı (%)	Emülsiyon KM’si (%)	Toz Teorik Yağ İçeriği (%)	Üretilen Toz Miktarı (g)	Nozul çapı (mm) / NHD (-)
1	Tüm formülasyonlar	30	37,3	57,4	-	0,7 / 7
2	NaC-MD	20	31,5	45,2	0,01	0,7 / 7
3	NaC-MD	10	25,8	27,7	5,94	0,7 / 7
4	NaC-MD	30	37,3	57,4	-	0,4 / 7
5	NaC-MD	30	37,3	57,4	0,08	0,4 / 12
6	NaC-MD	20	31,5	45,2	0,52	0,4 / 12
7	NaC-MD	20	35,5	40,1	10,23	0,4 / 12
8	NaC-MD	20	39,5	36,1	14,94	0,4 / 12

* Kullanılan kısaltmalar: KM, kurumadde; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; NHD, nozul hava debisi.

Ön üretim denemesi No.2’de dağılmış faz oranı %20 ve ön üretim denemesi No.3’de dağılmış faz oranı %10 olarak ayarlanmıştır. Bu ön deneme üretimlerinde sadece NaC-MD ile üretimler gerçekleştirilmiş ve toz elde edilip edilemediği belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan üretimler sonucunda, 90 mL çift katlı emülsiyonun püskürtmeli kurutucuya beslenmesi sonucunda (ön üretim No.2’de %31,5; No.3’de %25,8 KM) ön üretim No.2’de 0,01 g, ön üretim No.3’de ise 5,94 g toz elde edilmiştir. Elde edilen toz miktarı ve kurumadde değerlendirildiğinde, kurutma randımanı oldukça düşük olmakla beraber, ön üretim No.2’de %20 dağılmış faz oranı ile beslenen emülsiyonda toz oluşumunun gözlemlenmiş olması bir

veridir ve yağ içeriğinin önemini ortaya koymaktadır. %10 dağılmış faz ile yapılan üretimde ise kurutma randımanı %24,3'tür ve bu oran düşük olmakla beraber yine de laboratuvar tipi cihazların kullanıldığı koşullarda kabul edilebilirdir. Ancak, bu formülasyonun hem düşük miktarda kazein hidrolizati içermesi hem de enkapsülasyon açısından önemli olan iç faz tutulma etkinliğinin düşük olması, mecbur kalınmadığı sürece tercih edilmemesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu sebeple toz eldesinin sağlanabildiği %20 dağılmış faz oranında kurutma randımanını arttırmaya yönelik çözümler üretilmeye odaklanılmıştır.



Şekil 4.11. Çift katlı emülsiyonların püskürtmeli kurutulmasında kurutma kabini çıkışı ile siklon girişi arasında (çıkış hava sıcaklığının ölçüldüğü bölge) gözlemlenen sakızımsı (a) ve lor benzeri topaklı (b) yapışma görünümü.

Kurutma sırasında kurutma kabinde ıslanmanın gözlenmesi, temelde kurutma kabine gönderilen damlacığın yeterince hızlı ve etkin şekilde kuruyamadığını gösterir ve kuruma hızının artırılması ile çözümlenmeye çalışılmıştır. İlk olarak, damlacıkların etkin şekilde kabin içerisine atomize edilememiş olması olasılığına odaklanılmıştır. Bunun en önemli nedeni, sisteme beslenen emülsiyonun kurumadde içeriğinin ve viskozitesinin yüksek olmasıdır. Çift katlı emülsiyonunun dış su fazına polimerik çözelti ilavesi ile viskozitede önemli artışlar gözlemlenmiştir. Ayrıca, ön deneme üretimlerinde beslenen çift katlı emülsiyonların kurumadde içerikleri de %25,8-39,5 aralığında değişmiştir. Yüksek viskozite, Reynolds sayısını düşürür ve ayrıca sıvı jeti veya levhada herhangi bir doğal kararsızlığın

gelişmesini engeller. Kombine etki, damlacıkların parçalanmasını geciktirerek artan damla boyutlarına yol açar (Bhandari ve diğerleri, 2009). İki akışkanlı nozullar olarak da bilinen pnömatik nozullar, çift girişli hava ve sıvı akışlarına sahip bir borudan oluşur. Sıvı besleme, nozul gövdesinin içindeki veya dışındaki hava ile karıştırılabilir. Pnömatik nozullarla, sıvı besleme akışı, genellikle sıkıştırılmış hava olan ikinci bir akış temas ettiğinde damlacıklara bölünür ve normalde 20 ile 60° arasında değişen bir açıyla bir püskürtme modeline yol açar. Hava akışı, sıvı beslemenin parçalanmasına ve atomizasyona sebep olan sıvı yüzeyler üzerinde yüksek sürtünme kuvvetleri oluşturur. Pnömatik nozul ile sprey kurutma; düşük viskoziteli bir besleme, düşük ortalama damlacık boyutuna ve yüksek homojenliğe neden olurken, yüksek viskoziteli bir besleme, daha yüksek ortalama damlacık boyutuna ve daha düşük homojenliğe yol açacaktır. Aslında, viskozite ve yüzey gerilimi, sıvıyı atomize etmek için gereken enerji miktarını artırır ve bu özelliklerden herhangi birindeki artış tipik olarak damla boyutunu artırır. Fakat bu cihazlar oldukça esnektir ve gaz:sıvı oranını yada nozul çapını değiştirerek damla çapının manipüle edilmesini sağlar. Basınçlı havanın akış hızını ayarlayarak atomizasyon etkinliğini arttırmak mümkündür (O’Sullivan ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, kurutma kabinine gönderilen damlacıkların etkin atomize edilemediği, yeterince büyük yüzey alanına sahip olmadığı ve kuruma hızının bundan dolayı düşük kaldığı varsayılarak, önce cihazda kullanılan nozulun delik çapı küçültülmüş, sonra ise cihazın nozul hava debisi (NHD) 7’den, kullanılan nozul ile maksimum düzey olan 12’ye yükseltilmiştir. Kullanılan püskürtmeli kurutucu sisteminde üretici firma tarafından ürünle birlikte standart olarak sunulan nozulun delik çapı 0,7 mm’dir. Karşılaşılan bu durum nedeniyle ek nozul tedarik edilmiş ve 0,4 mm çaplı nozul sisteme yerleştirilerek yeni bir ön üretim denemesi (No.4) gerçekleştirilmiştir.

Bu ön deneme üretiminde, nozul kaynaklı değişimin etkisinin daha net görülebilmesi için, kabinde ıslanmanın en yoğun görüldüğü ve hatta kabin iç yüzeyinde sıvı akışının belirlendiği formülasyon (%30 dağılmış faz oranı) kullanılmıştır. %30 dağılmış faz ile emülsiyon üretilmiş ve diğer tüm değişkenler sabit tutularak emülsiyon sisteme beslenmiştir. Bu üretimde kısmi bir gelişme gözlemlenmiş, ancak toz elde edilememiştir. Gözlemlenen gelişme, kurutma esnasında kurutma kabini iç yüzeyinde sıvı halde ürün akışının olmamasıdır. Buna karşın, hafif bir nemlenme yine de gözlemlenmiş ve özellikle siklon girişindeki sıcaklık ölçümü yapılan bölgede yapışmış halde (topak veya sakız formunda) ürün

birikimi olmuştur, yani toz elde edilememiştir. Yine de gözlemlenen kısmi gelişmeden hareketle, kurutma kabinine gönderilen damlacık çapını küçültme çapası arttırılmış ve NHD değeri 7'den 12'ye çıkartılarak aynı formülasyon ve işlem koşullarında yeni bir ön üretim yapılmıştır (No.5). Bu üretimde kurutma kabininde nemlenme sorunu gözlemlenmemiş ve çok düşük miktarda da olsa toz ürün elde edilebilmiştir (0,08 g). Kurutmada randıman sorununun en yoğun gözlemlendiği nokta ise, siklon girişindeki çıkış sıcaklığının da ölçüldüğü yerdir ve burada ciddi miktarda yapışmış halde (topak veya sakız formunda) ürün birikimi olmuştur. Bu noktada artık toz elde edebilir hale gelinmiş, ancak çalışılması makul olmayan düşük bir kurutma randımanının olduğu saptanmıştır.

Düşük kurutma randımanı sorununun nedenine getirilen yorum; kurutma esnasında kullanılan duvar materyali miktarının, yağ damlalarını sarmaya yetmemesi olmuştur. Püskürtmeli kurutma sırasında buharlaşma hava-sıvı veya hava-katı arayüzlerinde meydana geldiğinden, enkapsüle edilmemiş ya da kurutma esnasında bozulan emülsiyonlardan açığa çıkan yağ moleküllerinin, proteinleri veya karbonhidratları aşarak hidrofobik yapıları nedeniyle toz parçacıklarının dış yüzeylerine yerleşme eğiliminde olduğu bilinmektedir (O'Callaghan ve Hogan, 2013). Tez çalışmasında karşılaşılan kurutma randımanı sorununun temelinde bunun yattığı varsayılarak, bu sorunun çözümü için kabuk/merkez (shell/core) oranının arttırılması denenmiştir. Bir başka ifadeyle, çift katlı emülsiyondaki birim dağılmış faza karşılık olarak kullanılan duvar materyali miktarının arttırılması denenmiştir. Burada 2 seçenek vardır; yağ dağılmış faz oranı azaltılacaktır (ki %20'nin altına inmek uygun görünmemektedir) ya da polimerik çözeltinin konsantrasyonu arttırılacaktır (ki bu da besleme kurumaddesini ve viskoziteyi arttırdığından atomizasyon etkinliğini yeniden düşürecektir). Özetle, kabuk/merkez oranının arttırılmasının önünde de önemli sınırlar bulunmaktadır. Yapılan son ön üretimlerde %30 dağılmış faz oranı ve %20 polimerik çözelti konsantrasyonu ile yeterli randıman elde edilememiştir. Bu koşullarda besleme kurumaddesi %37,3, toz teorik yağ oranı ise %57,4 iken, kurumaddenin arttırılması mümkün görünmediğinden, tek çare olarak dağılmış faz oranı, çalışılması kabul edilebilecek minimum oran olan %20'ye indirilmiştir. Ön üretim No.6'da %20 dağılmış faz ve %20 polimerik çözelti konsantrasyonu ile çalışılmış (besleme kurumaddesi %31,5; toz yağ içeriği %45,2) ve 90 mL'lik beslemedeki toz üretimi 0,52 g'a yükselmiştir. Üretilen toz miktarından bağımsız olarak, ön üretim No.5 için

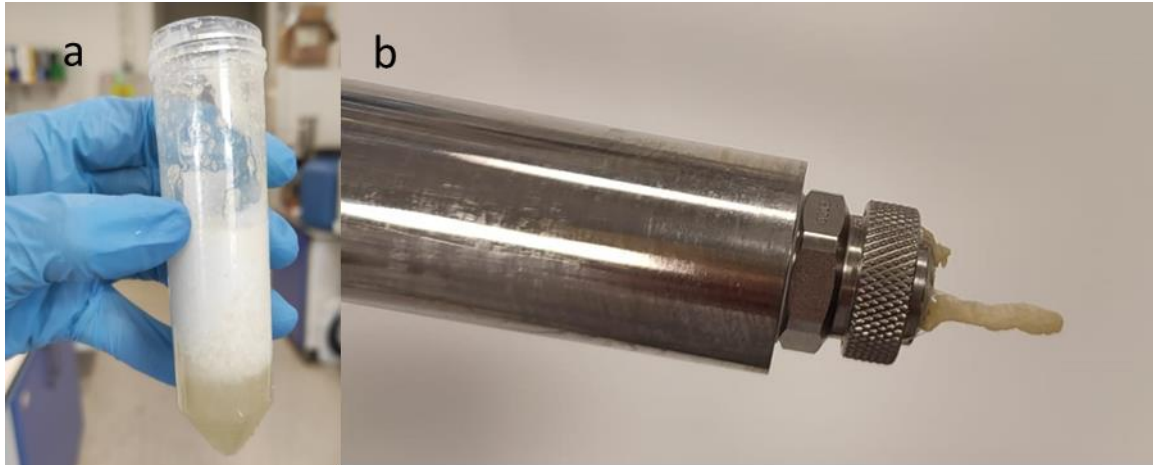
hesaplanan kurutma randımanı %0,2 iken, bu değer dağılmış faz oranının azaltılması ile %1,7'ye yükselmiştir. Dağılmış faz oranı azaltıldığından, besleme kurumaddesi azalmış ve polimerik çözeltinin konsantrasyonunu arttırmak artık mümkün hale gelmiştir. Bundan dolayı, ön üretim No.7'de %20 dağılmış faz ile %25 (besleme kurumaddesi %35,5; toz yağ içeriği %40,1), ön üretim No.8'de ise %30 polimerik çözelti konsantrasyonları (besleme kurumaddesi %39,5; toz yağ içeriği %36,1) denenmiştir.

Bu şekilde ön üretim No.7'de 10,23 g toz elde edilerek kurutma randımanı %30,4'e yükseltilmiş; ön üretim No.8'de ise 14,94 g'lık toz eldesi ile kurutma randımanı %39,9'a çıkmıştır. Yüksek yağ içeriğine sahip bir toz için, laboratuvar tipi püskürtmeli kurutucularda %30'un üzerinde kurutma randımanı elde etmek oldukça makul bir değerdir (Himmetagaoglu ve diğerleri, 2020; Salum, Berktaş, Cam ve Erbay, 2022). Kurutma randımanı üzerinde pek çok faktörün etkili olduğu bilinmekle beraber, kullanılan püskürtmeli kurutucunun kapasitesinin randıman üzerinde belirleyici bir etkiye sahip olduğu da literatürde vurgulanmaktadır. Özellikle laboratuvar tipi düşük kapasiteli püskürtmeli kurutucularda randıman çok düşüktür ve bu tip kurutuculardaki randımanın endüstriyel tiplerle değil, kendi muadilleriyle kıyaslanması gerekmektedir (Ahmad, Kausmann, Imtiaz-ul-Islam ve Langrish, 2013; Langrish, Marquez ve Kota, 2006; Salum, Berktaş, ve diğerleri, 2022). Ek olarak yağ içeriği yüksek olan beslemelerin de yapışma eğilimi ile düşük yoğunluğu nedeniyle randımanı düşük olmaktadır (Langrish ve diğerleri, 2006; Salum, Berktaş, ve diğerleri, 2022). Bu açılardan değerlendirildiğinde %30'un üzerindeki kurutma randımanlarını çalışmamız açısından iyi kabul etmek gerekmektedir. Laboratuvar tipi püskürtmeli kurutucular kullanılarak yüksek yağ içeriğine sahip olan tozların üretimine yönelik literatür bilgisi değerlendirildiğinde, krema tozu üretiminde kurutma randımanı %12,2-42,9 aralığında (Himmetagaoglu ve diğerleri, 2020), yağlı süt tozu üretiminde ise %28,4-72,6 aralığında (Nese, Palugan, Cerea ve Pinto, 2020) değiştiği görülmüştür. Özetle, bu aşamada elde edilen sonuçlar literatürle de uyumlu görünmektedir.

Yukarıda da ifade edildiği üzere, ön üretim deneme No.8'de elde edilen kurutma randımanı başarılı bulunduğu için, bu formülasyonla (%20 dağılmış faz oranı ve %30 polimerik çözelti konsantrasyonu) devam edilmeye karar verilmiştir. Ön üretim deneme No.2-8 aralığında sadece NaC-MD kombinasyonu ile çalışılmışken, ön üretim No.8'in koşulları tüm çalışılması

düşünülen duvar materyali bileşenleri için denenmiştir. Bu kapsamda, konjugat üretimleri de gerçekleştirilmiş ve duvar materyali olarak ön üretimlerde kullanılmıştır. Yapılan 12 ön üretim denemesi (ön üretim deneme No.8-19 aralığı), bu üretimler sonucu 90 mL emülsiyondan üretilen toz miktarları, kurutma randımanları ile emülsiyon aşamasından ve tozun rekonsitüe edilmesi sonrasında alınan örneklerin mikroskop görüntüleri Tablo Ek A13'te sunulmuştur.

Üretilen 12 formülasyondan 2 tanesi (No.10, NaC-GA; No.16, NaC-GA-K), püskürtmeli kurutucu sistemde bulunan peristaltik pompa ile beslenebilmesine karşın, çok kısa sürede nozul çıkışında katılaşarak nozulu tıkanmıştır. Bu tıkanma nedeniyle, üretimlerden birisinde nozul temizleme iğnesi kırılmış, diğerinde ise eğilmiştir. Bu durumu göstermesi açısından, çift katlı emülsiyonun sürekli fazı olması için hazırlanan NaC-GA çözeltisinin bir fotoğrafı Şekil 4.12a'da gösterilmiştir. Bu fotoğraftaki falkon tüpünün üstünde görünen köpük katılaşmış, tanecikli bir haldedir. Ayrıca, nozul tıkanmasına dair bir fotoğraf da Şekil 4.12b'de sunulmuştur. Bu fotoğraf NaC-GA ile yapılan bir üretim sırasında yaşanan nozul tıkanması sonrasında, sistem soğutulduktan sonra nozul ucunun görünümüdür. Çözelti nozul ucundan püskürtülememiş, yer çekimi etkisiyle uzamış ve katılaşmıştır. Özetle, bu 2 duvar materyali bileşenleri ile bu çalışılan formülasyonlarda elde edilen emülsiyonun, çalışmada kullanılan laboratuvar tipi püskürtmeli kurutucu ile kurutma kabinine atomizasyonu mümkün olamamıştır.



Şekil 4.12. (a) NaC-GA çözeltisinin görünümü, (b) püskürtmeli kurutulmasında yaşanan nozul tıkanmasına dair bir görünüm (iğne görünümünde uzayan, katılaşmış çözeltidir, nozul iğnesi nozulun içerisindedir).

WPC-Lac-K ile gerçekleştirilen ön üretim No.17’de kurutma kabinde ıslanma gözlemlenmiş ve bu koşullarda herhangi bir toz eldesi mümkün olmamıştır (Tablo Ek A13). Bunların yanı sıra, ön üretim No.11 (WPC-Lac), No.12 (WPC-MD) ve No.18’de (WPC-MD-K) ise toz elde edilebilmiş, ancak 90 mL’lik emülsiyon beslenmesi ile elde edilebilen toz miktarı 0,25-0,52 g aralığında kalmıştır. Buna göre bu üretimlerdeki kurutma randımanı %0,7-1,4 aralığında değişmiştir (Tablo Ek A13). Bu üretimlerde gözlemlenen, kurutma kabini çıkışı ile siklon girişindeki bölgede ürünün sakızımsı bir görünümde birikmesidir. Yukarıdaki açıklanan üretimler dışındaki 6 üretimde ise (No.8, NaC-MD; No.9, NaC-Lac; No.13, WPC-GA; No.14, NaC-Lac-K; No.15, NaC-MD-K, No.19, WPC-GA-K) hem görünüm açısından uygun tozlar hem de randıman açısından makul yüzdeler elde edilebilmiştir. Bu 6 üretimde 90 mL’lik emülsiyon beslenmesiyle 7,13-14,94 g aralığında toz, %19,1-39,9 aralığında kurutma randımanı ile üretilmiştir (Tablo Ek A13).

4.6.2. Uygun duvar materyallerinin belirlenmesi

Ön üretim denemeleri sonucunda; %20 dağılmış faz oranına sahip ve %30 polimerik çözelti içeren çift katlı emülsiyonların üretilerek püskürtmeli kurutucuya beslenmesi kararlaştırılmıştır. Mikroenkapsülasyon amacıyla farklı duvar materyali bileşenlerinin, farklı formlarda kullanılarak en uygununun belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, sürekli fazında (W₂) 6 farklı formülasyonda duvar materyali bulunan (NaC-Lac, NaC-MD, WPC-GA, NaC-Lac-K, NaC-MD-K ve WPC-GA-K) çift katlı emülsiyonlar üretilmiş ve bu emülsiyonlar püskürtmeli kurutma ile toza dönüştürülmüştür. Hem üretilen emülsiyonlar, hem de tozlar analiz edilmiştir. Toza dönüştürme amacıyla üretilmiş 6 formülasyondaki çift katlı emülsiyonun yanı sıra, sürekli fazında (W₂) herhangi bir duvar materyali kullanılmadan üretilen çift katlı emülsiyonlar da “kontrol” örneği olarak emülsiyon özellikleri açısından analiz edilmiştir. *In vitro* sindirim sonrası biyoaktif özellikleri açısından incelenen tozlarda mikroenkapsülasyon etkisinin incelenebilmesi için de, içerisinde kazein hidrolizati bulunmayan her bir duvar materyali formülasyonunda birer örnek “kontrol” olarak üretilmiş ve biyoaktivite açısından analiz edilmiştir. Bu amaçla, iç su fazında (W₁) kazein hidrolizati bulunmayan, ancak sürekli fazında (W₂) farklı formülasyonlarda duvar materyali bulunan çift katlı emülsiyonlar üretilmiş ve bu emülsiyonlar püskürtmeli kurutma ile toza dönüştürülmüştür. Bir başka ifadeyle, *in vitro* sindirim sonrası 12 toz örneğin biyoaktivitesi incelenmiştir (6 farklı duvar materyali formülasyonu ile üretilen örnekler ve onların her birisi için birer kontrol toz örneği).

4.6.2.1. Farklı duvar materyalleri ile üretilmiş çift katlı emülsiyonların özellikleri

Tablo 4.16’da emülsiyonların elektriksel iletkenlik, pH ve bulanıklık ölçümlerinin yanı sıra, emülsiyon hazırlanmasının hemen sonrasında yapılan sıcaklık ölçüm sonucu da verilmiştir. Aynı zamanda, çift katlı emülsiyonun sürekli fazı (W₂) olarak kullanılan polimerik çözeltilerin bireysel etkilerini de gözlemleyebilmek için, bu çözeltilerin her birisinin elektriksel iletkenlik ve pH değerleri de ölçülerek Tablo 4.16’da verilmiştir. WPC-GA ve WPC-GA-K polimerik çözeltilerinin ve bunların emülsiyonlarının diğerlerine kıyasla daha düşük pH değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu emülsiyonlardaki yapının diğerlerine göre daha floklu olmasının gerekçelerinden birisinin bu durum olabileceği düşünülmektedir (Şekil Ek A24). Benzer şekilde Fechner ve diğerleri (2007) düşük pH’da (pH=4) konjugat ve protein ilavesi ile ürettikleri emülsiyonlarda floklu görünümün oluştuğunu bildirmişlerdir (Fechner ve diğerleri, 2007). Polimerik çözeltinin ilavesi ile bulanıklık artmıştır. Polimerik çözelti ilavesi ile elde edilen emülsiyonlar karşılaştırıldığında bulanıklık sonuçları ile damlacık boyutu değerleri arasında ilişki gözükmemektedir. Tezin önceki bölümünde ifade edildiği üzere, bulanıklık ile D[4,3] değerleri arasında negatif korelasyon saptanmıştı. Bu durum, tez çalışmasının bu aşaması sonuçlarıyla da uyumludur.

Tablo 4.16. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların elektriksel iletkenlik, pH, sıcaklık ve bulanıklık değerleri.*

Örnek	Eİ ($\mu\text{S/s}$)		pH (-)		Bulanıklık (FNU)	T (°C)
	Çözelti	Emülsiyon	Çözelti	Emülsiyon	Emülsiyon	Emülsiyon
Kontrol	-	209	-	8,00	413,0 $\pm$ 25,5 ^a	31,2
NaC-Lac	1376	963	7,20	7,19	494,0 $\pm$ 15,6 ^b	31,4
NaC-MD	2808	797	7,09	7,20	502,7 $\pm$ 21,4 ^b	31,4
WPC-GA	4610	1897	5,31	5,56	516,3 $\pm$ 23,9 ^b	33,5
NaC-Lac-K	1137	1076	6,97	7,10	525,0 $\pm$ 2,8 ^{bc}	30,8
NaC-MD-K	1137	786	6,96	6,85	500,5 $\pm$ 17,7 ^b	31,6
WPC-GA-K	4080	3320	5,80	5,42	567,5 $\pm$ 30,4 ^c	33,6

* Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-c) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır ($p>0,05$). “Çözelti” olarak ifade edilen, duvar materyali çözeltisidir ve emülsiyon formülasyonuna katılmadan önce analiz edilmiştir. Kullanılan kısaltmalar: Eİ, Elektriksel iletkenlik; GA, Gam Arabik; K, Konjugat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; T, Sıcaklık; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi.

İncelenen çift katlı emülsiyonların damlacık boyut dağılımı analizleri sonucunda elde edilen sonuçlar 2 tablo halinde sunulmuştur (Tablo 4.17 ve Tablo Ek A14). Bunun yanı sıra, emülsiyonların damlacık boyut dağılımları Şekil Ek A25’de birlikte verilmiştir. Polimerik çözelti ilavesi ile birlikte damlacık boyutlarında düşüş yaşanmıştır (Tablo 4.17). WPC-GA ve WPC-GA-K kullanılarak üretilen emülsiyonlarda Span değeri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir. Bu durum, Şekil Ek A25’de de gözlemlenebilmektedir. Bunun sebebi, bu sistemde damlacıkların bir kısmının serbest bir şekilde dağılmasından, bir kısmının ise dağıtılması oldukça zor olan floklar halinde bulunmasında kaynaklanması olasıdır (Tablo Ek A13). Tablo 4.17’de görüldüğü üzere konjugatların kullanılması ile D(90) ve D[4,3] değerlerinde düşüşler gözlenmiştir. Bu düşüş, en çarpıcı olarak WPC-GA emülsiyonlarında saptanmıştır. Bunun yanı sıra, konjugasyon ile WPC-GA ile hazırlanan emülsiyonlarda polidisperslik azalmıştır. Fechner ve diğerleri (2007), B12 vitamininin iç su fazından (W₁) dışa salımını azaltmak için, sodyum kazeinat (SC)–dekstran konjugatlarını çift katlı emülsiyonların hazırlanmasında kullanmışlardır. Çalışmada protein yerine konjugatın kullanılması ile daha küçük damlacık boyutuna ve dar bir damlacık boyut dağılımına sahip W/O/W emülsiyonları üretilmiştir. Fakat bu çalışmada kontrol sisteminde konjugatı oluşturan diğer öge olan dekstirin ilavesi gerçekleşmemiştir (Fechner ve diğerleri, 2007). Bir diğer çalışmada WPI-durian tohumu gamı ile stabilize edilen çift katlı emülsiyonların konjugasyon sonrası ortalama damlacık boyutlarının küçüldüğü ve damlacık boyut dağılımının daraldığı gözlemlenmiştir (Tabatabaee Amid ve Mirhosseini, 2014). Ayrıca, bezelye protein izolatu ve pektin konjugatı ile stabilize edilen çift katlı emülsiyonlarda, doğal pektin ve Tween 80 içeren diğer emülsiyonlardan daha küçük damlacık boyutları saptanmıştır (Tamnak ve diğerleri, 2016).

Tablo 4.17. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların damlacık boyutuna dair elde edilen ölçüm sonuçları.*

	Örnek*	D(90) (µm)	D[3,2] (µm)	D[4,3] (µm)	Span (-)
Emülsiyon	Kontrol	9,08 ± 0,12 ^d	3,54 ± 0,03 ^e	5,31 ± 0,06 ^d	1,390 ± 0,008 ^a
	NaC-Lac	3,35 ± 0,03 ^c	1,22 ± 0,00 ^c	1,87 ± 0,01 ^b	1,607 ± 0,014 ^{ab}
	NaC-MD	2,90 ± 0,00 ^{ab}	0,94 ± 0,00 ^{bc}	1,52 ± 0,00 ^a	1,841 ± 0,000 ^b
	WPC-GA	9,92 ± 0,01 ^e	0,92 ± 0,01 ^b	3,24 ± 0,02 ^c	6,629 ± 0,174 ^d
	NaC-Lac-K	3,28 ± 0,02 ^{bc}	1,18 ± 0,01 ^d	1,81 ± 0,00 ^b	1,633 ± 0,006 ^{ab}
	NaC-MD-K	2,94 ± 0,06 ^a	0,98 ± 0,00 ^c	1,56 ± 0,02 ^a	1,767 ± 0,037 ^b
	WPC-GA-K	2,99 ± 0,19 ^{ab}	0,70 ± 0,01 ^a	1,39 ± 0,14 ^a	3,108 ± 0,182 ^d

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-e) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır ($p>0,05$). Toz ve emülsiyonlar kendi içinde istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Kullanılan kısaltmalar: GA, Gam Arabik; K, Konjugat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi.

Çalışma kapsamında üretilen ve incelenen çift katlı emülsiyonların viskozite değerlerinin değişimi Tablo 4.18’de verilmiştir. Viskozite hesaplamalarında oluşturulan denklemler ve yapılan lineerizasyon işlemlerinde elde edilen grafikler ise Şekil Ek A26’da sunulmuştur. Kontrol emülsiyon ile kıyaslandığında polimerik çözelti ilavesi ile akış davranışındaki kayma ile incelme özelliği artmıştır. NaC-MD ve NaC-Lac içeren formülasyonlarda konjugasyon ile görünür viskozitede artış gözlemlenmiştir. Protein-karbonhidrat konjugatı, görece büyük molekül ağırlığına sahip stabil bir hibrit polimerdir. Bu hibrit polimer, büyük molekül ağırlığı nedeniyle viskoziteyi kolayca artırabilir (Tabatabaee Amid ve Mirhosseini, 2014). Benzer sonuçlar WPI ve durian tohumu gamı kullanılarak oluşturulan çift katlı emülsiyonlarda da saptanmıştır. WPI-durian tohumu gamı konjugasyonu, W/O/W emülsiyonunun viskozitesini önemli ölçüde artırmıştır. WPI’nin durian tohumu gamının moleküler yapısına bağlanması, daha yüksek viskoziteye neden olan daha büyük molekül ağırlığına sahip hibrit polimer oluşumuna bağlanmıştır (Tabatabaee Amid ve Mirhosseini, 2014). O’Regan ve Mulvihill (2010) yaptıkları çalışmada farklı oligosakarit zincir uzunluğuna sahip iki konjugat ile hazırladıkları çift katlı emülsiyonlarda, zincir uzunluğundaki artış ile daha yüksek görünür viskozite ve kayma ile incelme davranışını belirlemiştir. Bu durum laktoz ve maltodekstrin konjugatları arasındaki kıvam katsayısı ve akış davranış indekslerinde de görülmektedir (O’Regan ve Mulvihill, 2010).

