

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROENKAPSÜLE BİBERİYE ESANSİYEL (UÇUCU) YAĞININ
İN VİTRO ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

FATMA SEZER ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2016

Onay Sayfası

Tezin Başlığı: Mikroenkapsüle Biberiye Esansiyel (Uçucu) Yağının *In Vitro*
Antioksidan Etkisinin İncelenmesi

Hazırlayan: Fatma Sezer ÖZTÜRK

Sınav Tarihi: 01.07.2016

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Gıda Mühendisliği Anabilim
Dalı'nda 'Yüksek Lisans Tezi' olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. İncilay GÖKBULUT

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Burhan ATEŞ

İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Türkan KEÇELİ MUTLU

Çukurova Üniversitesi



Prof. Dr. Alaattin ESEN

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘Mikroenkapsüle biberiye uçucu yağının in vitro antioksidan etkisinin incelenmesi’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım tüm kaynakların, hem metin içinde hem de kaynaklarda yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Fatma Sezer ÖZTÜRK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROENKAPSÜLE BİBERİYE ESANSİYEL (UÇUCU) YAĞININ IN VITRO ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatma Sezer ÖZTÜRK

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

71 + ix sayfa

2016

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İncilay GÖKBULUT

Mikroenkapsülasyon, gıda sektöründe sıvı, katı ve gaz bileşenlerin gıda saflığında kaplama materyalleri ile ince bir film içinde tutulmasında kullanılan bir tekniktir. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) yapısındaki fenolik bileşiklerden dolayı tıbbi açıdan yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. Biberiye uçucu yağı antimikrobiyal, antioksidan ve radikal süpürme aktiviteleri göstermektedir.

Mikroenkapsülasyon tekniği ile uçucu yağlar ve bu yağlarda bulunan antioksidan bileşenlerin kapsüllemesi ile elde edilen mikrokapsüller, serbest uçucu yağlara kıyasla çevre şartlarına daha dayanıklı, daha kararlı yapıda, midede sınırlı sindirilebilen, ince bağırsaktan daha yavaş emilip, kalın bağırsaktan daha hızlı salınan yapılara dönüşmekte, ayrıca serbest uçucu yağlara kıyasla gıdada bulunan diğer bileşenlerle daha az etkileşime girmektedir.

Çalışmanın amacı aljinat-nişasta ile mikroenkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının in vitro antioksidan özelliği ve salım özelliklerinin in vivo intestinal sistemini taklit eden mimik bir sistemde in vitro olarak incelenmesidir. Doğal antioksidanlar olarak kullanılan Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) uçucu yağı duvar materyali olarak aljinat/nişasta kullanımıyla mikroenkapsüle edilmiştir. Optimum mikrokapsüller, % 2,0 (w/v) sodyum aljinat, % 7,0 (w/v) biberiye uçucu yağı, % 1,0 (w/v) nişasta ve % 1,0 (w/v) CaCl₂ çapraz bağlama ajanı kullanılarak hazırlanmıştır.

Mikroenkapsülasyon etkinliği % 87,16 olarak belirlenmiştir. Nişasta kullanılarak ve nişasta kullanılmadan hazırlanmış olan mikrokapsüllerden biberiye uçucu yağının salım özellikleri 240 dk boyunca takip edilmiştir ve salınan uçucu yağ oranı doğrusal olarak değişmiş olup sırasıyla % 55,38 ve % 64,44 olarak tespit edilmiştir. Mikroenkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının 240 dk sonunda serbest uçucu yağa göre sırasıyla % 86,43 ve % 72,67 oranında DPPH ve ABTS süpürme gücüne sahip olduğu saptanmıştır. Optimize koşullar altında kırık ya da çatlak olmayan düzensiz yüzey alanlarına sahip küresel mikrokapsüller elde edilmiştir ve gözlenen ortalama çap 500-1000 µm'dir.

ANAHTAR KELİMELEER: Mikroenkapsülasyon, *Rosmarinus officinalis* L., Uçucu Yağ, Antioksidan

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF *IN VITRO* ANTIOXIDANT EFFECTS OF MICROENCAPSULATED ROSEMARY ESSENTIAL OIL

Fatma Sezer ÖZTÜRK

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

71 + ix pages

2016

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İncilay GÖKBULUT

Microencapsulation is a technique used for the entrapment of a thin film with coating materials in the liquid droplets, the solid particles or gas components. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is extensively used as medicinal plant due to its phenolic compounds. Rosemary essential oils have shown that antimicrobial, antioxidant, radical scavenger activities.

Microcapsules of essential oils obtained with microencapsulation technique are more resistant to conditions shows good stability in the stomach; they slow absorption and limited digestible in the intestinal system, released easily in the large intestine as compared to those in free form. Microencapsulated essential oils also interacts with other components, compared to free form.

The aim of this study is to determine the *in vitro* antioxidant properties and release properties of rosemary essential oil which encapsulated using alginate-starch in the system that simulates the *in vivo* intestinal system. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil which used as natural antioxidants microencapsulated using alginate/starch as coating materials. Optimum microcapsules were prepared with 2,0 % (w/v) sodium alginate, 7,0 % (w/v) rosemary essential oil, 1,0 % (w/v) starch and cross-linked with 1,0% (w/v) CaCl₂.

Microencapsulation efficiency was determined as 87,16 %. The release properties of rosemary essential oil from the microcapsules which used starch and without starch were followed for 240 minute and released essential oil ratio changed linearly with time, 55,38 % and 64,44 % respectively. It was found that compared to free essential oil the microencapsulated essential oil has the 86,43 % and 72,67 % DPPH and ABTS scavenging activity respectively. Microcapsules obtained under optimized conditions presented a spherical shape with irregular surfaces and no fissures or cracks, and the mean diameter observed was 500-1000 µm.

KEYWORDS: Microencapsulation, *Rosmarinus officinalis* L., Essential oil, Antioxidant

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan, öneri ve desteğini esirgemeyen, çalışmaya fiili olarak önemli katkılar sunan, beni yönlendiren, danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İncilay GÖKBULUT' a,

Fiili olarak çalışmama önemli katkılar sunan, öneri ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Burhan ATEŞ' e,

Değerli fikirleriyle çalışmama katkı sağlayan hocam Prof. Dr. İhsan KARABULUT' a,

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli malzemelerin temininde bana yardımcı olan, desteklerini esirgemeyen Arş. Grv. Hüseyin KARAKAYA, Arş. Grv. Tuğça BİLENLER ve Arş. Grv. Nurullah DEMİR' e,

Çalışmayı gerçekleştirirken hem manevi hem de fiili olarak yanımda olan arkadaşlarım Betül AKALIN ve Kübra TEKELİOĞLU' na,

Üzerimdeki emeklerini ve haklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim annem Leyla ÖZTÜRK ve babam İsmail ÖZTÜRK' e,

Manevi desteklerini her daim hissettiğim kardeşlerim Aslı Güner ÖZTÜRK DEMİR ve Recep Bahadır ÖZTÜRK' e ve diğer aile üyelerime,

En içten duygularımla teşekkür ederim.

TÜBİTAK 1001 kapsamında 2140195 nolu proje ile yüksek lisans tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Mikroenkapsülasyon	4
2.1.1. Kapsül morfolojisi	4
2.1.2. Kaplama materyali.....	5
2.1.3. Mikroenkapsülasyon tekniğinin uygulama alanları.....	6
2.1.4. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon	7
2.1.5. Mikroenkapsülasyon yöntemleri	8
2.2. Uçucu (esansiyel) Yağlar	17
2.2.1. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	18
2.3.1. Aljinatın tarihçesi	21
2.3.2. Aljinatın kimyasal yapısı	22
2.3.3. Aljinatın üç boyutlu yapısı	23
2.3.4. Aljinatın oluşumu ve kaynak ilişkisi	24
2.3.5. Aljinatın üretim süreci	24
2.3.6. Aljinatın özellikleri.....	24
2.3.7. Gıda uygulamalarında aljinat kullanımı	26
2.4. Mikroenkapsülasyon Tekniğinde Aljinat Kullanımı.....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal	30
3.2. Kullanılan Kimyasallar	30
3.3. Kullanılan Alet Ekipman ve Cihazlar	30
3.4. Yöntem.....	31
3.4.1. Biberiye uçucu yağının elde edilmesi.....	31

3.4.2. Biberiye uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi	31
3.4.3. Biberiye uçucu yağının mikroenkapsülasyonu.....	32
3.4.4. Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi.....	35
3.4.5. Mikrokapsül partikül boyut dağılımının ve morfolojisinin belirlenmesi	36
3.4.6. Mikrokapsüllerin zamana bağlı uçucu yağ salımlarının belirlenmesi	36
3.4.7. Uçucu yağların enkapsülasyon öncesi ve sonrası <i>in vitro</i> antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	40
4.1. Biberiye Uçucu Yağının Elde Edilmesi	40
4.2. Biberiye Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi	41
4.3. Biberiye Uçucu Yağının Mikroenkapsülasyonu	45
4.4. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	46
4.5. Mikrokapsül Partikül Boyut Dağılımının ve Morfolojisinin Belirlenmesi	48
4.6. Mikrokapsüllerin Zamana Bağlı Uçucu Yağ Salımlarının Belirlenmesi	50
4.7. Biberiye Uçucu Yağının Enkapsülasyon Öncesi ve Sonrası <i>in vitro</i> Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	53
4.7.1. DPHH testi.....	53
4.7.2. ABTS testi	55
5. SONUÇ.....	58
6. KAYNAKLAR	61
7. ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Mikrokapsüllerin farklı tiplerinin morfolojisi.....	5
Şekil 2.2.	<i>Phaeophyceae</i> türleri.....	21
Şekil 2.3.	<i>Laminaria hyperborea</i>	21
Şekil 2.4.	β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-guluronik asit (G).....	22
Şekil 2.5.	Kısmi asit hidrolizi sonucu oluşan aljinat fraksiyonları	23
Şekil 2.6.	G-G, M-M, G-M blokları	23
Şekil 2.7.	‘egg-box’ modelinin oluşumu	26
Şekil 3.1.	Yaş biberiye bitkisi	30
Şekil 3.2.	Kurutulmuş biberiye bitkisi	30
Şekil 3.3.	Clavenger düzeneğinde su distilasyonu yöntemi ile biberiye uçucu yağının eldesi	31
Şekil 3.4.	GC-FID sistemi	32
Şekil 3.5.	Manyetik karıştırıcıda aljinat solüsyonu ve biberiye uçucu yağı	33
Şekil 3.6.	Homojenizasyon işlemi	33
Şekil 3.7.	Uçucu yağ/aljinat solüsyonunun CaCl_2 solüsyonuna damlatılması..	34
Şekil 3.8.	Viallere alınan örnekler.....	36
Şekil 3.9.	Mikrokapsüllerin salımı.....	37
Şekil 4.1.	Biberiye uçucu yağı.....	40
Şekil 4.2.	Biberiye uçucu yağının GC-FID kromotagramı.....	41
Şekil 4.3.	Biberiye uçucu yağının GC-FID kromotagram verileri.....	41
Şekil 4.4.	Uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 4.5.	Boş kapsül.....	45
Şekil 4.6.	Dolu kapsül.....	45
Şekil 4.7.	Konsantrasyona bağlı mikroenkapsülasyon etkinlikleri	46
Şekil 4.8.	Kapsüllere ait SEM görüntüleri	49
Şekil 4.9.	Aljinat kapsülündeki uçucu yağın zamana bağlı % salım miktarları ve grafiksel gösterimi	51
Şekil 4.10.	Aljinat Kapsül+Nişasta’daki uçucu yağın zamana bağlı % salım miktarları ve grafiksel gösterimi.....	52
Şekil 4.11.	Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan aktivitesi.....	54
Şekil 4.12.	Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan aktivitesi	55
Şekil 4.13.	Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan aktivitesi.....	56

Şekil 4.14.	Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan aktivitesi.....	57
-------------	--	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Mikroenkapsülasyon tekniğinde kullanılan kaplama materyalleri.	6
Çizelge 2.2.	Farklı mikroenkapsülasyon teknikleri ve her teknikte kullanılan işlem basamakları.....	9
Çizelge 2.3.	Enkapsüle edilmiş gıda bileşenleri ve onların gıda endüstrisinde uygulamaları.....	16
Çizelge 2.4.	Gıda ürünlerinde aljinatın yaygın kullanımları.....	27
Çizelge 4.1.	Biberiye uçucu yağının kimyasal kompozisyonu.....	42
Çizelge 4.2.	Uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı GC-FID’ de 1,8-cineole’ ün pik alanı.....	44
Çizelge 4.3.	Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ mikroenkapsülasyonu sonucu elde edilen etkinlik verileri	46
Çizelge 4.4.	Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan değişimleri.....	53
Çizelge 4.5.	Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan değişimleri.....	54
Çizelge 4.6.	Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan değişimleri.....	56
Çizelge 4.7.	Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan değişimleri.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

CaCl ₂	Kalsiyum klorür
nm	Nanometre
UV	UltraViyole
BHA	Bütüllendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütüllendirilmiş hidroksitoluen
M	β -D-mannuronik asit
G	α -L-guluronik asit
MG	β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asitten oluşan yapı
MM	β -D-mannuronik asitlerden oluşan yapı
GG	α -L-guluronik asitlerden oluşan yapı
Ca ⁺² , Sr ⁺² , Ba ⁺² , Be ⁺²	Kalsiyum, Stronsiyum, Baryum ve Berilyum iyonları
PGA	Propilen glikol aljinat
ADI	Kabul edilebilir günlük alım miktarı (Acceptable daily intake)
bw	Vücut ağırlığı (body weight)
w/w	Ağırlıkça yüzde
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
DPPH	2,2-Difenil-1-pikril-hydrozyl
ABTS	2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt
Trolox	($\pm$)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkrom-2-karboksilik asit
PBS	Fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline)
GC-FID	Gaz kromatografisi- Alev iyonlaşma dedektörü
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
μ L	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SEM	Scanning Electron Microscopy
TE	Trolox Eşdeğeri
Tween 80	Polioksietilen(20) sorbitan monooleat

1. GİRİŞ

Uçucu yağlar, ikincil metabolitler olarak aromatik bitkilerde doğal olarak oluşan, güçlü kokularıyla karakterize edilen, oda sıcaklığında genellikle sıvı ve uçucu formda bulunan, su buharı ile sürüklenebilme ve kolayca kristallenebilme özelliğine sahip, çoğunlukla renksiz veya açık sarı renkli, çok sayıda kimyasal bileşenden oluşan kompleks ve doğal bileşiklerdir. En belirgin özellikleri uçucu ve kokulu olmalarıdır.

Bitkilerin yaprak, çiçek, kabuk, tohum ve köklerinden, su buharı distilasyonu veya ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağların antifungal [1], antioksidan [2], antimikrobiyal [3] etkilerine ilaveten, tümör hücrelerinde yayılmayı durdurucu (anti-proliferatif) [4], virusidal ve fungusidal etkilere de sahip oldukları [5,6] bildirilmektedir. Ayrıca uçucu yağların hayvanların sindirim sistemlerini stimüle ederek, sindirim enzimlerinin üretimini ve etkilerini artırdıkları ve karaciğerin fonksiyonunu olumlu etkiledikleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [7].

Uçucu yağlar ve bu yağlarda bulunan antioksidan bileşenlerin kapsüllenmesi ile elde edilen mikrokapsüllerin serbest uçucu yağlara kıyasla çevre şartlarına daha dayanıklı olduğu, daha stabil bir yapı kazandığı, midede sınırlı bir sindirime uğradığı, ince bağırsakta daha yavaş emildiği ve kalın bağırsakta daha hızlı salındığı belirtilmekte, mikrokapsül formdayken serbest uçucu yağlara kıyasla gıdada bulunan diğer bileşenlerle daha az etkileşime girdiği dolayısıyla stabilitesinin daha uzun süre devam ettiği bildirilmektedir [8].