Tablo 4.18. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların viskozite analiz sonuçları.*

Örnek	Akış Davranış İndeksi (-)	Kıvam Katsayısı (Pa.s ⁿ)	Viskozite (cP)
Kontrol	0,894 ± 0,054 ^d	0,045 ± 0,013 ^a	-
NaC-Lac	0,683 ± 0,006 ^c	0,830 ± 0,016 ^a	19,1 ± 0,08
NaC-MD	0,628 ± 0,004 ^c	1,725 ± 0,034 ^a	87,9 ± 0,30
WPC-GA	0,193 ± 0,001 ^a	33,60 ± 0,151 ^d	200,3 ± 1,26
NaC-Lac-K	0,650 ± 0,008 ^c	1,123 ± 0,048 ^a	22,1 ± 0,18**
NaC-MD-K	0,462 ± 0,002 ^b	4,378 ± 0,004 ^b	163,8 ± 0,01**
WPC-GA-K	0,468 ± 0,041 ^b	8,786 ± 1,328 ^c	137,7 ± 0,05**

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-e) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır ($p>0,05$). Kullanılan kısaltmalar: GA, Gam Arabik; K, Konjugat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi. Viskozite değeri, sırası ile her bir formülasyon için kayma gerilimi 105,6, 6,6 ve 33 s⁻¹ koşulları için sunulmuştur.

** Aynı formülasyonda üretilmiş konjugat ve karışım kullanımının iki kuyruklu t-testi sonucunda anlamlı ($p<0,05$) farklılık gösterdiğini ifade eder.

WPC-GA ve WPC-GA-K ile hazırlanan örnekler yüksek kıvam katsayıları ve düşük akış davranış indeksleri nedeniyle diğer örneklerden ayrılmaktadır. Ayrıca bu formülasyonda, konjugasyon sonrası diğer formülasyonların aksine viskozite düşüşü gerçekleşmiştir. Bu durum damlacık boyutu ve Span değerleri ile de zıtlık teşkil etmektedir. Düşük damlacık boyutuna ve daha monodispers yapıya sahip olan emülsiyonların (bu örnekte konjugatın) daha yüksek viskoziteye sahip olması beklenen durumdur (McClements, 2016; Pal, 1996). Bu davranışın bu emülsiyonlardaki flokülasyon ile açıklanabilmektedir. Floküle edilmiş damlacıklar içeren bir emülsiyon, aynı sayıda izole edilmiş damlacıklar içeren emülsiyondan daha yüksek bir viskoziteye sahiptir, çünkü floklar sürekli fazın bir kısmını yapılarında tutar ve bu nedenle tek tek damlacıkların gerçek hacim fraksiyonundan daha yüksek etkili hacim fraksiyonuna sahiptir. Floküle parçacıkların süspansiyonları, belirgin kayma incelmeleri davranış sergileme eğilimindedir. Düşük kayma hızlarında, hidrodinamik kuvvetler parçacıkları bir arada tutan bağları bozacak kadar büyük değildir ve bu nedenle floklar sabit bir boyut ve şekle sahip sert parçacıklar gibi hareket ederek sabit bir viskozite sağlar. Kayma hızı arttıkça, hidrodinamik kuvvetler topakların deforme olmasına ve parçalanmasına neden olacak kadar büyük hale gelir. Bu durum viskozitede düşüşe neden olur. Flokların nihai olarak parçalanması, etkin hacim fraksiyonlarını da azaltır ve bu nedenle aynı zamanda viskozitede bir azalmaya katkıda bulunur. Viskozite, yüksek kayma hızlarında sabit bir değere

ulaşır, bunun nedeni ya tüm flokların tamamen parçalanması ve böylece yalnızca tek tek damlacıkların kalmasıdır, ya da flok oluşum hızı topak bozulma hızına eşit olduğu için topaklanmış damlacıkların sayısının sabit kalmasıdır (McClements, 2016). Konjugasyon sonrası azalan kayma ile incelme davranışı ve polidispersite nedeniyle, konjugasyon ile flokülasyonda azalma oluştuğunu düşünmekteyiz. Şekil Ek A25'te görüleceği üzere konjugasyon sonrası damlacık boyut grafiğindeki  pikli görünümün yerini iki pikli görünüm aldığı gözükmektedir. Bunun yanı sıra flokların sert parçacıklar gibi davranması, bu durumu açıklayan bir başka sebep olabilir. Sert kürelerin yüksek konsantrasyonlu dispersiyonları durumunda, polidispersitenin (boyut dağılımı) reolojik davranış üzerindeki etkisi de önemli olabilmektedir. Bu sistemlerde, üç veya daha fazla farklı büyüklükteki parçacık birlikte karışırıldığında en küçük boyutlu parçacıkların oranı arttıkça viskozitede bir artış meydana gelir (Pal, 1996).

4.6.2.2. Farklı duvar materyalleri ile üretilmiş tozların özellikleri

Üretilen tozların tanecik boyut dağılımları Şekil Ek A27'de, damlacık boyut dağılım sonuçları ise Tablo 4.19 ve Tablo Ek A15'te verilmiştir. Ayrıca, üretilen tozların nem içeriği ve su aktivitesi değerleri Tablo Ek A16'da paylaşılmıştır. Üretilen tozların tanecik boyutlarında önemli farklılaşmalar olduğu görülmektedir (Tablo 4.20). D(90) değerlerinin 99,3-285,0 µm, D[3,2] değerlerinin 6,63-28,4 µm ve D[4,3] değerlerinin 40,2-142,1 µm aralığında değiştiği saptanmıştır. Buna karşın, en küçük D(90) değerine sahip D[3,2] ve D[4,3] değerine sahip tozun WPC-GA olduğu grlmştir. Bu durum emülsiyon aşamasında floklardan kaynaklı büyük damlacık boyutu tezini destekler niteliktedir. Bu rneği NaC-MD-K ve NaC-MD takip etmektedir. Bir başka ifadeyle, konjugasyon ile NaC-MD'de tanecik boyutunda azalma gerçekleşirken diğer kombinasyonlarda tanecik boyutu konjugasyon ile artmıştır.

Tablo 4.19. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen tozların tanecik boyutuna dair elde edilen ölçüm sonuçları ve enkapsülasyon etkinliği değerleri.*

Örnek*	D(90) (µm)	D[3,2] (µm)	D[4,3] (µm)	Span (-)
NaC-Lac	285,5 ± 5,80 ^e	24,0 ± 0,52 ^c	112,1 ± 2,16 ^e	4,25 ± 0,06 ^b
NaC-MD	165,3 ± 13,3 ^d	7,53 ± 0,44 ^{ab}	63,6 ± 3,77 ^d	5,27 ± 0,49 ^d
WPC-GA	89,3 ± 2,93 ^a	6,63 ± 0,13 ^a	40,2 ± 1,93 ^a	3,79 ± 0,17 ^a
NaC-Lac-K	351,3 ± 6,24 ^f	28,4 ± 1,27 ^d	142,1 ± 2,94 ^f	3,79 ± 0,09 ^a
NaC-MD-K	137,3 ± 3,21 ^c	7,33 ± 0,17 ^{ab}	55,6 ± 1,06 ^c	4,88 ± 0,04 ^c
WPC-GA-K	119,3 ± 3,51 ^b	7,83 ± 0,19 ^b	51,3 ± 2,02 ^b	3,97 ± 0,06 ^{ab}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-e) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır ($p>0,05$). Toz ve emülsiyonlar kendi içinde istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Kullanılan kısaltmalar: GA, Gam Arabik; K, Konjugat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi.

Span değerleri incelendiğinde ise NaC-MD ve NaC-Lac örneklerinde konjugasyonla beraber bu değerinin azaldığı görülmüştür (Tablo 4.19). Span değerinin azalması, tanecik boyut dağılımının daha dar bir aralıkta değiştiğini göstermektedir ve Şekil Ek A27’de de bu durum açıkça görülmektedir. Özellikle, NaC-MD-K ve WPC-GA örneğinin diğerlerinden daha tek düze bir dağılım sergilediği saptanmıştır. Literatürde, çalışmamızla doğrudan karşılaştırılabilecek çalışmalara rastlanmamıştır. MD ile kaplanmış püskürtülerek kurutulmuş ginseng ekstresi kapsüllerinin parçacık boyutları, W/O/W emülsiyonlarına ve WPC veya GA ile kaplanmış püskürtülerek kurutulmuş örnekler göre düşük bulunmuştur (Min, Lee, Chang ve Kwak, 2018). Berendsen ve diğerleri (2015) membran emülsifikasyonu ile üretilen prosiyanidin yüklü W/O/W emülsiyonlarının püskürtmeli kurutulma sırasında WPI, WPI–karboksilmetil selüloz, WPI–GA ve WPI–kitosan kullanmıştır. Partikül boyut dağılımı, püskürtülerek kurutulmuş emülsiyon tipine göre önemli farklılıklar göstermiştir ve çalışma sonuçlarına göre WPI-GA ile elde edilen örneklerin daha geniş bir damlacık boyut dağılımına sahip olduğu rapor edilmiştir (Berendsen ve diğerleri, 2015). Bir başka çalışmada, S/O/W’den üretilen tozlarda duvar materyali olarak NaC, NaC-MD karışımı ve konjugatı denenmiştir. Çalışma sonucunda, en küçük tanecikli ve en yüksek enkapsülasyon verimine sahip tozlar NaC-MD konjugatı kullanımı ile elde edilmiştir (Qu ve Zhong, 2017).

Toz örneklerin mikroenkapsülasyon verimi (tutulan peptit miktarı) ve yüzey yağı değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Tablo 4.20’de listelenmiştir. En yüksek mikroenkapsülasyon verimi ve en düşük yüzey yağı değerleri WPC-GA’da belirlenmiştir.

Benzer şekilde, 3-metilbütiraldehit içeren W/O/W emülsiyonlarının kurutulmasında farklı duvar materyallerinin (modifiye nişasta, WPC, GA ve MD) incelendiği bir çalışmada, en yüksek enkapsülasyon verimi GA ile elde edilmiştir (Bade ve Kunz, 2007).

Tablo 4.20. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen tozların enkapsülasyon etkinliği ve yüzey yağı değerleri.*

Örnek*	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Yüzey Yağı (%)
NaC-Lac	46,0 ± 2,3 ^a	19,94 ± 0,52 ^e
NaC-MD	64,4 ± 2,3 ^b	13,16 ± 0,53 ^c
WPC-GA	83,1 ± 1,8 ^d	6,62 ± 0,24 ^a
NaC-Lac-K	71,1 ± 0,9 ^c	20,92 ± 0,33 ^e
NaC-MD-K	66,0 ± 0,5 ^b	9,55 ± 1,06 ^b
WPC-GA-K	81,4 ± 2,1 ^d	10,85 ± 0,37 ^d

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-e) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır ($p>0,05$). Toz ve emülsiyonlar kendi içinde istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Kullanılan kısaltmalar: GA, Gam Arabik; K, Konjugat; Lac, Laktöz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi.

Tez çalışmasında NaC-MD ve WPC-GA örneklerinde bunun konjugatı kullanılarak hazırlanmış örneklerde enkapsülasyon etkinliği istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde değişmemişken, NaC-Lac örneğinde enkapsülasyon etkinliği istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Shimizu ve Nakane (1995) yaptıkları çalışmada WPC ve NaC'ın enkapsülasyon etkinliğini kazein dekstirin konjugatı ile kıyaslamışlar ve konjugatın yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip çift katlı emülsiyonların üretilmesine izin verdiğini saptamışlardır (Shimizu ve Nakane, 1995). Benzer sonuçlar sodyum kazeinatın farklı tip maltodekstrinlerle hazırlanan konjugatlarının kullanıldığı çalışmada da elde edilmiştir (O'Regan ve Mulvihill, 2010). Fakat her iki çalışmada da, konjugasyon işleminden kaynaklanan değişimleri kıyaslamak için kullanılan kontrol örneklerinde sadece protein kullanılmış olması bir eksiklik olarak düşünülmektedir.

Tozların halen çift katlı emülsiyon yapılarını barındırıp barındırmadığının gözlemlenmesi amacıyla, tozlar distile suda çözündürülmüş (rekonstitüsyon) ve sonrasında mikroskop yardımı ile görüntüleri alınmıştır. Her bir formülasyonda üretilen tozdan alınan mikrograflardan, örnek oluşturması amacıyla ikişer adedi Şekil Ek A28'de paylaşılmıştır. Mikrograflarda görüldüğü üzere, emülsiyona oranla boyutları büyümüş olmakla beraber, çift

katlı emülsiyonlar tozların rekonstitüsü sonrasında da varlığını sürdürmüştür. Benzer şekilde Ying ve diğerleri (2021) dondurularak kurutulmuş W/O/W emülsiyonlarının suda çözündürülmesi sonrasında çift katlı emülsiyon görünümünün korunduğunu ancak damlacık boyutlarının anlamlı şekilde büyüdüğünü belirlemişlerdir (Ying ve diğerleri, 2021). Fakat kullanılan polimerik çözeltiye bağlı olarak morfolojide farklılıklar gözlemlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği sonuçları ile rekonstitüe edilmiş tozların görünümleri arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Özellikle NaC-Lac ve NaC-Lac-K formülasyonu ile üretilmiş tozların rekonstitüe edilmiş hallerinde, daha küçük damlacıkların yanı sıra boş damlacıkların varlığı da göze çarpmaktadır. NaC-MD ve NaC-MD-K ile üretilmiş tozların rekonstitüe hallerinde ise daha büyük ve yakın konumlanmış damlacıklar söz konusudur. Yine bu formülasyonlarda da boş damlacıklar gözlemlenmiştir. WPC-GA ve WPC-GA-K ile hazırlanmış rekonstitüe tozlarda ise floklar şeklinde konumlanmış büyüklü küçüklü, içi boş ve dolu damlacıklar göze çarpmıştır. Bu durumun, emülsiyonda koalesansa işaret edebileceği düşünülmektedir. Berendsen ve diğerleri (2015), tarafından yapılan çalışmada, farklı duvar materyalleri ile hazırlanan çift katlı emülsiyonların püskürtmeli kurutulması sonrasında elde edilen tozlar suda tekrar çözülmüş ve yapıları incelenmiştir. Çalışma sonucunda her bir formülasyonda çift katlı emülsiyonların varlığı saptanmış fakat özellikle GA ve kitosan içeren tozların çözündürmeden sonra çoklu damlacık boyut dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir (Berendsen ve diğerleri, 2015).

Mikroenkapsülasyon veriminin yüksek olması tez çalışması açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak, diğer önemli konu ise enkapsüle edilen bileşenin *in vitro* sindirim sürecinde de korunması ve ince bağırsak ortamında salımıdır. Farklı duvar materyali formülasyonlarıyla üretilen tozların bu niteliklerinin ortaya konulabilmesi için, tüm toz örnekler *in vitro* sindirim ortamında sindirim simülasyonuna tabi tutulmuştur. İncelenen sindirim ortamları ağız, mide ve ince bağırsak içermektedir. İnce bağırsak sindirimi sonunda ise ortamdaki enzimlerin inaktivasyonu sağlanmış ve sindirim sonucu elde edilmiş olan ortam, farklı biyoaktivite analizlerine tabi tutulmuştur. Hem sindirim sürecindeki ortamlar hem de örnekte kazein hidrolizatı dışında bulunan bileşenlerden kaynaklı var olan veya süreçte ortaya çıkabilecek biyoaktif özelliklerin saptanması, mikroenkapsülasyon işlemi ile sağlanan korumanın ve salımın düzeyinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bundan dolayı,

içerisinde kazein hidrolizati bulunmayan, bunun dışında tüm bileşenleri aynı miktarlarda içeren çift katlı emülsiyonlar hazırlanmış, aynı işlem koşullarında püskürtmeli kurutucuda toza dönüştürülmüş ve bu tozlar da *in vitro* sindirim sürecinden geçirildikten sonra biyoaktif özellikleri açısından kontrol grupları olarak analiz edilmiştir. Çalışma kapsamında örneklerdeki proteinlerin hidroliz düzeyine dair fikir vermesi açısından TPM belirlenmiştir. Ayrıca, tozların ve kontrollerinin antioksidan, antidiyabetik ve antihipertansif potansiyelleri belirlenmiş, Tablo 4.21 ve 4.22’de verilmiştir.

Tablo 4.21. Farklı duvar materyali formülasyonu ile üretilen tozların ve hidrolizat içermeyen kontrollerinin *in vitro* sindirim sonrası toplam peptit miktarı, serbest radikal süpürme aktivitesi ve ACE inhibisyonu özellikleri.*

Özellikler	Duvar Materyali Formülasyonu	Örnek		T-testi
		Toz	Kontrol	p-değeri (iki kuyruklu)
TPM (g Tripton/g örnek)	NaC-Lac	548,5 ± 12,2 ^e	442,8 ± 14,0	0,001
	NaC-MD	487,5 ± 10,4 ^d	349,1 ± 6,7	0,000
	WPC-GA	289,4 ± 9,3 ^a	295,1 ± 3,6	0,381
	NaC-Lac-K	410,2 ± 17,7 ^b	413,4 ± 4,1	0,773
	NaC-MD-K	440,5 ± 6,1 ^c	431,0 ± 14,7	0,364
	WPC-GA-K	301,8 ± 17,1 ^b	306,4 ± 11,7	0,719
SRGA (ABTS) (μmol Troloks/g örnek)	NaC-Lac	183,3 ± 2,3 ^c	156,4 ± 5,6	0,001
	NaC-MD	183,0 ± 10,0 ^c	141,1 ± 1,2	0,016
	WPC-GA	138,6 ± 0,4 ^a	161,4 ± 5,2	0,070
	NaC-Lac-K	168,2 ± 2,1 ^b	194,1 ± 5,6	0,106
	NaC-MD-K	187,8 ± 7,4 ^c	159,2 ± 2,3	0,305
	WPC-GA-K	148,3 ± 7,5 ^a	156,4 ± 5,6	0,075
ACE inhibisyonu (μmol kaptopril/kg örnek)	NaC-Lac	211,10±9,62 ^d	133,63±12,58	0,020
	NaC-MD	164,88±3,97 ^c	137,55±6,38	0,003
	WPC-GA	4,35±1,10 ^a	3,57±0,61	0,346
	NaC-Lac-K	161,72±9,15 ^c	162,58±5,70	0,916
	NaC-MD-K	126,62±16,75 ^b	126,62±2,73	1,000
	WPC-GA-K	7,76±1,01 ^a	8,45±0,80	0,404

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kullanılan kısaltmalar: ACE, anjiyotensin dönüştürücü enzim; GA, Gam Arabik; K, Konjugat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; SRGA, Serbest radikal giderme aktivitesi (ABTS); TPM, Toplam peptit miktarı; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi.

Tablo 4.22. Farklı duvar materyali formülasyonu ile üretilen tozların ve hidrolizat içermeyen kontrollerinin *in vitro* sindirim sonrası toplam α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu özellikleri.*

Özellikler	Duvar Materyali Formülasyonu	Örnek		T-testi
		Toz	Kontrol	p-değeri (iki kuyruklu)
α -Glukosidaz inhibisyon Aktivitesi (g Akarboz/g örnek)	NaC-Lac	14,16 $\pm$ 1,38 ^{ab}	11,30 $\pm$ 0,98	0,116
	NaC-MD	48,17 $\pm$ 5,51 ^d	38,18 $\pm$ 7,08	0,196
	WPC-GA	12,04 $\pm$ 0,95 ^{ab}	10,83 $\pm$ 0,91	0,187
	NaC-Lac-K	14,53 $\pm$ 2,53 ^b	15,32 $\pm$ 2,66	0,728
	NaC-MD-K	19,84 $\pm$ 2,03 ^c	23,28 $\pm$ 2,12	0,165
	WPC-GA-K	9,71 $\pm$ 0,75 ^a	10,73 $\pm$ 0,98	0,228
α -Amilaz inhibisyon Aktivitesi (g Akarboz/g örnek)	NaC-Lac	284,2 $\pm$ 11,1 ^c	346,6 $\pm$ 12,5	0,009
	NaC-MD	115,1 $\pm$ 6,8 ^a	281,8 $\pm$ 12,1	0,000
	WPC-GA	159,9 $\pm$ 32,8 ^b	218,0 $\pm$ 31,6	0,092
	NaC-Lac-K	273,4 $\pm$ 18,2 ^c	259,3 $\pm$ 33,8	0,561
	NaC-MD-K	141,1 $\pm$ 13,2 ^{ab}	148,5 $\pm$ 4,5	0,408
	WPC-GA-K	144,6 $\pm$ 13,0 ^{ab}	120,5 $\pm$ 23,8	0,198

* Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Kullanılan kısaltmalar: GA, Gam Arabik; K, Konjugat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi.

Tablo 4.21'deki TPM sonuçlarına göre NaC-Lac ve NaC-MD örneklerindeki TPM miktarında, kontrol örneğine göre belirgin artışlar saptanmıştır. Bu durum, sindirim süreci boyunca hidrolizatın korunabildiğine ve bu hidrolizatın ince bağırsakta salımının gerçekleştiğine dair fikir vermektedir. Diğer 4 formülasyonda ise TPM miktarı açısından kontrolle istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Bu durum, bu formülasyonlarla üretilmiş tozlardan ince bağırsakta herhangi bir hidrolizat salımının gerçekleşmediğini göstermektedir. Önceki bölümde saptandığı üzere, bu formülasyonlarda kazein hidrolizatı enkapsüle edilebilmiştir. Ancak, ince bağırsakta salımın olmamasının, ince bağırsaktan önce salımın olup bileşenlerin parçalanması nedeniyle mi, yoksa kapsülün yapısını ve içeriğindeki hidrolizatı ince bağırsak ortamında koruyup salmaması nedeniyle mi olduğu çalışmadaki verilerden net anlaşılamamaktadır. Buna karşın, hem hidrolizatın dayanımı (parçalanırsa bile tamamen yok olmayacağından temel amin grupların korunarak TPM analizinde saptanacağı ve hatta parçalanma ile sayısının artabileceği) hem de konjugasyonun ve gam arabik kullanımının beklenen sonuçları içerisinde sindirime direncin olabileceği bilgisi nedenleriyle

kapsül yapısının korunmuş olma olasılığı daha yüksek görünmektedir. Gam arabik (Acacia gum, INS 414; E414) bir gıda katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Gam arabik, hem insanlar hem de hayvanlar tarafından sindirilemeyen, bağırsakta parçalanmayan, ancak kolonda mikroorganizmaların etkisi altında fermente olan kompleks bir polisakkarittir (Patel ve Goyal, 2015; Phillips, 1998). Protein-polisakkarit konjugatları tarafından stabilize edilen gıda emülsiyonlarının, esas olarak pepsin tarafından arayüzde proteinlerin proteolizini engelleyen polisakkarit segmenti nedeniyle gastrik sindirime karşı yüksek stabiliteye sahip olduğu bilinmektedir (Nooshkam ve Varidi, 2020). Zaten, Maillard konjugatlarının gastrointestinal sistemin üst kısmındaki (yani mide ve ince bağırsak) enzimatik sindirime karşı yüksek stabilitesi, onları bağırsak hastalıklarını önlemek veya muhtemelen tedavi etmek için kolona özgü dağıtım sistemlerinin tasarlanması için ideal bir aday haline getirdiği bilinmektedir (Nooshkam ve Varidi, 2020).

TPM sonuçlarına benzer eğilim ve sonuçlar, SRGA analizinde ve ACE inhibisyon aktivitesinde de görülmüştür. Buna göre, NaC-Lac ve NaC-MD örneklerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptanmış, buna karşın diğer formülasyonlarda fark belirlenememiştir. Bu durumun sindirim ortamında salınan hidrolizattan kaynaklanıyor olduğu düşünülmektedir. Kazein hidrolizatlarının ACE inhibisyon aktivitesi ve antioksidan aktivite sergiledikleri bilinmektedir (Abdel-Hamid ve diğerleri, 2017; Bueno-Gavilá ve diğerleri, 2019; Salami ve diğerleri, 2011).

Üretilen tozlardan kaynaklı antidiyabetik aktivitenin analizinde iki farklı enzimin inhibisyonu incelenmiştir (Tablo 4.22). Bu kapsamda α -glukosidaz inhibisyonu analizi sonucunda hiçbir formülasyonda kontrol örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenememiştir. Örneklerde α -glukosidaz enzimini inhibe edici bir etki saptanmıştır, ancak bu inhibisyon aktivitesinin ince bağırsak ortamına ulaşan sindirim sıvılarındaki bileşenler ve/veya toz içeriğindeki hidrolizat dışı bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşın, hidrolizat içeren örneklerin α -amilaz enzimini inhibe edici özellikleri kontrol örneğine göre istatistiksel olarak anlamlı farklıdır ($p<0,05$). Bu fark bir önceki sonuçlara benzer şekilde NaC-Lac ve NaC-MD formülasyonlarına sahip örneklerde saptanmıştır. Ancak önceki sonuçların aksine, bu örneklerde α -amilaz inhibisyonu kontrol örneklere kıyasla daha düşük

bulunmuştur. Buna benzer sonuçlar, süt ürünleri ile yapılmış benzer çalışmalarında da saptanmıştır. Buna göre, proteolize olmuş süt proteinleri α -amilaz inhibisyon aktivitesi gösterirken, bu hidrolize proteinler *in vitro* sindirim süreci sonrasında bu niteliğini, yani α -amilaz inhibisyon aktivitesini yitirmiştir (Erbay, Aydemir, Erkin, Altınyüzük, 2021; Erbay, Aydemir, Erkin, Uğurlu, 2021)

Tüm bu sonuçlar ışığında, sindirim sonrası yüksek biyoaktiviteye ve enkapsülasyon etkinliğine sahip tozların eldesine olanak veren duvar materyali kombinasyonlarının seçimi için TOPSIS yönteminden yararlanılmıştır. TOPSIS analizinde kullanılan yanıtlar ve analiz sonuçları Tablo 4.23'te verilmiştir.

Tablo 4.23. Mikroenkapsüle kazein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan çift katlı emülsiyonların dış faz formülasyonu seçiminde kullanılan TOPSİS tablosu*.

Kod	Yüzey yağı (%)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	TPM (g Tripton/g örnek)	SRGA (μ mol Troloks/g örnek)	ACE inhibisyonu (μ mol kaptopril/kg örnek)	Görelî Yakınlık (-)
NaC-Lac	19,9	46	548,5	183,3	211	0,74
NaC-MD	13,2	64	487,5	183,0	165	0,74
WPC-GA	6,62	83	289,4	138,5	4,35	0,27
NaC-Lac-K	20,9	71	410,2	168,2	162	0,65
NaC-MD-K	9,55	66	440,5	187,8	127	0,61
WPC-GA-K	10,8	81	301,8	148,3	7,76	0,22
Ağırlıklar	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	

* Değerler ortalama olarak verilmiştir. Kullanılan kısaltmalar: ACE, anjiyotensin dönüştürücü enzim; GA, Gam Arabık; K, Konjugat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; NaC, Sodyum kazeinat; SRGA, Serbest radikal giderme aktivitesi (ABTS); WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi.

Tablo 4.23'te de görüldüğü üzere, en yüksek görelî yakınlık değerine NaC-Lac ve NaC-MD örnekleri sahiptir. Burada laktoz kullanımının, laktoz intoleransı olan bireylerde yaratacağı dezavantaj göz önüne alınmış ve çalışmanın ilerleyen aşamasında kullanılmak üzere NaC-MD formülasyonu seçilmiştir.

4.7. Çift katlı emülsiyonların püskürtmeli kurutması için kullanılacak duvar materyalli formülasyonunun optimizasyonu

Tez çalışmasının bu aşamasında kazein yüklü çift katlı emülsiyonların kurtulmasında kullanılan duvar materyali oranı ve bu duvar materyalinin karbonhidrat:protein oranı optimize

edilmiştir. Optimizasyonu için RSM'den yararlanılmıştır. Faktörler ile yanıtlar arasındaki ilişki bilinmediğinden ikinci dereceden polinomial bir modelle en uygun yanıt fonksiyonuna ulaşılabileceği varsayılmıştır. Bu amaçla gerekli deneysel üretim koşulları CCRD deneme planı seçilerek belirlenmiştir. Püskürtmeli kurutucuda yapılacak üretimler için tanımlanan 2 faktörlü CCRD ve belirlenen kodlanmış seviyeler, bu seviyeler doğrultusunda CCRD'ye göre rastgele hazırlanan deneme planı Tablo 3.9'da görülmektedir. Deneme planı doğrultusunda üretilen tozların analiz sonuçları Tablo Ek A17'de sunulmuş, tozların partikül boyut dağılımlarına dair grafik Şekil Ek A29'da gösterilmiştir. Bunun yanı sıra tozlar rekonstitüsü sonrasındaki mikroskopla alınmış görüntüleri Şekil Ek A30'da sunulmuştur.

Optimizasyonda yanıt olarak kurutma verimi, mikroenkapsülasyon etkinliği, yüzey yağı ve örneklerin kontrol örneklerine göre SRGA (ABTS) ve ACE inhibisyonu açısından göstermiş olduğu farklar kullanılmıştır. Her bir işlem değişkeninin her bir yanıtla doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden etkilerinin değerlendirilmesi için ANOVA çizelgesi oluşturulmuş ve Tablo 4.24'te paylaşılmıştır. Her bir yanıt üzerinde tüm doğrusal, interaksiyon ve kare terimlerin etkisinin anlamlı olduğu görülmüştür. Seçilmiş tüm modellerin R^2 değerlerinin 0.9'ın üzerinde olması beklenirken, tez çalışmasındaki modellerin R^2 değerlerinin 0.925'in üzerinde olduğu görülmektedir. Aynı zamanda, "lack of fit" değerlerinin 0,1'in üzerinde olması istenirken, model değerlerinde 0,3'ün üzerinde değerler hesaplanmıştır. Ek olarak, Pre- R^2 değeri ile Adj- R^2 değerleri arasındaki farkın %20'nin altında olması ve Adeq.Precision değerinin 4'ten büyük olması (belirlenen modellerde en düşük değer 10.618 olmuştur) istenmektedir (Tablo 4.24). Tüm bu değerler, optimizasyon amacıyla üretilen modellerin varyasyonun önemli bir kısmını açıkladığını ve tahminleme açısından istatistiksel olarak uygun olduğunu göstermektedir.

Elde edilen modellerle işlem değişkenlerinin yanıtlar üzerine etkisinin görsel olarak da belirlenebilmesi için yanıt yüzey grafikleri ve izohips eğrileri çizilmiştir. İki faktörlü bir çalışma yapıldığından tek bir interaksiyon etki incelenmiştir ve tüm yanıtlar için bu interaksiyon etki önemli bulunduğundan, 5 yanıt için de yanıt yüzey grafikleri çizilebilmiştir. Çizilen yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.13'de paylaşılmıştır.

Tablo 4.24. Mikroenkapsüle kazein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan çift katlı emülsiyonların dış faz formülasyonlarının optimizasyonunda ANOVA sonucu her bir yanıtı dair elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler.*

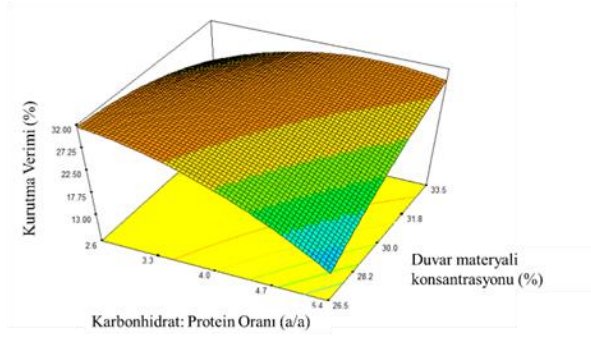
Kaynak*	Kurutma Randımanı (%)	Mikroenkapsülasyon Verimi (%)	SRGA (g Tripton/g örnek)	ACE İnhibisyon Aktivitesi (%)	Yüzey Yağ (%)
	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri
Model	<0,0001	<0,0001	0,0008	0,0001	<0,0001
x_1	0,0004	0,0086	0,0219	0,0424	<0,0001
x_2	0,0031	<0,0001	0,0006	0,0090	<0,0001
x_1x_2	<0,0001	0,0003	0,0423	0,0963	0,0180
x_1^2	0,0004	0,0166	0,0020	<0,0001	0,0093
x_2^2	0,0211	0,0003	0,0030	0,0001	0,0118
<i>Lack of Fit</i>	0,4141	0,3551	0,5531	0,9150	0,3027
R^2	0,9607	0,9694	0,9251	0,9572	0,9781
Adj- R^2	0,9326	0,9475	0,8716	0,9266	0,9625
Pred- R^2	0,8349	0,8637	0,7275	0,9070	0,8976
Adeq. Precision	18,734	20,913	10,618	12,749	24,695
PRESS	57,95	202,17	389,40	51,79	10,11
C.V.	5,27	5,43	18,04	19,48	6,36

* x_1 , karbonhidrat:protein oranı (-); x_2 , duvar materyali konsantrasyonu (%). Kullanılan kısaltmalar: ACE, anjiyotensin dönüştürücü enzim; SRGA, Serbest radikal giderme aktivitesi (ABTS).

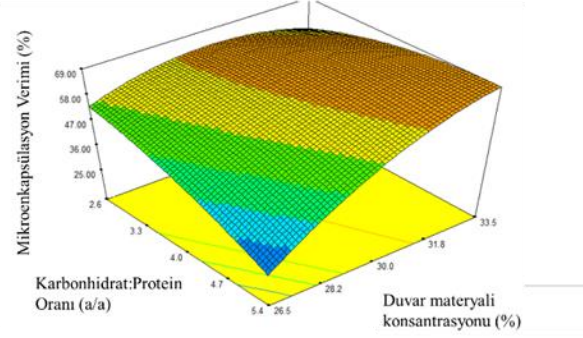
Şekil 4.13a-b’de görüldüğü üzere kurutma verimi ve enkapsülasyon verimi benzer davranışlar göstermiştir. En yüksek karbonhidrat oranı ve en düşük duvar materyali oranında bu verimler minimumdur. Probiyotik bakterilerin çift katlı enkapsülasyonundan sonra püskürtmeli kurutma ile kurutulduğu bir çalışmada, düşük duvar materyali oranında canlı bakteri popülasyonunda daha büyük bir azalma meydana geldiğini saptanmış ve katı miktarındaki artışın ısı hasara karşı daha iyi bir koruma sağladığı belirtilmiştir (Flores-Belmont, Palou, López-Malo ve Jiménez-Munuguía, 2015). Tez çalışmasında, protein oranının ve duvar materyali oranının belirli bir noktaya kadar artışı kurutma verimini ve mikroenkapsülasyon verimini olumlu etkilemiştir. Fakat belirli bir noktadan sonra bu değerlerdeki artış artık verimleri olumsuz etkilemeye başlamıştır. Püskürtmeli kurutma ile toz ürün üretiminde özellikle karbonhidratların duvar materyali olarak kullanımları ile ilgili etkileri inceleyen çalışmalarda da, benzer sonuçlar alınmıştır. Örneğin; duvar materyali olarak süktroz-NaC ve süktroz-WPC kullanılan çalışmalarda, protein ilavesi ile kurutma randımanı önce olumlu etkilemiş, artan protein oranı ile bu etki olumsuzla dönmeye başlamıştır. Yazarlar düşük

konsantrasyonlardaki protein ilavesi ile artan randımanı, protein moleküllerinin damlacık-hava arayüzüne tercihli göçüne bağlamışlardır. Bu şekilde, tozun kuruması sürecinde, protein açısından zengin ve ince bir film oluşabilmekte ve tozun camsı geçiş kaynaklı yapışmasının önüne geçilebilmektedir (Adhikari, Howes, Bhandari ve Langrish, 2009; Adhikari, Howes, Wood ve Bhandari, 2009). Yine bir başka çalışmada duvar materyali olarak MD ile beraber WPI kullanımının belli bir orana kadar kurutma randımanını arttırdığı, fakat belirli bir noktadan sonra etkili olmadığı belirtilmiştir. Çalışmada yüzey geriliminin belirli bir protein oranına kadar düştüğünün, ancak proteince doymuş halinin (%0,5-1 proteinde) üzerindeki protein konsantrasyonlarında, artışın yüzey gerilimini etkilemediği belirtilmiştir (Fang ve Bhandari, 2012). Protein varlığının öneminin yanı sıra sistemde belirli bir oranda karbonhidrat bulunması da önemlidir. Fäldt ve Bergenståhl (1995) yaptıkları çalışmada sodyum-kazeinatla stabilize edilmiş soya yağı emülsiyonlarının püskürtülerek kurutulmasında laktoz varlığının önemini vurgulamıştır. Çalışmada sadece sodyum kazeinat kullanımı sonucunda tozlarda yüksek yüzey yağı belirlenmiştir. Yazarlar bunu, kurutma sırasında proteinin aşırı susuzlaşması ve buna bağlı olarak protein filminin büzülmesi ile açıklamışlardır. Laktoz varlığında ise protein filminin stabilitesinin arttığı belirlenmiştir. (Fäldt ve Bergenståhl, 1995). Çalışmamızda da belirli bir konsantrasyondan sonra verimlerdeki azalma buna bağlı gerçekleşmiş olabilir. Bir başka çalışmada düşük molekül ağırlıklı emülgatör varlığının kurutma randımanını etkileyebildiği belirtilmiştir. Çalışmada, randımandaki düşüşün düşük moleküler ağırlıklı emülgatörün hava su arayüzeyindeki protein yerine yerleşmesinden dolayı gerçekleştiği düşünülmektedir (Jayasundera, Adhikari, Adhikari ve Aldred, 2011). Çalıştığımız sistemde Crillet™ 1 (Tween 20) varlığı ve bunun bir kısmının yağ su arayüzeyinde değil de dış su fazında olma olasılığı yanı sıra sistemdeki sodyum kazeinatın da bir kısmının yağ su arayüzeyine yerleşme olasılığı sistemin yorumlanmasını zorlaştırdığı açıktır.

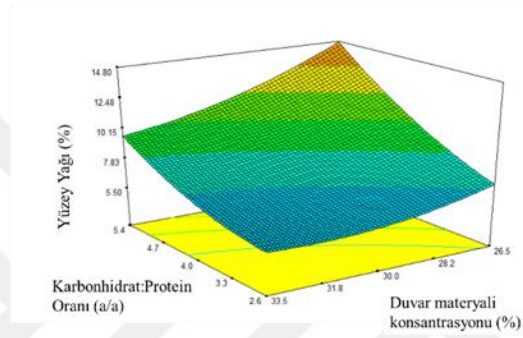
a



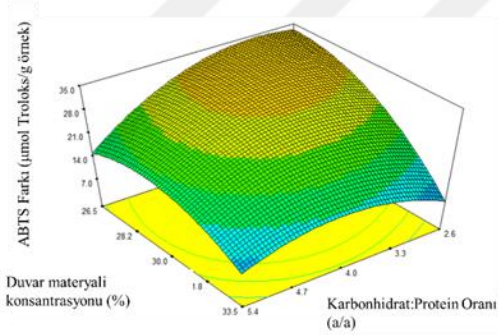
b



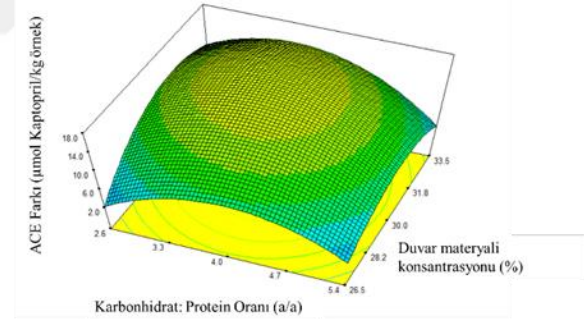
c



d



e



Şekil 4.13. Karbonhidrat:protein oranı ve duvar materyali oranının (a) kurutma verimi, (b) mikroenkapsülasyon etkinliği, (c) yüzey yağı, (d) ABTS değerlerinin ve (e) ACE değerlerinin kontrol örneklerine göre farkının üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri.

Şekil 4.13c'de yüzey yağının artan protein oranı ve duvar materyali oranı ile azaldığı görülmektedir. Bu durumda yağ damlacıklarının yeterince sarılmasında proteinin karbondhidrata oranla daha işlevli olduğu sonucuna varılabilir. Genel olarak yüzey yağı için en belirleyici parametre, tozun yağ içeriğidir. Bunun yanı sıra, formülasyondaki diğer bileşenler (protein ve karbondhidrat) ile emülsiyon stabilitesinin de önemli olduğu bilinmektedir (Saxena

ve diğerleri, 2023). McCarthy ve diğerleri (2013) tozlarda karbonhidrat protein karışımı sırasında protein içeriğinin düşürmenin, model tozlarında yüzeydeki serbest yağ içeriğini artırdığını göstermiştir (McCarthy ve diğerleri, 2013).

Şelik 4.13d-e’de ise üretilen tozların *in vitro* sindirim sonrası kontrol tozlara (hidrolizat içermeyen) karşı gösterdiği serbest radikal giderme aktivitesi farkı ve ACE inhibisyonu farkı gösterilmektedir. Serbest radikal giderme aktivitesinin farkı artan karbonhidrat oranı ve düşer duvar materyali oranı ile artmış artış ve bu artış bir noktadan sonra durmuştur. ACE inhibisyonu farkı ise merkez koşullara yakın bir noktada en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Özellikle, ACE inhibisyonu sonuçları mikroenkapsülasyon verimi ile uyum içerisindedir. Ayrıca, bu durum istenilirlik fonksiyon değerinin yüksek oluşundan da anlaşılmaktadır (Tablo 4.25). ACE inhibisyonu, mikroenkapsülasyon veriminin yüksek olduğu bölgelerde yüksektir. Bu durum aktif bileşenin başarı ile korunduğu ve aynı zamanda hedef bölgede salındığı anlamına gelebilmektedir. Ayrıca ACE inhibisyonunda net bir şekilde görülen (Şekil 4.12e’de), optimum noktanın üzerinde yüksek protein oranının olumsuz etkilerinin bir diğer sebebi kazeinin sindirim ortamı ile olan ilişkisi de olabilir. Kazein proteini yavaş sindirilen bir protein olarak bilinmektedir. Kazein açısından zengin örneklerin, mide sindirimi boyunca kalıcı olan ve besin boşalmasında gecikmeye, daha yavaş sindirime neden olan koagülanlar oluşturduğu bilinmektedir (Mulet-Cabero ve diğerleri, 2020). Chen ve ark., (2020) yaptıkları çalışmada *in vitro* sindirim sırasında proteinlerin O/W emülsiyon sistemindeki β -karotenin biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışma, sodyum kazeinatın pepsin varlığında agglomere olduğu saptanmıştır. Sodyum kazeinat ile hazırlanan emülsiyonlarda yağ-su arayüzlerinde lipoliz ürünleri ve safra tuzlarının hızlı adsorpsiyonu, lipazın yağa yaklaşmasını sterik olarak engelleyerek, lipoliz ve miselizasyon oranlarının düşmesine yol açtığı belirlenmiştir (Chen, Yokoyama, Liang ve Zhong, 2020). Bu nedenle, kazein oranındaki fazla artışın *in vitro* sindirim sonrasındaki salımı olumsuz etkilemesi beklenebilir.

Optimizasyonda kullanılan yanıtların ağırlıkları sırası ile 5, 5, 2, 2 ve 5 olarak ayarlanmıştır. Yanıtlar arasında yüzey yağı minimize edilmiş diğer yanıtlar maksimize edilmiştir. Deneysel veriler çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş ve her bir yanıt için işlem değişkenlerine bağlı ikinci dereceden denklemler oluşturulmuştur. Bu amaçla, her bir yanıt için belirlenen

modellerin eş zamanlı çözümüne dayanan “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” yöntemi kullanılmıştır. İstenilirlik fonksiyonu yöntemi ile elde edilen optimum karbonhidrat protein oranı 3,6:1 ve duvar materyali konsantrasyonu 30,8 bulunmuştur. Analiz sonucunda İstenilirlik fonksiyonu değerinin 0,864 gibi oldukça yüksek bir değer olduğu saptanmıştır (Tablo 4.25).

Tablo 4.25. Çift katlı emülsiyon üretilmesindeki US uygulaması için optimum işlem koşulları ve istenilirlik fonksiyonu değeri.

	Optimum İşlem Koşulları	İstenilirlik Fonksiyonu Değeri
Karbonhidrat:Protein (a/a)	3,6:1	0,864
Konsantrasyon (%)	30,8	

Elde edilen teorik optimum formülasyonun doğrulaması yapılmıştır. Bu amaçla, hesaplanmış olan optimum formülasyonda 3 üretim yapılmış ve optimizasyonda kullanılan yanıtlar deneysel olarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve bu sonuçların istatistiksel analizi Tablo 4.26’da paylaşılmıştır. Her bir yanıt için, optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olup olmadığı tek örnek *t*-testi uygulanarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre tüm yanıtlar için doğrulama denemelerinden elde edilen sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı ($p>0,05$) saptanmıştır.

Tablo 4.26. Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulanması.

Yanıt*	Tahminlenen Değer	Deneysel Sonuçlar ^a	SH ^b	Fark	%Hata ^c	<i>p</i> -değeri
Kurutma verimi (%)	30,3	31,7 ± 1,46	0,85	1,39	4,39	0,24
Enkapsülasyon etkinliği (%)	64,6	62,9 ± 1,74	0,83	-1,71	2,72	0,23
SRGA (µmol Troloks/g örnek)	28,1	27,1 ± 3,48	2,01	-1,01	3,74	0,66
ACE inhibisyonu farkı (%)	17,2	17,8 ± 0,86	0,49	0,58	3,29	0,36
Yüzey Yağı (%)	6,9	6,24 ± 1,31	0,76	-0,61	9,83	0,51

* ACE, anjiyotensin dönüştürücü enzim; SRGA, Serbest radikal giderme aktivitesi (ABTS).

^a Ortalama deneysel değer ± standart sapma.

^b Ortalama standart hata.

^c %Hata = $\frac{|y_{deneysel} - y_{tahmin\ edilen}|}{y_{deneysel}} \times 100$

5. SONUÇLAR

Tez çalışması ile kazein hidrolizatlarının biyoaktivitelerinin korunması ve ince bağırsak ortamında salımı için çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ilk kez çalışılmıştır. Ayrıca tez kapsamında emülsiyon damlacık boyutlarının belirlenmesi için mikroskop destekli görüntü analizi protokolü geliştirilmiştir. Bu kapsamda segmentasyon aşaması için eğitilebilir WEKA segmentasyonu ilk kez kullanılmıştır. Belirlenen protokol partikül boyutu belirlemede yaygın şekilde kullanılan lazer kırınım parçacık boyutu analiz cihazı ile doğrulanmıştır.

Tez kapsamında, dağılmış fazı kazein hidrolizatı olan $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonunun üretiminde kullanılabilecek birincil emülsiyonun (W_1/O) üretilmesi için uygun emülgatör ve konsantrasyonu ile emülsiyon üretimindeki faz oranları ($W_1:O$) belirlenmiştir. Bu aşamada, en kararlı birincil emülsiyonlar %25 iç su fazı (kazein hidrolizatı) ve %75 yağ fazı kullanılarak elde edilmiştir. Bu emülsiyonların yağ fazında emülgatör olarak %5 PGPR kullanılmasına karar verilmiştir.

Daha sonra birincil emülsiyonun oluşturulmasında farklı mekanizmalarla çalışan homojenizatörler (rotor-statör, yüksek basınç homojenizatör ve ultrases homojenizatör) optimize edilmiş ve emülsifikasyon etkinlikleri kıyaslanmıştır. Buna göre, rotor-statörde 17.800 rpm karıştırma hızında 530 s emülsifikasyon işlemi, ultrases homojenizatörde %39 genlikte 139 s emülsifikasyon işlemi ve yüksek basınç homojenizatörde 1.475 bar basınçta 520 s emülsifikasyon işlemi optimum koşul olarak belirlenmiştir.

Optimum koşullarda üretilmiş en uygun birincil emülsiyona TOPSIS yardımı ile karar verilmiştir. Bu analizde emülsiyonların viskozite, damlacık boyutu ve stabilite özellikleri göz önüne alınmıştır. Sonuçlar incelendiğinde rotor-statör ile elde edilmiş birincil emülsiyonun en yüksek (0,9812) göreceli yakınlık değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasında ayrıca $W_1/O/W_2$ çift katlı emülsiyonunun üretiminde kullanılabilecek uygun hidrofilik emülgatör ve konsantrasyonu ile emülsiyon üretimindeki faz oranları ($W_1/O:W_2$) belirlenmiştir. Bu aşamada, en kararlı çift katlı emülsiyon, %30 birincil emülsiyon ve %70 dış su fazı kullanılarak elde edilmiştir. Bu emülsiyonlarda hidrofilik emülgatör olarak %1 Polisorbat 20 kullanılmasına karar verilmiştir.

Kazein hidrolizatlarının mikroenkapsülasyonunda çift katlı emülsiyon/püskürtmeli kurutma tekniği ilk kez uygulanmıştır. Çalışmada duvar materyali olarak 2 farklı protein (kazein, peynir altı suyu konsantresi) ve 3 farklı karbonhidratın (laktoz, maltodekstrin, gam arabik) karışımı ve konjugatı kullanılmıştır. Mikroenkapsülasyonda uygun duvar materyalleri ile kombinasyonları yöntemin etkinliği *in-vitro* sindirimdeki salım dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Uygun formülasyon TOPSİS yardımı ile belirlenmiştir. Bu kapsamda duvar materyali olarak maltodekstrin sodyum kazeinat karışımının kullanılmasına karar verilmiştir. Ek olarak çalışma sonucunda konjugasyon ve gam arabik kullanımının *in-vitro* sindirim sonrası ince bağırsak ortamında peptit salımını kısıtladığı belirlenmiştir.

Son olarak, mikroenkapsülasyonda uygun duvar materyalleri olan maltodekstrin sodyum kazeinat karışımının, karbonhidrat:protein oranı ve konsantrasyonu optimize edilmiştir. Optimizasyon sırasında düşük yüzey yağı, yüksek kurutma randımanı, mikroenkapsülasyon etkinliği ACE inhibisyonu ve serbest süpürme aktivitesi hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda optimum karbonhidrat protein oranı 3,6:1 ve duvar materyali konsantrasyonu 30,8 bulunmuştur.

KAYNAKÇA

- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A. ve Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, 66, 91–98. doi:10.1016/j.idairyj.2016.11.006.
- Adachi, S., Imaoka, H., Ashida, H., Maeda, H. ve Matsuno, R. (2004). Preparation of microcapsules of W/O/W emulsions containing a polysaccharide in the outer aqueous phase by spray-drying. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(4), 225–231. doi:10.1002/ejlt.200300900.
- Adachi, S., Imaoka, H., Hasegawa, Y. ve Matsuno, R. (2003). Preparation of a water-in-oil-in-water (W/O/W) type microcapsules by a single-droplet-drying method and change in encapsulation efficiency of a hydrophilic substance during storage. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(6), 1376–1381. doi:10.1271/bbb.67.1376
- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B. R. ve Langrish, T. A. G. (2009). Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. *Journal of Food Engineering*, 94(2), 144–153. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.01.029
- Adhikari, B., Howes, T., Wood, B. J. ve Bhandari, B. R. (2009). The effect of low molecular weight surfactants and proteins on surface stickiness of sucrose during powder formation through spray drying. *Journal of Food Engineering*. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.01.022
- Aditya, N. P., Aditya, S., Yang, H. J., Kim, H. W., Park, S. O., Lee, J. ve Ko, S. (2015). Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. *Journal of Functional Foods*, 15, 35–43. doi:10.1016/j.jff.2015.03.013
- Agrawal, H., Joshi, R. ve Gupta, M. (2021). Optimization of pearl millet-derived bioactive peptide microspheres with double emulsion solvent evaporation technique and its release characterization. *Food Structure*, 29(May), 100200. doi:10.1016/j.foostr.2021.100200
- Aguilar-Toala, J. E., Quintanar-Guerrero, D., Liceaga, A. M. ve Zambrano-Zaragoza, M. L. (2022). Encapsulation of bioactive peptides: A strategy to improve the stability, protect the nutraceutical bioactivity and support their food applications. *RSC Advances*, 12(11), 6449–6458. doi:10.1039/d1ra08590e
- Agyei, D. ve Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29(3), 272–277. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.001
- Ahmad, J., Kausmann, T., Imtiaz-ul-Islam, M. ve Langrish, T. A. G. (2013). The Effect of Fats in Whey Protein Isolate Powder. *Drying Technology*, 31(6), 619–632. doi:10.1080/07373937.2012.751603
- Akpınar, A. ve Uysal, H. R. (2013). Gıda Kaynaklı Antihipertensif Peptitlerin Biyoyararlılığı, Üretimi Ve İlaç Olarak Kullanım Olanakları. *Gıda*, 38(3), 167–174. <https://dergipark.org.tr/gida/issue/6951/92715> adresinden erişildi.

- Alade, O. S., Mahmoud, M., Al Shehri, D. A. ve Sultan, A. S. (2021). Rapid Determination of Emulsion Stability Using Turbidity Measurement Incorporating Artificial Neural Network (ANN): Experimental Validation Using Video/Optical Microscopy and Kinetic Modeling. *ACS Omega*, 6(8), 5910–5920. doi:10.1021/acsomega.1c00017
- Altuntas, O. Y., Sumnu, G. ve Sahin, S. (2017). Preparation and characterization of W/O/W type double emulsion containing PGPR–lecithin mixture as lipophilic surfactant. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38(4), 486–493. doi:10.1080/01932691.2016.1179121
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A. ve Seung, H. S. (2017). Trainable Weka Segmentation: A machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*, 33(15), 2424–2426. doi:10.1093/bioinformatics/btx180
- Ay, C. ve Şanlı, T. (2018). Süt Ürünlerinde Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu ve Fonksiyonel Özellikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1), 115–120. doi:10.25308/aduziraat.340581
- Azarikia, F., Abbasi, S., Scanlon, M. G. ve McClements, D. J. (2017). Emulsion stability enhancement against environmental stresses using whey protein–tragacanthin complex: Comparison of layer-by-layer and mixing methods. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 2084–2095. doi:10.1080/10942912.2017.1362651
- Bade, M. ve Kunz, B. (2007). Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process Monika Bruckner, 137–146. doi:10.1007/s00217-006-0518-3
- Balcaen, M., Steyls, J., Schoeppe, A., Nelis, V. ve Van der Meeren, P. (2021). Phosphatidylcholine-depleted lecithin: A clean-label low-HLB emulsifier to replace PGPR in w/o and w/o/w emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 581, 836–846. doi:10.1016/j.jcis.2020.07.149
- Balcaen, M., Vermeir, L. ve Van der Meeren, P. (2017). Influence of protein type on Polyglycerol Polyricinoleate replacement in W/O/W (water-in-oil-in-water) double emulsions for food applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 535(August), 105–113. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.09.034
- Bamba, B. S. B., Shi, J., Tranchant, C. C., Xue, S. J., Forney, C. F., Lim, L. T., ... Xu, G. (2018). Coencapsulation of polyphenols and anthocyanins from blueberry pomace by double emulsion stabilized by whey proteins: Effect of Homogenization parameters. *Molecules*, 23(10). doi:10.3390/molecules23102525
- Bas, D., Kendirci, P., Salum, P., Govce, G. ve Erbay, Z. (2019). Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: I-effects of proteolytic enzymes and determination of their appropriate combination. *Food and Bioprocess Processing*, 117, 287–301. doi:10.1016/j.fbp.2019.07.016
- Benichou, A., Aserin, A. ve Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 29–41. doi:10.1016/j.cis.2003.10.013

- Berendsen, R., Güell, C. ve Ferrando, M. (2015). Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. *Food Chemistry*, 178, 251–258. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.093
- Berton-carabin, C. ve Schroe, K. (2019). ScienceDirect Towards new food emulsions : designing the interface and beyond " n. doi:10.1016/j.cofs.2019.06.006
- Bhandari, B. R., Patel, K. . ve Xiao, D. C. (2009). *Drying technologies in food processing*. (X. D. Chen ve A. . Mujumdar, Ed.)*International Journal of Food Microbiology* (C. 129). doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.004
- Bilati, U., Allémann, E. ve Doelker, E. (2003). Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method. *Pharmaceutical Development and Technology*, 8(1), 1–9. doi:10.1081/PDT-120017517
- Bou, R., Cofrades, S. ve Jiménez-Colmenero, F. (2014). Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. *Lwt*, 59(2P1), 621–628. doi:10.1016/j.lwt.2014.06.044
- Boukil, A., Suwal, S., Chamberland, J., Pouliot, Y. ve Doyen, A. (2018). Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of tryptic hydrolysate generated from pressure-treated B-lactoglobulin. *Journal of Membrane Science*, 556(March), 42–53. doi:10.1016/j.memsci.2018.03.079
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L. ve Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1–2), 359–378. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.052
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. doi:10.1038/s41596-018-0119-1
- Bruckner, M., Bade, M. ve Kunz, B. (2007). Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process Monika Bruckner, 137–146. doi:10.1007/s00217-006-0518-3
- Bueno-Gavilá, E., Abellán, A., Girón-Rodríguez, F., Cayuela, J. M., Salazar, E., Gómez, R. ve Tejada, L. (2019). Bioactivity of hydrolysates obtained from bovine casein using artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10711–10723. doi:10.3168/jds.2019-16596
- Bueschelberger, H. G., Tirok, S., Stoffrls, I. ve Schoeppe, A. (2014). Lecithins. V. Norn (Ed.), *Emulsifiers in Food Technology* içinde (ss. 21–35). West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Bušić, A., Komes, D., Belščak-Cvitanovic, A., Cebin, A. V., Špoljarić, I., Mršić, G. ve Miao, S. (2018). The potential of combined emulsification and spray drying techniques for encapsulation of polyphenols from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Food Technology and Biotechnology*, 56(4), 494–505. doi:10.17113/ftb.56.04.18.5680

- Çam, M. ve İçyer, N. C. (2015). Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1489–1497. doi:10.1007/s13197-013-1148-y
- Cardoso-Ugarte, G. A., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N., Jiménez-Fernández, M. ve Jiménez-Munguía, M. T. (2021). Stability of oregano essential oil encapsulated in double (w/o/w) emulsions prepared with mechanical or high-pressure homogenization and its effect in *Aspergillus niger* inhibition. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2), 1–9. doi:10.1111/jfpp.15104
- Chakrabarti, S., Guha, S. ve Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1–17. doi:10.3390/nu10111738
- Chawda, P. J., Shi, J., Xue, S. ve Young Quek, S. (2017). Co-encapsulation of bioactives for food applications. *Food Quality and Safety*, 1(4), 302–309. doi:10.1093/fqsafe/fyx028
- Chen, L., Yokoyama, W., Liang, R. ve Zhong, F. (2020). Enzymatic degradation and bioaccessibility of protein encapsulated β -carotene nano-emulsions during in vitro gastro-intestinal digestion. *Food Hydrocolloids*, 100(June 2019), 105177. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105177
- Chevalier, R. C., Gomes, A. ve Cunha, R. L. (2022). Role of aqueous phase composition and hydrophilic emulsifier type on the stability of W/O/W emulsions. *Food Research International*, 156(March), 111123. doi:10.1016/j.foodres.2022.111123
- Choi, M. J., Briançon, S., Bazile, D., Royere, A., Min, S. G. ve Fessi, H. (2007). Effect of cryoprotectant and freeze-drying process on the stability of W/ O/W emulsions. *Drying Technology*, 25(5), 809–819. doi:10.1080/07373930701370183
- Choi, M. J., Choi, D., Lee, J. ve Jo, Y. J. (2020). Encapsulation of a bioactive peptide in a formulation of W1/O/W2-type double emulsions: Formation and stability. *Food Structure*, 25(June), 100145. doi:10.1016/j.foostr.2020.100145
- Christiansen, K. (2014). PGPR, Polyglycerolpolyricinoleate, E476. V. Norn (Ed.), *Emulsifiers in Food Technology* içinde (ss. 209–227). West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. ve Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2
- Clare, D. A. ve Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187–1195. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74983-6
- Contreras, M. del M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M. ve Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566–573. doi:10.1016/j.idairyj.2009.05.004
- Contreras, M. del M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J. ve Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 9–15. doi:10.1016/j.lwt.2010.06.017

- Cottrell, T. ve van Peij, J. (2014). Sorbitan Esters and Polysorbates. V. Norn (Ed.), *Emulsifiers in Food Technology* içinde (ss. 271–280). West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Coumans, W. J., Kerkhof, P. J. A. M., Brink, E. A. ve Otten, W. M. (1998). *The Properties of Water in Foods ISOPOW 6. The Properties of Water in Foods ISOPOW 6*. doi:10.1007/978-1-4613-0311-4
- Cox, S., Sandall, A., Smith, L., Rossi, M. ve Whelan, K. (2020). Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. *Nutrition Reviews*, 0(0), 1–16. doi:10.1093/nutrit/nuaa038
- Daliri, E. B. M., Lee, B. H. ve Oh, D. H. (2018). Current trends and perspectives of bioactive peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2273–2284. doi:10.1080/10408398.2017.1319795
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3). doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x
- Dias, S. V. E., Züge, L. C. B., Santos, A. F. ve Scheer, A. de P. (2018). Effect of surfactants and gelatin on the stability, rheology, and encapsulation efficiency of W1/O/W2 multiple emulsions containing avocado oil. *Journal of Food Process Engineering*, 41(4). doi:10.1111/jfpe.12684
- Dickinson, E. (2011). Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. *Food Biophysics*, 6(1), 1–11. doi:10.1007/s11483-010-9188-6
- Dickinson, E. (2019). Strategies to control and inhibit the flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 96(May), 209–223. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.05.021
- Ding, S., Serra, C. A., Vandamme, T. F., Yu, W. ve Anton, N. (2019). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release*, 295(September 2018), 31–49. doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.037
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. ve Roberfroid, M. B. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81(4), S1–S27. doi:10.1017/S0007114599000471
- Edris, A. ve Bergnsthål, B. (2001). Encapsulation of orange oil in a spray dried double emulsion. *Nahrung - Food*, 45(2), 133–137. doi:10.1002/1521-3803(20010401)45:2<133::aid-food133>3.3.co;2-3
- Erbay, Z., Salum, P. ve Bolat, E. B. (2023). Drying of dairy products. M. S. Jafari ve N. Malekjani (Ed.), *Drying Technologies in Food Processing* içinde (ss. 651–686). Cambridge, United States: Woodhead Publishing Limited.
- Erbay, Z., Aydemir, L.Y.A., Erkin, Ö.C., Altınyüzük, A. (2021). Olgun beyaz peynir lezzetine sahip enzim modifiye peynirin üretim ve in vitro sindirim süreçlerinde oluşan peptitlerin biyoaktivite değişimlerinin belirlenmesi. *TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı*, Proje No: 120O088, Sonuç Raporu.