Ağız yoluyla alınan uçucu yağ bileşenleri solunum ya da deri yoluyla hızlı bir şekilde vücutta absorbe edildikten hemen sonra çoğunluğu metabolize olmakta ve böbreklerden glukuronoid formunda ya da akciğerlerden karbondioksit (CO₂) şeklinde atılmaktadır. Metabolik dönüşümleri ve vücuttan atılma oranlarının hızlı olması ve kısa yarılanma ömürleri [9] nedeniyle, uçucu (esansiyel) yağların vücut dokularında birikimleri mümkün olmamaktadır [10].

Uçucu yağların bir katman ile kaplanarak (mikrokapsül) salımlarının azaltılması ve uçuculuklarının geciktirilmesine yönelik yapılan çalışmalar son yıllarda dikkat çekmektedir. Mikrokapsül adı verilen bu yapı, belirli koşullar altında ince film tabakaları veya polimer kapsüller yardımı ile küçük katı partiküllerin, sıvı damlaların ya da gazların tutuklandığı ve kontrollü salımın amaçlandığı fiziksel bir tutuklama yöntemi olan mikrokapsülasyon ile oluşturulan yapılardır [11].

Enkapsülasyon teknolojisi ile reaktif, hassas ve uçucu gıda katkıları (vitaminler, çeşniler, uçucu yağlar) stabil ingredientlere dönüştürülmekte ve bu ingredientlerin kontrollü salımı gerçekleştirilmektedir. Ayrıca antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi yüksek fakat arzu edilmeyen kokuya sahip, uçucu yağların enkapsülasyonu ile istenilmeyen koku ya da tadın maskelenmesi sağlanmaktadır [12].

Aljinat, gastrointestinal sistemin üst kısımlarındaki mukoz membranları üzerinde koruyucu etkiye sahip, toksik olmayan bir bileşendir. Kuru haldeki aljinatların bünyesine su alarak tekrar şişebilme yeteneği, kontrollü salıma olanak sağlamaktadır. Uzun yıllardır içecek ve gıda endüstrisinde yoğunlaştırıcı (kalınlaştırıcı), jelleştirici ajan ve koloidal stabilizör olarak kullanılmakta olan aljinatlar, aynı zamanda çeşitli protein ve hücre dağılımı ve/veya tutuklanmasında kullanılmaktadır.

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) yapısında barındırdığı fenoller ve uçucu yağ özelliklerinden dolayı tıbbi ve aromatik olarak kullanılan bir bitkidir. Uçucu yağların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda biberiye türlerinden elde edilen uçucu yağın çeşitli ekstrakt ve bileşimlerinde yer alan başlıca bileşenlerinden bazılarının antimikrobiyal, antioksidan, radikal süpürücü ve sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmektedir [13-15].

Biberiyede yer alan antioksidan moleküller serbest radikal süpürücü olarak görev yapmakta ve karaciğer dokusunda ksenobiyotikleri metabolize eden ya da hücre ölümü, tümör yayılımı, hücre içi sinyal iletimi gibi fizyolojik süreçleri içeren belirli enzimatik sistemlerin sentezlenmesi ve/veya aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar [16,17].

Yukarıda belirtildiği üzere uçucu yağlar, oda sıcaklığında uçucu formda olup, oksijen, hava, sıcaklık gibi çeşitli etkilerle stabilitelerini ve etkilerini kolaylıkla yitirmektedir. Gastrointestinal bölge sıvılarına ve/veya yüksek pH koşullarına çok düşük stabilite göstermesi, emilim ve su çözünürlüklerinin zayıf olması, uçucu yağlardan yararlanma noktasında sıkıntı yaratmaktadır. Bu nedenle, uçucu yağların uygun materyallerle kapsüllenmesi sonucu elde edilecek kapsüllenmiş uçucu yağlar enzimatik parçalanmalardan korunurken, kan akışında daha etkin bir şekilde dağılım göstermekte ve vücuttaki biyoyarayışlıkları artmaktadır.

Bu tezin kapsamı “Mikroenkapsüle biberiye esansiyel (uçucu) yağının *in vitro* antioksidan etkisinin incelenmesi” aljinat-nişasta ile mikroenkapsüle edilmiş biberiye

uçucu yağının *in vitro* antioksidan özelliği ve salım özelliklerinin *in vivo* intestinal sistemini taklit eden bir sistemde *in vitro* incelenmesidir.

Biberiye yağının uçucu olmasından kaynaklanan kısa süreli etkisinin elimine edilmesi, sistemik metabolizmasının yüksek olması ve bahsi geçen bu faydalarının incelenmesi nedeniyle mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde yağ/su emülsiyon yöntemi yardımıyla ve de çözünürlük açısından uygun bir materyal olan aljinat-nişasta kullanımı ile biberiye uçuğu yağı kaplanarak mikrokapsül elde edilmiştir.

Daha sonra elde edilmiş olan mikrokapsüllerin etkinlikleri, salımları ve antioksidan etki düzeyleri belirlenmiştir. Bu amaçla serbest halde bulunan biberiye uçucu yağı ile kapsül haline getirilmiş biberiye uçucu yağları ayrı ayrı analiz edilerek ve her iki formda antioksidan etki düzeyleri, salımları ve etkinlikleri kıyaslanarak, birbirlerine karşı üstünlükleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

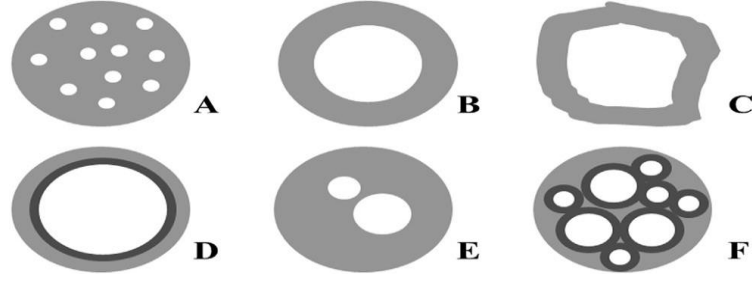
2.1. Mikroenkapsülasyon

Enkapsülasyon, bir maddenin veya karışımın başka bir madde ya da sistem ile kaplanması/hapsedilmesi olarak tanımlanmaktadır [18]. Enkapsülasyonun temel amacı, dış çevre tarafından kaynaklanan bozulmalara karşı korumayı ve belirli maddelerin kontrollü salınımını sağlamaktır [19]. Mikroenkapsülasyon hassas bileşenlerin koruyucu bir duvar materyali içinde fiziksel olarak sarılmasını ve karşıt reaksiyonlardan, uçucu kaybindan veya besinsel bozulmalardan çekirdek materyallerin ya da böyle bileşenlerin korunmasını sağlayan bir teknolojidir [20]. Mikrokapsüller basitçe küre şeklinde olup çevresinde homojen bir duvar yer almaktadır. Mikrokapsül içerisinde yer alan madde veya karışım çekirdek, iç faz veya dolgu olarak ifade edilirken dış kısımda yer alan duvar ise kabuk, kaplama, duvar materyali veya membran olarak isimlendirilmektedir [21].

Mikrokapsüllerin görünüşleri çekirdek materyalinin fiziko-kimyasal özelliklerine, duvar materyalinin kompozisyonuna ve mikroenkapsülasyon tekniğine göre değişim göstermektedir [22].

2.1.1. Kapsül morfolojisi

Mikrokapsüllerin morfolojisi başlıca kabuk kaplama işlemine ve çekirdek materyaline bağlıdır [23]. Şekil ve yapı bakımından kapsüller iki gruba ayrılmaktadır: mikrokapsüller ve mikroküreler. Mikrokapsüller, kapsül membranını oluşturan bir polimer tabakası ile kaplanmış olan ve aktif bileşeni içeren bir iç çekirdekten oluşan partiküllerdir. Tek çekirdekli ve çok çekirdekli mikrokapsüller çekirdeğin bölünür olup olmaması tarafından ayırt edilebilmektedir. Bunun aksine mikroküreler çekirdeğin bir polimer ağında muntazam bir şekilde çözündüğü ya da dağıldığı matris sistemleridir. Mikroküreler çekirdeğin moleküler durumuna ya da partiküllerin oluşumuna bağlı olarak sırasıyla homojen ya da heterojen olabilmektedir [24]. Mikrokürelerin boyutu, yapısı ve şekli üretim sürecine ve ilgili materyallere bağlıdır [25]. Şekil 2.1’ de farklı tipteki mikrokapsüllerin morfolojileri gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Mikro kapsüllerin farklı tiplerinin morfolojisi. A: Matriks, B: Basit mikrokapsül, C: Düzensiz mikrokapsül, D: Multi-duvarlı kapsül, E: Multi-çekirdekli kapsül, F: Bir araya gelmiş mikrokapsül [25].

Bununla birlikte mikropartikülün içyapısının morfolojisi, seçilen kabuk materyaline ve kullanılacak mikroenkapsülasyon yöntemlerine bağlıdır [26].

2.1.2. Kaplama materyali

Mikroenkapsülasyon tekniğinde kaplama materyali seçilirken aşağıda belirtilen özellikler aranmalıdır [27];

- Yüksek konsantrasyonda reolojik özellikleri muntazam olmalı
- Kapsülasyon sırasında kolay işlenebilmeli
- Emülsiyon ve dispersiyon özelliği olmalı ve ayrıca emülsiyon stabilitesi yüksek olmalı
- Kaplama işlemi esnasında ve depolama sırasında çekirdek materyalin özelliklerini bozacak şekilde reaksiyona girmemeli
- Çekirdek materyalini kaplayabilmeli ve bunu hem kaplama işlemi gerçekleşirken hem de depolama aşamasındayken stabil bir şekilde muhafaza edebilmeli
- İstenilen çözgüde çözünabilmeli ve ucuz olmalı

Kaplama materyalleri çeşitli sentetik ve doğal polimerlerden seçilebilmektedir [24]. Bazı enkapsülasyon işlemlerinde tek bir kaplama materyali gereken tüm özelliklere sahip olmadığı için kaplama materyallerinin kombine edilmiş formları kullanılmaktadır [25]. Hidrolize edilmiş nişastalar (glikoz, laktoz, mısır şurubu solidleri ve maltodekstrin), genel olarak koruma özelliklerinin geliştirilmesi için bir ikincil kaplama materyali olarak ilave edilmektedir [28].

Çizelge 2. 1. Mikroenkapsülasyon tekniğinde kullanılan kaplama materyalleri [27]

Kategori	Kaplama materyali
Karbonhidratlar	Nişasta Maltodekstrinler Chitosan Mısır şurubu solidleri Dekstran Modifiye edilmiş nişasta Siklodekstrinler
Selüloz	Karboksi metil selüloz Metil selüloz Etilselüloz Selüloz asetat-ftalat Selüloz asetat-bütilat-ftalat
Gumlar	Gum arabic Agar Sodyum aljinat Karragenan
Yağlar	Wax Parafin Bal mumu Diaçilgliserol Sıvı yağlar Katı yağlar
Proteinler	Gluten Kazein Jelatin Albumin Peptitler

2.1.3. Mikroenkapsülasyon tekniğinin uygulama alanları

Günümüzde mikroenkapsülasyon, gıda [29], tekstil [30], farmakoloji [31,32], kozmetik [33], agrokimyasal [34], elektronik [35] gibi çok geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Bu nedenle mikronekapsülasyon tekniğine olan ilgi giderek artmıştır. Green ve Schleicher karbonsuz kopyalama kağıdı üretmek amacıyla jelatin ve arap zambının kompleks faz ayrımı tarafından mikroenkapsülenmiş boyaları elde etmeleri sayesinde mikrokapsüllerin hazırlanması 1950' lere kadar uzanmaktadır. 1960' lı yıllarda, jelatin ve akasyanın bir kompleks faz ayrımı ile kolesterik sıvı kristalinin

mikroenkapsülasyonu ile ısıya duyarlı bir görüntüleme materyali üretildiği rapor edilmiştir. Böylece 1970' lerin ortalarından bu yana, mikroenkapsülasyon yöntemi ilaç endüstrisi ve yanı sıra günlük kullanım içinde pek çok ürün ve işlemlerde giderek popüler bir hale gelmiştir [26].

2.1.4. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon

Mikroenkapsülasyon, gıda sektöründe genellikle, sıvı damlacıkların, katı partiküllerin veya gaz bileşenlerin gıda saflığında kaplama materyalleri ile ince bir film içinde hapsedilmesinde kullanılan bir tekniktir [28]. Son yıllarda fonksiyonel gıdaların öneminin giderek artmasıyla beraber mikroenkapsülasyon yöntemi gıda sektöründe daha önemli bir hale gelmiştir [36]. Gıda sistemlerinde mikroenkapsülasyon çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. En yaygın amacı çekirdek materyalini çevre koşullarına olan reaktivitesini azaltarak bozunmadan korumaktır. Bu esasen bir fiziksel bariyer olarak duvar materyalinin kullanımı ile çekirdek ve dış ortam arasındaki kütle transferinin kontrolü tarafından gerçekleştirilmektedir [37].

Gıda ürünleri içerisinde çoğunlukla katı ve sıvı yağlar, aroma bileşenleri, polifenoller, oleoresinler (çam reçineleri), vitaminler, mineraller, enzimler ve bakteriler (örneğin başlatıcılar ya da probiyotikler olarak hareket eden laktik asit bakterileri) mikroenkapsüle edilmektedir [38, 18]. Kaplama materyali olarak ise çoğunlukla nişasta, maltodekstrin, maltoz, pullulan, sakkaroz gibi karbonhidratlar, jelatin, peynir altı suyu proteinleri, polipeptonlar, soya proteinleri, kazein ve kazeinatlar gibi proteinler ve gam arabik gibi gıamlar kullanılmaktadır [36, 22].

Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon tekniğinin kullanım amaçları;

- Nem, sıcaklık, hava ve ışık gibi dış etkenlere karşı çekirdek materyalinin korunması,
- Çekirdek materyalin buharlaşarak kaybolmasının önlenmesi ve fiziksel özelliklerinin daha iyi korunması,
- Kolay bir şekilde işlenmesinin sağlanması,
- Maddenin kaplanmasıyla birlikte taşınmasının kolaylaştırılması,
- Çekirdek materyalin doğru yerde ve doğru zamanda çalışmasının sağlanması ve tat ve kokusunun maskelenmesi,
- Başka bileşenlerle reaksiyona girmesinin önlenmesi,

- Küçük miktarlarda kullanımı istendiğinde seyreltilebilmesi ve seyreltmenin homojen bir halde sağlanması, şeklinde sıralanabilmektedir [27, 39, 40].

2.1.5. Mikroenkapsülasyon yöntemleri

Kaplama materyalleri içerisinde çekirdek materyal olarak gıda bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Mikroenkapsülasyon yönteminin seçilmesiesnasında, çekirdek ve kaplama materyallerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri ve kaplanacak olangıda bileşeninin kullanılacağı yer büyük bir öneme sahiptir. En uygun mikroenkapsülasyon yöntemi seçimi, çekirdeğin tipine, mikrokapsül uygulamasına, gerekli partikül boyutuna, çekirdek ve duvarın fiziksel ve kimyasal özelliklerine, gerekli salım mekanizmasına, üretimin boyutuna ve maliyetine bağlıdır [24].