- Erbay, Z., Aydemir, L.Y.A., Erkin, Ö.C., Uğurlu, Ö. (2021). Türkiye'nin farklı bölgelerinde klasik yöntemle üretilmiş olgun beyaz peynirlerin biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi". Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 19103013, Sonuç Raporu.
- Fäldt, P. ve Bergenståhl, B. (1995). Fat encapsulation in spray-dried food powders. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(2), 171–176. doi:10.1007/BF02638895
- Fang, Z. ve Bhandari, B. (2012). Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Research International*, 48(2), 478–483. doi:10.1016/j.foodres.2012.05.025
- Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I. ve Muscholik, G. (2007). Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, 21(5–6), 943–952. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.10.021
- Fieber, W., Hafner, V. ve Normand, V. (2011). Oil droplet size determination in complex flavor delivery systems by diffusion NMR spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 356(2), 422–428. doi:10.1016/j.jcis.2011.01.018
- Flores-Belmont, I. A., Palou, E., López-Malo, A. ve Jiménez-Munguía, M. T. (2015). Simple and double microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with chitosan using spray drying. *International Journal of Food Studies*, 4(2), 188–200. doi:10.7455/ijfs/4.2.2015.a7
- Fournaise, T., Burgain, J., Perroud, C., Scher, J., Gaiani, C. ve Petit, J. (2020). Impact of formulation on reconstitution and flowability of spray-dried milk powders. *Powder Technology*, 372, 107–116. doi:10.1016/j.powtec.2020.05.085
- Fu, N., Woo, M. W. ve Chen, X. D. (2011). Colloidal transport phenomena of milk components during convective droplet drying. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(2), 255–266. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.026
- Gaonkar, A. G. (1991). Surface and interfacial activities and emulsion characteristics of some food hydrocolloids. *Topics in Catalysis*, 5(4), 329–337. doi:10.1016/S0268-005X(09)80045-3
- García, A. F., Zöller, H., Butz, P., Stärke, J. ve Tauscher, B. (2006). High pressure induced hydrolysis at C-terminus of peptide derivatives yielding bioactive peptides. *Food Chemistry*, 95(2), 301–306. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.010
- García, M. C., Muñoz, J., Alfaro, M. C. ve Franco, J. M. (2016). Influence of Processing on the Physical Stability of Multiple Emulsions Containing a Green Solvent. *Chemical Engineering and Technology*, 39(6), 1137–1143. doi:10.1002/ceat.201500283
- Garti, N., Aserin, A., Tiunova, I. ve Binyamin, H. (1999). Double emulsions of water-in-oil-in-water stabilized by α -form fat microcrystals. Part 1: Selection of emulsifiers and fat microcrystalline particles. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(3), 383–389. doi:10.1007/s11746-999-0246-5
- Garti, N ve Lutz, R. (2004). Recent progress in double emulsions. D. N. Petsev (Ed.), *Interface Science and Technology* içinde (ss. 557–605). Elsevier. doi:10.1016/S1573-4285(04)80016-4

- Garti, Nissim. (1997a). Double emulsions-scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123–124, 233–246. doi:10.1016/S0927-7757(96)03809-5
- Garti, Nissim. (1997b). Double emulsions - Scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123–124, 233–246. doi:10.1016/S0927-7757(96)03809-5
- Garti, Nissim ve Benichou, A. (2004). Recent Developments in Double Emulsions for Food Applications. S. E. Friberg, K. Larsson ve J. Sjöblom (Ed.), *Food Emulsions: Third Edition, Revised and Expanded* içinde .
- Gharehbeiglou, P., Jafari, S. M., Hamishekar, H., Homayouni, A. ve Mirzaei, H. (2019). Pectin-whey protein complexes vs. small molecule surfactants for stabilization of double nano-emulsions as novel bioactive delivery systems. *Journal of Food Engineering*, 245(June 2018), 139–148. doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.10.016
- Ghasemi, H., Darjani, S., Mazloomi, H. ve Mozaffari, S. (2020). Preparation of stable multiple emulsions using food-grade emulsifiers: evaluating the effects of emulsifier concentration, W/O phase ratio, and emulsification process. *SN Applied Sciences*, 2(12), 1–9. doi:10.1007/s42452-020-03879-5
- Girolodi, M., Grambusch, I. M., Neutzling Lehn, D. ve Volken de Souza, C. F. (2021). Encapsulation of dairy protein hydrolysates: Recent trends and future prospects. *Drying Technology*, 39(11), 1513–1528. doi:10.1080/07373937.2021.1906695
- Giroux, H. J., Robitaille, G. ve Britten, M. (2016). Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 225–232. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.050
- Giroux, H. J., Shea, R., Sabik, H., Fustier, P., Robitaille, G. ve Britten, M. (2019). Effect of oil phase properties on peptide release from water-in-oil-in-water emulsions in gastrointestinal conditions. *Lwt*, 109(April), 429–435. doi:10.1016/j.lwt.2019.04.012
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. (2010). Süt Serum Proteinleri ve Türevlerinin Biyolojik ve Fizyolojik Aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 8(1), 23–31.
- Hall, M., Frank, E., Holmes, G., Pfahringer, B., Reutemann, P. ve Witten, I. H. (2009). The WEKA data mining software. *ACM SIGKDD Explorations Newsletter*, 11(1), 10–18. doi:10.1145/1656274.1656278
- Han, L., Zhou, S., Lu, K., Zheng, Y., Qi, B. ve Li, Y. (2022). Effects of inducer type and concentration on the formation mechanism of W/O/W double emulsion gels. *Food Chemistry*, 379(January), 132166. doi:10.1016/j.foodchem.2022.132166
- Hartel, R. W. (2016). *Food Emulsifiers and Their Applications*.
- Hartel, R. W. ve Firoozmand, H. (2016). Emulsifiers in Confectionery. G. L. Hasenhuettl ve R. W. Hartel (Ed.), *Food Emulsifiers and Their Applications* içinde (3 th.). Cham, Switzerland: Springer.

- Hassanshahi, N., Hu, G., Lee, K. ve Li, J. (2023). Effect of ultrasonic homogenization on crude oil-water emulsion stability. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 58(3), 211–221. doi:10.1080/10934529.2023.2178788
- Hildebrand, G. E. ve Tack, J. W. (2000). Microencapsulation of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(2), 173–176. doi:10.1016/S0378-5173(99)00415-9
- Himmetagaoglu, A.B., Erbay, Z. ve Cam, M. (2018). Production of microencapsulated cream: Impact of wall materials and their ratio. *International Dairy Journal*, 83, 20–27. doi:10.1016/j.idairyj.2018.03.007
- Himmetagaoglu, A. B., Berktaş, S., Cam, M. ve Erbay, Z. (2020). Optimisation of spray drying process in microencapsulated cream powder production. *Journal of Dairy Research*, 87(3), 375–378. doi:10.1017/S0022029920000795
- Ho, M. L., Fu, Y. C., Wang, G. J., Chen, H. T., Chang, J. K., Tsai, T. H. ve Wang, C. K. (2008). Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite. *Journal of Controlled Release*, 128(2), 142–148. doi:10.1016/j.jconrel.2008.02.012
- Hoppel, M., Juric, S., Reznicek, G., Wirth, M. ve Valenta, C. (2015). Multiple W/O/W emulsions as dermal peptide delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 25(February), 16–22. doi:10.1016/j.jddst.2014.11.001
- Hu, Y. T., Ting, Y., Hu, J. Y. ve Hsieh, S. C. (2017). Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 16–26. doi:10.1016/j.jfda.2016.10.021
- Jamshidi, A., Antequera, T., Solomando, J. C. ve Perez-Palacios, T. (2020). Microencapsulation of oil and protein hydrolysate from fish within a high-pressure homogenized double emulsion. *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 60–69. doi:10.1007/s13197-019-04029-5
- Jayasundera, M., Adhikari, B., Adhikari, R. ve Aldred, P. (2011). The effects of proteins and low molecular weight surfactants on spray drying of model sugar-rich foods: Powder production and characterisation. *Journal of Food Engineering*, 104(2), 259–271. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.017
- Jiao, J. ve Burgess, D. J. (2009). Multiple Emulsion: Technology and Applications. Abraham Aserin (Ed.), *Small içinde* (1. bs., C. 5, ss. 1–29). Hoboken, New Jersey: Wiley. doi:10.1002/smll.200990090
- Jillavenkatesa, A., Dapkunas, S. J. ve Lum, L.-S. H. (2001). Particle Size Characterization. *Natl. Inst. Stand. Technol*, 960(1–165).
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A. ve Vernon-Carter, E. J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2425–2433. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.06.022

- Jo, Y. J., Karbstein, H. P. ve Van Der Schaaf, U. S. (2019). Collagen peptide-loaded W1/O single emulsions and W1/O/W2 double emulsions: Influence of collagen peptide and salt concentration, dispersed phase fraction and type of hydrophilic emulsifier on droplet stability and encapsulation efficiency. *Food and Function*, 10(6), 3312–3323. doi:10.1039/c8fo02467g
- Jo, Y. J. ve van der Schaaf, U. S. (2021). Fabrication and characterization of double (W1/O/W2) emulsions loaded with bioactive peptide/polysaccharide complexes in the internal water (W1) phase for controllable release of bioactive peptide. *Food Chemistry*, 344(February 2020), 128619. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128619
- Jokela, P., Fletcher, P. D. I., Aveyard, R. ve Lu, J. R. (1990). The use of computerized microscopic image analysis to determine emulsion droplet size distributions. *Journal of Colloid And Interface Science*, 134(2), 417–426. doi:10.1016/0021-9797(90)90152-E
- Kabakci, C., Sumnu, G., Sahin, S. ve Oztop, M. H. (2021). Encapsulation of Magnesium with Lentil Flour by Using Double Emulsion to Produce Magnesium Enriched Cakes. *Food and Bioprocess Technology*, 14(10), 1773–1790. doi:10.1007/s11947-021-02672-5
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R. ve Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 170–175. doi:10.1016/j.ifset.2007.07.005
- Khadem, B. ve Sheibat-Othman, N. (2019). Theoretical and Experimental Investigations of Double Emulsion Preparation by Ultrasonication. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58(19), 8220–8230. doi:10.1021/acs.iecr.9b00556
- Khalid, N., Kobayashi, I., Neves, M. A., Uemura, K. ve Nakajima, M. (2013). Preparation and characterization of water-in-oil emulsions loaded with high concentration of l-ascorbic acid. *Lwt*, 51(2), 448–454. doi:10.1016/j.lwt.2012.11.020
- Kim, C. K., Kim, S. C., Shin, H. J., Kim, K. M., Oh, K. H., Lee, Y. B. ve Oh, I. J. (1995). Preparation and characterization of cytarabine-loaded w/o/w multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 124(1), 61–67. doi:10.1016/0378-5173(95)00074-S
- Kim, E. H.-J., Chen, X. D. ve Pearce, D. (2005). Melting characteristics of fat present on the surface of industrial spray-dried dairy powders. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42(1), 1–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.01.004
- Kim, H. J., Decker, E. A. ve McClements, D. J. (2004). Comparison of droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin at pH 3 and 7. *Langmuir*, 20(14), 5753–5758. doi:10.1021/la048899b
- Kim, J. H. ve Bae, Y. H. (2004). Albumin loaded microsphere of amphiphilic poly(ethylene glycol)/poly(α -ester) multiblock copolymer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(3), 245–251. doi:10.1016/j.ejps.2004.07.011
- Kim, J. W., Kang, H. H., Suh, K. Do ve Oh, S. G. (2003). Stabilization of water-soluble antioxidant in water-in-oil-in-water double emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 24(6), 833–839. doi:10.1081/DIS-120025551

- Kim, Y. M., Wang, M. H. ve Rhee, H. I. (2004). A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research*, 339(3), 715–717. doi:10.1016/j.carres.2003.11.005
- Kınık, Ö. ve Oğuz, G. (2002). Süt Proteinleri Kaynaklı Biyoaktif Peptitler. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 195–203.
- Kocaman, E., Can Karaca, A. ve Van der Meeren, P. (2020). Release of amino acids encapsulated in PGPR-stabilized W/O/W emulsions is affected by temperature and hydrophobicity. *Food Research International*, 137(January), 109527. doi:10.1016/j.foodres.2020.109527
- Kocaman, E., Rabiti, D., Murillo Moreno, J. S., Can Karaca, A. ve Van der Meeren, P. (2022). Oil Phase Solubility Rather Than Diffusivity Determines the Release of Entrapped Amino Acids and Di-Peptides from Water-in-Oil-in-Water Emulsions. *Molecules*, 27(2). doi:10.3390/molecules27020394
- Korhonen, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 79–88. doi:10.1046/j.1471-0307.2002.00050.x
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. doi:10.1016/j.jff.2009.01.007
- Korhonen, H. ve Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308. doi:10.2174/1381612033454892
- Kralova, I. ve Sjöblom, J. (2009). Surfactants Used in Food Industry : A Review Surfactants Used in Food Industry : A Review, 2691. doi:10.1080/01932690902735561
- Kumar, A., Kaur, R., Kumar, V., Kumar, S., Gehlot, R. ve Aggarwal, P. (2022). New insights into water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions: Properties, fabrication, instability mechanism, and food applications. *Trends in Food Science and Technology*, 128(March), 22–37. doi:10.1016/j.tifs.2022.07.016
- Lamba, H., Sathish, K. ve Sabikhi, L. (2015). Double Emulsions: Emerging Delivery System for Plant Bioactives. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 709–728. doi:10.1007/s11947-014-1468-6
- Lane, M. E., Brennan, F. S. ve Corrigan, O. I. (2010). Comparison of post-emulsification freeze drying or spray drying processes for the microencapsulation of plasmid DNA. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(7), 831–838. doi:10.1211/0022357056406
- Langrish, T. A. G., Marquez, N. ve Kota, K. (2006). An investigation and quantitative assessment of particle shape in milk powders from a laboratory-scale spray dryer. *Drying Technology*, 24(12), 1619–1630. doi:10.1080/07373930601031133
- Leal-Calderon, F., Bibette, J. ve Schmitt, V. (2007). *Emulsion science: Basic principles. Emulsion Science: Basic Principles*. doi:10.1007/978-0-387-39683-5
- Lee, J. I. ve Yoo, H. S. (2008). Biodegradable microspheres containing poly(ϵ -caprolactone)-Pluronic block copolymers for temperature-responsive release of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(1), 81–87. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.07.008

- Lee, L., Hancocks, R., Noble, I. ve Norton, I. T. (2014). Production of water-in-oil nanoemulsions using high pressure homogenisation: A study on droplet break-up. *Journal of Food Engineering*, 131, 33–37. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.01.024
- Lee, L. L., Niknafs, N., Hancocks, R. D. ve Norton, I. T. (2013). Emulsification: Mechanistic understanding. *Trends in Food Science and Technology*, 31(1), 72–78. doi:10.1016/j.tifs.2012.08.006
- Lee, Y. K., Ahn, S. Il ve Kwak, H. S. (2013). Optimizing microencapsulation of peanut sprout extract by response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 307–314. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.06.006
- Leister, N. ve Karbstein, H. P. (2020). Evaluating the Stability of Double Emulsions—A Review of the Measurement Techniques for the Systematic Investigation of Instability Mechanisms. *Colloids and Interfaces*, 4(1), 8. doi:10.3390/colloids4010008
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B. ve Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). doi:10.3390/ijms17060950
- Leong, T. S. H., Zhou, M., Kukan, N., Ashokkumar, M. ve Martin, G. J. O. (2017). Preparation of water-in-oil-in-water emulsions by low frequency ultrasound using skim milk and sunflower oil. *Food Hydrocolloids*, 63, 685–695. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.10.017
- Li, J., Wang, S., Wang, H., Cao, W., Lin, H., Qin, X., ... Zheng, H. (2023). Effect of ultrasonic power on the stability of low-molecular-weight oyster peptides functional-nutrition W1/O/W2 double emulsion. *Ultrasonics Sonochemistry*, 92(October 2022), 106282. doi:10.1016/j.ultsonch.2022.106282
- Lin, Y., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A. ve Guinee, T. P. (2018). Effect of heat treatment, evaporation and spray drying during skim milk powder manufacture on the compositional and processing characteristics of reconstituted skim milk and concentrate. *International Dairy Journal*, 78, 53–64. doi:10.1016/j.idairyj.2017.10.007
- Linke, C. ve Drusch, S. (2016). Turbidity in oil-in-water-emulsions — Key factors and visual perception. *Food Research International*, 89, 202–210. doi:10.1016/j.foodres.2016.07.019
- López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L. ve Recio, I. (2007). Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Dairy Science and Technology*, 87(4–5), 241–249. doi:10.1051/lait:2007019
- Lormand, C., Zellmer, G. F., Németh, K., Kilgour, G., Mead, S., Palmer, A. S., ... Moebis, A. (2018). Weka trainable segmentation plugin in ImageJ: A semi-automatic tool applied to crystal size distributions of microlites in volcanic rocks. *Microscopy and Microanalysis*, 24(6), 667–675. doi:10.1017/S1431927618015428

- Luo, S., Chen, J., Zeng, Y., Dai, J., Li, S., Yan, J. ve Liu, Y. (2022). Effect of water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions to encapsulate nisin on the quality and storage stability of fresh noodles. *Food Chemistry: X*, 15(June), 100378. doi:10.1016/j.fochx.2022.100378
- Luo, T. ve Wei, Z. (2023a). Recent progress in food-grade double emulsions: Fabrication, stability, applications, and future trends. *Food Frontiers*, (May), 1–21. doi:10.1002/fft2.276
- Luo, T. ve Wei, Z. (2023b). Recent progress in food-grade double emulsions: Fabrication, stability, applications, and future trends. *Food Frontiers*, (May), 1–21. doi:10.1002/fft2.276
- Maa, Y. F. ve Hsu, C. C. (1997). Effect of primary emulsions on microsphere size and protein-loading in the double emulsion process. *Journal of Microencapsulation*, 14(2), 225–241. doi:10.3109/02652049709015335
- Maaref, S. ve Ayatollahi, S. (2018). The effect of brine salinity on water-in-oil emulsion stability through droplet size distribution analysis: A case study. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 39(5), 721–733. doi:10.1080/01932691.2017.1386569
- Marciniak, A., Suwal, S., Naderi, N., Pouliot, Y. ve Doyen, A. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science and Technology*, 80(February), 187–198. doi:10.1016/j.tifs.2018.08.013
- Marcone, S., Belton, O. ve Fitzgerald, D. J. (2017). Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 152–162. doi:10.1111/bcp.13002
- Marefati, A., Sjö, M., Timgren, A., Dejmek, P. ve Rayner, M. (2015). Fabrication of encapsulated oil powders from starch granule stabilized W/O/W Pickering emulsions by freeze-drying. *Food Hydrocolloids*, 51, 261–271. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.04.022
- Martins, C., Higaki, N. T. F., Montrucchio, D. P., de Oliveira, C. F., Gomes, M. L. S., Miguel, M. D., ... Dias, J. de F. G. (2020). Development of W1/O/W2 emulsion with gallic acid in the internal aqueous phase. *Food Chemistry*, 314(July 2019), 126174. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126174
- Matos, M., Gutiérrez, G., Coca, J. ve Pazos, C. (2014). Preparation of water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing trans-resveratrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 69–79. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.05.065
- Matos, M., Gutiérrez, G., Iglesias, O., Coca, J. ve Pazos, C. (2015). Enhancing encapsulation efficiency of food-grade double emulsions containing resveratrol or vitamin B12 by membrane emulsification. *Journal of Food Engineering*, 166, 212–220. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.06.002

- Mayers, R. H., Montgomery, D. C. ve Anderson Cook, C. M. (2009). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. (R. H. Mayers, D. C. Montgomery ve C. M. Anderson Cook, Ed.) (3 trh.). New Jersey, USA: Wiley.
- McCarthy, N. A., Gee, V. L., Hickey, D. K., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A. ve Fenelon, M. A. (2013). Effect of protein content on the physical stability and microstructure of a model infant formula. *International Dairy Journal*, 29(1), 53–59. doi:10.1016/j.idairyj.2012.10.004
- McClements, D. J. (1996). Principles of ultrasonic droplet size determination in emulsions. *Langmuir*, 12(14), 3454–3461. doi:10.1021/la960083q
- McClements, D. J. (2016). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. (D.J. McClements, Ed.) (3 th.). Broken Sound Parkway NW: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- McClements, D.J. (2012). Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. N. Garti ve D. J. McClements (Ed.), *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals* içinde (ss. 1–18). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- McClements, David Julian. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649. doi:10.1080/10408390701289292
- McClements, David Julian. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 17(5), 235–245. doi:10.1016/j.cocis.2012.06.002
- McClements, David Julian. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27–53. doi:10.1016/j.cis.2015.02.002
- McClements, David Julian. (2016). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. (D. Julian McClements, Ed.) (thirth.). Broken Sound Parkway NW: CRC Press.
- McClements, David Julian. (2018). Recent developments in encapsulation and release of functional food ingredients: delivery by design. *Current Opinion in Food Science*, 23, 80–84. doi:10.1016/j.cofs.2018.06.008
- McClements, David Julian ve Gumus, C. E. (2016). colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3–26. doi:10.1016/j.cis.2016.03.002
- Merkus, H. G. (2009). *Particle size measurements : fundamentals, practice, quality*. (H. G. Merkus, Ed.). Berlin, Germany: Springer.
- Mikhaylin, S., Boussetta, N., Vorobiev, E. ve Bazinet, L. (2017). High Voltage Electrical Treatments to Improve the Protein Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(12), 11706–11714. doi:10.1021/acssuschemeng.7b03192

- Min, J. Y., Lee, Y. K., Chang, Y. H. ve Kwak, H. S. (2018). Red ginseng extract capsule fabricated using W/O/W emulsion techniques. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1755–1768. doi:10.1080/10942912.2017.1354016
- Mlalila, N., Swai, H., Kalombo, L. ve Hilonga, A. (2014). Effects of spray-drying on w/o/w multiple emulsions prepared from a stearic acid matrix. *Nanotechnology, Science and Applications*, 105. doi:10.2147/nsa.s72083
- Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., He, Q. S., Bazinet, L. ve Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: A review. *RSC Advances*, 5(97), 79270–79278. doi:10.1039/c5ra13419f
- Moonen, H. ve Bas, H. (2014). Mono- and Diglycerides. V. Norn (Ed.), *Emulsifiers in Food Technology* içinde (ss. 73–90). West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Moradi, M., Alvarado, V. ve Huzurbazar, S. (2011). Effect of salinity on water-in-crude oil emulsion: Evaluation through drop-size distribution proxy. *Energy and Fuels*, 25(1), 260–268. doi:10.1021/ef101236h
- Morais, A. R. D. V., Alencar, É. D. N., Xavier Júnior, F. H., Oliveira, C. M. De, Marcelino, H. R., Barratt, G., ... Elaissari, A. (2016). Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 503(1–2), 102–114. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.02.047
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M. J., ... Lambré, C. (2017). Re-evaluation of sorbitan monostearate (E 491), sorbitan tristearate (E 492), sorbitan monolaurate (E 493), sorbitan monooleate (E 494) and sorbitan monopalmitate (E 495) when used as food additives. *EFSA Journal*, 15(5). doi:10.2903/j.efsa.2017.4788
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Domenico, A. Di, Dusemund, B., Frutos, M. J., ... Lambré, C. (2016). Re-evaluation of ammonium phosphatides (E 442) as a food additive. *EFSA Journal*, 14(11). doi:10.2903/j.efsa.2016.4597
- Mulet-Cabero, A. I., Torcello-Gómez, A., Saha, S., Mackie, A. R., Wilde, P. J. ve Brodkorb, A. (2020). Impact of caseins and whey proteins ratio and lipid content on in vitro digestion and ex vivo absorption. *Food Chemistry*, 319(February), 126514. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126514
- Muschiolik, G. (2007). Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), 213–220. doi:10.1016/j.cocis.2007.07.006
- Muschiolik, G. ve Dickinson, E. (2017). Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 532–555. doi:10.1111/1541-4337.12261
- Mutaliyeva, B., Grigoriev, D., Madybekova, G., Sharipova, A., Aidarova, S., Saparbekova, A. ve Miller, R. (2017). Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 521, 147–152. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.10.041

- Narkiewicz-Michalek, J., Szymula, M., Losada-Barreiro, S. ve Bravo-Diaz, C. (2019). Concentration of resveratrol at the oil–water interface of corn oil-in-water emulsions. *Adsorption*, 25(4), 903–911. doi:10.1007/s10450-019-00108-3
- Nese, C., Palugan, L., Cerea, M. ve Pinto, J. F. (2020). Preparation and characterization of a powder manufactured by spray drying milk based formulations for the delivery of theophylline for pediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, 580(March), 119227. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119227
- Neumann, S. M., Wittstock, N., van der Schaaf, U. S. ve Karbstein, H. P. (2018). Interactions in water in oil in water double emulsions: Systematical investigations on the interfacial properties and emulsion structure of the outer oil in water emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 537(August 2017), 524–531. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.10.070
- Niknam, S. M., Escudero, I. ve Benito, J. M. (2020). Formulation and preparation of water-in-oil-in-water emulsions loaded with a phenolic-rich inner aqueous phase by application of high energy emulsification methods. *Foods*, 9(10), 13–28. doi:10.3390/foods9101411
- Nooshkam, M. ve Varidi, M. (2020). Maillard conjugate-based delivery systems for the encapsulation, protection, and controlled release of nutraceuticals and food bioactive ingredients: A review. *Food Hydrocolloids*, 100(September 2019), 105389. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105389
- Norn, V. (2014). Ammonium Phosphatides. V. Norn (Ed.), *Emulsifiers in Food Technology* içinde (ss. 61–71). West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- O’Callaghan, D. J. ve Hogan, S. A. (2013). The physical nature of stickiness in the spray drying of dairy products - A review. *Dairy Science and Technology*, 93(4–5), 331–346. doi:10.1007/s13594-013-0114-9
- O’Regan, J. ve Mulvihill, D. M. (2010). Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*, 43(1), 224–231. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.031
- O’Sullivan, J. J., Norwood, E. A., O’Mahony, J. A. ve Kelly, A. L. (2019). Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. *Journal of Food Engineering*, 243(May 2018), 57–69. doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.08.027
- Orrego, C. E., Salgado, N. ve Sarmiento, L. F. (2023). Freeze drying and vacuum drying. M. S. Jafari ve N. Malekjani (Ed.), *Drying Technologies in Food Processing* içinde (ss. 203–240). Cambridge, United States: Woodhead Publishing Limited.
- Otağ, F. B. ve Hayta, M. (2013). Gidalarda Biyoaktif Peptit Oluşumu ve Aktivitesi Üzerine Isıl İşlem ve Fermantasyonun Etkileri. *Gıda*, 38(5), 307–314. doi:10.5505/gida.2013.99609
- Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H. ve El-Shabrawy, S. A. (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(5), 488–503. doi:10.1016/j.idairyj.2006.05.011

- Ozen, A. E., Pons, A. ve Tur, J. A. (2012). Worldwide consumption of functional foods: A systematic review. *Nutrition Reviews*, 70(8), 472–481. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00492.x
- Pal, R. (1996). Effect of Droplet Size on the Rheology of Emulsions. *AIChE Journal*, 42(11), 3181–3190. doi:10.1002/aic.690421119
- Pal, R. (2011). Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(1), 41–60. doi:10.1016/j.cocis.2010.10.001
- Patange, S. R., Sabikhi, L., Shelke, P. A., Rathod, N., Shaik, A. H., Khetra, Y. ve Kumar M H, S. (2022). Encapsulation of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from alpha-lactalbumin extracted from milk of Gir cows – A *Bos indicus* species. *International Journal of Dairy Technology*, 75(3), 575–587. doi:10.1111/1471-0307.12882
- Patel, S. ve Goyal, A. (2015). Applications of natural polymer gum Arabic: A review. *International Journal of Food Properties*, 18(5), 986–998. doi:10.1080/10942912.2013.809541
- Paula, D. de A., de Oliveira, E. B., de Carvalho Teixeira, A. V. N., Soares, A. de S. ve Ramos, A. M. (2018). Double emulsions (W/O/W): physical characteristics and perceived intensity of salty taste. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 475–483. doi:10.1111/ijfs.13606
- Paximada, P., Batchelor, M., Lillevang, S., Evageliou, V., Howarth, M. ve Dubey, B. N. (2021). Impact of lipophilic surfactant on the stabilization of water droplets in sunflower oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(9), 1–12. doi:10.1111/jfpp.15757
- Pessi, J., Santos, H. A., Miroshnyk, I., Joukoyliruusi, Weitz, D. A. ve Mirza, S. (2014). Microfluidics-assisted engineering of polymeric microcapsules with high encapsulation efficiency for protein drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1–2), 82–87. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.06.012
- Phillips, G. O. (1998). Acacia gum (Gum Arabic): A nutritional fibre; metabolism and calorific value. *Food Additives and Contaminants*, 15(3), 251–264. doi:10.1080/02652039809374639
- Qian, C. ve McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.09.017
- Qu, B. ve Zhong, Q. (2017). Casein-maltodextrin conjugate as an emulsifier for fabrication of structured calcium carbonate particles as dispersible fat globule mimetics. *Food Hydrocolloids*, 66, 61–70. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.12.022
- Quirós, J., Boltes, K. ve Rosal, R. (2016). Bioactive Applications for Electrospun Fibers. *Polymer Reviews*, 56(4), 631–667. doi:10.1080/15583724.2015.1136641
- Raviadarán, R., Ng, M. H., Manickam, S. ve Chandran, D. (2019). Ultrasound-assisted water-in-palm oil nano-emulsion: Influence of polyglycerol polyricinoleate and NaCl on its stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52(December 2018), 353–363. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.12.012