Mikroenkapsülasyon işleminde kapsüllerin oluşturulması için çeşitli teknikler kullanılmaktadır [27, 41]. Bunlar:

1. Püskürterek kurutma yöntemi
2. Püskürterek dondurma yöntemi
3. Akışkan yatak kaplama yöntemi
4. Ekstrüzyon yöntemi
5. Dondurarak kurutma yöntemi
6. Faz ayrımı yöntemi
7. Merkezkaç kuvvetinin kullanıldığı süspansiyon yöntemi
8. Kokristalizasyon yöntemi
9. Lipozom tutma yöntemi
10. İnklüzyon kompleksleşme yöntemi
11. Emülsifikasyon yöntemi

Çizelge 2. 2. Farklı mikroenkapsülasyon teknikleri ve her teknikte kullanılan işlem basamakları [27]

Mikroenkapsülasyon tekniği	Enkapsülasyonun işlem basamakları
Püskürterek kurutma yöntemi	1. Dispersiyonun hazırlanması 2. Dispersiyonun homojenizasyonu 3. Besleme dispersiyonunun küçük parçacıklara ayrılması 4. Atomize edilmiş partiküllerin dehidrasyonu
Püskürterek dondurma yöntemi	1. Dispersiyonun hazırlanması 2. Dispersiyonun homojenizasyonu 3. Besleme dispersiyonunun küçük parçacıklara ayrılması
Akışkan yatak kaplama yöntemi	1. Kaplama solusyonunun hazırlanması 2. Çekirdek partiküllerinin akışkanlaştırılması 3. Çekirdek partiküllerinin kaplanması
Ekstrüzyon yöntemi	1. Erimiş kaplama solusyonunun hazırlanması 2. Erimiş polimer içine çekirdeğin dispersiyonu 3. Dehidrasyon sıvısı sayesinde çekirdek-kaplama karışımının soğutulması
Dondurarak kurutma yöntemi	1. Kaplama solusyonunun içinde çekirdeğin karıştırılması 2. Karışımın dondurarak kurutulması
Faz ayrımı yöntemi	1. Üç-karışmaz kimyasal fazın oluşturulması 2. Kaplamanın çöktürülmesi 3. Kaplamanın katılaştırılması
Merkezkaç kuvvetinin kullanıldığı süspansiyon yöntemi	1. Kaplama materyalinin içinde çekirdeğin karıştırılması 2. Dönen bir disk üzerine karışımın dökülmesi 3. Kurutma
Kokristalizasyon yöntemi	1. Süper doymuş sukroz solüsyonunun hazırlanması 2. Süper doymuş solüsyona çekirdeğin ilavesi 3. Sukroz kristalizasyon sıcaklığına ulaştıktan sonra önemli ısı emisyonu

Lipozom tutma yöntemi	1. Mikro akışkanlaştırma 2. Ultrasonikasyon 3. Ters faz evaporasyonu
İnklüzyon kompleksleşme yöntemi	1. Karıştırma, öğütme ya da püskürterek kurutma tarafından komplekslerin hazırlanması
Emülsifikasyon yöntemi	1. Kaplama materyali ile çekirdeğin karıştırılması 2. Karışımın CaCl_2 solüsyonuna damlatılmasıyla kürelerin elde edilmesi 3. Filtrasyon 4. Kurutma

2.1.5.1. Püskürterek kurutma yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi, gıda endüstrisinde su miktarının ve su aktivitesinin azaltılması ile birlikte ürünlerin mikrobiyolojik stabilitelerinin sağlanması, kimyasal ya da mikrobiyolojik bozulmaların önlenmesi, ürünlerin kendine özgü özelliklerinin korunması ve depolama ve taşıma maliyetlerinin azaltılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [21, 42, 43].

Püskürterek kurutma yöntemi en yaygın kullanılan mikroenkapsülasyon yöntemidir. Bu yöntemin avantajlarından biri, donanım temininin kolay olması ve işlem maliyetinin diğer yöntemlere göre nispeten daha düşük olmasıdır. Bu yöntem tekrarlanabilir ve endüstriyel uygulamalara uygundur. Püskürterek kurutma yönteminin dezavantajı ise uygulama alanının küçük olmasıdır. Ayrıca yüksek sıcaklık uygulaması ile bakterilerin canlılıkları azalabilmektedir. Bunu engellemek için, ortama kurutma öncesi koruyucular eklenebilmektedir [44].

Püskürterek kurutma yönteminde öncelikle çözeltiye basınç uygulanmaktadır ve sonrasında bir “sis” oluşturması için kurutma bölgesinde küçük parçacıklara ayrılmaktadır. Hava ya da azot gibi bir sıcak gaz kurutma bölgesine üflenmektedir. Bu sıcak gaz sayesinde çözücünün buharlaşması sağlanmaktadır. Daha sonra elde edilen kapsüller geri kazanım için bir siklon ayırıcıya taşınmaktadır [41].

Mikroenkapsülasyon işlemi için püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak doğal, yenilebilir, ucuz, gıda saflığında, kokusuz, tatsız ve gıda bileşenleri ile reaksiyona girerek ürünün asıl özelliklerini değiştirmeyen kaplama materyalleri olan karbonhidratlar (maltodekstrinler, laktoz, pullulan, chitosan, dekstroz v.s.), selülozlar

(karboksimetilseluloz, metilseluloz, etilseluloz v.s.), gamlar (agar, akasya gamı, sodyum aljinat) ve proteinler (gluten, kazein, jelatin) kaplama materyali olarak kullanılmaktadır [21, 45].

Gıda endüstrisinde püskürterek kurutma tarafından mikroenkapsülasyon, yağlar ve lezzet maddeleri gibi kuru stabil gıda katkı maddelerinin hazırlanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Püskürterek kurutma proteinler, karbonhidratlar ve gumlar gibi duvar materyallerinin yoğun solüsyonu ile genelde yağ olan çekirdek materyalin emülsifikasyonunu, küçük parçacıklara ayrılmasını ve emülsiyonun kurutulmasını içermektedir [46].

2.1.5.2. Püskürterek dondurma yöntemi

Püskürterek dondurma yöntemi vitaminler, mineraller ve aromalarda dahil olmak üzere hassas, katı gıda katkı maddelerinin ısıtma işlemi sırasında buharlaşmasını geciktirmek amacıyla çoğunlukla uygulanmaktadır [47]. Püskürterek dondurma ile mikroenkapsülasyon düşük sıcaklıklardan faydalanması ve büyük ölçekli üretimlerde yüksek potansiyele sahip olması sebebiyle en ucuz enkapsülasyon tekniği olarak kabul edilmektedir [24].

Kapsül kaplama materyali olarak genelde mumlar, yağ asitleri, suda çözünür ve çözünmez polimerler ve ayrıca monomerler kullanılmaktadır. Püskürterek dondurma yöntemi ile elde edilen kapsüller, püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen kapsüllerden daha büyük yüzey alanına sahiptir. Elde edilen kapsüller çevre şartlarına karşı koruma sağlamak için ek bir kabuk ile kaplanabilmektedirler. Püskürterek dondurma yönteminin dezavantajı yüksek enerji kullanımı ve uzun işleme süresinden dolayı püskürterek kurutmada 30-50 kat daha fazla maliyet gerektirmesidir [44]. Bu yöntem çekirdek materyaliyle çözeltinin hazırlanması, kaplama materyalinin katılaştırılması ve kaplama materyalinin taşınması (ekstraksiyon ya da evaporasyon) olmak üzere üç temel aşamayı içermektedir.

2.1.5.3. Akışkan yatak kaplama yöntemi

Akışkan yatak kaplama yöntemi püskürterek kurutma yöntemine benzerdir. Sıvı malzemenin bir tabakası yüksek basınçlı aerosol içinde bir çekirdek materyal üzerine püskürtülmektedir. Püskürterek kurutma ve akışkan yatak kaplama arasındaki fark çekirdek malzemenin daha önceden toz haline getirilmiş olmasıdır [47]. Akışkan yatak

kaplama yöntemi, hidrojene edilmiş bitkisel yağlar, yağ asitleri, emülgatörler, stearinler ve mumlar ya da maltodekstrinler, nişastalar, sakızlar gibi çözücü bazlı kaplamalar gibi sıcak-eriyik kaplamalarda kullanılabilmektedir [27].

Gıda endüstrisinde akışkan yatak kaplama yöntemi beslenmede destekleyici olarak kullanılan C vitamini, B vitaminleri, demir sülfat, sodyum askorbat, potasyum klorid, demir fumarat ve çeşitli vitamin mineral karışımları gibi besinsel maddelerin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Et endüstrisinde ise renk ve aromanın geliştirilmesi amacıyla çeşitli gıda asitleri akışkan yatak kaplama yöntemi ile enkapsüle edilmektedir [22].

2.1.5.4. Ekstrüzyon yöntemi

Ekstrüzyon yöntemi genellikle aroma maddelerinin kaplanması amacıyla kullanılmaktadır [27]. Bu yöntem, çok-değerlikli iyon ile temas ettiğinde çekirdeği immobilize eden bir polisakkarit jeli üzerine dayanmaktadır. Ekstrüzyon yöntemi, çekirdeğin bir sodyum aljinat solüsyonu içerisine dahil edilmesini içermektedir. Bu karışım çapı azaltılmış bir pipet ya da şırınga yardımıyla kalsiyum klorür (CaCl_2) gibi bir sertleştirme çözeltisi içine damla damla ilave edilmektedir [24]. Kaplama materyali olarak genellikle sakkaroz, maltodekstrin, glukoz şurubu, gliserin ve glukoz kullanılmaktadır [44].

Bu yöntemin başlıca avantajı, oksijene karşı neredeyse geçirimsiz olan bir bariyer sağlamasıdır ve bu sayede de aroma bileşiklerinin raf ömrünü uzatmasıdır [48]. Dezavantajı ise ekstrüzyon yöntemi tarafından elde edilen kapsüllerin oldukça büyük boyutlarda (tipik olarak 500-1000 mm) olması nedeniyle ağız hissini önemli olduğu uygulamalarda kullanım alanının sınırlı olmasıdır. Bunlara ilaveten çok sınırlı sayıdaki duvar materyalleri ekstrüzyon yoluyla enkapsülasyonda kullanılmaktadır [24].

2.1.5.5. Dondurarak kurutma yöntemi

Dondurarak kurutma yöntemi, donmuş materyalin bir vakum süblimasyon işlemi altında dehidratasyonunu içermektedir. Başka bir deyişle yüksek sıcaklıklara numuneyi göndermeden bileşenden suyun uzaklaştırılmasıdır. Yüksek sıcaklıklara bağlı olan değişimleri minimize ettiği için bu yöntemle mükemmel kalitede ürünler elde edilmektedir. Genellikle esansların/özlerin ve aromaların enkapsülasyonunda

kullanılmaktadır. Fakat yüksek maliyeti ve uzun işlem süresi liyofilizasyon yönteminin ticari olarak uygulanabilirliğini azaltmaktadır [24].

Dondurarak kurutma işlemi ürünün dondurulması ve buz kristallerinin süblimasyonla üründen uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır. Bu yöntem üç aşamada gerçekleşmektedir; dondurma aşaması, temel kurutma aşaması ve ikinci kurutma aşaması. Dondurma aşamasında; şoklama veya derin dondurucuda gıdadaki suyun buz kristalleri haline dönüştürülmesi, temel kurutma aşamasında; buz kristallerinin süblimasyonla üründen uzaklaştırılması, ikinci kurutma aşamasında ise gıdada bulunan bağlı suyun uzaklaştırılması sağlanmaktadır [44].

2.1.5.6. Faz ayrımı yöntemi

Faz ayrımı yöntemiyle mikrokapsülasyon başlangıç solüsyonundan bir veya daha fazla hidrokolloidin faz ayrılması göstermesidir ve daha sonra aynı reaksiyon ortamı içerisinde süspansiyon ya da emülsiyon haline getirilmiş etkin bileşen çevresinde yeni oluşturulmuş olan ayrılmış fazın çöktürülmesidir. Faz ayrımı yöntemi ile hazırlanmış mikrokapsüller, suda çözünmeyen, ısıya, mekanik strese ve sürekli salınımına dayanıklı mükemmel kontrollü salınım özelliklerine sahiptir. Bu mikroenkapsülasyon tekniği aroma yağlarının, vitaminlerin, kasein hidrolisatın ve ilaçların enkapsülasyonunda kullanılmaktadır [49].

Kontrollü salınımın amaçlandığı durumlarda kompleks faz ayrımı yöntemi özellikle uygulanabilir. Çünkü bu işlemle kaplama materyali içinde aktif bileşenin tamamen korunabildiği gerçek kapsüller üretilmektedir. Kompleks koaservasyon yöntemiyle daha çok hidrofobik bileşenler enkapsüle edilmektedir. Hidrofilik bileşenlerin enkapsülasyonunun zor olması dezavantajdır [50].

2.1.5.7. Merkezkaç kuvvetinin kullanıldığı süspansiyon yöntemi

Merkezkaç kuvvetinin kullanıldığı süspansiyon yöntemi prensip olarak çekirdek ve duvar materyallerinin karıştırılmasını ve daha sonra döner bir diske eklenmesini içermektedir. Sonra bu çekirdek materyaller kalan sıvının kaplanmasıyla diskten uzaklaştırılmaktadır. Diskten çıkarıldıktan sonra bu mikrokapsüller kurutulmakta ya da dondurulmaktadır. Bütün bu işlemler çok kısa bir sürede gerçekleşmektedir. Katılar, sıvılar ya da 2 mm ila 30 mm'lik süspansiyonlar bu şekilde kapsüllenebilmektedir.

Kaplamaların kalınlığı 1-200 mm olabilmekte ve yağları, polietilen glikolü, digliseritleri ve diğer eriyebilir maddeleri de içerebilmektedir. Gıdalar için son derece uygun bir yöntemdir. Bu uygulama aspartam, vitaminler ya da metionin gibi hali hazırda nemi absorplayan ya da hassas olan gıdaları korumak için kullanılmaktadır [27].

2.1.5.8. Kokristalizasyon yöntemi

Kokristalizasyon, sakkaroz matrisi ile çekirdek materyalin birleşmesi sonucu ortaya çıkan bir kaplama yöntemidir. Sakkaroz şurubu süper doymuş hale gelecek şekilde konsantre edilmekte ve sıcaklık kristalizasyonu önleyecek şekilde ayarlanmaktadır. Önceden belirlenen miktar kadar çekirdek materyal kuvvetli bir şekilde karıştırılan yoğunlaştırılmış şurup içerisine ilave edilmektedir. Karıştırma işleminin yardımıyla sakkaroz ve çekirdek materyal iç içe geçerek kapsülleme işlemi gerçekleştirilmektedir [22].

2.1.5.9. Lipozom tutma yöntemi

Lipozomlar bir veya daha fazla eş merkezli fosfolipit tabakalarından düzenlenen küresel kesecikleri kapsamaktadır. Lipozomlar biyoparçalanabilir, biyouyumlu, toksik olmayan ve bağışıklık oluşturmeyen yapılardır [51]. Lipozomlar, uçucu yağların çözünürlüklerini ve kimyasal kararlılıklarını geliştirerek böyle doğal bileşiklerini bünyesine almada etkili bir yaklaşım sunmaktadır [52]. Son zamanlarda lipozomların virozomlar ve uyarıcılara duyarlı lipozomlar gibi yeni tipleri geliştirilmiştir [53]. Lipit ve sulu fazlara sahip olması nedeniyle lipozomlar, suda çözünür materyallerin, yağda çözünür materyallerin ve amfilik materyallerin kapsüllenmesinde ve salınımında kullanılmaktadır.