- Raviadarán, R., Ng, M. H., Manickam, S. ve Chandran, D. (2020). Ultrasound-assisted production of palm oil-based isotonic W/O/W multiple nanoemulsion encapsulating both hydrophobic tocotrienols and hydrophilic caffeic acid with enhanced stability using oil-based Sucragel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64(January), 104995. doi:10.1016/j.ultsonch.2020.104995
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical, 26(98), 1231–1237.
- Rivas, J. C. M., Schneider, Y. ve Rohm, H. (2016). Effect of emulsifier type on physicochemical properties of water-in-oil emulsions for confectionery applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 1026–1033. doi:10.1111/ijfs.13063
- Rodriguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragan, L. A., Beristain, C. I. ve Vernon-Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids. *Food Engineering and Physical Properties*, 69(7), 351–359.
- Rojas, E. C., Staton, J. A., John, V. T. ve Papadopoulos, K. D. (2008). Temperature-induced protein release from water-in-oil-in-water double emulsions. *Langmuir*, 24(14), 7154–7160. doi:10.1021/la703974n
- Salami, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Moosavi-Movahedi, F., Ehsani, M. R., Yousefi, R., Farhadi, M., ... Haertlé, T. (2011). Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 471–478. doi:10.1017/S0022029911000628
- Salum, P., Berktaş, S., Cam, M. ve Erbay, Z. (2022). Enzyme-modified cheese powder production: Influence of spray drying conditions on the physical properties, free fatty acid content and volatile compounds. *International Dairy Journal*, 125, 105241. doi:10.1016/j.idairyj.2021.105241
- Salum, P. ve Erbay, Z. (2019). Optimization of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile compounds of high-fat dairy powders. *Food Analytical Methods*, 12(10), 2216–2225. doi:10.1007/s12161-019-01576-7
- Salum, P., Erbay, Z., Kelebek, H. ve Selli, S. (2017). Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction with Different Fibers for the Analysis of Volatile Compounds of White-Brined Cheese by Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 10(6). doi:10.1007/s12161-016-0774-1
- Salum, P., Güven, O., Aydemir, L. Y. ve Erbay, Z. (2022). Microscopy-assisted digital image analysis with trainable Weka segmentation (TWS) for emulsion droplet size determination. *Coatings*, 12(3), 364. doi:10.3390/coatings12030364
- Santos, J., Calero, N. ve Muñoz, J. (2016). Optimization of a green emulsion stability by tuning homogenization rate. *RSC Advances*, 6(62), 57563–57568. doi:10.1039/c6ra10207g
- Sapei, L., Naqvi, M. A. ve Rousseau, D. (2012). Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 316–323. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.10.008

- Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M. ve Jafari, S. M. (2019). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*, 251(December 2018), 19–28. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.02.004
- Saxena, J., Adhikari, B., Brkljaca, R., Huppertz, T., Zisu, B. ve Chandrapala, J. (2023). Influence of Lactose on the Physicochemical Properties and Stability of Infant Formula Powders: A Review. *Food Reviews International*, 39(2), 772–786. doi:10.1080/87559129.2021.1928182
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., ... Albert, C. (2009). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7). doi:10.1038/nmeth.2019.Fiji
- Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A. C., Paulus, N. ve Runkel, F. (2010). Multiple W/O/W emulsions-Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 372(1–3), 48–54. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.09.025
- Schuch, A., Wrenger, J. ve Schuchmann, H. P. (2014). Production of W/O/W double emulsions. Part II: Influence of emulsification device on release of water by coalescence. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 461, 344–351. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.11.044
- Shalaby, S. M., Zakora, M. ve Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73(2), 178–186. doi:10.1017/S0022029905001639
- Shimizu, M. ve Nakane, Y. (1995). Encapsulation of Biologically Active Proteins in a Multiple Emulsion. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(3), 492–496. doi:10.1271/bbb.59.492
- Silva, M., Anh Bui, T. H., Dharmadana, D., Zisu, B. ve Chandrapala, J. (2020). Ultrasound-assisted formation of double emulsions stabilized by casein-whey protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 109(April), 106143. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106143
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. ve Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), 456–467. doi:10.1016/j.appet.2008.05.060
- Tabatabaee Amid, B. ve Mirhosseini, H. (2014). Stabilization of water in oil in water (W/O/W) emulsion using whey protein isolate-conjugated durian seed gum: Enhancement of interfacial activity through conjugation process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 107–114. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.08.042
- Taha, A., Ahmed, E., Ismaiel, A., Ashokkumar, M., Xu, X., Pan, S. ve Hu, H. (2020). Trends in Food Science & Technology Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 363–377. doi:10.1016/j.tifs.2020.09.024

- Tamnak, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., Tabatabaee Amid, B., Kazemi, M. ve Hedayatnia, S. (2016). Encapsulation properties, release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectin-pea protein isolate conjugate and Tween 80. *Food Hydrocolloids*, 61, 599–608. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.023
- Tavares, T., Contreras, M. D. M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I. ve Malcata, F. X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, 32(5), 1013–1019. doi:10.1016/j.peptides.2011.02.005
- Tcholakova, S., Denkov, N. D., Sidzhakova, D., Ivanov, I. B. ve Campbell, B. (2003). Langmuir 2003 Tcholakova Interrelation between drop size and protein adsorption at various emulsification conditions, (13), 5640–5649.
- Tekin Pulatsü, E., Sahin, S. ve Sumnu, G. (2018). Characterization of different double-emulsion formulations based on food-grade emulsifiers and stabilizers. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 39(7), 996–1002. doi:10.1080/01932691.2017.1379021
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C. ve Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395–404. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.119
- Toledo-Madrid, K., Gallardo-Velázquez, T. ve Osorio-Revilla, G. (2018). Microencapsulation of purple cactus pear fruit (*Opuntia ficus indica*) extract by the combined method W/O/W double emulsion-spray drying and conventional spray drying: A comparative study. *Processes*, 6(10), 1–18. doi:10.3390/pr6100189
- Tripathi, S., Bhattacharya, A., Singh, R. ve Tabor, R. F. (2017). Rheological behavior of high internal phase water-in-oil emulsions: Effects of droplet size, phase mass fractions, salt concentration and aging. *Chemical Engineering Science*, 174, 290–301. doi:10.1016/j.ces.2017.09.016
- Tu, M., Liu, H., Zhang, R., Chen, H., Fan, F., Shi, P., ... Du, M. (2018). Bioactive hydrolysates from casein: generation, identification, and in silico toxicity and allergenicity prediction of peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3416–3426. doi:10.1002/jsfa.8854
- Tyufin, A. A., Mohammed, H., P. Kerry, J., O'Sullivan, M. G., Hamill, R. ve Kilcawley, K. (2021). Microscopy-Assisted Digital Photography as an Economical Analytical Tool for Assessment of Food Particles and Their Distribution Through The use of the ImageJ Program. *Advances in Nutrition and Food science*, 2021(02). doi:10.37722/anafs.2021202
- Udenigwe, C. C. ve Fogliano, V. (2017). Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin? *Journal of Functional Foods*, 35, 9–12. doi:10.1016/j.jff.2017.05.029

- Van Der Graaf, S., Schroën, C. G. P. H. ve Boom, R. M. (2005). Preparation of double emulsions by membrane emulsification - A review. *Journal of Membrane Science*, 251(1–2), 7–15. doi:10.1016/j.memsci.2004.12.013
- Vernon-Carter, E. J., Ponce-Palafox, J. T., Arredondo-Figueroa, J. L. ve Pedroza-Islas, R. (2001). Development of microcapsules containing water and lipid soluble natural colorants for trout pigmentation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(2), 59–74. doi:10.1300/J030v10n02_06
- Wang, B., Li, D., Wang, L. J. ve Özkan, N. (2010). Effect of concentrated flaxseed protein on the stability and rheological properties of soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Food Engineering*, 96(4), 555–561. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.09.001
- Wang, L., Dong, C., Li, X., Han, W. ve Su, X. (2017). Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources (Review). *Oncology Reports*, 38(2), 637–651. doi:10.3892/or.2017.5778
- Wang, S., Li, C., Wang, R., Liu, Z., Wang, M., Tan, H., ... Zheng, H. (2021). Annotation-efficient deep learning for automatic medical image segmentation. *Nature Communications*, 12(1), 1–13. doi:10.1038/s41467-021-26216-9
- Wen, L. ve Papadopoulos, K. D. (2000). Effects of surfactants on water transport in W1/O/W2 emulsions. *Langmuir*, 16(20), 7612–7617. doi:10.1021/la000071b
- Wu, T., Liu, C. ve Hu, X. (2022). Enzymatic synthesis, characterization and properties of the protein-polysaccharide conjugate: A review. *Food Chemistry*, 372(May 2021), 131332. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131332
- Xie, S., Wang, S., Zhu, L., Wang, F. ve Zhou, W. Z. (2009). The effect of glycolic acid monomer ratio on the emulsifying activity of PLGA in preparation of protein-loaded SLN. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 358–361. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.08.005
- Yang, W., Li, J., Ren, D., Cao, W., Lin, H., Qin, X., ... Zheng, H. (2021). Construction of a water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion system based on oyster peptides and characterisation of freeze-dried products. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 6635–6648. doi:10.1111/ijfs.15354
- Ye, M., Kim, S. ve Park, K. (2010). Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *Journal of Controlled Release*, 146(2), 241–260. doi:10.1016/j.jconrel.2010.05.011
- Yildirim, M., Sumnu, G. ve Sahin, S. (2017). The effects of emulsifier type, phase ratio, and homogenization methods on stability of the double emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38(6), 807–814. doi:10.1080/01932691.2016.1201768
- Ying, X., Gao, J., Lu, J., Ma, C., Lv, J., Adhikari, B. ve Wang, B. (2021). Preparation and drying of water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion to encapsulate soy peptides. *Food Research International*, 141(September 2020), 110148. doi:10.1016/j.foodres.2021.110148

- Yuan, W., Wu, F., Guo, M. ve Jin, T. (2009). Development of protein delivery microsphere system by a novel S/O/O/W multi-emulsion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2–3), 212–218. doi:10.1016/j.ejps.2008.08.009
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E. ve Vigneron, C. (1999). Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 60(2–3), 179–188. doi:10.1016/S0168-3659(99)00073-5
- Zhang, J. ve Reineccius, G. A. (2016). Preparation and stability of W/O/W emulsions containing sucrose as weighting agent. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(1), 51–56. doi:10.1002/ffj.3269
- Zhang, S., Wang, K., Qin, Y., Zhu, S., Gao, Q. ve Liu, D. (2023). The synthesis, biological activities and applications of protein-polysaccharide conjugates in food system: A review. *Food Quality and Safety*, 7(September 2022), 1–17. doi:10.1093/fqsafe/fyad006
- Zhang, Y., Gou, J., Sun, F., Geng, S. C., Hu, X., Zhang, K., ... Tang, X. (2014). Impact of electrolytes on double emulsion systems (W/O/W) stabilized by an amphiphilic block copolymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 368–374. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.07.008
- Zhao, R. J., Huo, C. Y., Qian, Y., Ren, D. F. ve Lu, J. (2017). Ultra-high-pressure processing improves proteolysis and release of bioactive peptides with activation activities on alcohol metabolic enzymes in vitro from mushroom foot protein. *Food Chemistry*, 231, 25–32. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.058

EKLER

Tablo Ek A1. Mikroskop destekli dijital görüntü analizi ve lazer kırınımı teknikleri ile yapılan partikül boyutu ölçümü sonuçları.

Yağ (%)	Süre (dk)	Depolama (gün)	Mikroskopik Ölçümler			Lazer Kırınımı		
			D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)	D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)
5	3	0	29,67	7,20	15,12	21,10	2,69	8,46
10	3	0	32,83	7,78	16,70	27,80	3,87	13,60
		1	36,01	11,51	19,51	27,00	3,79	13,10
	6	0	31,95	7,38	12,12	20,90	3,12	9,43
		1	32,18	10,38	18,71	23,80	3,54	11,40
	9	0	32,40	7,48	13,25	22,20	3,49	10,50
		1	31,51	10,18	17,86	24,00	3,69	11,50
20	3	0	34,22	12,81	21,71	32,30	6,00	18,60
30	3	0	40,74	12,68	22,60	34,10	7,23	20,70
		1	35,25	14,97	23,44	33,70	7,07	20,20
	6	0	38,57	9,07	19,92	31,40	6,68	18,80
		1	33,11	11,85	19,78	31,70	6,61	18,80
	9	0	37,16	9,75	18,73	27,80	5,76	16,00
		1	33,97	11,93	20,62	28,00	5,65	16,00
40	3	0	32,57	15,53	22,32	31,70	7,22	19,40
50	3	0	37,87	17,99	24,06	26,00	6,35	15,80

Tablo Ek A2. Mikroskop destekli dijital görüntü analizi ve lazer kırınımı teknikleri ile yapılan partikül boyutu ölçümü sonuçları.

Yağ (%)	Süre (dk)	Depolama (gün)	Bulanıklık	Absorbans		Viskozite (cP)
				450 nm	850 nm	
5	3	0	188 ± 2	0,461 ± 0,002	0,340 ± 0,003	1,57 ± 0,01
10	3	0	283 ± 4	0,581 ± 0,016	0,491 ± 0,035	1,82 ± 0,08
		1	313 ± 1	0,605 ± 0,015	0,514 ± 0,014	1,81 ± 0,05
	6	0	290 ± 1	0,641 ± 0,011	0,503 ± 0,005	1,74 ± 0,08
		1	311 ± 9	0,659 ± 0,010	0,513 ± 0,014	1,97 ± 0,09
	9	0	262 ± 1	0,574 ± 0,014	0,449 ± 0,011	1,73 ± 0,06
		1	281 ± 1	0,596 ± 0,007	0,462 ± 0,001	2,00 ± 0,03
20	3	0	471 ± 3	0,804 ± 0,010	0,758 ± 0,006	2,92 ± 0,34
30	3	0	623 ± 7	0,882 ± 0,023	0,869 ± 0,012	4,80 ± 0,18
		1	600 ± 18	0,892 ± 0,018	0,885 ± 0,013	4,54 ± 0,44
	6	0	692 ± 21	0,976 ± 0,018	0,943 ± 0,005	3,92 ± 0,06
		1	656 ± 30	1,043 ± 0,009	0,956 ± 0,022	3,82 ± 0,18
	9	0	816 ± 21	1,164 ± 0,014	1,078 ± 0,005	3,79 ± 0,09
		1	782 ± 1	1,183 ± 0,006	1,082 ± 0,003	3,68 ± 0,08
40	3	0	984 ± 13	1,298 ± 0,009	1,218 ± 0,011	6,45 ± 0,52
50	3	0	1000+	1,560 ± 0,019	1,494 ± 0,023	12,48 ± 1,66

Tablo Ek A3. Rotor-statör homojenizatör ile optimizasyon deneme planına göre üretilen emülsiyonların çeşitli fiziksel özellikleri*.

Üretim Kodu	Viskozite (cP)	n	K	EI (μS/s)	T (°C)	0.Gün			Stabilite İndeksi (%)	30.Gün		
						D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)		D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)
RS-1	94,5	0,93	1,19	0,02	52,8	0,75	0,41	0,47	93,10	0,71	0,45	0,55
RS-2	99,8	0,95	1,19	0,02	38,1	0,98	0,48	0,59	95,91	1,13	0,72	1,00
RS-3	97,0	0,94	1,19	0,02	50,1	0,65	0,39	0,44	91,74	0,67	0,43	0,51
RS-4	108,3	0,94	1,32	0,02	38,9	1,34	0,50	0,67	90,81	1,28	0,76	0,88
RS-5	101,0	0,94	1,22	0,02	41,2	0,93	0,45	0,56	91,92	0,77	0,50	0,56
RS-6	99,1	0,95	1,18	0,02	39,1	1,14	0,51	0,65	93,22	0,86	0,56	0,62
RS-7	96,9	0,95	1,16	0,02	39,3	0,96	0,62	0,70	92,69	0,95	0,63	0,71
RS-8	103,5	0,95	1,22	0,02	41,7	1,21	0,69	0,81	95,38	1,19	0,73	0,83
RS-9	51,2	0,56	2,50	1107	26,0	10,53	2,90	4,91	60,99	13,01	3,25	5,88
RS-10	97,9	0,95	1,17	0,02	38,3	1,28	0,75	0,87	88,61	1,36	0,83	0,94
RS-11	47,0	0,58	2,17	1013	26,3	12,78	3,78	6,02	59,81	23,23	4,64	12,19
RS-12	97,4	0,95	1,16	0,02	32,5	1,42	0,82	1,04	92,23	1,84	1,03	1,21
RS-13	94,5	0,96	1,08	0,02	31,3	1,64	0,88	1,08	89,56	5,05	1,02	1,96

* D, tanecik çapı; EI, elektriksel iletkenlik; K, kıvrım katsayısı; n, akış davranış indeksi; RS, rotor-statör homojenizatör; T, örnek sıcaklığı.

Tablo Ek A4. Ultrases homojenizatör ile optimizasyon deneme planına göre üretilen emülsiyonların çeşitli fiziksel özellikleri*.

Üretim Kodu	Viskozite (cP)	n	K	Eİ (μS/s)	T (°C)	O.Gün			Stabilite indeksi (%)	30.Gün		
						D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)		D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)
US-1	101,1	0,94	1,23	0,02	68,5	5,52	1,08	2,75	83,76	13,99	6,53	10,58
US-2	97,6	0,95	1,15	0,02	43,0	3,53	0,84	1,41	89,94	5,37	1,14	2,41
US-3	102,1	0,95	1,20	0,02	66,6	5,41	1,44	2,96	83,72	13,67	7,58	9,87
US-4	103,6	0,94	1,20	0,02	58,5	3,52	1,17	1,88	84,92	6,99	2,42	4,46
US-5	93,4	0,95	1,11	0,02	34,6	6,38	1,38	2,90	92,23	13,05	2,72	6,62
US-6	103,3	0,96	1,20	0,02	69,8	5,44	1,00	2,46	85,37	12,02	4,28	7,40
US-7	101,2	0,96	1,17	0,02	69,3	5,65	1,03	2,44	84,58	12,28	5,65	9,56
US-8	100,6	0,93	1,14	0,02	64,5	4,29	1,16	2,20	83,83	12,03	5,41	8,55
US-9	98,8	0,96	1,14	0,02	80,0	9,19	1,83	4,50	82,38	15,93	6,81	11,54
US-10	96,8	0,95	1,15	0,02	85,3	8,22	2,75	5,25	83,58	11,88	4,86	7,86
US-11	103,9	0,93	1,17	0,02	70,0	5,68	1,01	2,11	85,21	12,64	5,43	8,65
US-12	101,6	0,98	1,20	0,02	72,2	6,41	1,75	3,98	84,29	12,17	5,17	8,08
US-13	95,9	0,94	1,15	0,02	48,9	6,05	0,85	2,23	89,09	15,67	3,81	10,61

* D, tanecik çapı; Eİ, elektriksel iletkenlik; K, kıvam katsayısı; n, akış davranış indeksi; T, örnek sıcaklığı; US, ultrases homojenizatör.

Tablo Ek A5. Yüksek basınç homojenizatör ile optimizasyon deneme planına göre üretilen emülsiyonların çeşitli fiziksel özellikleri*.

Üretim Kodu	Viskozite (cP)	n	K	Eİ (μS/s)	T (°C)	O.Gün			Stabilite indeksi (%)	30.Gün		
						D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)		D(90) (μm)	D[3,2] (μm)	D[4,3] (μm)
HPH-1	99,2	0,92	1,30	0,02	38,2	9,91	2,61	5,51	83,41	11,98	3,16	7,43
HPH-2	96,6	0,95	1,15	0,02	50,4	7,24	3,24	4,97	86,47	13,41	5,13	8,73
HPH-3	95,2	0,95	1,12	0,02	46,4	6,44	2,55	4,17	85,55	13,28	5,91	8,56
HPH-4	91,7	0,94	1,12	0,02	70,4	3,82	1,24	2,04	90,40	6,93	3,09	4,76
HPH-5	90,1	0,95	1,07	0,02	64,1	7,30	3,29	4,83	89,45	8,52	3,10	4,71
HPH-6	88,6	0,95	1,05	0,02	57,1	4,12	1,58	2,28	87,97	11,09	5,50	7,51
HPH-7	92,0	0,96	1,06	0,02	57,4	8,17	2,22	4,04	85,02	13,87	5,93	8,40
HPH-8	94,8	0,96	1,09	0,02	48,2	10,71	2,44	5,58	84,48	17,51	6,70	11,36
HPH-9	94,5	0,95	1,11	0,02	56,5	5,85	2,18	3,56	88,14	13,47	5,25	8,31
HPH-10	95,3	0,94	1,17	0,02	56,5	6,97	2,29	3,88	83,84	13,01	5,16	9,00
HPH-11	94,5	0,95	1,12	0,02	57,1	10,60	2,80	6,11	83,65	12,06	4,01	7,15
HPH-12	102,0	0,95	1,20	0,02	39,9	11,57	2,36	5,59	87,24	17,94	2,92	9,50
HPH-13	105,4	1,01	1,03	0,02	39,5	11,43	2,05	5,12	85,89	13,67	2,30	6,65

* D, tanecik çapı; Eİ, elektriksel iletkenlik; HPH, yüksek basınç homojenizatör; K, kıvam katsayısı; n, akış davranış indeksi; T, örnek sıcaklığı.

Tablo Ek A6. W/O emülsiyon üretimi için rotor-statör homojenizatör kullanımının optimizasyonunda ANOVA sonucu her bir yanıtı dair elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler.

Kaynak*	Viskozite	D(90) / 0.Gün	Stabilite İndeksi	D(90) / 30.Gün
	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri
Model	0,0003	0,0005	0,0007	0,0004
x ₁	0,0002	<0,0001	0,0004	<0,0001
x ₂	0,0165	0,0164	0,0114	0,0058
x ₁ x ₂	0,0030	0,0626	0,0093	0,0916
x ₁ ²	0,0004	0,0512	0,0015	0,0654
x ₂ ²	0,8057	0,2787	0,8954	0,0371
<i>Lack of Fit</i>	0,1873	0,1739	0,0974	0,3087
R ²	0,9444	0,9365	0,9292	0,9414
Adj-R ²	0,9047	0,8912	0,8786	0,8995
Pred-R ²	0,7088	0,6629	0,5903	0,7274
Adeq Precision	14,236	14,001	13,130	15,156
PRESS	1283,5	0,33	724,89	0,37
C.V.	6,47	10,81	4,84	12,65

* x₁, karıştırma hızı; x₂, işlem süresi.

Tablo Ek A7. W/O emülsiyon üretimi için ultrases homojenizatör kullanımının optimizasyonunda ANOVA sonucu her bir yanıtı dair elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler.

Kaynak*	Viskozite	D(90) / 0.Gün	Stabilite İndeksi	D(90) / 30.Gün
	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri
Model	0,0010	0,0003	0,0003	0,0001
x ₁	0,0113	0,0004	0,2318	0,0002
x ₂	0,0032	0,0006	<0,0001	0,0136
x ₁ x ₂	0,0625	0,9828	0,6827	0,0003
x ₁ ²	0,6086	0,1806	0,2410	0,0007
x ₂ ²	0,0003	0,0006	0,0014	0,0533
<i>Lack of Fit</i>	0,3216	0,6407	0,1983	0,7767
<i>R</i> ²	0,9205	0,9427	0,9425	0,9560
Adj- <i>R</i> ²	0,8638	0,9018	0,9013	0,9246
Pred- <i>R</i> ²	0,6427	0,8108	0,6980	0,8787
Adeq Precision	13,635	17,186	14,757	17,724
PRESS	45,27	5,89	31,08	12,86
C.V.	1,20	8,72	1,07	6,73

* x₁, genlik; x₂, işlem süresi.

Tablo Ek A8. W/O emülsiyon üretimi için yüksek basınç homojenizatör kullanımının optimizasyonunda ANOVA sonucu her bir yanıtı dair elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler.

Kaynak*	Viskozite	D(90) / 0.Gün	Stabilite İndeksi	D(90) / 30.Gün
	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri
Model	0,0006	0,0004	0,0018	<0,0001
x ₁	0,0002	0,0008	0,0296	<0,0001
x ₂	0,0004	0,0003	0,0022	0,0177
x ₁ x ₂	0,0447	0,0095	0,0024	<0,0001
x ₁ ²	0,1285	0,0026	0,0052	0,6536
x ₂ ²	0,9863	0,4346	0,9591	<0,0001
<i>Lack of Fit</i>	0,5662	0,5077	0,6088	0,5909
R ²	0,9313	0,9389	0,9057	0,9945
Adj-R ²	0,8821	0,8953	0,8383	0,9906
Pred-R ²	0,7526	0,7663	0,6758	0,9808
Adeq Precision	14,201	15,189	12,944	55,941
PRESS	64,48	19,64	18,82	2,09
C.V.	1,68	10,69	1,03	2,28

* x₁, basınç; x₂, işlem süresi.

Tablo Ek A9. Üç farklı emülsifikasyon tekniğinin optimum işleme koşulları altında üretilen emülsiyonların fiziksel özellikleri*.

		RS	US	HPH
0. Gün	Viskozite (cP)	93,13 ± 0,62 ^b	97,52 ± 0,25 ^c	90,29 ± 2,06 ^a
	n	0,958 ± 0,004 ^b	0,944 ± 0,000 ^b	0,895 ± 0,016 ^a
	K	1,064 ± 0,024 ^a	1,179 ± 0,001 ^b	1,316 ± 0,073 ^c
	D(90) (µm)	0,67 ± 0,05 ^a	4,07 ± 0,37 ^b	3,55 ± 0,27 ^b
	D[3,2] (µm)	0,423 ± 0,03 ^a	0,982 ± 0,54 ^b	1,438 ± 0,198 ^c
	D[4,3] (µm)	0,479 ± 0,029 ^a	1,177 ± 0,097 ^b	2,157 ± 0,220 ^c
	Span	0,830 ± 0,068 ^a	3,168 ± 0,409 ^b	1,091 ± 0,01 ^a
30. Gün	Stabilite İndeksi (%)	93,77 ± 2,07 ^b	89,57 ± 1,10 ^a	90,08 ± 1,10 ^a
	D(90) (µm)	0,77 ± 0,04 ^a	5,97 ± 0,67 ^b	6,83 ± 1,21 ^b
	D[3,2] (µm)	0,485 ± 0,015 ^a	1,062 ± 0,220 ^b	2,153 ± 0,306 ^c
	D[4,3] (µm)	0,583 ± 0,051 ^a	2,329 ± 0,646 ^b	3,874 ± 0,586 ^c
	Span	0,850 ± 0,041 ^a	4,190 ± 0,735 ^b	1,512 ± 0,094 ^a

* D, tanecik çapı; EI, elektriksel iletkenlik; HPH, yüksek basınç homojenizatör; K, kıvam katsayısı; n, akış davranış indeksi; RS, rotor-statör homojenizatör; US, ultrases homojenizatör.

Tablo Ek A10. W/O/W emülsiyonlarının analizleri sonucunda elde edilen bulanıklık, elektriksel iletkenlik, iç faz tutulma etkinliği, sıcaklık, enerji tüketimi ve ortalama damlacık boyutu değerleri.

Kod	Bulanıklık (FNU)	Elektriksel iletkenlik (μ S/s)	İç Faz Tutulma Etkinliği (%)	Sıcaklık (°C)	Enerji Tüketimi (kJ)	D[3,2] (μ m)	D[4,3] (μ m)
1	632,5	699,0	64,0	37,1	6,16	2,01	3,23
2	653,3	511,0	73,7	34,4	4,36	2,39	3,82
3	593,0	293,7	84,9	27,9	2,39	3,11	4,99
4	626,0	381,0	80,4	29,2	2,75	2,79	4,43
5	660,5	679,0	65,1	34,6	5,73	2,00	3,29
6	636,0	388,0	80,0	29,3	3,08	2,82	4,46
7	523,5	94,9	95,1	23,9	0,64	4,21	7,05
8	640,5	198,0	89,8	26,1	1,67	3,28	5,17
9	643,0	402,0	79,3	29,1	3,14	2,78	4,44
10	651,5	401,0	79,4	29,4	3,15	2,78	4,49
11	650,0	502,0	74,2	31,1	4,05	2,60	4,55
12	658,5	396,0	79,6	30,1	3,09	2,89	4,87
13	526,5	141,5	92,7	26,4	1,15	3,65	6,05

Tablo Ek A11. W/O/W emülsiyonlarının analizleri sonucunda elde edilen damlacık boyutu dağılım parametreleri.

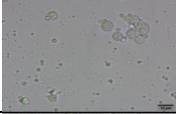
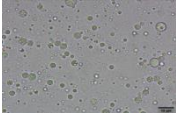
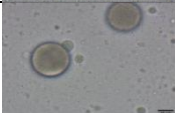
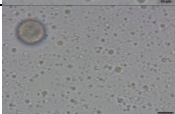
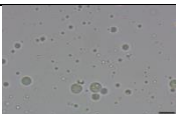
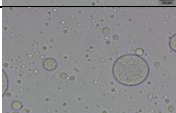
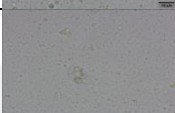
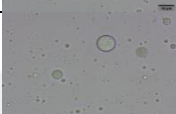
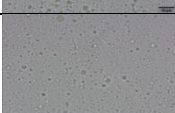
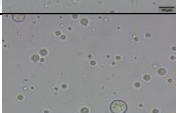
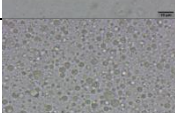
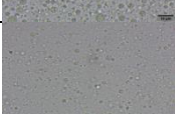
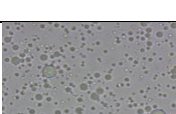
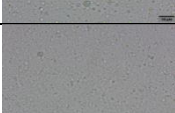
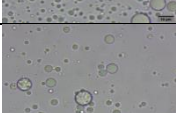
Kod	D(10) (μm)	D(50) (μm)	D(90) (μm)	D(100) (μm)	Spesifik Yüzey Alanı (m^2/kg)	Konsantrasyon (%)	Tekdüzelik (-)	Span (-)
1	0,95	2,90	5,96	11,00	3241	0,0044	0,524	1,731
2	1,20	3,50	6,90	11,20	2729	0,0049	0,494	1,630
3	1,71	4,55	8,98	14,50	2098	0,0055	0,491	1,598
4	1,51	4,08	7,88	12,70	2333	0,0060	0,477	1,561
5	0,92	2,94	6,11	12,60	3255	0,0061	0,533	1,764
6	1,53	4,10	7,95	12,70	2313	0,0049	0,478	1,565
7	2,31	6,08	13,40	24,10	1548	0,0066	0,559	1,826
8	1,84	4,68	9,32	16,40	1986	0,0058	0,492	1,599
9	1,50	4,08	7,92	14,30	2345	0,0050	0,480	1,572
10	1,50	4,08	8,08	16,20	2345	0,0052	0,494	1,613
11	1,31	3,86	8,22	39,60	2509	0,0048	0,584	1,789
12	1,55	4,26	8,77	34,90	2256	0,0057	0,539	1,694
13	2,00	5,29	11,30	21,20	1785	0,0053	0,541	1,751

Tablo Ek A12. W/O/W emülsiyon üretimindeki ultrases homojenizatör işlem koşullarının optimizasyonunda ANOVA sonucu her bir yanıtı dair elde edilmiş doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden terimler.

Kaynak*	İç Faz Tutulma Etkinliği (%)	D (90) (µm)	D [4,3] (µm)
	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri	<i>p</i> -değeri
Model	<0,0001	0,0003	0,0002
x ₁	<0,0001	<0,0001	<0,0001
x ₂	<0,0001	0,0049	0,0028
x ₁ x ₂	0,0005	0,8299	0,4905
x ₁ ²	0,2310	0,0136	0,0321
x ₂ ²	0,6505	0,6045	0,5241
<i>Lack of Fit</i>	0,1967	0,0695	0,0828
<i>R</i> ²	0,9977	0,9435	0,9502
Adj- <i>R</i> ²	0,9960	0,9031	0,9147
Pred- <i>R</i> ²	0,9879	0,6649	0,7105
Adeq Precision	79,453	16,178	17,545
PRESS	12,82	16,36	3,72
C.V.	0,74	7,37	6,46

* x₁, genlik (%); x₂, işlem süresi (s).

Tablo Ek A13. Farklı bileşimlerde %30 polimerik çözelti ve %20 dağılmış faz içeren çift katlı emülsiyonların kurutulması kapsamında yapılan ön deneme üretimleri.

Üretim No	Polimerik çözelti	Atomizasyon Durumu	Üretilen Toz Miktarı (g) / Kurutma Randımanı (%)	Emülsiyon Görüntüsü	Rekonstitüe Toz Görüntüsü
8	NaC-MD	√	14,94 / 39,9		
9	NaC-Lac	√	11,21 / 30,0		
10	NaC-GA	Nozul tıkanıdı!	-		-
11	WPC-Lac	√	0,50 / 1,3		
12	WPC-MD	√	0,25 / 0,7		
13	WPC-GA	√	7,13 / 19,1		
14	NaC-Lac-K	√	11,15 / 31,4		
15	NaC-MD-K	√	12,60 / 33,7		
16	NaC-GA-K	Nozul tıkanıdı!	-		-
17	WPC-Lac-K	√	-		-
18	WPC-MD-K	√	0,52 / 1,4		
19	WPC-GA-K	√	11,16 / 29,8		

Tablo Ek A14. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların damlacık boyutu dağılımına dair hesaplanan parametreleri.*

Örnek*	D(10) (μm)	D(50) (μm)	D(100) (μm)	Spesifik Yüzey Alanı (m^2/kg)	Konsantrasyon (%)	Tekdüzelik (-)
Kontrol	$2,15 \pm 0,02^e$	$4,99 \pm 0,04^e$	$14,40 \pm 0,00^c$	$1844 \pm 17,0^a$	0,0076	$0,427 \pm 0,003^a$
NaC-Lac	$0,56 \pm 0,00^d$	$1,74 \pm 0,01^d$	$6,67 \pm 0,02^b$	$5334 \pm 0,00^b$	0,0018	$0,490 \pm 0,005^a$
NaC-MD	$0,43 \pm 0,00^c$	$1,34 \pm 0,00^b$	$5,55 \pm 0,35^a$	$6912 \pm 7,50^d$	0,0014	$0,577 \pm 0,001^a$
WPC-GA	$0,39 \pm 0,00^b$	$1,44 \pm 0,04^c$	$24,00 \pm 0,00^d$	$7087 \pm 91,0^d$	0,0015	$1,799 \pm 0,036^c$
NaC-Lac-K	$0,54 \pm 0,00^d$	$1,68 \pm 0,01^d$	$6,65 \pm 0,00^b$	$5519 \pm 38,5^b$	0,0019	$0,501 \pm 0,000^a$
NaC-MD-K	$0,44 \pm 0,00^c$	$1,41 \pm 0,01^{bc}$	$5,47 \pm 0,43^a$	$6683 \pm 13,0^c$	0,0015	$0,552 \pm 0,013^a$
WPC-GA-K	$0,34 \pm 0,00^a$	$0,85 \pm 0,01^a$	$5,90 \pm 0,00^a$	9370 ± 119^e	0,0010	$1,050 \pm 0,147^b$

* Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-e) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır ($p>0,05$). Kullanılan kısaltmalar: NaC, Sodyum kazeinat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi; GA, Gam Arabik; K, Konjugat.

Tablo Ek A15. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen tozların tanecik boyutu dağılımına dair hesaplanan parametreleri.*

Duvar Materyali Formülasyonu	D(10) (μm)	D(50) (μm)	D(100) (μm)	Spesifik Yüzey Alanı (m^2/kg)	Konsantrasyon (%)	Tekdüzelik (-)
NaC-Lac	$17,15 \pm 0,13$	$63,2 \pm 1,17^d$	$665,0 \pm 0,00^b$	$249,9 \pm 5,45^b$	0,000010	$1,27 \pm 0,02_{ab}$
NaC-MD	$9,77 \pm 0,22^c$	$29,5 \pm 1,33^c$	$664,3 \pm 0,58^b$	$806,3 \pm 46,11^d$	0,000012	$1,61 \pm 0,14^c$
WPC-GA	$8,37 \pm 0,18^a$	$21,8 \pm 0,60^a$	$609,3 \pm 45,62_a$	$913,5 \pm 18,75^e$	0,000004	$1,30 \pm 0,10^b$
NaC-Lac-K	$17,75 \pm 0,53^e$	$88,1 \pm 3,13^e$	$666,0 \pm 0,00^b$	$211,8 \pm 9,25^a$	0,000019	$1,18 \pm 0,03^a$
NaC-MD-K	$9,21 \pm 0,03^b$	$26,4 \pm 0,57^b$	$663,3 \pm 0,58^b$	$824,7 \pm 19,43^d$	0,000011	$1,55 \pm 0,00^c$
WPC-GA-K	$9,55 \pm 0,16^{bc}$	$27,5 \pm 0,84_{bc}$	$610,0 \pm 45,03_a$	$768,2 \pm 18,83_c$	0,000008	$1,30 \pm 0,03^b$

* Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-f) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır ($p>0,05$). Kullanılan kısaltmalar: NaC, Sodyum kazeinat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi; GA, Gam Arabik; K, Konjugat.

Tablo Ek A16. Farklı duvar materyali formülasyonları ile üretilen tozların nem içerikleri ve su aktivitesi değerleri.*

Özellikler	Duvar Materyali Formülasyonu					
	NaC-Lac	NaC-MD	WPC-GA	NaC-Lac-K	NaC-MD-K	WPC-GA-K
Nem İçeriği (%)	5,67 ± 0,17 ^c	1,62 ± 0,10 ^a	2,82 ± 0,05 ^b	1,54 ± 0,25 ^a	1,15 ± 0,06 ^a	3,08 ± 1,16 ^b
Su Aktivitesi (-)	0,268 ± 0,002 ^d	0,248 ± 0,010 ^c	0,238 ± 0,015 ^{bc}	0,225 ± 0,015 ^{ab}	0,226 ± 0,020 ^{ab}	0,213 ± 0,009 ^a

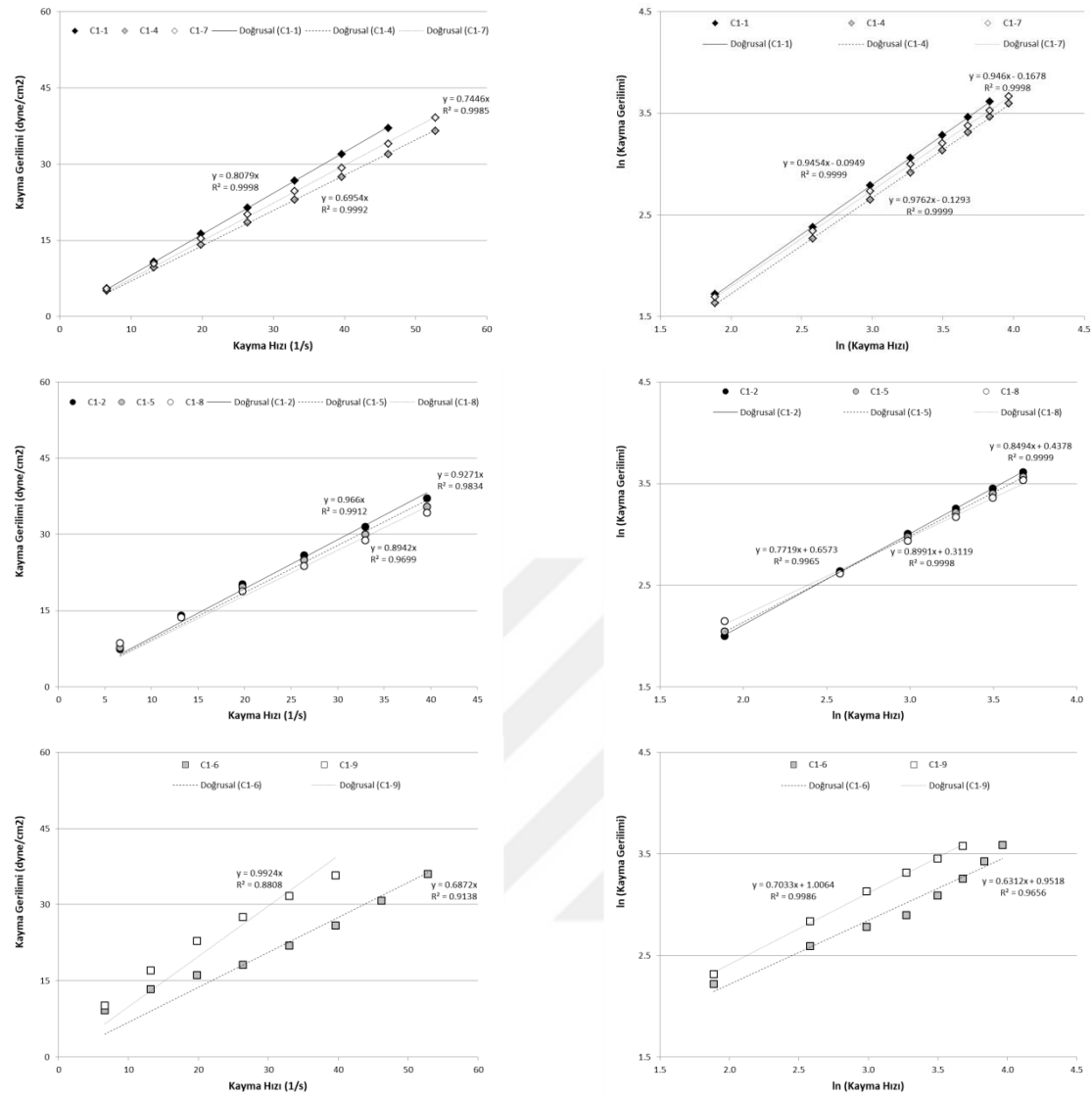
* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-e) aynı ise, üretilen örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır (p>0,05). Kullanılan kısaltmalar: NaC, Sodyum kazeinat; Lac, Laktoz; MD, Maltodekstrin; WPC, Peynir altı suyu protein konsantresi; GA, Gam Arabik; K, Konjugat.

Tablo Ek A17. Mikroenkapsüle kazein hidrolizatlarının üretiminde hesaplanan kurutma randımanı, yüzey yağı, mikroenkapsülasyon verimi ve *in-vitro* sindirim sonrası anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu ve serbest radikal giderme aktivitesi değerleri.*

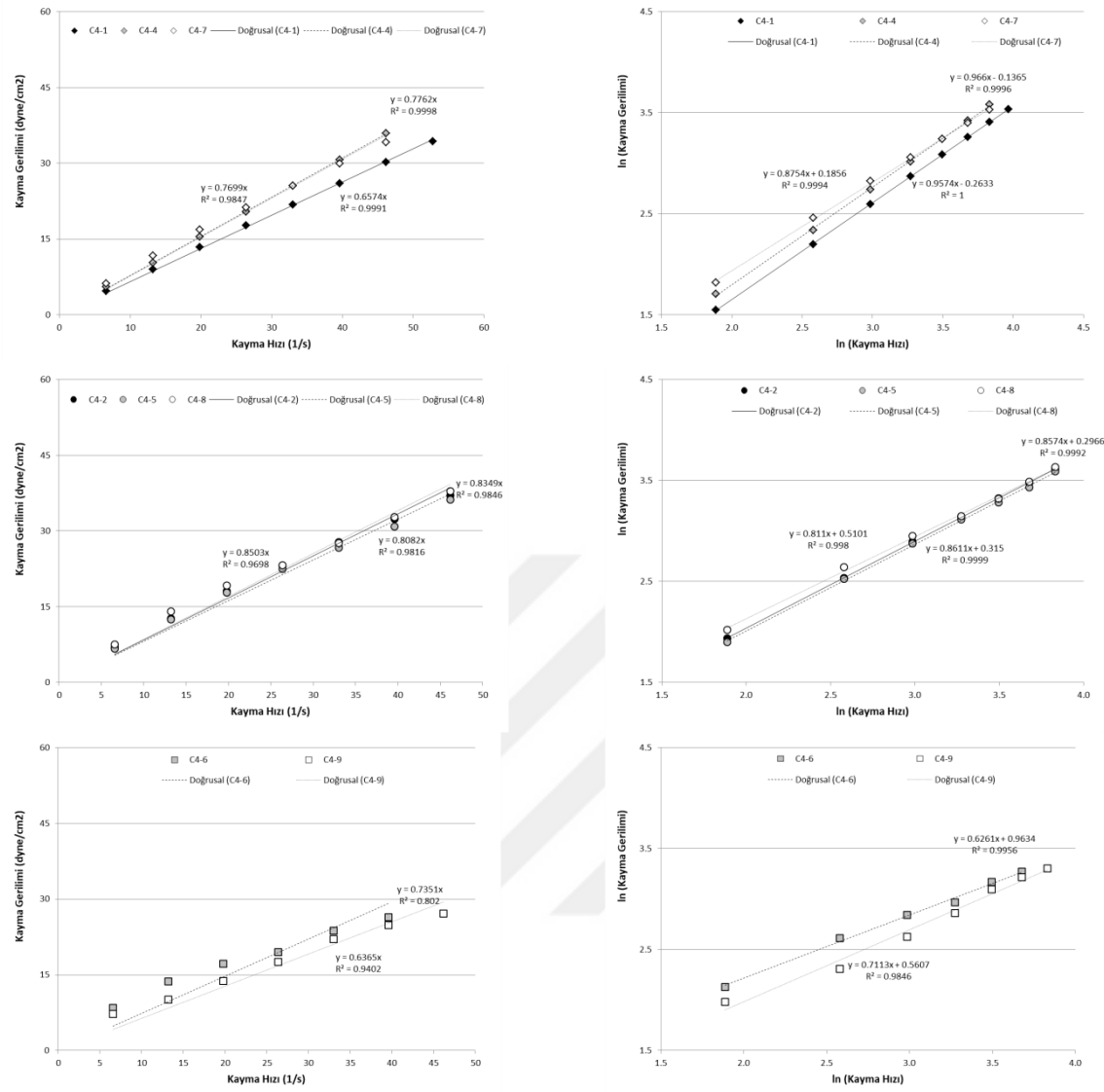
Kod	Kurutma Randımanı (%)	Yüzey Yağı (%)	Mikroenkapsülasyon Verimi (%)	TPM (g Tripton/g örnek)	TPM (fark**) (g Tripton/g örnek)	SRGA (μmol Troloks/g örnek)	SRGA (fark**) (μmol Troloks/g örnek)	ACE inhibisyonu (%)	ACE inhibisyonu (fark**) (%)
1	28,60	8,30	64,99	374,5	32,2	206,5	26,4	34,1	15,9
2	19,23	13,03	48,66	368,6	51,5	139,3	12,8	20,0	0,4
3	29,51	7,57	64,63	388,6	46,3	214,8	34,7	32,7	14,5
4	30,66	7,32	58,78	379,3	37,0	212,8	32,7	34,6	16,4
5	12,32	14,91	27,03	370,0	31,7	154,6	14,8	20,1	3,7
6	30,68	7,57	51,63	471,5	116,7	206,3	36,4	19,8	2,8
7	31,32	8,40	60,00	378,1	35,8	205,3	25,2	38,8	20,7
8	27,38	4,91	63,78	548,6	20,3	224,5	19,0	22,5	5,7
9	24,83	11,40	31,03	371,2	29,1	201,2	26,8	21,6	2,1
10	24,98	6,12	53,19	501,3	67,3	221,2	8,3	30,0	10,1
11	28,78	6,39	65,60	412,3	40,2	209,9	7,1	25,3	10,1
12	28,14	7,57	62,75	381,3	39,1	211,1	31,0	35,0	16,9
13	29,94	10,04	68,45	372,2	26,2	180,1	6,1	20,4	3,8

* ACE, anjiyotensin dönüştürücü enzim; SRGA, serbest radikal giderme aktivitesi; TPM, toplam peptit miktarı.

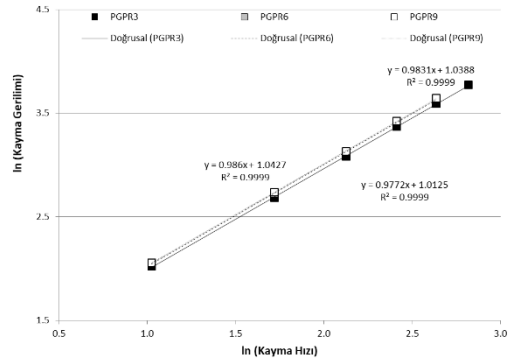
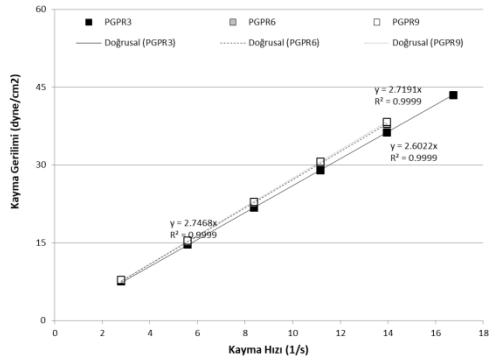
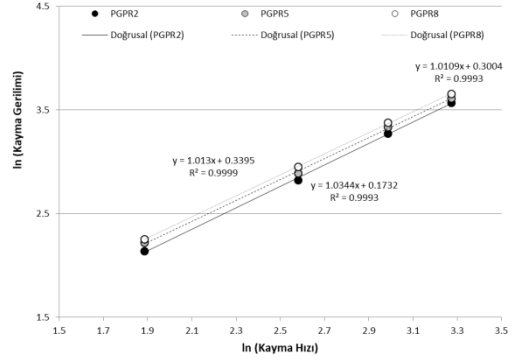
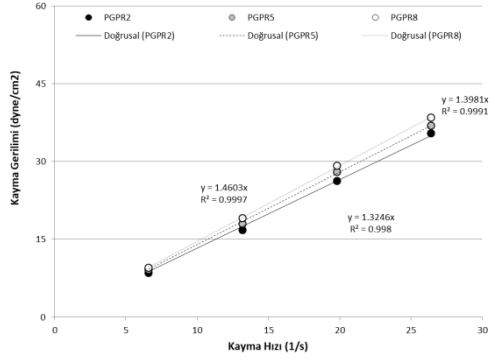
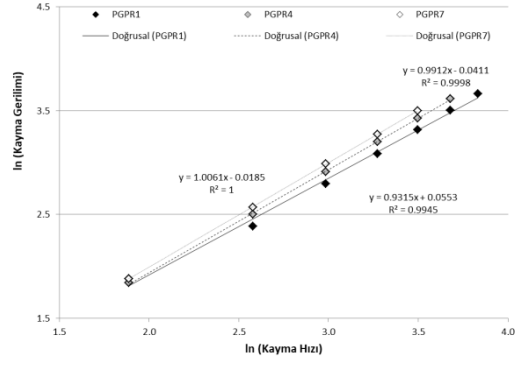
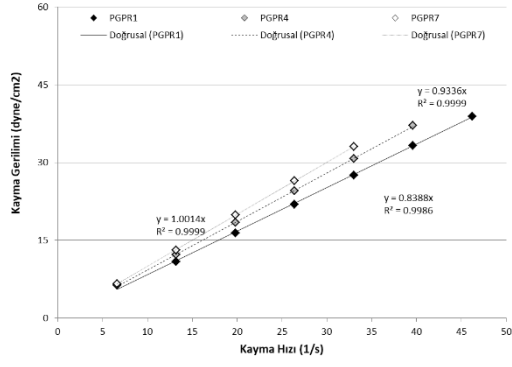
**Fark, örneklerde saptanan değerlerden hidrolizat içermeyen kontrol örneklerinden saptanan değerlerin çıkarılması ile elde edilmiştir.



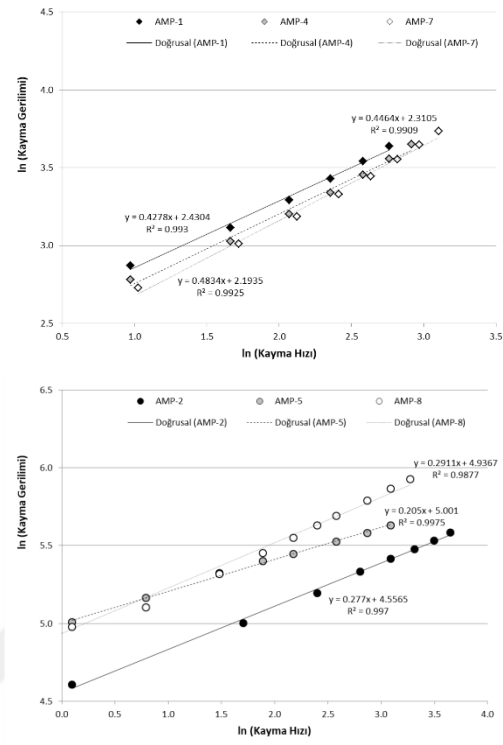
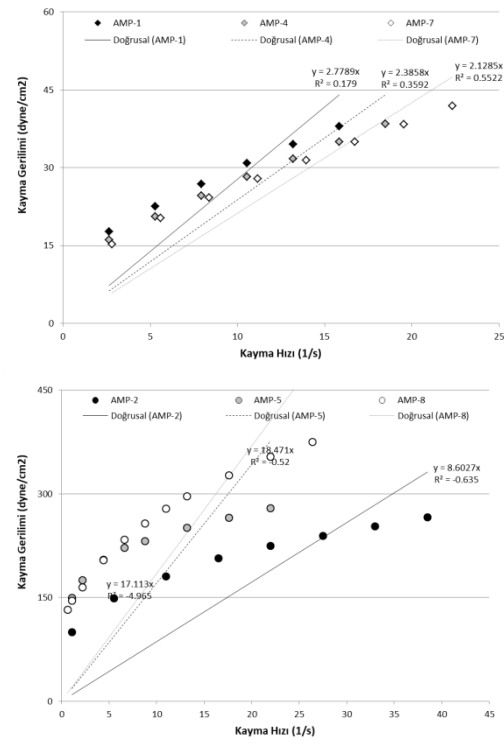
Şekil Ek A1. Crill™ 1 kullanılarak üretilmiş emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler.



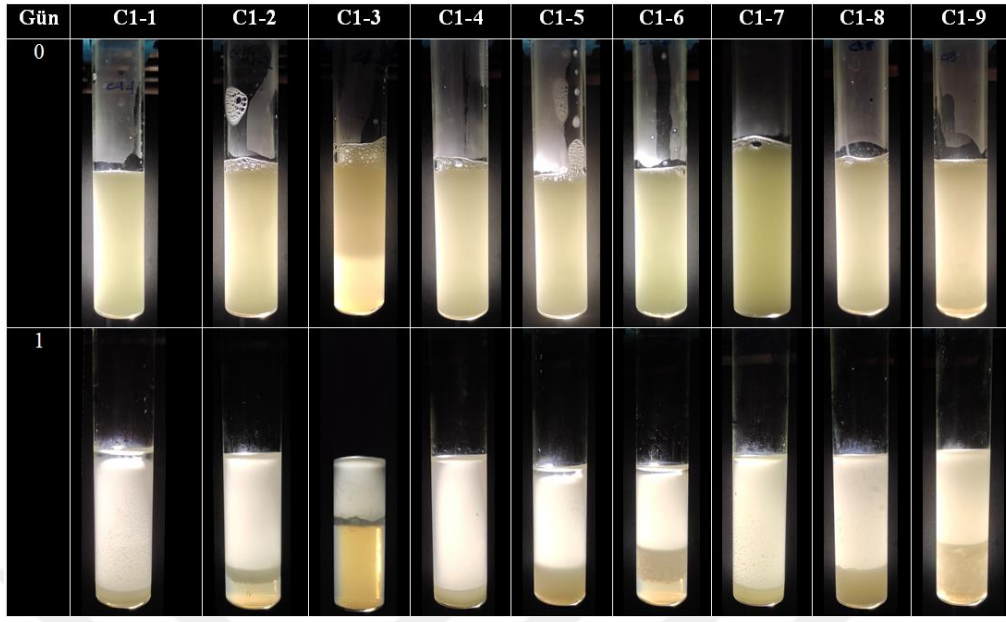
Şekil Ek A2. Crill™ 4 kullanılarak üretilmiş emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler.



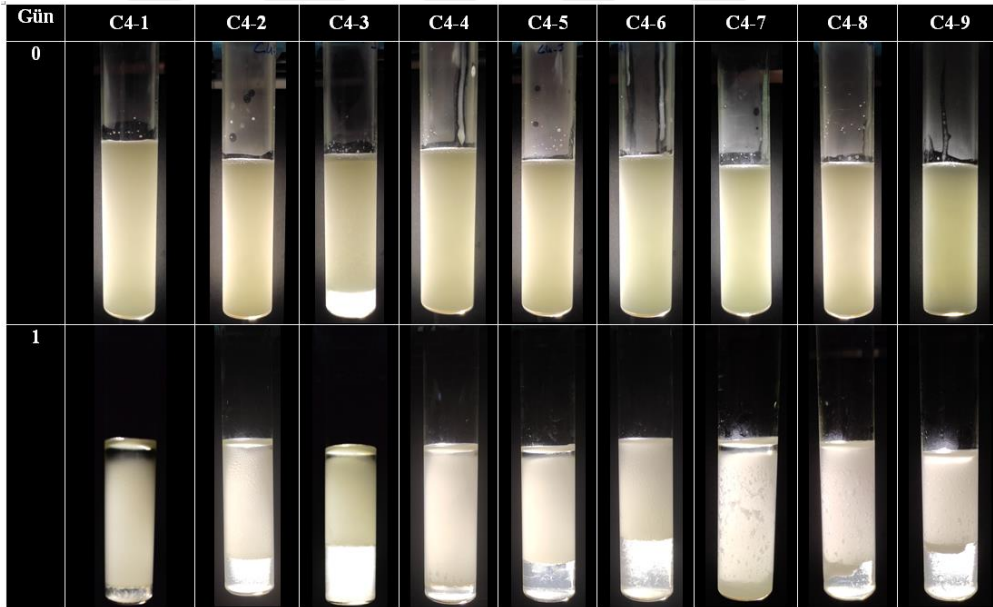
Şekil Ek A3. PGPR 4150 kullanılarak üretilmiş emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler.



Şekil Ek A4. AMP 4455 kullanılarak üretilmiş emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler.



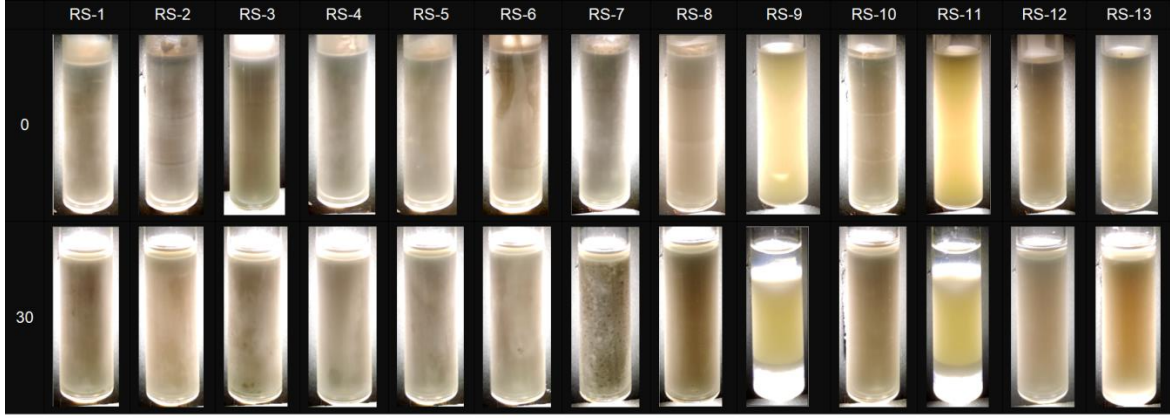
Şekil Ek A5. Crill™ 1 emülgatörü kullanılarak üretilen emülsiyonların kararlılık fotoğrafları.



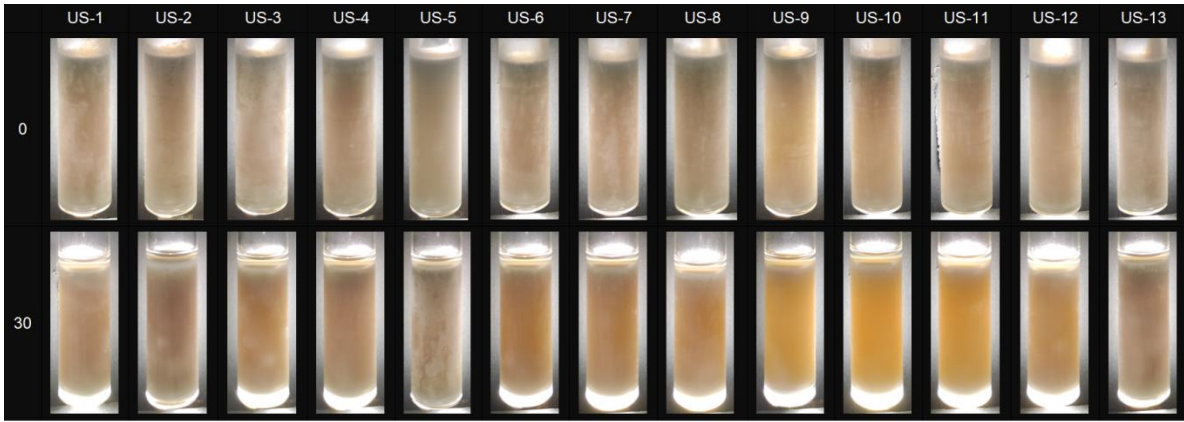
Şekil Ek A6. Crill™ 4 emülgatörü kullanılarak üretilen emülsiyonların kararlılık fotoğrafları.



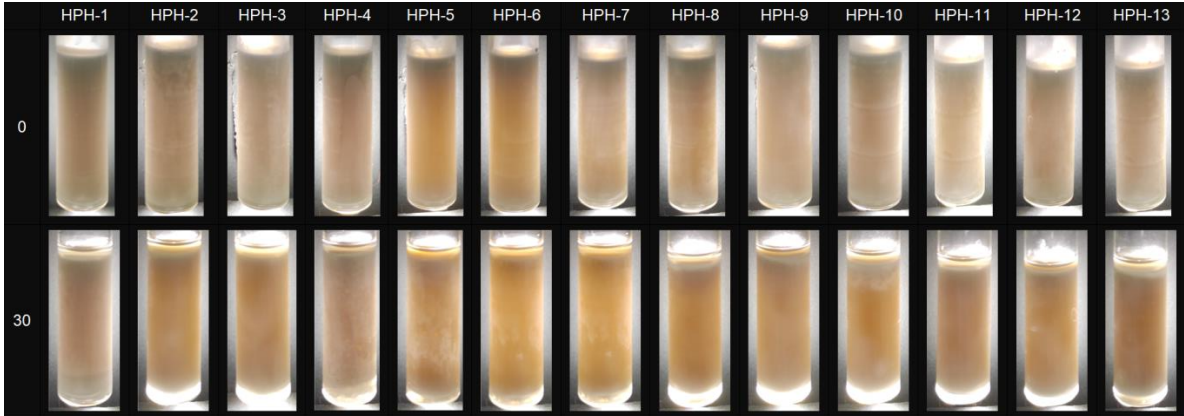
Şekil Ek A7. PGPR 4150 emülgatörü kullanılarak üretilen emülsiyonların kararlılık fotoğrafları.