Lipozom tutma yönteminin başlıca avantajları, uygun zamana kadar enkapsüle edilmiş materyalin saklanabilmesi ve salınım oranının kontrol edilebilir olmasıdır. Enkapsülasyonda kullanılan lipozomlar tadın kararlı hala getirilmesinde ve depolama stabilitesinin artırılmasında etkili olmaktadır. Lipozomlar sağlığa olumlu etkileri olan bileşenleri sistem içine alarak ve bunları kapsüle ederek gıdaların biyolojik yararlılıklarını ve dolayısıyla besinsel özelliklerini artırmaktadırlar [44].

2.1.5.10. İnklüzyon kompleksleşme yöntemi

İnklüzyon kompleksleşme, diğer molekülleri tutmak ya da enkapsüle etmek amacıyla kaplama materyali olarak β -siklodekstrinler gibi siklik polimerlerin

kullanıldığı bir enkapsülasyon yöntemidir. Yaklaşık 0,65 nm çapında olan bu iç boşluk uçucu yağ bileşiklerinin dahil edilmesine izin vermekte ve bir veya daha fazla aroma uçucu moleküllerini tutabilmektedir [27]. Bu siklodekstrin molekülleri lezzet maddeleri, renk maddeleri ve vitaminler gibi diğer moleküller ile kompleks oluşturmakta ya da tutulan halka şeklindeki oyuk merkezlerine sahip olmaktadır. İnklüzyon kompleksleri oksijen, ışık ve radyasyona karşı stabildir [47].

İnklüzyon kompleksleşme de hayli çözünmez konukların çözünürlüğünün geliştirilmesi, görünür ya da UV ışığın, ısıнын ve oksidasyonun parçalayıcı etkilerine karşı dayanıksız olan konuk moleküllerin stabilizasyonu, uyumsuz bileşiklerin fiziksel izolasyonu, kromatografik ayrılmalar, kötü kokuların ve aromaların maskelenmesi ile tadın modifikasyonu ve ilaçların ve aromaların kontrollü salınımı gibi konuk molekülün bazı özellikleri değiştirilebilmektedir [54].

2.1.5.11. Emülsifikasyon yöntemi

Emülsifikasyon öncelikle duvar materyalinin bulunduğu organik solvent içine çekirdeğin disperse edilmesidir. Daha sonra bu dispersiyon, emülsiyon stabilizörünü içeren su ya da yağ içine emülsifiye edilmektedir. Bu organik solvent karıştırma altında evaporasyon tarafından uzaklaştırılmaktadır ve çekirdeğin kapsüllendiği yoğun polimer globüllerinin oluşumunu sağlamaktadır [24].

Emülsifikasyon, uygulaması kolay bir yöntemdir. Emülsifikasyon yönteminde dikkat edilmesi ve üzerinde durulması gereken en önemli aşama karıştırma ya da homojenizasyon işlemidir. Homojenizasyon işlemi, mikroenkapsüle edilecek uçucu yağ ve elde edilecek kapsül boyutu üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Kapsül boyutu kullanılan homojenizerin özelliklerine göre değişim göstermektedir. Bu nedenle, mikroenkapsülasyon işlemi sırasında amaca en uygun homojenizer seçilmesi gerekmektedir [55, 56].

Emülsifikasyon yönteminde kaplama materyali olarak aljinat, pektin ve karragenan gibi hidrokoloidler kullanılmaktadır [44]. Oluşan jel boncukları hücre için ek koruma sağlayan bir kaplama tabakası oluşturmak amacıyla ikinci bir çözelti içine daldırılarak yeniden kaplanabilmektedir [42, 43]. Emülsifikasyon yönteminde daha küçük çaplarda boncuklar elde edildiği için çok aşamalı uygulamalara uygun olmaktadır [44].

Çizelge 2. 3. Enkapsüle edilmiş gıda bileşenleri ve onların gıda endüstrisinde uygulamaları [27]

Gıda bileşenlerinin kategorisi	Örnekler	Tercih edilen uygulama tarzı	Uygulamaları
Asitliği düzenleyiciler	Laktik asit, vitamin C, asetik asit, sorbik asit, potasyum sorbat, kalsiyum propiyonat ve sodyum klorit	Akışkan yatak kaplama Ekstrüzyon yöntemi	Et ve et ürünlerinde renk ve aroma gelişimine yardımcı olur. Pişirme endüstrisinde, işleme ve sonraki pişirme işlemi sırasında karbondioksit salınımını kontrol etmek için kararlı asitler ve kabartma tozu ilave edilir.
Aroma maddeleri	Limon yağı, nane yağı, sarımsak yağı	İnklüzyon kompleksleşme, Ekstrüzyon Püskürterek kurutma yöntemi	Sıvı aromaları, kararlı ve serbest akışlı tozlar haline dönüştürmek için kullanılır.
Tatlandırıcılar	Şekerler Aspartam	Kokristalizasyon Akışkan yatak kaplama	Higroskopisiteyi azaltmak, akışkanlığı geliştirmek ve tatlılık algısını uzatmak için kullanılır.
Renklendiriciler	Annatto β -karoten Turmeric	Ekstrüzyon Emülsifikasyon yöntemi	Enkapsüle edilmiş renk maddelerinin işlenmesi daha kolaydır ve daha gelişmiş çözünürlük sunduğu için kullanılır.
Yağlar	Balık yağı Linolenik asit Palmitik asit Sardalya yağı	Püskürterek kurutma Liyofilizasyon yöntemi	İşleme ve depolama esnasında oksidatif bozulmayı önlemek için kullanılır.
Vitaminler ve mineraller	Yağda çözünen: vitamin A, D, E ve K Suda çözünen: vitamin C, B, folik asit	Koaservasyon İnklüzyon kompleksleşme Püskürterek kurutma yöntemi	İstenmeyen lezzetleri azaltmak, besinlerin zamana bağlı salınımını sağlamak, sıcaklık ve nemin aşırı olduğu yerlerde stabiliteyi arttırmak ve her bir besinin diğer bileşenlerle etkileşimini azaltmak için kullanılır.
Enzimler ve mikroorganizmalar	Lipaz, intervaz <i>Brevibacterium linens</i>	Koaservasyon Püskürterek kurutma yöntemi Lipozom tutma	Kararlılıkları geliştirmek ve olgunlaşma süresini azaltmak için kullanılır.

2.2. Uçucu (esansiyel) Yağlar

Uçucu yağ, bitkilerden ve bitkilerin farmakolojik bileşenlerce etkin olan bölgelerinden ekstraksiyon ya da distilasyonla elde edilen, çoğunlukla renksiz veya açık sarı renkte olan, oda sıcaklığında genellikle sıvı formda bulunan, su ile sürüklenme özelliğine sahip yağimsı karışımlardır. Bulunduğu bitkiye karakteristik özellik sağlayıp bitkiye ait koku, yakıcı lezzet veren çok sayıda kimyasal bileşenden oluşmaktadır. En belirgin özellikleri uçucu ve kokulu olmalarıdır.

Sahip olduğu suda hafif çözünürlük özelliği ile bünyesine aldığı koku ve aromayı suya verebilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonu başlıca terpenler, alkoller, esterler, aldehitler, ketonlar, fenoller ve eterler gibi çok sayıda ve farklı konsantrasyonlarda bileşeni barındırmaktadır.

Uçucu yağlar ve bitkilerin çeşitli ekstraktları doğal ürünlerin kaynakları olarak ilgiyi artırmıştır. Uçucu yağların pek çok enfeksiyonlu hastalıkların tedavisinde alternatif ilaçlar olarak potansiyel kullanımları gösterilmiştir [57]. Bu metabolitler farmakoloji, tıp, klinikal mikrobiyoloji ve fitopatoloji alanlarında ve gıda muhafazasında uygulanmış ve etkileri gösterilmiştir [58].

Aromatik bitkilerden, isopren birimlerinden oluşan uçucu C10 ve C15 terpenler üretilmektedir. Uçucu yağlar olarak bilinen bu kaynaklar buhar distilasyonu ya da diğer modifiye edilmiş metotlar tarafından bitkilerin çeşitli parçalarından izole edilmektedir. Siklik ya da siklik olmayan çeşitli terpen hidrokarbonlar ve onların oksijenli isoprenoit bileşikleri karışım olarak uçucu yağların içinde mevcuttur [59].

Bir bitkisel uçucu yağın kimyasal kompozisyonu,

- Çevresel koşullar,
- Aromatik bitkilerin toplandığı sezon,
- Dehidrasyon işlemi,
- Uçucu yağ ekstraksiyonuna kadar toplanmış bitkilerin depolama koşulları,
- Uçucu yağın izolasyonunda uygulanan yöntem,
- Bileşenlerin belirlenmesinde kullanılan analiz koşulları (kolon, programlanmış sıcaklık), gibi pek çok parametreye bağlıdır [59].

Yağ oksidasyonu yağın kalite niteliklerini ve raf ömrünü etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Oksidasyon gıdaların tat, koku, doku, lezzet ve görünümünde istenmeyen değişikliklere neden olmakta ve yağda eriyen vitaminleri yok etmektedir. Ayrıca yağların bu oksidatif bozulması insan sağlığında doğrudan tehdit oluşturabilecek biyolojik membranlara, enzimlere ve proteinlere zarar verebilmektedir [14, 60].

Sadece insan vücudundaki serbest radikallerin sağlığa zararlı tahmini etkilerini değil aynı zamanda gıda bileşenlerindeki yağların ve diğer bileşenlerin bozulmasını engellemek amacıyla özellikle fenoller gibi doğal antioksidanlara olan ilgi giderek artmıştır [13]. Uçucu yağların bu antioksidan özelliği doğal gıda katkı maddeleri olarak kullanımı destekleyen fiziko-kimyasal metotlar ile *in vitro* olarak gösterilmiştir [58].

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ekstraktı güçlü antioksidan kapasitesi ve yağda çözünme özelliği nedeniyle popüler olan doğal bir antioksidandır ve Avrupa yönetmeliklerinde resmen kabul edilmiştir. Doğal bir antioksidan olarak biberiye ekstraktı kullanımı ilk olarak 1955 yılında Rac ve Ostric-Matijasevic tarafından bildirilmiştir. Wu ve ark. (1982), doğal bir antioksidan olarak biberiye ekstraktının BHT ve BHA' dan daha iyi bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu bildirilmiştir. Chen ve ark. (1992), bütün biberiye ekstraktlarının lipid oksidasyonu üzerinde güçlü inhibitör etkiler gösterdiklerini bildirmişlerdir. Biberiye ekstraktının antioksidan kapasitesi, tekli oksijeni, hidroksil radikalleri ve lipid peroksil radikalleri toplayan ve dolayısıyla lipid oksidasyonunu engelleyen fenolik diterpenlerin varlığına atfedilmiştir. Biberiye ekstraktında fenolik diterpenlerin üç tipi vardır: karnosik asit, karnosol ve rosmanolur ve başlıca fenolik diterpen olarak karnosik asit bulunmaktadır. Buna ek olarak, önceden yapılmış bir çalışmada karnosik asitin biberiye ekstraktındaki en aktif antioksidan bileşeni olduğu belirtilmiştir [60].

2.2.1. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)

Sicilya adasının baskın rol oynadığı Akdeniz bölgesi, yaz mevsiminin sıcak ve kış mevsiminin de hafif geçmesiyle karakterize edilmiş pozisyonu ve kıyı uzanımı nedeniyle kendine has bir çevredir. Bu iklim büyük bir biyoçeşitlilik sunmakta ve bu bölgede Lamiaceae familyasına ait çok sayıda aromatik bitkiler optimal yaşam bulmaktadır. Özellikle biberiye çeşitli özellikleri ve uygulamaları nedeniyle en ilginç aromatik türlerden biridir [61].

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), kozmetik ve tıp alanlarında, gıdalarda tatlandırıcı olarak veya süs bitkisi olarak ya da bir baharat olarak yemeklerin pişirilmesi sırasında yaygın bir şekilde kullanılan ve bazı hastalıklara çare olarak geleneksel tıpta iyi bilinen, dünyanın pek çok yerinde özellikle Akdeniz bölgesinde yetişen, yaprak dökmeyen, yoğun bir şekilde bulunan, doğal aromatik bir çalı (Lamiaceae) 'dır [62, 63]. Gıda ürünlerinde biberiye gibi bitkiler hoş bir tat ve aroma sağlamak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Akdeniz mutfağının lezzetlendiricisi olarak aromatik bir bitki olan biberiye kullanımı geniş ölçüde yer bulmaktadır. Bununla birlikte lezzet katkılarının yanı sıra biberiye fenolik asitler, flavonoidler, diterpenler ve fenolik triterpenler gibi bileşiklerin varlığı ile bağlantılı olan antioksidan aktivitesine de sahiptir [14].

Uçucu yağlar bitkilerden ekstrakte edilmiş doğal ürünlerdir. *Rosmarinus officinalis* L.' nin uçucu yağı genellikle geleneksel hidrodistilasyon ya da organik solvent ekstraksiyonu tarafından taze yapraklardan izole edilmektedir. Aromalar oksidasyonun, kimyasal interaksiyonların ve volatilizasyonun bir sonucu olarak değişebilen duyuşsal algının kararsız bileşenleri ve uçucu maddelerin kompleks karışımlarıdır. Böyle kimyasal bileşenler nem, sıcaklık ve oksijene duyarlıdır [39].

Tarih boyunca biberiye tıbbi madde olarak renal kolik ve dismenore tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca, solunum yolu bozukluklarının neden olduğu semptomları hafifletmek için ve saç büyümesini teşvik etmek için kullanılmıştır. Biberiye ekstraktları anksiyete ile ilgili koşulları tedavi etmek ve uyanıklığı artırmak için aromaterapide kullanılmaktadır [62]. Biberiyenin antimutajenik ve etkili bir kemopreventif ajan olduğu bilinmektedir ve hayvan modellerinde non-toksik özellik göstermiştir [64].

Tıbbi açıdan kullanılan bir bitki olarak biberiye, birçok ülkede resmi farmakoloji indeksinde listelenen ve etkinliği büyük ölçüde kabul edilen bitkiler havuzuna aittir. Biberiyenin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur ve hafızayı geliştirmede, nörodejeneratif hastalıklar ve hipertansiyonun tedavisinde, antidepresan olarak ve onun antikanserojenik, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antitrombotik ve antioksidan özelliklerinden ötürü kullanılmaktadır. Yukarıda belirtilen özelliklerinin çoğu biberiye ekstraktlarının birçok fitokimyasal çalışmalarında tanımlanan polifenol türevlerinin varlığından, diğer bir deyişle flavonoidlerin (genkwanin ve cirsimaritin),

aromatik terpenoidlerin (karnosol ve karnosik asit) ve organik asitlerin (rosmarinik asit ve kafeik asit) varlığından kaynaklanmaktadır [61]. Kimyasal açıdan bakıldığında biberiye uçucu yağı cineoliferum (1,8-cineolün yüksek içeriği), camphoriferum (camphorun yüksek içeriği) ve verbenoniferum (verbenonun yüksek içeriği) olarak üç gruba ayrılmaktadır. Fakat, diğer ilgili bileşiklerin göreceli bolluklarına göre başka kemotiplerde tanımlanmıştır ve doğadan toplanan diğer aromatik yağları içeren otlar gibi biberiye popülasyonları da belirli bir kompozisyon karmaşıklığı göstermiştir [61].

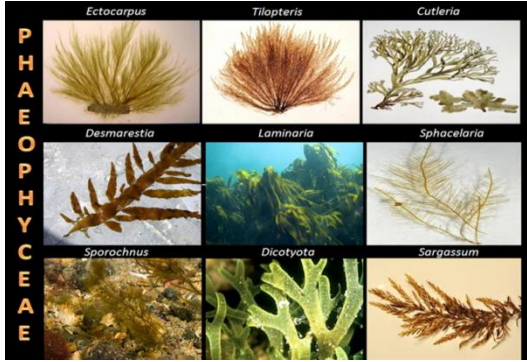
Rosmarinus L. cinsi, uçucu yağların kalitesi bakımından geniş ölçüde değerlendirilmiştir. Akdeniz bölgesi beş tür içermektedir: *Rosmarinus officinalis* L., *Rosmarinus eriocalyx* Jourdan ve Fourr, *Rosmarinus laxiflorus* (De Noé) Batt., *Rosmarinus lavandulaceus* Batt. ve *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath ve Maire. *R. officinalis* L., bir diploittir ($2n = 2x = 24$) ve allogamous türler, çoğunlukla Akdeniz havzasında yetişmektedir. *R. officinalis* L., uçucu yağları ve fenol biyolojik özellikleri sebebiyle en çok talep gören türdür [58].

Biberiyenin kimyasal bileşimi özellikle başlıca bileşenler olarak 1,8-cineole, α -pinene, β -pinene, limonene, borneol, camphor, camphene ve verbenone içeren uçucu yağ bileşimine bağlıdır. Biberiyenin insan ve hayvan sağlığında ve gıda korunmasında etkisi olan çoğunlukla antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ve birçok biyolojik aktiviteleri bileşimindeki uçucu yağlara dayandırılmaktadır. Biberiyeden ekstrakte edilen bileşenler antioksidan aktivitesi [63] yanında antikanserojenik ve antimikrobiyal aktivite [65] gibi farmakolojik ve tıbbi özelliklere sahiptir.

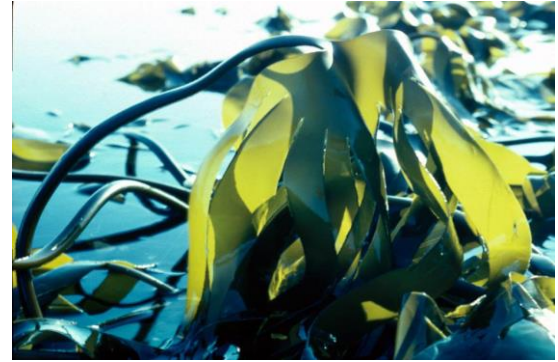
İspanya, Fas ve Tunus gibi Akdeniz havzası ülkeleri ve bununla birlikte Amerika Birleşik Devletleri ve Meksika başlıca üretici ülkelerdir. Bununla birlikte distilasyon verimi kuru bitkinin 100 g' ı başına 0,8-2,5 g uçucu yağ arasındadır [63]. Dahası distilasyon katı kalıntıları hala antioksidan, antimikrobiyal, antikanserojenik, anti-inflamatuar, antidiyabetik, diüretik, antitrombotik, antiülserojenik ve antinosiseptif özelliklere sahip flavanoidleri, karnosik asiti, carnosol, rosmanol ve rosmarinik asit dahil olmak üzere uçucu olmayan değerli bileşenleri içermektedir. Böyle özellikler bu kalıntıları, kozmetik ürünlerindeki yaşlanma karşıtı bileşenlerin ya da gıda ve yemdeki koruyucuların ve sağlığı destekleyici bileşenlerin kaynağı olarak oldukça umut verici hale getirmekte ve aynı zamanda ürüne ek bir fayda sağlayabilmektedir [63].

2.3. Aljinat

Aljinatlar kahverengi deniz yosunu türlerinin (*Phaeophyceae*) hücre duvarlarından izole edilmiş olan bir poliüronik sakkarittir ve belli toprak bakterileri (*Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi) tarafından bir ekstraselüler matriks olarak üretilmektedir [66, 67]. Aljinatlar (1-4) bağlı β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-guluronik asitten (G) oluşan bir anyonik polisakkarittir [68].



Şekil 2.2. *Phaeophyceae* türleri



Şekil 2.3. *Laminaria hyperborea*

Aljinat β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-guluronik asit (G) gibi fonksiyonel bileşenlerine ayrılabilen, düşük maliyetli, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir bir polimerdir [69]. Bu polimer, ilaç ve ilaç iletim ve salınım uygulamaları [70,71], doku mühendisliği [72-74] ve çevre koruması gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Bu polimer iki değerli katyonların varlığında ya da aljinat solüsyonuna ilave edildiğinde kararlı bir hidrojel oluşturma yeteneği sayesinde özellikle su arıtmada kullanılmaktadır [75, 68, 76]. Bu ilginç ve yararlı özellik onun bileşiminin doğrudan bir sonucudur.

Aljinatın gıdalardaki endüstriyel uygulamaları; su tutma yeteneği, jelleştirme, viskozlaştırma, kararlı hale getirme, tekstür geliştirme ve emülsifiye etme gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır.

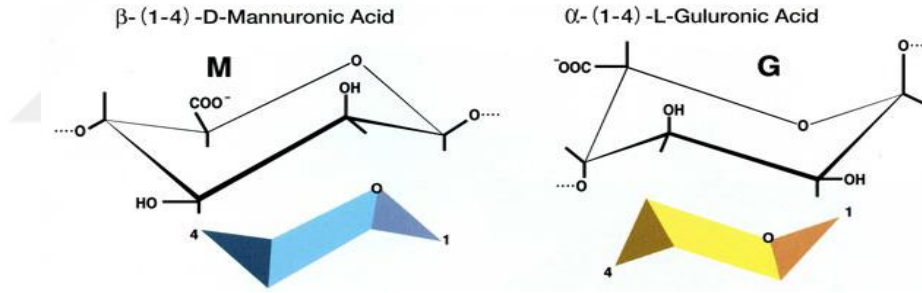
2.3.1. Aljinatın tarihçesi

İlk olarak bir İngiliz kimyacı olan E. C. C. Stanford 12 Ocak 1881 tarihli patent ile aljinatı (kahverengi deniz yosunundan ‘aljinik asit’ in hazırlanması ile) tanımlamıştır. 1926 yılında, bağımsız olarak çalışan bazı gruplar üronik asitin aljinik asitin bir bileşeni olduğunu keşfetmişlerdir. Daha sonra yapılan araştırmalarda aljinatın

hidrolizatı içinde D-mannuronik asit tespit edilmiştir. Fischer ve Dörfel aljinik asitin hidrolizatları içinde mannuronik asitten farklı bir üronik asit varlığını keşfetmişlerdir. Üronik asit L-guluronik asit olarak tanımlanmıştır. Aljinat daha sonra α -L-guluronik ve β -D-mannuronik kalıntılarından oluşan bir ikili kopolimer olarak kabul edilmiştir. Aljinat molekülü içindeki üronik asit kalıntıları arasındaki bağların doğası, selüloz gibi β -1,4 olarak belirlenmiştir [77].

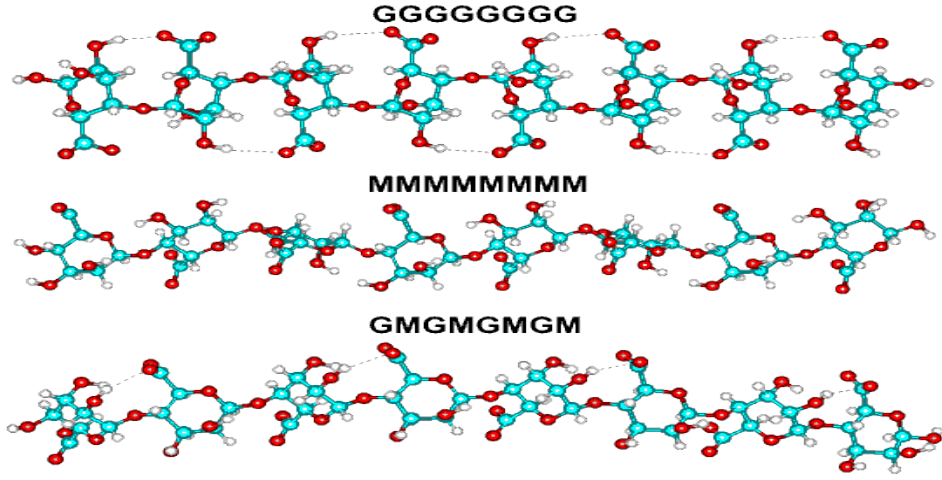
2.3.2. Aljinatın kimyasal yapısı

Dallanmamış ikili kopolimer ailesinden olan aljinatların oldukça değişen bileşimi ve sekansı, (1,4) bağlı β -D-mannuronik asit (M) ve onun C5 epimeri olan α -L-guluronik asitten (G) oluşmaktadır. Şekil 2.4' te M ve G' nin kimyasal yapısı gösterilmektedir. Aljinatın polimer zincirinde M blokları, G blokları ve MG bloklarının uzun dizilerinin birbiriyle bağlanması mümkün olabilmektedir [78,79].



Şekil 2.4. β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-guluronik asit (G)

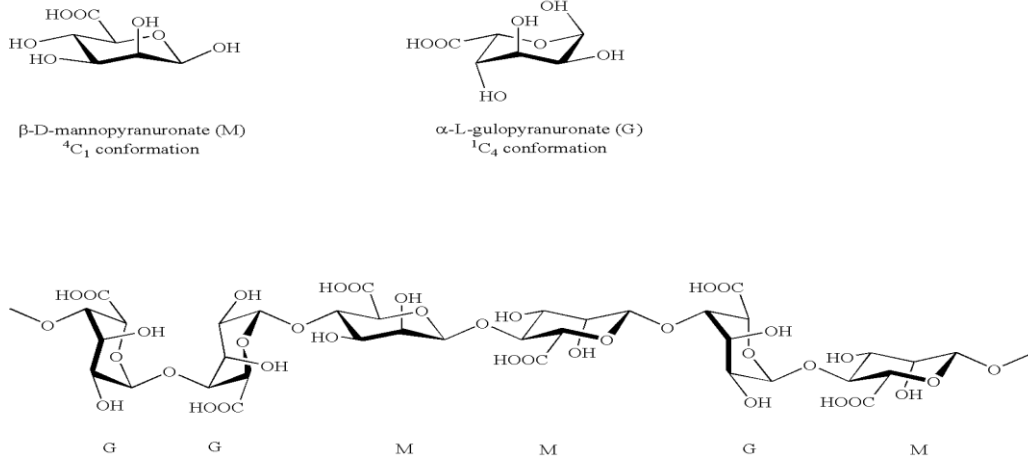
Kısmi asit hidrolizi tarafından aljinat, üç fraksiyona ayrılmıştır. Bunlardan ikisi G ve M' nin neredeyse homopolimerik moleküllerini içerirken üçüncü fraksiyon hem monomerlerden hem de çok sayıda MG ikili kalıntılarından neredeyse eşit oranda oluşmuştur [77]. Şekil 2.5' te aljinat fraksiyonları gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Kısmi asit hidrolizi sonucu oluşan aljinat fraksiyonları

2.3.3. Aljinatın üç boyutlu yapısı

Mannuronatça ve guluronatça zengin aljinatların X-ray difraksiyon (kırılma) çalışmaları, Şekil 2.6' da gösterildiği gibi homopolimerik bloklar içindeki guluronat kalıntılarının ${}^1C_4$ konformasyonunda mannuronat kalıntılarının ise ${}^4C_1$ konformasyonunda olduğunu bildirmişlerdir [77].



Şekil 2.6. G-G, M-M, G-M blokları

Aljinat solusyonlarının viskozite verisi, bu zincir bloklarının sağlamlığının MG<MM<GG düzeninde arttığını göstermiştir [55]. MG blokları polisakkarit zincir esnekliğine olanak sağlar. Bu yüzden MG alanları aljinat solusyon viskozitesini

düşürmektedir. Aljinatın biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri aljinatın molekül ağırlığına ve M:G oranına bağlıdır [80].

2.3.4. Aljinatın oluşumu ve kaynak ilişkisi

Ticari aljinatlar başlıca *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica* ve *Sargassum* türlerinden üretilmiştir.

Yüksek G içeriği genel olarak yaşlı *Laminaria hyperborea* bitkilerinin saplarından hazırlanan aljinatlarda bulunuyorken *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Macrocystis pyrifera*’ dan elde edilen aljinatlarda G-bloklarının düşük miktarda bulunması ve düşük jel gücü karakterize edilmektedir. [77].

2.3.5. Aljinatın üretim süreci

Ticari olarak kullanılan aljinatlar tipik olarak *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera*’ yı içeren kahverengi deniz yosunundan (*Phaeophyceae*) genellikle sodyum hidroksit (NaOH) gibi sulu alkali solüsyonları ile muamele edilmek suretiyle ekstrakte edilmektedir. Bu ekstrakt filtre edilmekte veya sodyum ya da kalsiyum klorid aljinatı çöktürmek için filtrata ilave edilmektedir. Bu aljinat tuzu, seyreltik hidroklorik asit (HCl) ile muamele edilerek aljinik asite dönüştürülmektedir. Saflaştırma ve dönüştürme işleminden sonra suda çözünür sodyum aljinat tozu elde edilmektedir [70].

2.3.6. Aljinatın özellikleri

Diğer jelleştirici polisakkaritler ile karşılaştırıldığında aljinatın en çarpıcı özelliği jel oluşumu için esas olan çok değerlikli katyonları seçici bağlamasıdır ve aslında aljinatın bu sol-jel dönüşümü özellikle sıcaklık ile etkilenmemektedir [77].

2.3.6.1. Çözünürlük

Su içinde aljinatların çözünürlüğü 3 parametre tarafından yönetilir; solventin pH’ si, ortamın iyonik gücü ve solvent içindeki jelleştirici iyonların varlığı.

Aljinatları çözünür yapmak için protonlanmış karboksilik asit grupları ve pH’ nin belirli kritik değerlerin üzerinde tutulması gereklidir. Ortamın değişen iyonik gücü, polimer konformasyonunu, zincir uzamasını, viskoziteyi ve bu nedenle çözünürlük gibi

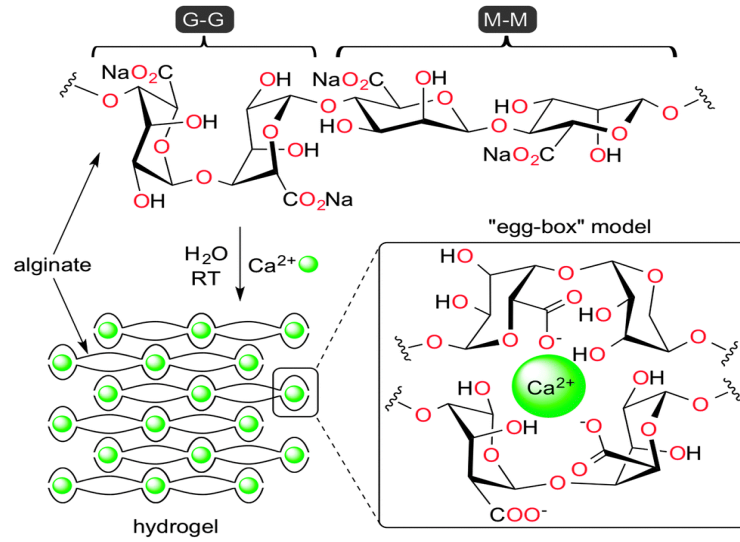
çözelti özelliklerini etkilemektedir. Aljinatlar Ca^{+2} , Sr^{+2} ve Ba^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında jelleşmektedirler. Bu nedenle çözünmenin sağlanması için çapraz bağlama iyonlarının sulu serbest solvent olması gerekmektedir [81]. Aljinik asit ve kalsiyum aljinat suda çözünmezken, amonyum aljinat, potasyum aljinat ve sodyum aljinat suda çözünmektedir.