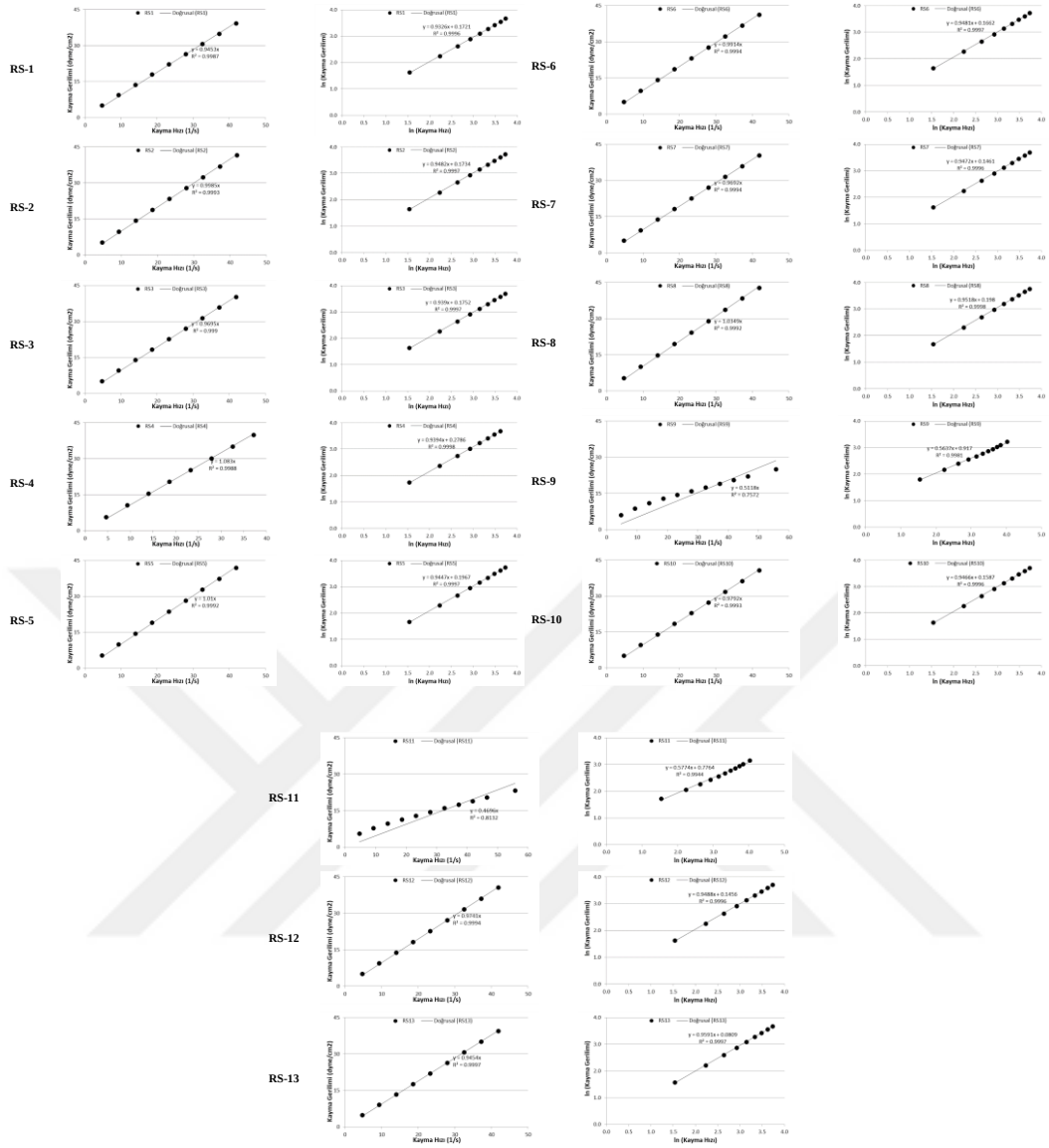
Şekil Ek A8. Rotor-statör kullanılarak üretilen emülsiyonların kararlılık fotoğrafları.



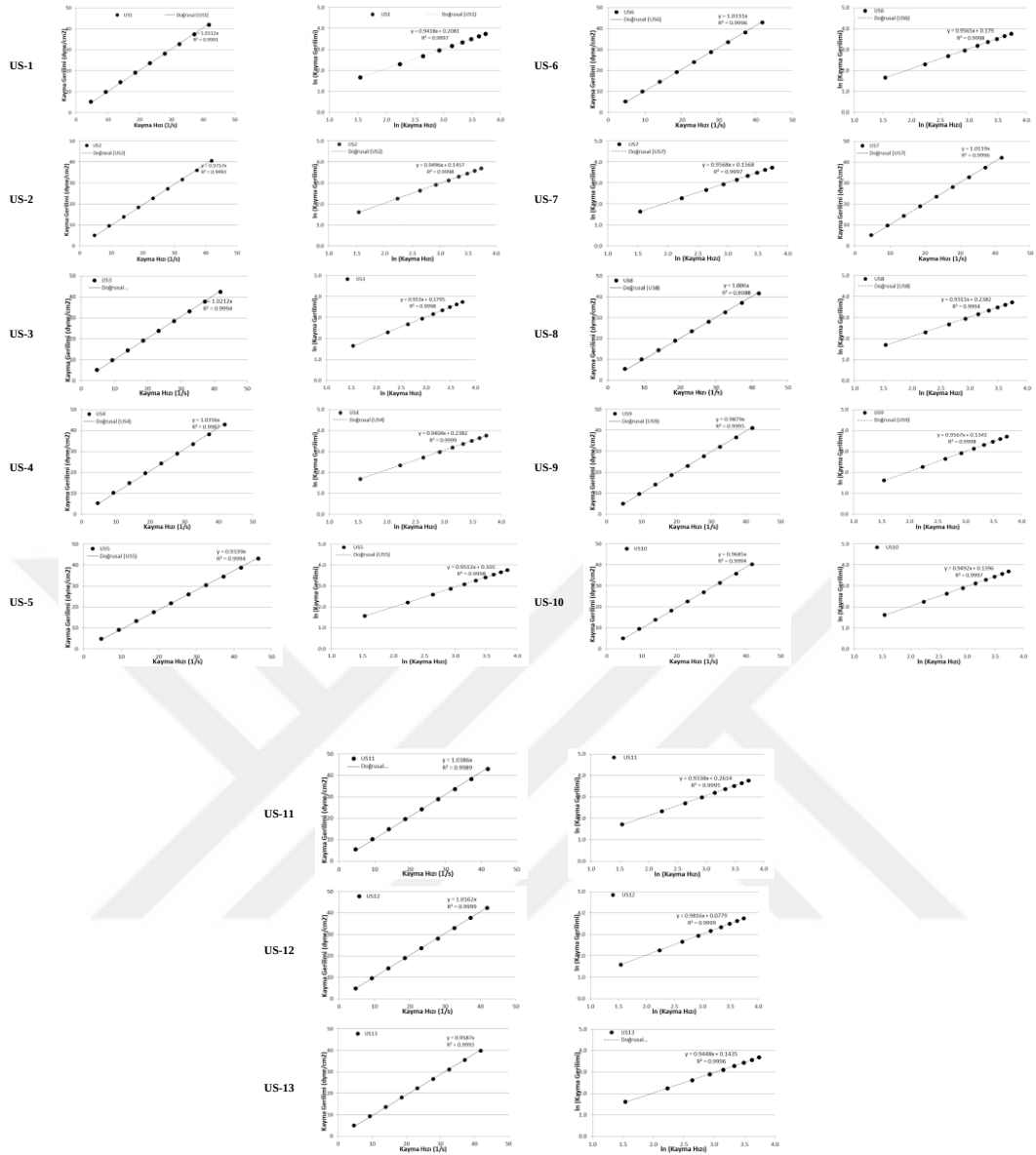
Şekil Ek A9. Ultrases homojenizatör kullanılarak üretilen emülsiyonların kararlılık fotoğrafları.



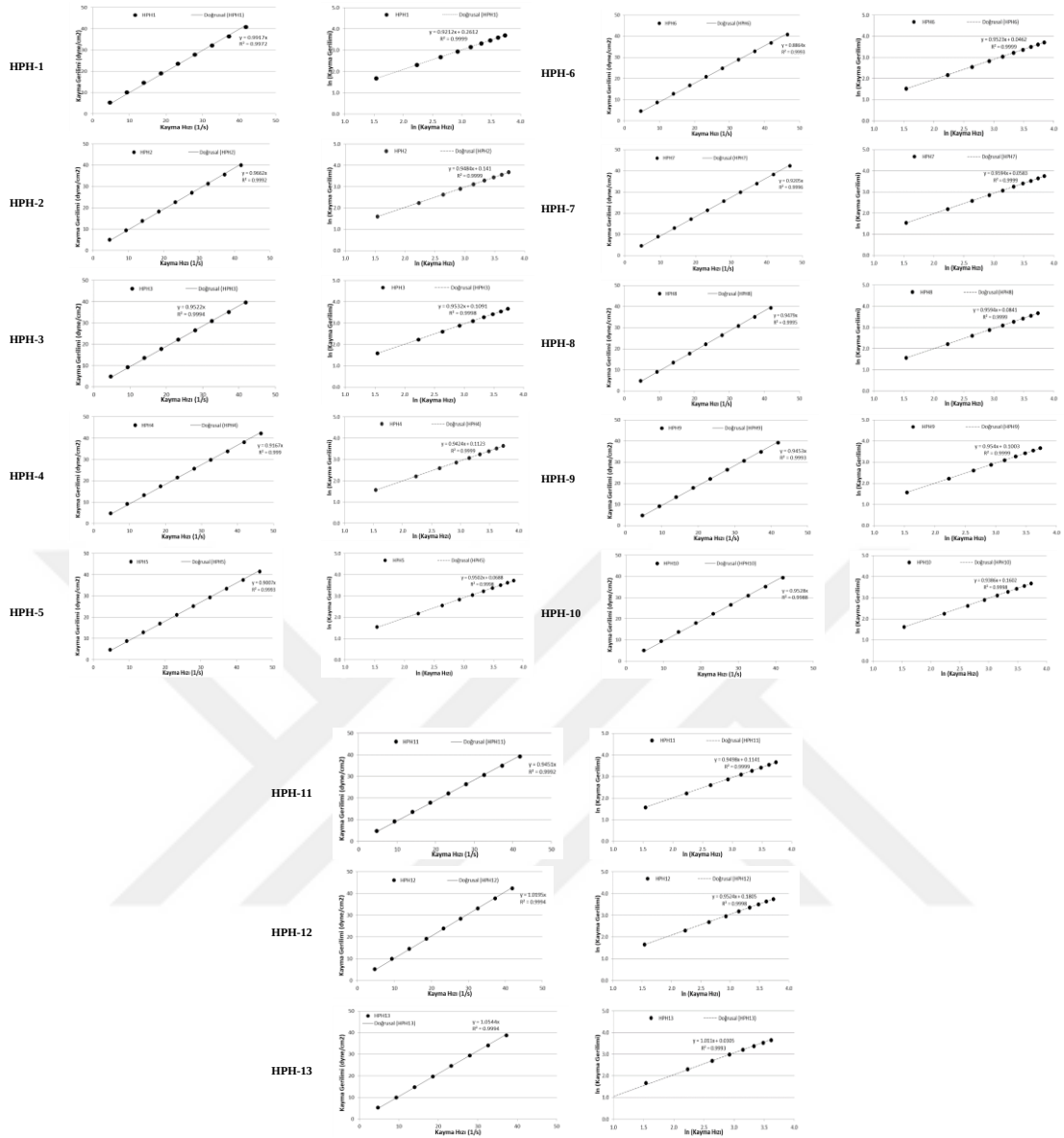
Şekil Ek A10. Yüksek basınç homojenizatör kullanılarak üretilen emülsiyonların kararlılık fotoğrafları.



Şekil Ek A11. Rotor-statör homojenizatör ile deneme tasarımına uygun biçimde hazırlanmış emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler.

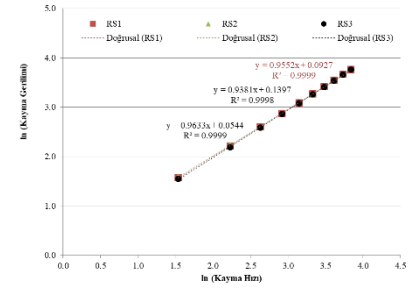
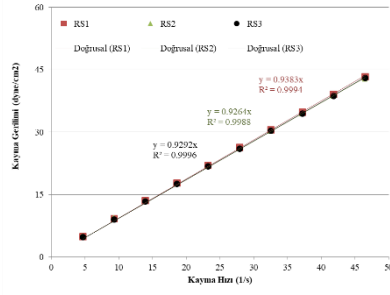


Şekil Ek A12. Ultrases homojenizatör ile deneme tasarımına uygun biçimde hazırlanmış emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler.

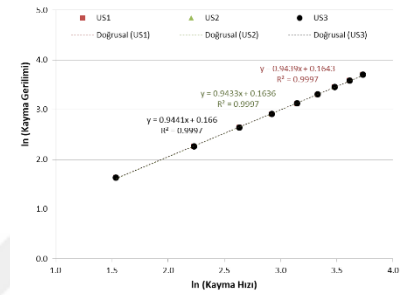
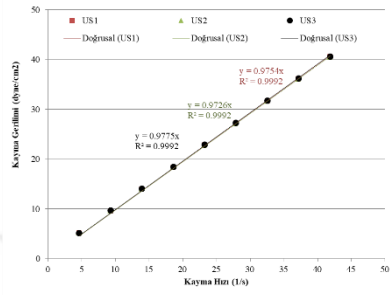


Şekil Ek A13. Ultrases homojenizatör ile deneme tasarımına uygun biçimde hazırlanmış emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı hesaplamalarında kullanılan grafikler.

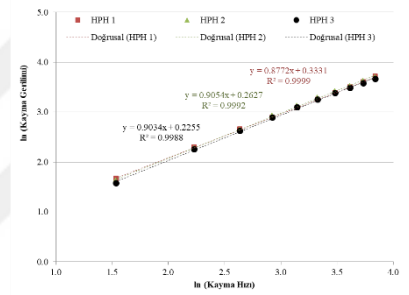
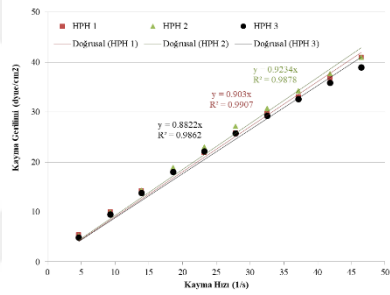
RS



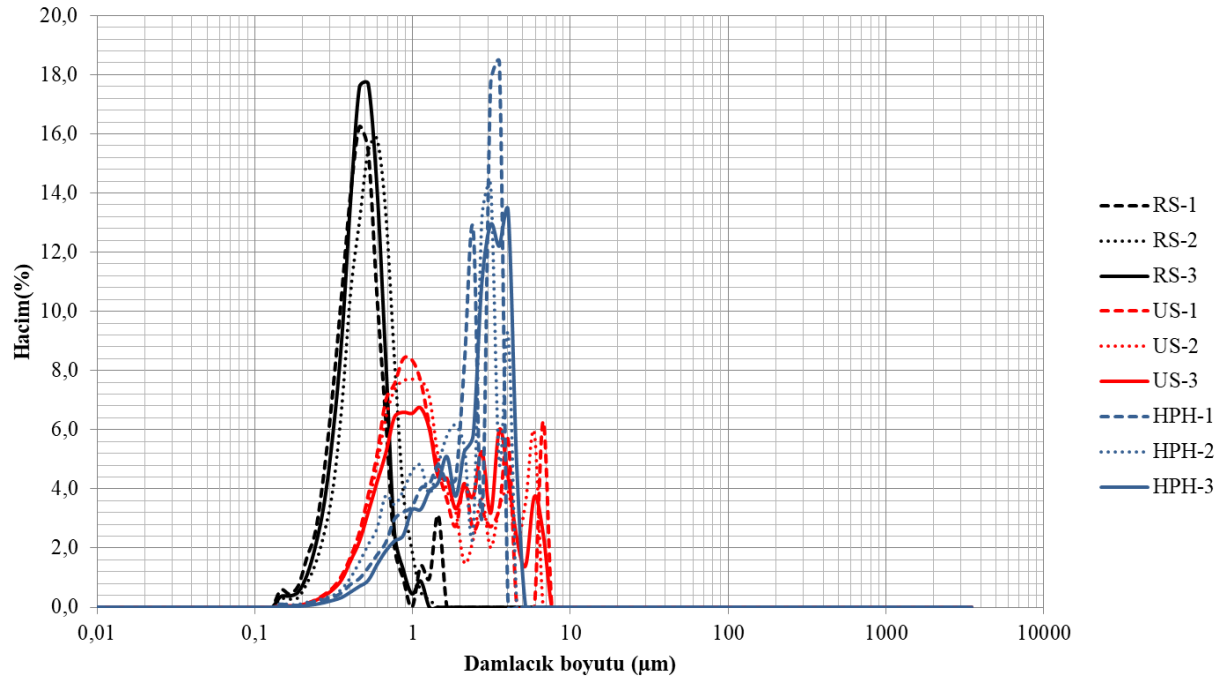
US



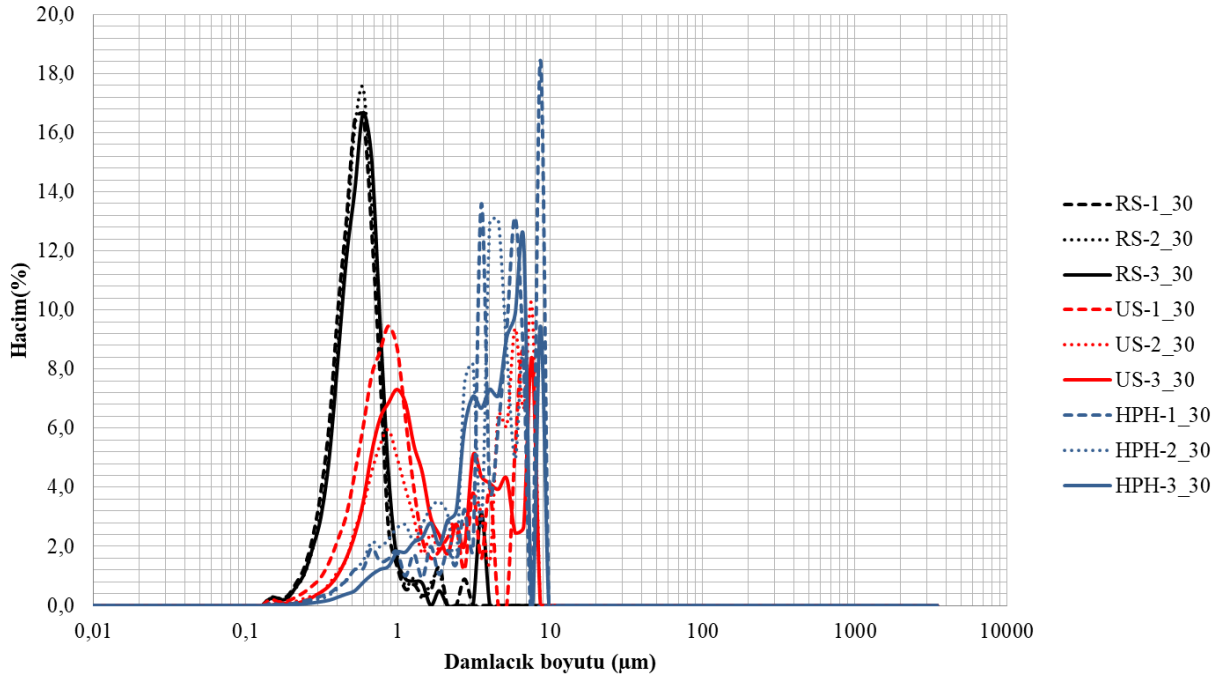
HPH



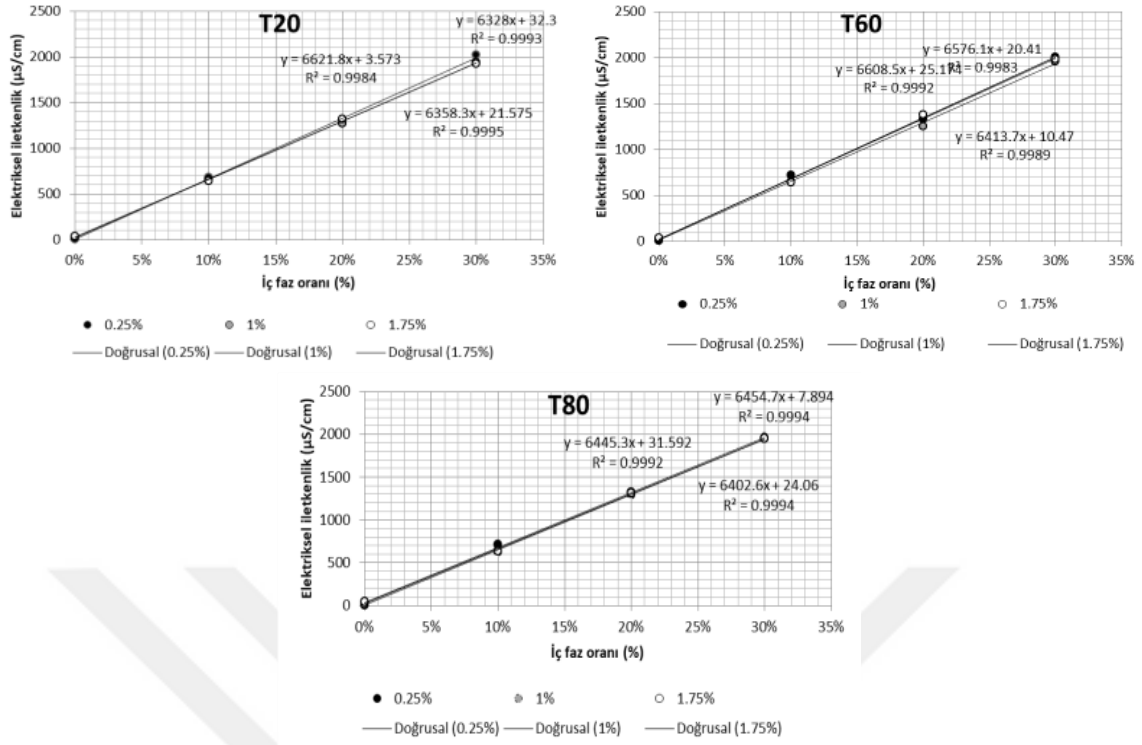
Şekil Ek A14. Üç farklı homojenizatörün optimum noktalarında hazırlanmış emülsiyonların viskozite analiz sonuçları.



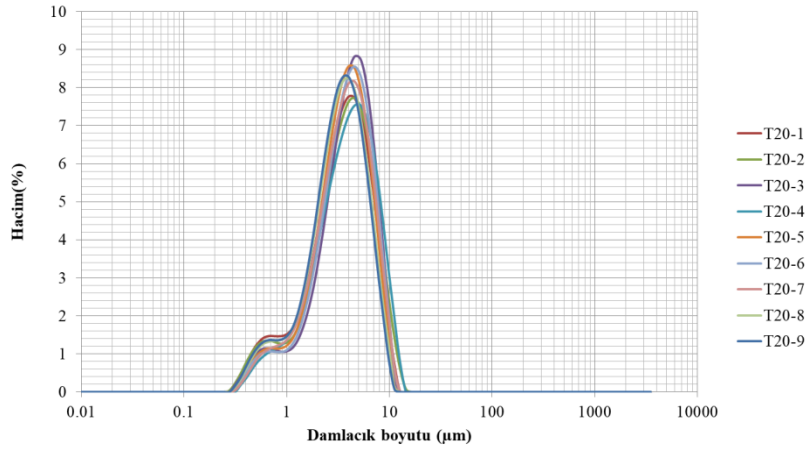
Şekil Ek A15. Üç farklı emülsifikasyon tekniği ile belirlenen optimum işlem koşullarında üretilen emülsiyonların 0.günlerindeki damlacık boyut dağılımları (RS: rotor statör homojenizatör, US: ultrases homojenizatör, HPH: yüksek basınç homojenizatör).



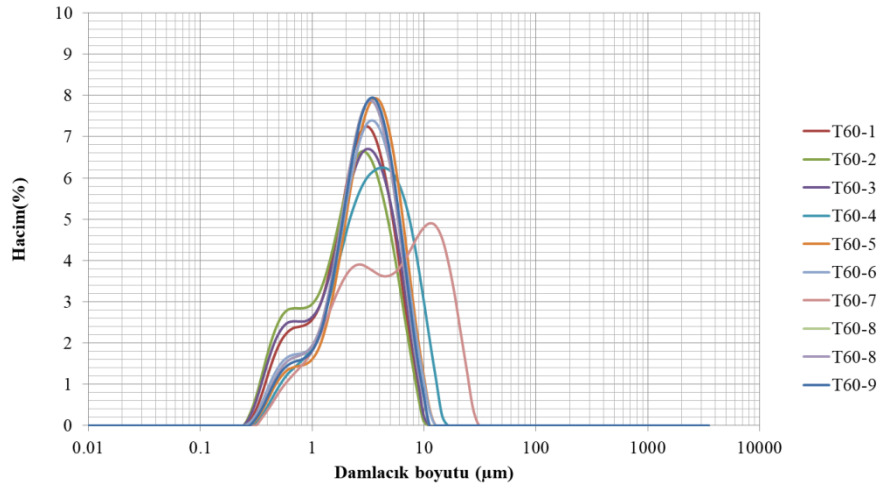
Şekil Ek A16. Üç farklı emülsifikasyon tekniği ile belirlenen optimum işlem koşullarında üretilen emülsiyonların 30.günlerindeki damlacık boyut dağılımları (RS: rotor statör homojenizatör, US: ultrases homojenizatör, HPH: yüksek basınç homojenizatör).



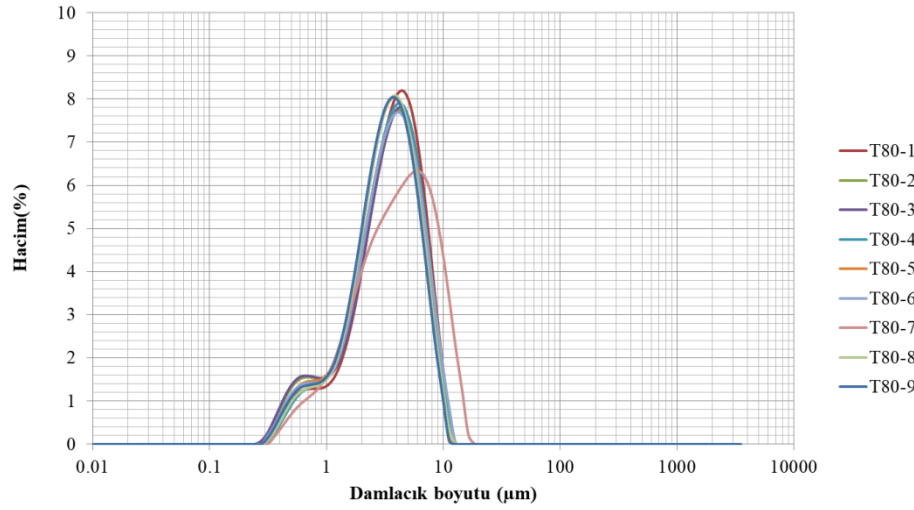
Şekil Ek A17. Farklı oranlarda iç faz (kazein hidrolizatu) içeren dış faz çözeltilerinin elektriksel iletkenlik değerleri.



Şekil Ek A18. Crillet™ 1 (Tween 20) kullanılarak üretilen emülsiyonların damlacık boyut dağılım grafikleri.



Şekil Ek A19. Crillet™ 3 (Tween 60) kullanılarak üretilen emülsiyonların damlacık boyut dağılım grafikleri.



Şekil Ek A20. Crillet™ 4 (Tween 80) kullanılarak üretilen emülsiyonların damlacık boyut dağılım grafikleri.