2.3.6.2. Selektif iyon bağlama

Cascone ve diğerleri iyon değiştirme kromatografisi ve afiniteye yönelik küreler (baloncuklar) yapmak için aljinatların kimyasal çapraz bağlamasını rapor etmişlerdir. Bir iyon değişim materyalinde aljinat omurgası üzerindeki karboksilik asit gruplarının kullanılması zorunludur [81].

Aljinatlar kalsiyum ve baryum iyonları gibi iki değerlikli katyonların varlığında iyonotropik çapraz bağlama yoluyla hidrojel oluşturma yeteneğine sahiptir. CaCl_2 yaygın bir şekilde kalsiyum aljinat jeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Bununla birlikte Ca^{2+} hızlı bir şekilde aljinat ile reaksiyona girmektedir ve homojen bir hidrojel oluşturmaları zordur [72].

Kalsiyum iyonu ve/veya diğer iki veya çok değerlikli katyon içeren sulu çözeltilere aljinat solüsyonunun damlalar halinde ilave edilmesi küresel (boncuk şeklinde) jel yapı oluşumuna neden olmaktadır [82]. Jelleşme kapasitesini düzenleyen bu mekanizma zincir boyunca mevcut G bloklarının miktarı ile doğrudan ilişkilidir çünkü yalnızca guluronik asit bu hidrojinin oluşumunda aktif rol oynamaktadır. Bir başka deyişle bir aljinat solüsyonu Ca^{+2} ve Be^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında hidrojel yapıya dönüşebilmektedir [83]. Bu hidrojel yapı, guluronik asit kalıntıları ve iki değerlikli katyonların moleküller arası çapraz bağlanması sonucu, kalsiyum iyonlarının etkisi altında iyonik etkileşimler yardımıyla birbirine tutunan üç boyutlu aljinat filamentleri oluşturarak “egg-box” adı verilen jel yapıya dönüşmektedir [84]. Şekil 2.7’ de “egg-box” modelinin oluşumu gösterilmiştir. Bu reaksiyon çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir ve bu jelin stabilitesi solüsyona eklenen iyonların miktarına ve stabil birleşmelerin oluşumundaki G bloklarının uzunluğuna bağlıdır [85].



Şekil 2.7. ‘egg-box’ modelinin oluşumu

İyonik çapraz bağlama tarafından aljinat jellerinin hazırlanmasında iki farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlar, difüzyon metodu ve iç jelasyon metodudur. Bu yöntemlerde çapraz bağlama iyonlarının ekleniş yolları farklıdır. Genellikle jelasyon işleminde kullanılan iyon kalsiyumdur.

Difüzyon yöntemi aljinat çözeltisi içine bir dış hazneden iki değerlikli iyonların girişi ile karakterize edilmektedir. Bu jelleşme neredeyse anlıktır ve aljinat jeli içindeki çapraz bağların homojen olmayan bir dağılımı ile sonuçlanmaktadır [85]. İç jelasyon yöntemi aljinat solusyonu ile çapraz bağlama iyonunun bir inaktif formunun karıştırılmasına dayanmaktadır. Bir literatürde bildirildiği üzere etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) gibi şelatlama ajanları ile kompleksleşen çözünmeyen kalsiyum karbonat (CaCO_3) ve Ca^{+2} iyonları kullanılmaktadır [86]. Bu Ca^{+2} iyonları organik asitlerin ilavesiyle pH düşürülerek salınmaktadır. Bu metot yavaş bir şekilde gerçekleşmekte, jellerin oluşumunu kontrol etmekte ve aljinat jelinin homojen bir şekilde dağılımını sağlamaktadır [85].

2.3.7. Gıda uygulamalarında aljinat kullanımı

Gıda uygulamalarında aljinatın kullanımı genellikle maliyet odaklıdır [78]. Sadece gıdalarda kullanılan aljinat türü, propilen glikol aljinat (PGA)’dır. İlk olarak Steiner (1947) PGA’ı hazırlamıştır ve bu işlemi Steiner ve McNeely (1950) geliştirmiştir. PGA, düşük pH değerlerinde yüksek derece çözünebilirlik özelliği

yüzünden asit emülsiyonlarını (Fransız sosları gibi), asitli meyve içeceklerini, meyve sularını ve bira köpüğünü stabilize etmek amacıyla kullanılmaktadır [77].

Çizelge 2. 4. Gıda ürünlerinde aljinatın yaygın kullanımları [80]

Aljinat uygulamaları	Gıda uygulamalarında toplam aljinat yüzdesi	Uygulamalar hakkında bilgiler
Bira köpüğü stabilizasyonu	21,2	Düşük pH' larda yüksek çözünürlüğü sayesinde bira köpüğünü stabilize etmektedir.
Yeniden yapılandırılmış gıdalar	19,6	Gıda materyalinin düzeltilmesinde kullanılır (soğan halkaları).
PGA' nın kullanıldığı gıdalar	18,9	PGA asite duyarlıdır ve viskozite kaybını engeller (alkolsüz içecekler, soslar, lezzetlendiriciler, sütlu içecekler, meyve püreleri, dondurma, erişte/makarnalar)
Unlu mamüller	14,9	Ekmek ve kek karışımlarında raf ömrünü uzatır ve nem tutulmasını geliştirir.
Meyve konserveleri	6,5	Reçellerde, marmelatlarda ve meyve soslarında jelleştirici, stabilize edici ve kıvam verici olarak kullanılmaktadır.
Dondurma	3,8	Kristalizasyon ve çekilme/büzülme olmaksızın dondurmanın doğru viskoziteside olmasını sağlamaktadır.
Diğerleri	15,1	Tatlılar (dondurulmuş kremler, puding)Emülsiyonlar ve soslar (mayonez, ketçap, salata sosları) Ekstrüde gıdalar (erişteler, makarnalar)

Mevzuata gelince, aljinik asit ve onun amonyum, kalsiyum, potasyum ve sodyum tuzlarının koruyuculuğu 1992' deki 39. toplantıda Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives -JECFA) tarafından değerlendirilmiştir. Bir ADI 'not specified' olarak tayin edilmiştir. JECFA, 17. toplantı da propilen glikol aljinat (PGA) için 0 ila 25 mg/kg bw ADI değeri belirlemiştir [77].

2.4. Mikroenkapsülasyon Tekniğinde Aljinat Kullanımı

Chan et al. [87], emülsifikasyon metotları tarafından sodyum aljinat kullanarak buğday ruşeymi yağı ve çuha çiçeği yağının enkapsüle edilmesinin uygulanabilirliği araştırmışlardır. Sodyum aljinat ve kalsiyum gibi iki ve çok değerlikli katyonlar arasındaki kimyasal etkileşimlerden faydalanarak çeşitli konsantrasyonlarda buğday ruşeymi yağının ve çuha çiçeği yağının mikroenkapsüle etmişlerdir. Bu çalışmada enkapsülasyon etkinliği ve buğday ruşeymi yağının yağ içeriği, yağ yükündeki artış ile yükselmiştir ve Çuha çiçeği yağı mikrokürelerinin enkapsülasyon etkinliği, ayrı ayrı 50, 250 ve 350 w/w'lik yağ yüklerinde, buğday ruşeymi yağı mikrokürelerine benzer olmuştur. Sodyum aljinatın kaplama materyali olarak kullanıldığı bu emülsifikasyon metodu ~%88' lik maksimum enkapsülasyon verimi ile buğday ruşeymi yağında başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Sultana et al. [88], probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu için kalsiyum aljinatın kullanıldığı modifiye edilmiş bir metot geliştirmişlerdir. Bir ön hazırlık çalışmasını 8 haftalık bir süre için yoğurt içinde *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp.'nin hayatta kalma süreleri üzerine enkapsülasyonun etkilerini izlemek için uygulamışlardır. Bu çalışma, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium* spp.'nin enkapsüle edilmiş kültürlerinin hayatta kalma süresi 8 haftalık süre içinde, canlı sayısında yaklaşık 0,5 log bir azalış göstermişken, yoğurt içine serbest hücreler olarak katılan kültürler için ise yaklaşık 1 log' luk bir azalışın olduğunu göstermiştir. Probiyotik bakterilerin Hi-Maize nişastasının katılımı ile yapılan mikroenkapsülasyonun nişasta kullanılmadan yapılan mikroenkapsülasyona nazaran canlı bakterilerin enkapsülasyonunu geliştirdiğini gözlemişlerdir.

Chang et al. [89], okaliptüs yağı içeren aljinat kompleks kapsüllerini ara yüzey insolübilizasyon reaksiyonu tarafından hazırlamışlardır ve onun kontrollü salınım karakteristiklerini incelemişlerdir. % 5 w/v sarı yağlı boya içeren okaliptüs uçucu yağlarının 2 mL' sini, % 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 ya da 2,5 w/v konsantrasyonlarındaki sodyum aljinat sulu çözeltilerinin 8 mL'si ile karıştırmışlardır. Daha sonra oluşan emülsiyonlardan 4' er gram alarak % 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 ya da 2,0 w/v konsantrasyonlarındaki kalsiyum klorür içeren jelleşme banyolarının (gelling baths) 10 g' ı içine bir enjektör ile damlatmışlardır. Çalışmalarında % 1,0 w/v sodyum aljinat, % 2,0 w/v kalsiyum klorüre karar vermişlerdir ve çapraz bağlanma süresini 37 °C' de 20

dakika olarak belirlemişlerdir. Kapsüller içindeki maksimum yağ içeriğini bu koşullarda % 90-92 olarak elde etmişlerdir.

Tan et al. [90], duvar materyali olarak aljinat/nişasta karışımını kullanarak kurutma yöntemi tarafından balık yağını mikroenkapsüle etmişlerdir. Mikrokürelerin morfolojisi, verimi ve mikroenkapsülasyon etkinliği üzerine aljinat türü ve içeriğinin etkisini araştırmışlardır. Mikroenkapsüle edilmemiş balık yağına nazaran mikroenkapsüle edilmiş balık yağının depolama sırasında bileşiminde daha az kayıp olduğu ve daha stabil kaldığı sonucuna varmışlardır.

Soliman et al. [91], yaptıkları çalışmalarında mikroenkapsülasyon yoluyla uçucu yağların buharlaşma oranını düşürmek istemişlerdir. Uçucu yağ olarak kekik yağı, tarçın yağı ve karanfil yağını kullanmışlardır. Aljinat mikrokürelerini CaCl_2 'yi çapraz bağlama ajanı olarak kullanıp oluşturmuşlardır. Enkapsülasyon etkinliği üzerine % 0,5-8 aljinat konsantrasyonu, % 0,125-2 CaCl_2 konsantrasyonu ve 5-30 dakika çapraz bağlama süresinin etkisini araştırmışlardır. Uçucu yağın türüne göre optimum koşullar altında enkapsülasyon etkinliğini % 90-94 bulmuşlardır.

Xiao et al. [92], tatlı portakal yağı mikrokapsülünü Ca^{+2} ile sodyum aljinatın jelasyonu tarafından hazırlamışlardır. % 2,0 w/v sodyum aljinat konsantrasyonu, % 1,5 w/v kalsiyum klorür konsantrasyonu, 1,5:1,0 çekirdek materyal: duvar materyali oranı, % 0,1 w/v Tween 80 ve % 0,1 w/v gliseril monostearat konsantrasyonu ile optimum koşulları sağlamışlardır. Bu koşullar altında maksimum enkapsülasyon etkinliğini % 76,1 elde etmişlerdir.

Chew et al. [29], koekstrüzyon teknolojisi kullanarak mikroenkapsüle edilmiş hibiskus (*Hibiscus cannabinus* L.) yağının karakteristikleri üzerine kabuk ve çekirdeğin farklı akış oranları, titreşim frekansları, kurutma yöntemleri ve kabuk formülasyonları gibi farklı işlem parametelerinin etkisini incelemişlerdir. % 1,5 (w/w) aljinat solusyonu kullanarak hazırlamış oldukları mikrokapsüllerden % 76,62 maksimum mikroenkapsülasyon etkinliği elde etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisi yerel marketlerden temin edilerek laboratuara getirilmiştir. Biberiye bitkisi kullanılıncaya kadar +4 °C’ de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Yaş biberiye bitkisi



Şekil 3.2. Kurutulmuş biberiye bitkisi

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallardan sodyum aljinat, kalsiyum klorid dihidrat, potasyum peroksisülfat ($K_2O_8S_2$), sodyum sitrat tribasic dihidrat, α -amilaz, etil asetat, 2,2-Difenil-1-pikril-hydrazil (DPPH), 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), ($\pm$)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkrom-2-karboksilik asit (Trolox) SIGMA-ALDRICH firmasından, Tween 80 (Polioksietilen(20) sorbitan monooleat) ve PBS tabletleri BioShop firmasından ve nişasta ise CARLO ERBA firmasından temin edilmiştir.

3.3. Kullanılan Alet Ekipman ve Cihazlar

Clavenger cihazı, DAIHAN SSMH-6 çoklu ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, WiseTis marka homojenizatör, GC-FID kromatografi cihazı, MULTISCAN GO marka ELİSA cihazı, vorteks karıştırıcı, santrifüj cihazı, otomatik pipet seti, pH metre ve tartı bu tez kapsamında laboratuarda kullanılan cihaz ve ekipmanlardır.

3.4. Yöntem

3.4.1. Biberiye uçucu yağının elde edilmesi

Çalışmada kullanılacak olan biberiye bitkileri +4 °C’ de buzdolabında muhafaza edilmiştir. 100 g tartılarak alınan biberiye bitkisi balon jojeye yerleştirilip 1:7 oranında saf su ilave edilmiştir. Clavenger düzeneğinde su distilasyonu yöntemi ile uçucu yağ elde edilmiştir (Şekil 3.3). Bu elde edilen uçucu yağ çalışmada kullanılıncaya kadar +4 °C’ de bekletilmiştir.



Şekil 3.3. Clavenger düzeneğinde su distilasyonu yöntemi ile biberiye uçucu yağının eldesi

3.4.2. Biberiye uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

Kompozisyonu belirlemede, polar bir kapiler kolon bulunan GC (Shimadzu GC–2010)-MS (Shimadzu QP–2010) sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.4). Bir organik çözücü içerisinde uygun oranda seyreltilecek uçucu yağdan 1 µL otomatik enjektör vasıtasıyla

sisteme verilecek ve en iyi ayrımın gerçekleştiği fırın sıcaklığı koşullarında bileşenlerin ayrımı gerçekleştirilecektir. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı 250 °C ve uygun bir split oranı kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Kütle spektrometresi 70 eV’ da 15-210 amu aralığında electron impact (EI)-mode ‘da çalıştırılmıştır. Ayrımı gerçekleştirilen aroma bileşiklerinin tanımlanmasında Wiley 7 (7th edition), National Institute of Standards and Technology (NIST) kütüphaneleri, her bir pikin alıkonma zamanları ile hidrokarbon standardının (C8 - C20) alıkonma zamanları kullanılarak hesaplanacak “Retention Index” (RI) değerleri referans alınmıştır. Sonuçlar her bir pikin toplam pik alanına % oranı şeklinde verilmiştir.



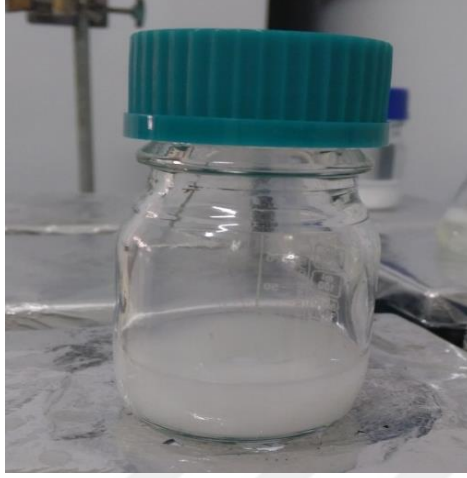
Şekil 3.4. GC-FID sistemi

3.4.3. Biberiye uçucu yağının mikroenkapsülasyonu

Xiao et al. [92], tarafından yapılan çalışma modifiye edilerek mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. % 1, % 2,5, % 5, % 7, % 7,5, % 8 ve % 10 uçucu yağ konsantrasyonlarında % 2 aljinat ve % 0,1 Tween 80 (Polioksietilen(20) sorbitan monooleat)’ den oluşan 20 mL çözelti hazırlanarak emülsifikasyon yöntemi ile mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

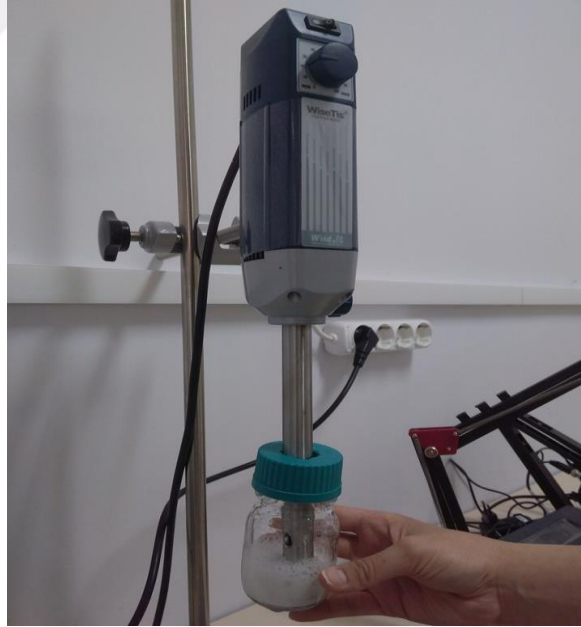
100 mL’ lik kapaklı cam şişede % 2’ lik aljinat solusyonu DAIHAN SMSH-6 çoklu ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 55 °C’ de 700 rpm’ de aljinat tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Çözünme gerçekleşince ısıtıcı kapatılıp soğuyuncaya kadar 700 rpm’ de karıştırmaya devam edilmiştir. Soğuduktan sonra Tween 80 ilave

edilip 250 rpm’ de 10 dk karıştırılmıştır. Süre sonunda % 1 konsantrasyonunda olacak şekilde biberiye uçucu yağı ilave edilip 250 rpm’ de 10 dk karıştırılmıştır.



Şekil 3.5. Manyetik karıştırıcıda aljinat solüsyonu ve biberiye uçucu yağı

Daha sonra şişe içerisindeki magnet çıkarılarak WiseTis homojenizatörde 2 devir’ de 3 dk homojenize edilmiştir (Şekil 3.6). Süre bitiminde düz bir zeminde ağzı kapatılarak 3 dk bekletilmiştir.



Şekil 3.6. Homojenizasyon işlemi

Manyetik karıştırıcıda 150 rpm’ de karışan 100 mL’ lik kapaklı cam şişedeki 0,5 molar (M) 20 mL CaCl_2 çözeltisi üzerine ucuna 200’ lük mikropipet ucu takılmış olan

enjektör yerleştirilmiştir. Düz bir zeminde 3 dk bekletilmiş olan uçucu yağ/aljinat solüsyonu yerleştirilmiş olan enjektöre doldurulmuştur ve CaCl_2 solüsyonuna 60 damla/dk olacak şekilde damlatılmıştır (Şekil 3.7). Damlama tamamlandıktan sonra huniye yerleştirilen süzgeç kağıdı sayesinde oluşan mikrokapsüller süzölmüştür (*Aljinat+Uçucu yağ kapsöl*).



Şekil 3.7. Uçucu yağ/aljinat solüsyonunun CaCl_2 solüsyonuna damlatılması

Kapaklı 100 mL' lik cam şişede hazırlanmış olan % 1' lik 20 mL nişasta çözeltisi içine süzölmüş olan mikrokapsüller ilave edilmiştir. Nişasta çözeltisindeki mikrokapsüller manyetik karıştırıcıda 100 rpm' de 10 dk karıştırılmıştır. Süre sonunda huniye yerleştirilen süzgeç kağıdı yardımı ile mikrokapsüller süzölmüştür (*Aljinat+Uçucu yağ Kapsöl*)+Nişasta). Oluşan mikrokapsüller suyunun uzaklaşması amacıyla oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra kapsüller tartılmıştır.

Bu kapsöl oluşum işlemi aljinat, Tween 80, CaCl_2 ve nişasta konsantrasyonları değiştirilmeksizin % 2,5, % 5, % 7, % 7,5, % 8 ve % 10' luk biberiye uçucu yağı konsantrasyonlarındaki mikrokapsülleri oluşturmak için de kullanılmıştır.

Uçucu yağ içermeyen boş mikrokapsüller elde edilmiştir. Bunun için 100 mL' lik kapaklı cam şişede % 2' lik aljinat solüsyonu DAIHAN SMSH-6 çoklu ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 55 °C' de 700 rpm' de aljinat tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Çözünme gerçekleşince ısıtıcı kapatılıp soğuyuncaya kadar 700 rpm' de karıştırmaya devam edilmiştir. Soğuduktan sonra Tween 80 ilave edilip 250 rpm' de 10

dk karıştırılmıştır. Daha sonra şişe içerisindeki magnet çıkarılarak WiseTis homojenizatörde 2 devir’ de 3 dk homojenize edilmiştir. Süre bitiminde düz bir zeminde ağzı kapatılarak 3 dk bekletilmiştir.

Manyetik karıştırıcıda 150 rpm’ de karışan 100 mL’ lik kapaklı cam şişedeki 0,5 M 20 mL CaCl_2 çözeltisi üzerine ucuna 200’ lük mikropipet ucu takılmış olan enjektör yerleştirilmiştir. Düz bir zeminde 3 dk bekletilmiş olan aljinat solüsyonu, yerleştirilmiş olan enjektöre doldurulmuştur ve CaCl_2 solüsyonuna 60 damla/dk olacak şekilde damlatılmıştır. Damlama tamamlandıktan sonra huniye yerleştirilen süzgeç kağıdı sayesinde oluşan mikrokapsüller süzölmüştür (*Aljinat Kapsül*).

Kapaklı 100 mL’ lik cam şişede hazırlanmış olan % 1’ lik 20 mL nişasta çözeltisi içine süzölmüş olan mikrokapsüller ilave edilmiştir. Nişasta çözeltisindeki mikrokapsüller manyetik karıştırıcıda 100 rpm’ de 10 dk karıştırılmıştır. Süre sonunda huniye yerleştirilen süzgeç kağıdı yardımı ile mikrokapsüller süzölmüştür (*Aljinat Kapsül+Nişasta*). Oluşan mikrokapsüller suyunun uzaklaşması amacıyla oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra kapsüller tartılmıştır.

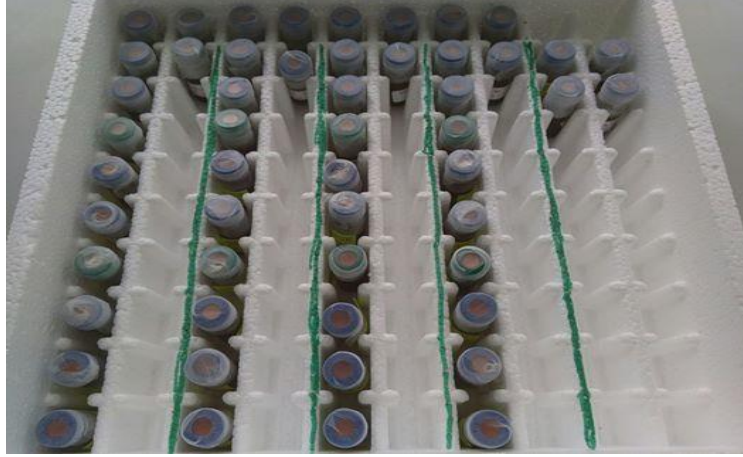
Hazırlanmış olan boş ve dolu mikrokapsüller kullanılıncaya kadar hava geçirmeyecek şekilde petri kaplarında + 4°C’ de buzdolabında saklanmıştır.

3.4.4. Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılmış olan biberiye uçucu yağı içerisinde en fazla bulunan ve fonksiyonel özelliklerden sorumlu olduğu kabul edilen major bileşen 1,8-cineole’ dür. Biberiye uçucu yağındaki 1,8-cineole miktarı GC-FID sistemi kullanılarak kantitatif olarak saptanmıştır. Saptanan bu değer üzerinden hareketle, etkinlik testinde salınan biberiye uçucu yağının bileşimindeki 1,8-cineole miktarı kullanılarak, salınan toplam uçucu yağ miktarı belirlenmiştir.

Üretilmiş olan + 4 °C’ de muhafaza edilen mikrokapsüllerden Falcon tüplerine 0,5’ er g tartılmıştır. Falcon tüpünün üzerine 40 mL % 1’ lik sodyum sitrat tribasic dihidrat çözeltisi ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcıda 37 °C’ de 130 rpm’ de 30 dk karıştırılmıştır. Süre sonunda üzerine 4,5 mL etil asetat ilave edilip 4000 rpm’ de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra kapsül içerisinde bulunan biberiye uçucu

yağı etil asetata geçmiştir. Bu etil asetatlı sıvı kısım GC viallerine alınmıştır ve GC-FID’ de analiz edilinceye kadar -18 °C’ de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Viallere alınan örnekler

Bu enkapsülasyon etkinliği analizi % 1, % 2,5, % 5, % 7, % 7,5, % 8 ve % 10’ luk uçucu yağ konsantrasyonlarında hazırlanmış olan mikrokapsüller için 2 ya da 4 paralel olacak şekilde uygulanmıştır.

$$\% \text{ Enkapsülasyon Etkinliği} = \frac{\text{Kapsül Merkezinde Belirlenecek Uçucu Yağ}}{\text{Toplam Uçucu Yağ}} \times 100$$

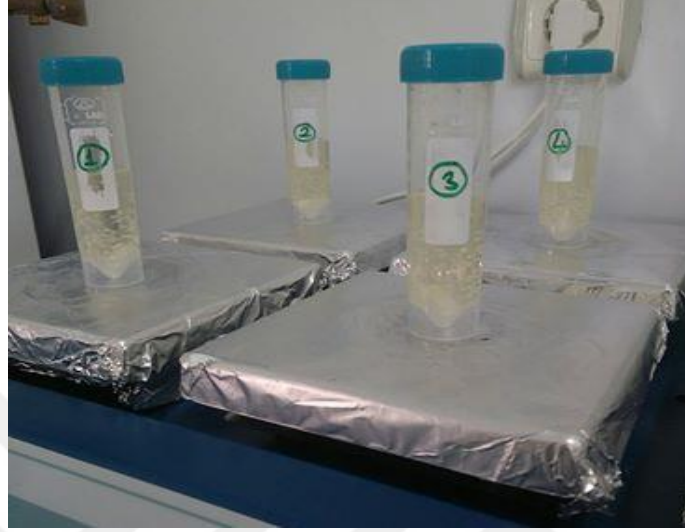
3.4.5. Mikrokapsül partikül boyut dağılımının ve morfolojisinin belirlenmesi

Elde edilecek mikrokapsüllerin yüzey morfolojilerindeki değişiklik ve partikül boyut dağılımları Quispe-Condori et al. [93], uyguladığı yöntemle göre Scanning Electron Microscopy (SEM) ile belirlenmiştir.

3.4.6. Mikrokapsüllerin zamana bağlı uçucu yağ salımlarının belirlenmesi

Maji et al. [94], tarafından yapılan çalışma modifiye edilerek salım analizi gerçekleştirilmiştir. Nişasta ile muamele edilen ve nişasta ile muamele edilmeyen % 7 uçucu yağ konsantrasyonunda hazırlanmış olan mikrokapsüllerin intestinal ortam koşullarında salım hızlarını belirlemek amacıyla Falcon tüplerine hem nişastalı hem de

nişastasız mikrokapsüllerden 500' er mg tartılmıştır ve üzerine % 2' lik 25 mL pankreatik amilaz çözeltisi içeren fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH:7,0) ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 37 °C' de 130 rpm' de manyetik karıştırıcı yardımıyla 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dk karıştırılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Mikrokapsüllerin salımı

Öngörülen zaman aralıklarında Falcon tüplerinden 1' er mL örnek alınmıştır ve hacmi sabit tutmak için alınan örnek ile aynı miktarda (1 mL) tampon solüsyonu ortama ilave edilmiş ve 4 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

Alınan 1 mL örnek üzerine, salınan uçucu yağı ekstrakte etmek amacıyla 4,5 mL etil asetat ilave edilmiştir ve 15 sn vortekslenmiştir. Ardından 4000 rpm' de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan etil asetat fazı GC viallerine alınarak, GC-FID' de analiz edilinceye kadar -18 °C' de bekletilmiştir.

3.4.7. Uçucu yağların enkapsülasyon öncesi ve sonrası *in vitro* antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi

3.4.7.1. DPPH testi

Antioksidan kapasitelerin belirlenmesinde örneğin DPPH süpürme gücü Hosseini et al. [95] 'ın önerdiği şekilde ve Bondet et al. [96] 'ın uyguladığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Antioksidan kapasitelerin belirlenmesinde örneklerin DPPH serbest radikalleri süpürme gücünden faydalanılmıştır. % 7 uçucu yağ içeren 2 g

kapsül Falcon tüpüne tartılmıştır. Üzerine % 2' lik pankreatik amilaz çözeltisi ve % 1' lik Tween 80 çözeltisi içeren 15 mL fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH:7,0) ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 37 °C' de 130 rpm' de manyetik karıştırıcı yardımıyla 10, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dk karıştırılmıştır. Öngörülen zaman aralıklarında Falcon tüplerinden 2' şer mL örnek alınmıştır ve hacmi sabit tutmak için alınan örnek ile aynı miktarda (2 mL) tampon solüsyonu ortama ilave edilmiştir. Alınan 2 mL örnek üzerine, salınan uçucu yağı ekstrakte etmek amacıyla 2 mL etil asetat ilave edilmiştir ve 15 saniye vortekslenmiştir. Ardından 4000 rpm' de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

DPPH çözeltisinin hazırlanması: 100 mL' lik mavi kapaklı cam şişeye bir miktar (5-10 mg) DPPH tartılmıştır. Üzerine 100 mL metanol ilave edilip manyetik karıştırıcıda 400 rpm' de 10 dk karıştırılmıştır. Daha sonra MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında kullanılmadan önce DPPH' nin 517 nm dalga boyunda absorpsiyonunun 0,700-0,750 değerleri arasına ayarlanması gerekmektedir. Ayarlama işlemi gerçekleştirilirken metanol kullanılmıştır.