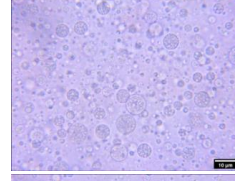
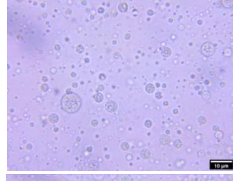
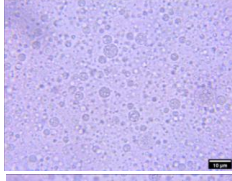
Örnek

T20

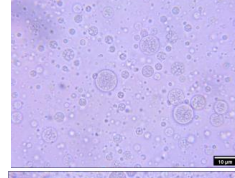
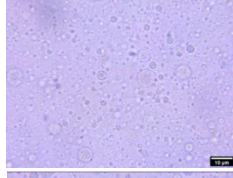
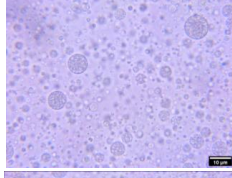
T60

T80

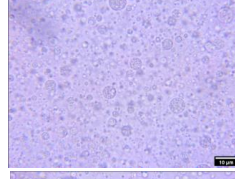
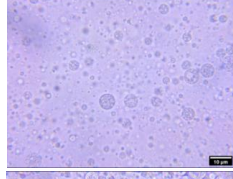
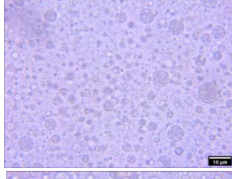
1



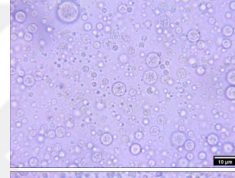
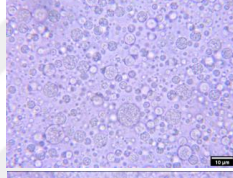
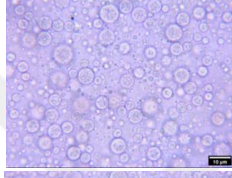
2



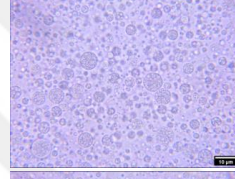
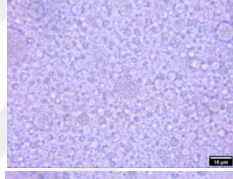
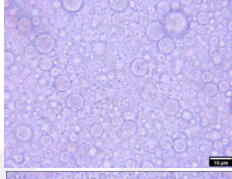
3



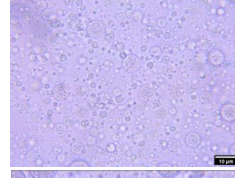
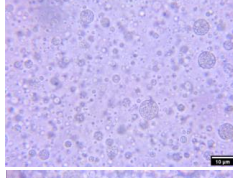
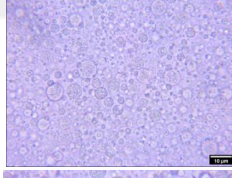
4



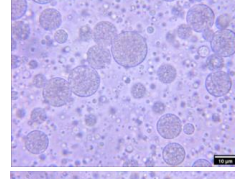
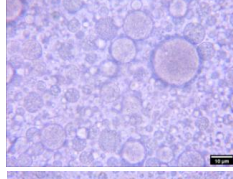
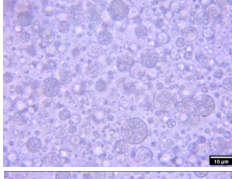
5



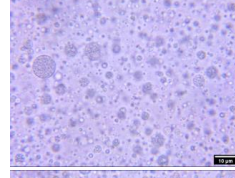
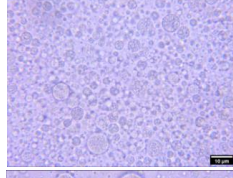
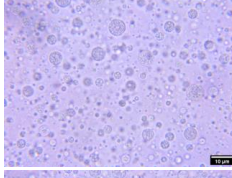
6



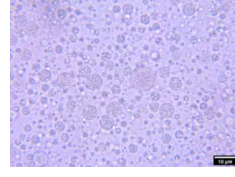
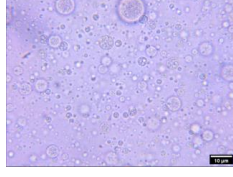
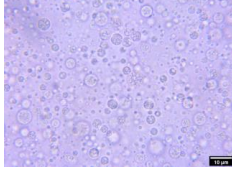
7



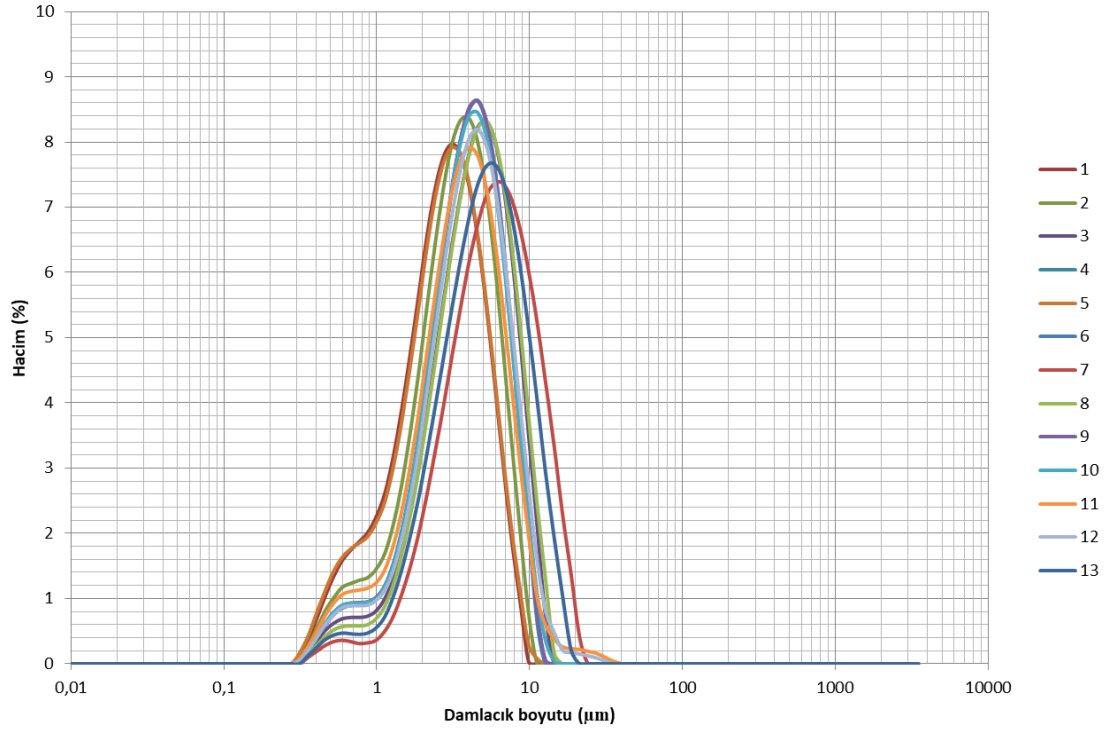
8



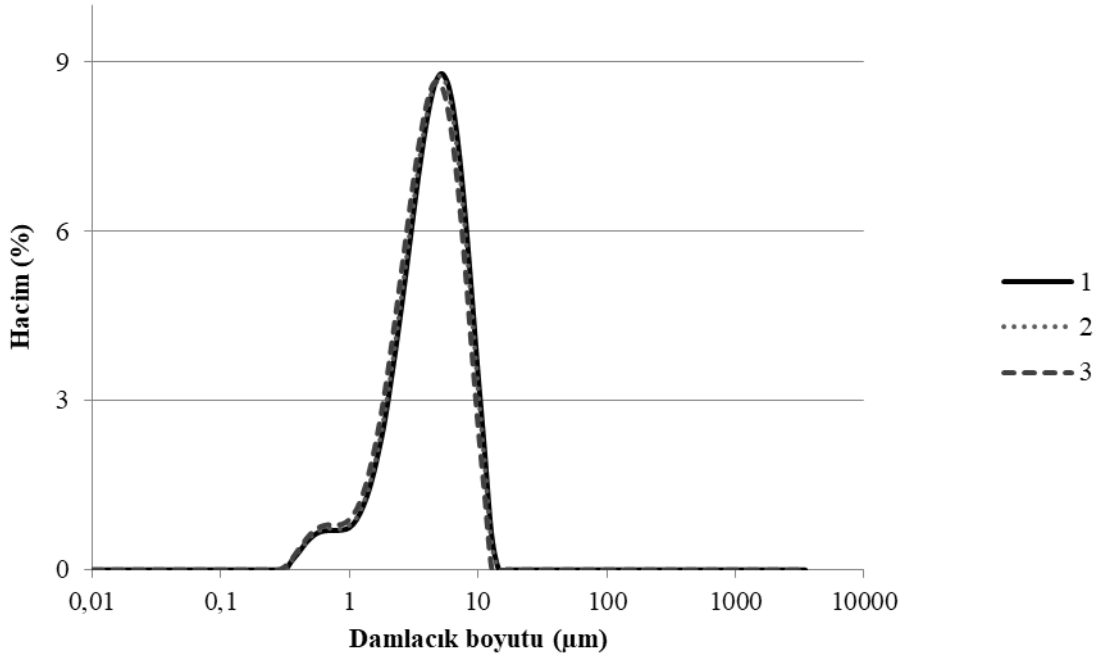
9



Şekil Ek A21. Üretilen emülsiyonların mikroskopla elde edilen mikrografları.

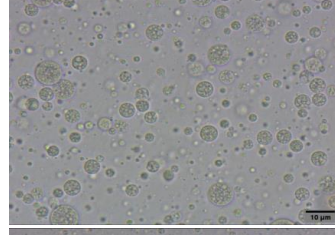
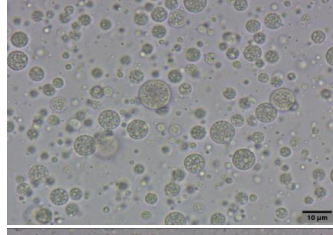


Şekil Ek A22. Optimizasyon deneme desenine göre farklı koşullarda üretilen W/O/W emülsiyonlarının damlacık boyut dağılımları.

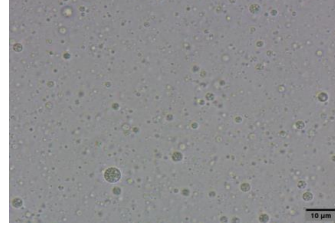
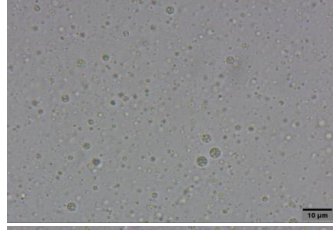


Şekil Ek A23. Belirlenen optimum işlem koşullarında üretilen üç emülsiyonun damlacık boyut dağılımları.

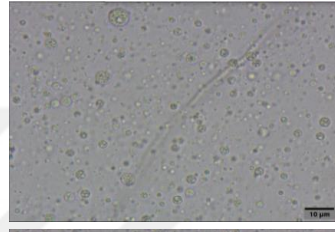
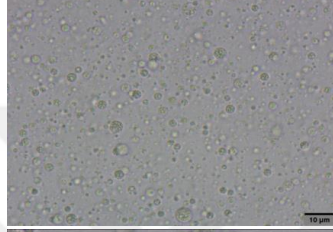
Kontrol



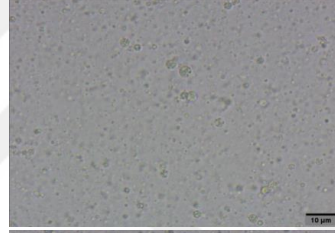
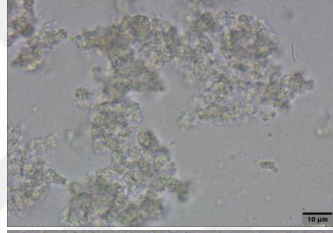
NaC-MD



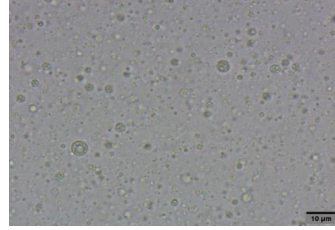
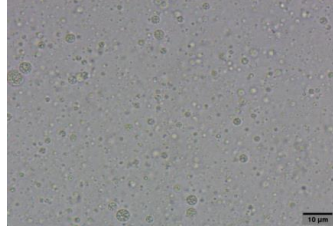
NaC-Lac



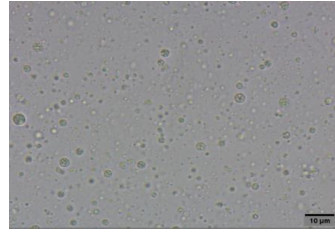
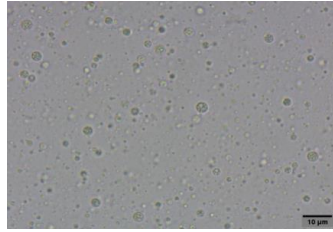
WPC-GA



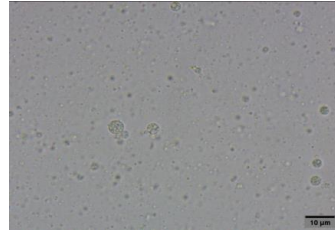
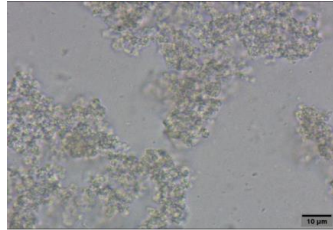
NaC-MD-K



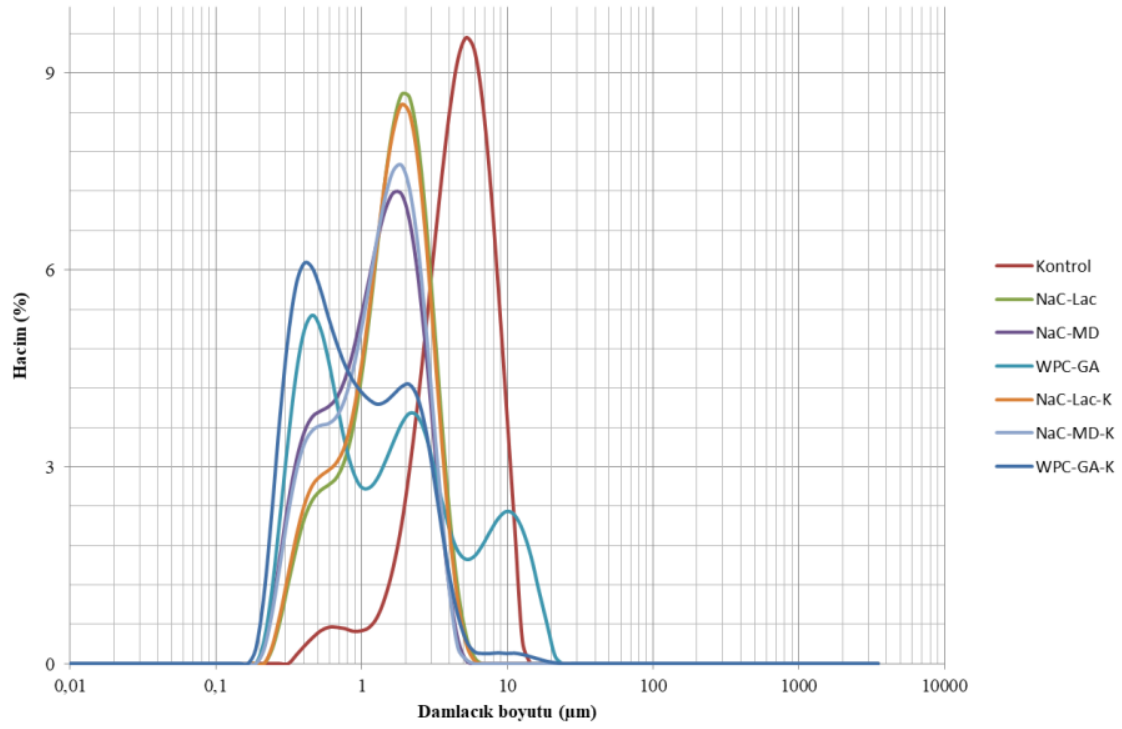
NaC-Lac-K



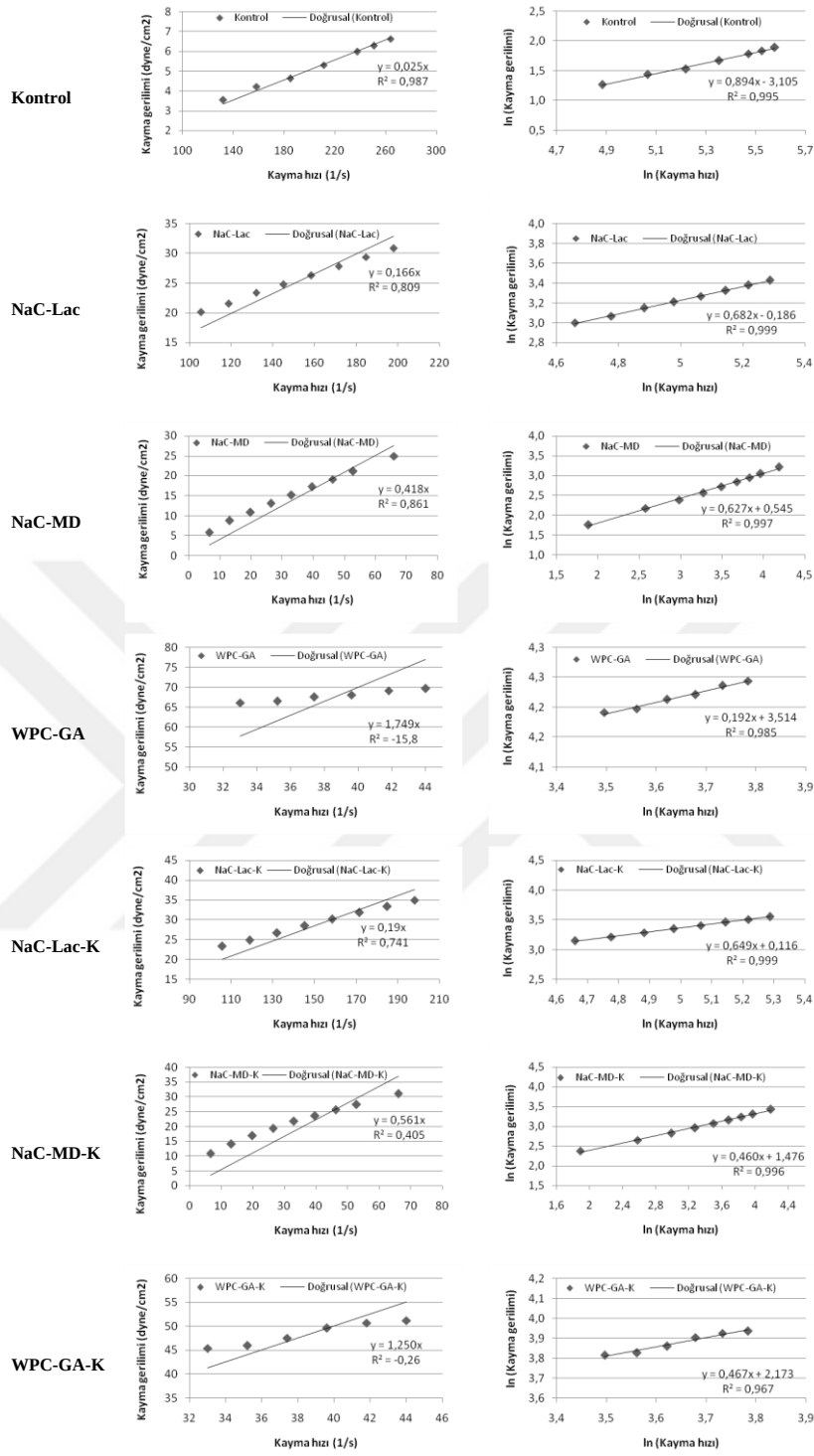
WPC-GA-K



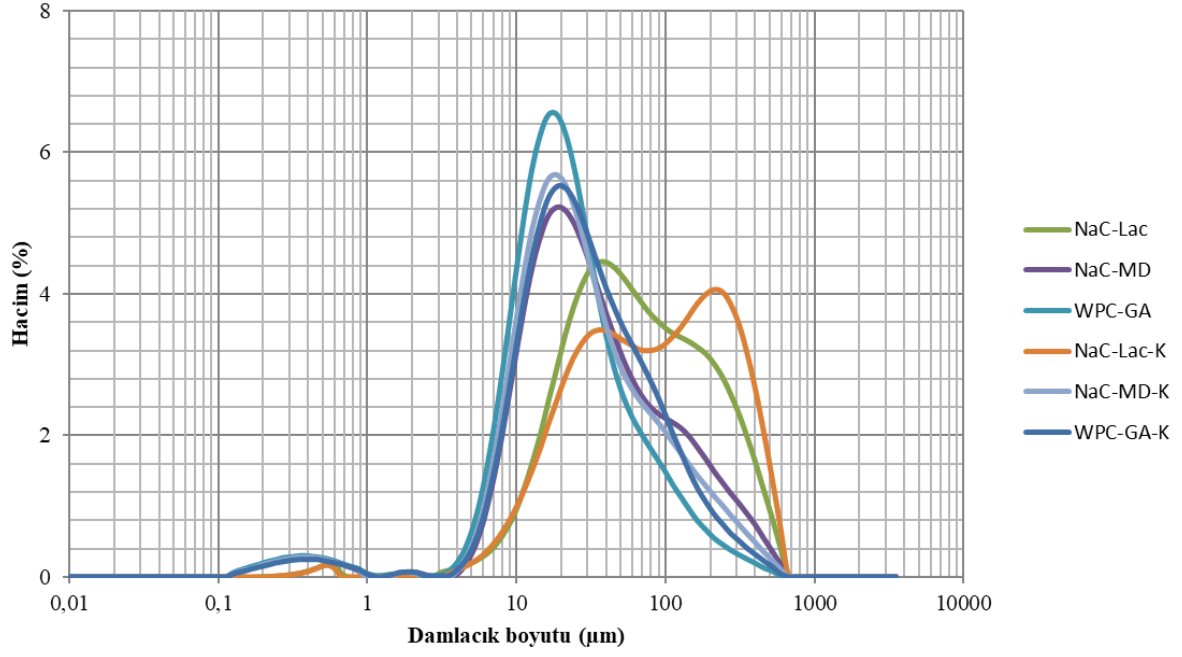
Şekil Ek A24.Emülsiyon örneklerinin 100X lens kullanılarak elde edilmiş mikroskop görüntüleri.



Şekil Ek A25. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların birleştirilmiş damlacık boyut dağılım grafiği.

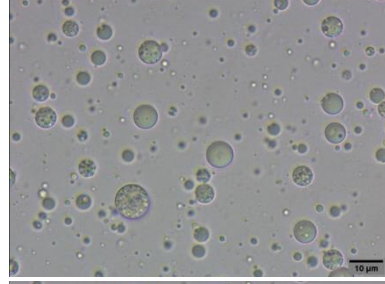
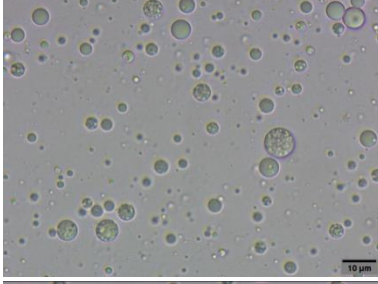


Şekil Ek A26. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen çift katlı emülsiyonların viskozite analizleri sonucu elde edilen ve akış davranışı grafikleri.

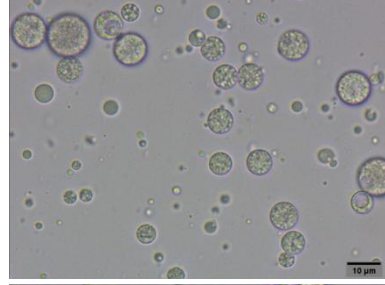


Şekil Ek A27. Farklı duvar materyali formülasyonları kullanılarak üretilen tozların birleştirilmiş tanecik boyut dağılım grafiği.

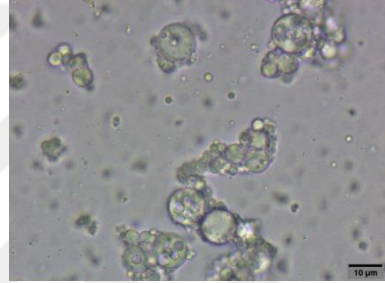
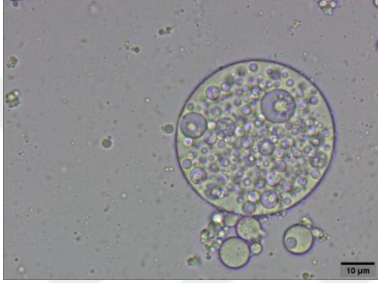
NaC-Lac



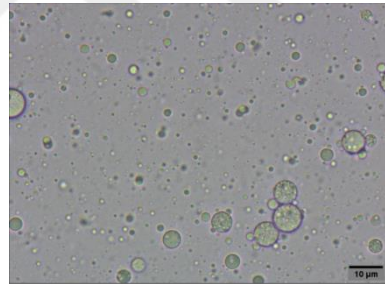
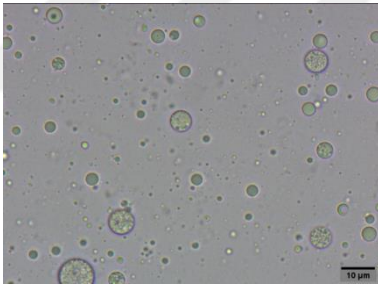
NaC-MD



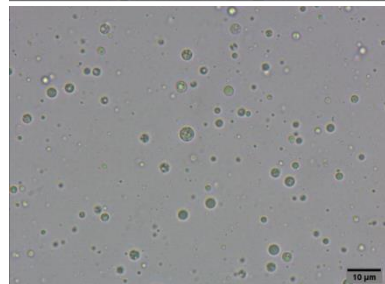
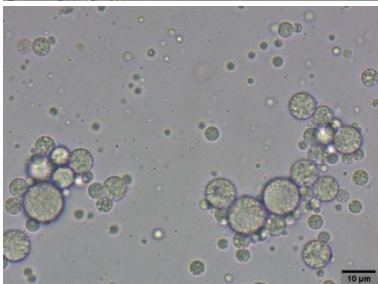
WPC-GA



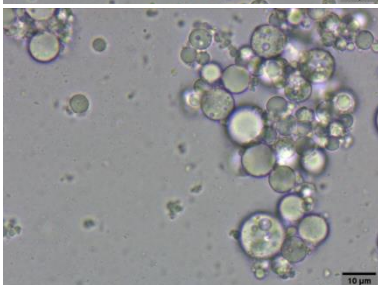
NaC-Lac-K



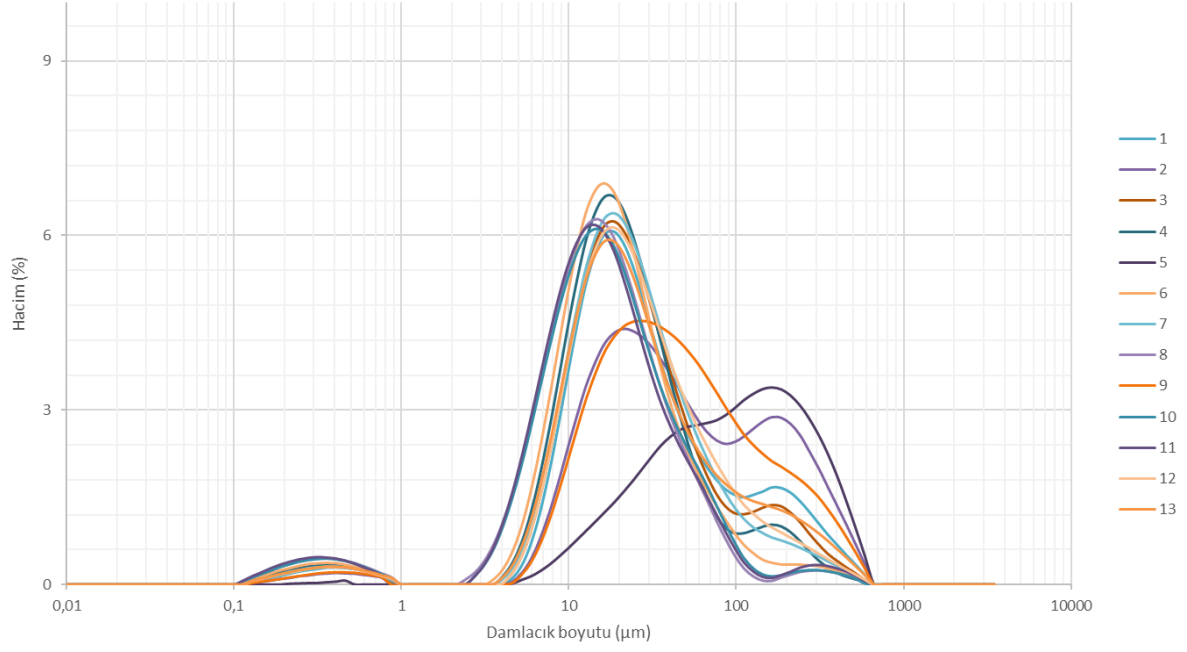
NaC-MD-K



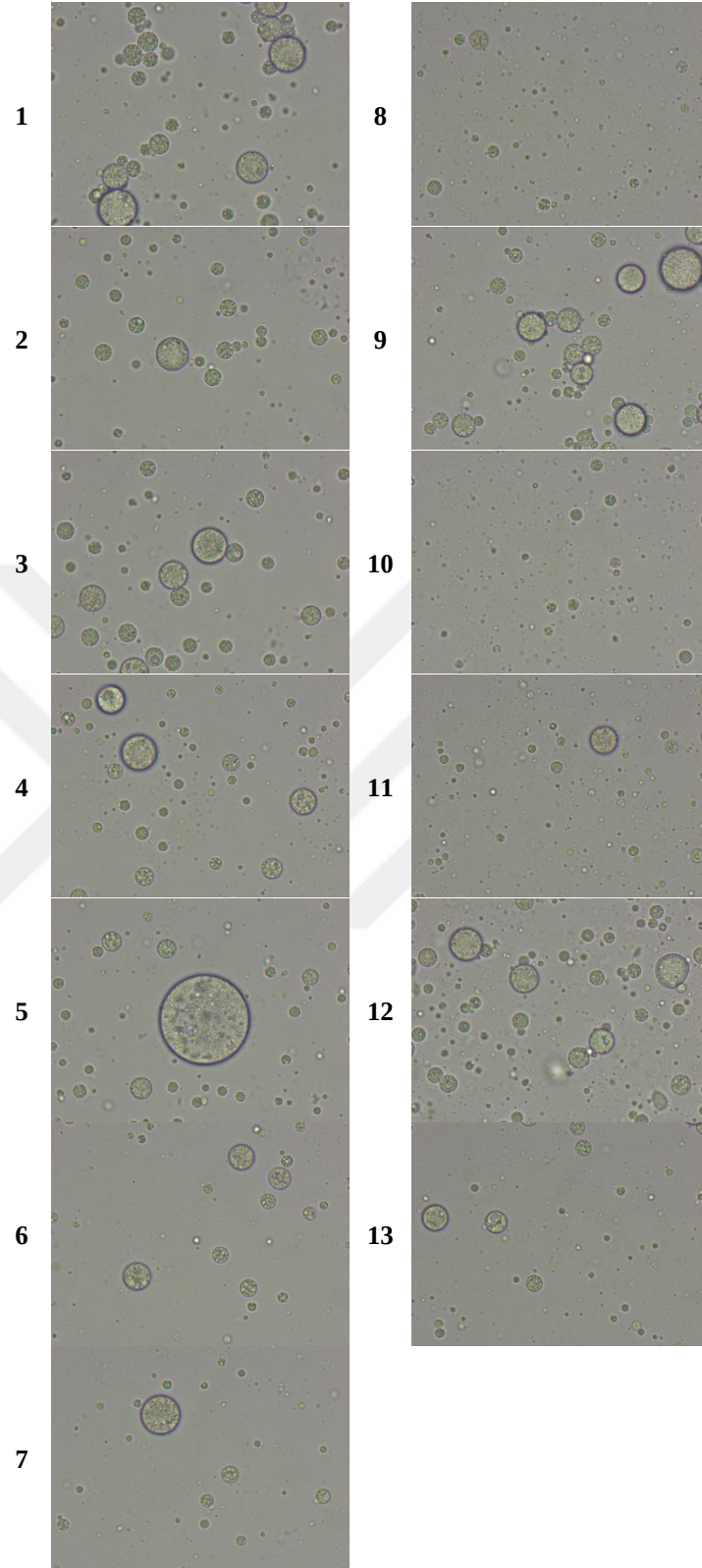
WPC-GA-K



Şekil Ek A28. Rekonstitüe edilmiş tozların 100X lens kullanılarak elde edilmiş mikroskop görüntüleri



Şekil Ek A29. Deneme planına göre üretilmiş tozların partikül boyut dağılım grafikleri



Şekil Ek A30. Deneme planına göre üretilmiş rekonstitüye tozların 100X objektif ile alınmış mikrografları.