Belirli sürelerde gerçekleştirilmiş olan santrifüj sonrasında deney tüplerinde oluşan üstteki etil asetat fazından MULTISCAN GO marka ELİSA cihazı plakalarına 20 µL alınıp üzerine 180 µL DPPH (0,1 mM) ilave edilmiştir. MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında inkübasyona bırakılarak 15 dk için 517 nm' deki absorpsiyon değerleri belirlenmiştir. DPPH aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiş ve % olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ DPPH aktivitesi} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}}$$

3.4.7.2. ABTS testi

Antioksidan kapasitelerin belirlenmesinde örneğin ABTS süpürme gücü Re et al. [97] 'ın uyguladığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Antioksidan kapasitelerin belirlenmesinde örneklerin ABTS serbest radikalleri süpürme gücünden faydalanılmıştır. % 7 uçucu yağ içeren 2 g kapsül Falcon tüpüne tartılmıştır. Üzerine % 2' lik pankreatik amilaz çözeltisi ve % 1' lik Tween 80 çözeltisi içeren 15 mL fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH:7,0) 15 ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 37 °C' de 130 rpm' de manyetik karıştırıcı yardımıyla 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dk karıştırılmıştır. Öngörülen zaman aralıklarında Falcon tüplerinden 2' şer mL örnek

Alınmıştır ve hacmi sabit tutmak için alınan örnek ile aynı miktarda (2 mL) tampon solüsyonu ortama ilave edilmiştir. Alınan 2 mL örnek üzerine, salınan uçucu yağı ekstrakte etmek amacıyla 2 mL etil asetat ilave edilmiştir ve 15 saniye vortekslenmiştir. Ardından 4000 rpm’ de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

ABTS çözeltisinin hazırlanması: 100 mL’ lik mavi kapaklı cam şişeye 0,0693 g potasyum peroksisülfat ($K_2O_8S_2$) tartılıp 100 mL saf suda çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. 0,0388 g ABTS deney tüpüne tartılmıştır. Üzerine hazırlanmış olan stok $K_2O_8S_2$ çözeltisinden 10 mL eklenip reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla karanlık bir yerde bir gece bekletilmiştir. MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında kullanılmadan önce ABTS’ nin 739 nm dalga boyunda absorbansının 0,700-0,750 değerleri arasına ayarlanması gerekmektedir.

Belirli sürelerde gerçekleştirilmiş olan santrifüj sonrasında deney tüplerinde oluşan üstteki etil asetat fazından MULTISCAN GO marka ELİSA cihazı plakalarına 20 μ L alınıp üzerine 180 μ L ABTS (0,1 mM) ilave edilmiştir. MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında inkübasyona bırakılarak 6 dakika için 739 nm’ deki absorbans değerleri belirlenmiştir. ABTS aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiş ve % olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ ABTS}^+ \text{ aktivitesi} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}}$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

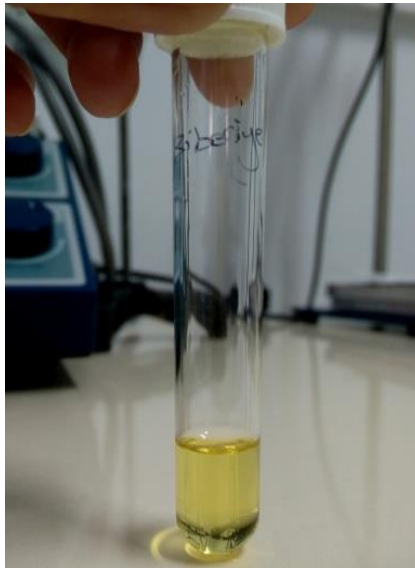
Tez çalışmasında biberiye bitkisine ait uçucu yağ elde edilmiş, daha sonra farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ kullanılarak aljinat-nişasta kaplama materyali uygulaması ile elde edilen enkapsüllerin etkinlik sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği en yüksek olan kapsüllerin SEM görüntüleri ve yapısındaki bileşenler tespit edilmiştir. Karakterizasyonu tamamlanan enkapsül ve serbest haldeki uçucu yağın *in vitro* antioksidan özelliği ve salım kinetiğinin *in vivo* intestinal sistemi taklit eden mimik bir sistemde *in vitro* incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

4.1. Biberiye Uçucu Yağının Elde Edilmesi

Kuru biberiye bitkisinden uçucu yağ eldesinde Clavenger düzeneğinde yağ/su distilasyonu yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 100 gram kuru biberiye bitkisinden her bir Clavenger distilasyonu uygulamasından sonra yaklaşık % 1 biberiye uçucu yağı elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağ çalışmada kullanılıncaya kadar + 4 °C’ de bekletilmiştir.

Literatürde biberiye kuru bitkisi distilasyonu verimi 100 g kuru bitki başına % 0,8-2,5 olarak belirlenmiştir [63]. Elde ettiğimiz uçucu yağ verimi literatürdeki mevcut bilgilerle uyumludur.

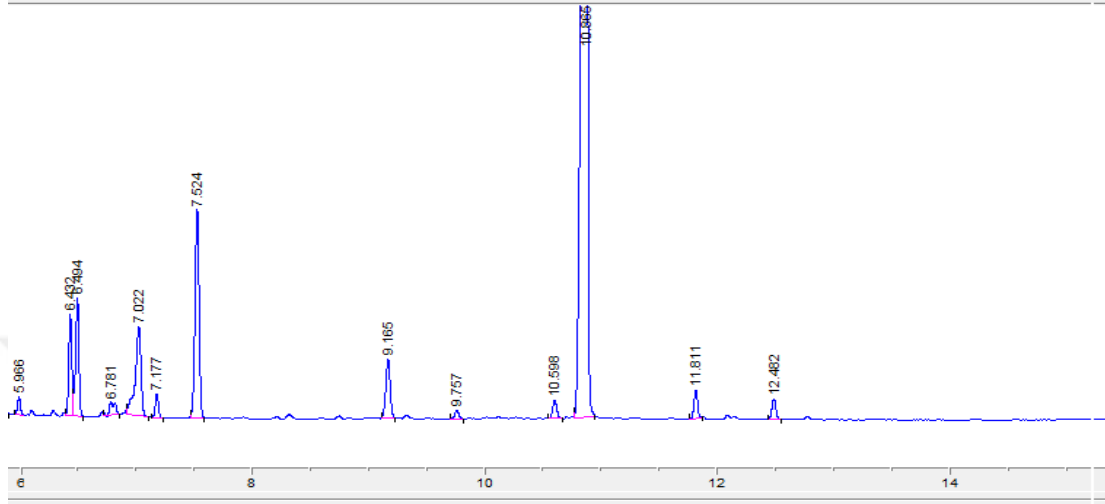
Aşağıda kuru biberiye bitkisinden elde edilen biberiye uçucu yağına ait görüntü mevcuttur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Biberiye uçucu yağı

4.2. Biberiye Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi

Bileşim belirlemede, polar bir kapiler kolon bulunan GC (Shimadzu GC-2010)-MS (Shimadzu QP-2010) sistemi kullanılmış olup biberiye uçucu yağının GC-FID kromotagramı Şekil 4.2’ de ve kimyasal bileşimi Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Biberiye uçucu yağının GC-FID kromotagramı

Biberiye uçucu yağının GC-FID’ de gerçekleştirilmiş olan analizi sonucunda yapıda en fazla bulunan bileşenin yaklaşık 10.865. dakikada belirlenen 1,8-cineole olduğu tespit edilmiştir. Buradan anlaşıldığı üzere her örnek için aynı dakikalarda ortaya çıkan ve en büyük pik alanına sahip olan bileşenin 1,8-cineole olduğu tespit edilmiştir.

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
12	6.781	9.5	2.8	0.0449	0.000	0.275
13	7.022	64.8	19.1	0.0505	0.003	1.649
14	7.177	9.7	5.2	0.0299	0.000	0.964
15	7.524	111.2	45	0.0388	0.005	1.117
16	9.165	34.4	12.9	0.0412	0.002	1.059
17	9.757	4.3	1.9	0.034	0.000	1.029
18	10.598	9.8	3.8	0.0399	0.000	0.946
19	10.865	1000.8	333.8	0.044	0.048	2.16
20	11.811	13.3	6	0.0347	0.001	0.983
21	12.482	10.7	4.5	0.0369	0.001	0.981
22	17.003	29.5	9.9	0.0438	0.001	0.568
23	18.72	150.2	54.5	0.0432	0.007	1.049
24	19.442	36.3	14.8	0.0386	0.002	0.987

Şekil 4.3. Biberiye uçucu yağının GC-FID kromotagram verileri

Çizelge 4. 1. Biberiye uçucu yağının kimyasal kompozisyonu

BİLEŞEN	RI	%
Ethylacetate	837	0,06
α -Pinene	954	10,76
α -Fenchene	997	0,18
Camphene	1010	4,15
β -pinene	1078	1,26
Verbenene	1108	0,96
3-Carene	1157	1,50
β myrcene	1186	1,38
l-Phellandrene	1190	0,12
α -Terpinene	1223	0,49
Limonene	1268	4,22
1,8-Cineole	1295	22,69
β -Ocymene, (Z)	1353	0,17
γ -Terpinen	1383	0,21
(E)- β -Ocymene	1397	0,14
3-Octanone	1404	0,11
p-Cimene	1452	4,10
α -Terpinolene	1485	0,18
p-Cymenene	1978	0,28
Filifolone	1990	0,30
Octene-1-ol-3	1995	0,43
Linalooloxide	2088	0,05
α -Campholenal	2177	0,17
α -Copaene	2195	0,17
Chrysanthenone	2239	0,31
Camphor	2276	8,56
Linalool	2333	2,78
Pinocamphone	2362	1,15
Pinocarvone	2420	0,27
Fenchol	2438	0,15
l-Bornylacetate	2444	0,61
Phenylmethanesulfonate	2466	0,15
4-Terpineol	2483	1,63
Caryophyllene	2491	1,03
(E)-Pinocarveol	2603	0,22
α -Terpineol	2633	0,93
Verbenol	2650	0,45
Fenchol	2689	5,04
Borneol	2704	13,09
l-Verbenone	2729	6,33

Carvol	2784	0,11
Citronellol	2827	0,15
δ -Cadinene	2835	0,16
Nopol	2891	1,11
(<i>E</i>)-Anethole	2972	0,21
(-)-Caryophylleneoxide	3296	0,25
Methyleugenol	3322	0,23
4-Fluorobenzoyl chloride	3357	0,21
Carvacrol	3670	0,36
(-)- α -Bisabolol	3687	0,32

Çizelge 4.1’ de görüldüğü üzere biberiye uçucu yağında toplam 50 adet bileşen tespit edilmiş olup, en fazla miktarda bulunan temel bileşen ise 1,8-cineole (% 22,69) olarak belirlenmiştir. Diğer önemli bileşenler ise borneol (% 13,09), α -pinene (% 10,76), camphor (% 8,56), camphene (% 4,15) olarak tespit edilmiştir. Literatürde biberiye uçucu yağ kompozisyonunun belirlendiği birçok çalışma mevcut olup elde edilen sonuçların pek çoğu bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Tavassoli et al. [98], biberiye bitkisine ait uçucu yağın kimyasal kompozisyonu ve antimikrobiyal etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, en önemli bileşenleri 1,8-cineole (% 23,14), camphor (% 12,35), α -pinene (% 9,87), β -pinene (% 6,10) ve borneol (% 5,61) olarak belirlemişlerdir.

Saber Miresmailli et al. [99], biberiye bitkisine ait uçucu yağda en fazla 1,8-cineole (% 31,5), camphor (% 20,0) ve α -pinene (% 17,5) bileşenlerini belirlediklerini rapor etmişlerdir.

Rahman et al. [100], Hindistan’da yaptıkları çalışmalarında biberiye bitkisi uçucu yağının kimyasal kompozisyonunu araştırmışlar ve bulgularımızla benzer şekilde 1,8-cineole (% 23,40), α -pinene (% 9,94), camphene (% 5,83), myrcene (% 4,86) ve borneol (% 2,05) bileşenlerini en fazla miktarda tespit etmişlerdir.

Angioni et al. [101], İtalya’da yetişen biberiye bitkisine ait uçucu yağın kimyasal kompozisyonunu araştırdıkları çalışmalarında temel bileşen olarak α -pinene (~% 23), borneol (~% 16), camphene (~% 7,6), camphor (~% 4,5), verbenone (~% 9,4) ve bornyl-acetate (~% 10,4) tespit etmişlerdir.

Lübnan’da yetişen biberiye bitkisine ait uçucu yağda 1,8-cineole (~%20) ve α -pinene (~% 18,8–38,5) başlıca bileşen olarak belirlenirken [102], Hindistan’daki biberiye uçucu yağında [103], 1,8-cineole (~% 30) ve camphor (~% 30) temel bileşen olarak tespit edilmiştir. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda Japonya’da yetişen biberiye bitkisine ait uçucu yağın yüksek miktarda 1,8-cineole (~% 50) ve düşük miktarda α -pinene ve camphor (~% 10) içerdiği, Portekizde yetişen bitkiye ait uçucu yağınise myrcene, 1,8-cineole ve camphor ile karakterize edildiği gösterilmiştir [104]. Arjantin ve Brezilya’da yetişen bitki uçucu yağlarındaki bileşen ve oranları Portekiz’de tespit edilen miktarlar ile benzerlik göstermiştir [105, 106].

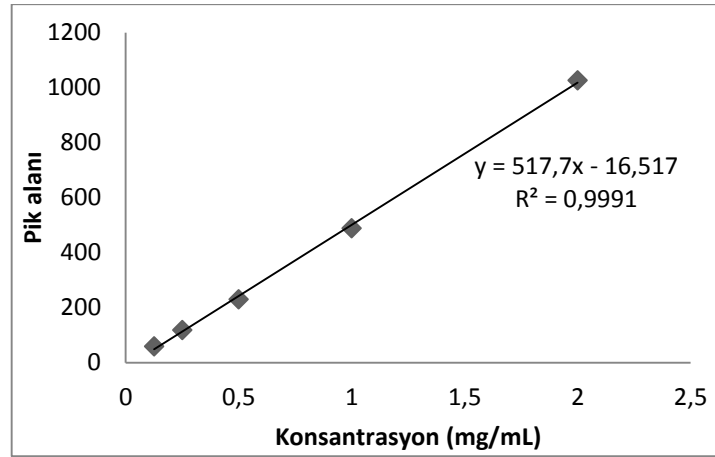
Santoyo et al. [107], biberiye bitkisine ait uçucu yağın antimikrobiyal özelliklerini belirlemek üzere gerçekleştirdikleri çalışmalarında yapıda en fazla yer alan bileşenlerin 1,8-cineole, α -pinene, camphor ve borneol olduğunu ve antimikrobiyal etkinin de mevcut bileşenlerden kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Biberiye uçucu yağının kimyasal kompozisyonu ve miktarlarındaki farklılıkların bitkinin yetiştirildiği bölge, coğrafi ve iklimsel özelliklerden kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir.

Biberiye uçucu yağında miktar olarak en fazla bulunduğu tespit edilen 1,8-cineole bileşeni kullanılarak biberiye uçucu yağı için bir standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.4). Farklı konsantrasyon oranlarında hazırlanan biberiye uçucu yağının pik alanları belirlenmiş (Çizelge 4.2), bu verilerden yola çıkılarak bir standart grafik oluşturulmuştur. Bu standart grafik kullanılarak örneklerdeki etkinlik ve salım analizlerinde biberiye uçucu yağı miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 4. 2. Uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı GC-FID’ de 1,8-cineole’ ün pik alanı

Konsantrasyon (mg/mL)	Pik alanı
0,125	59,70
0,250	118,40
0,500	230,20
1,000	488,20
2,000	1027,00



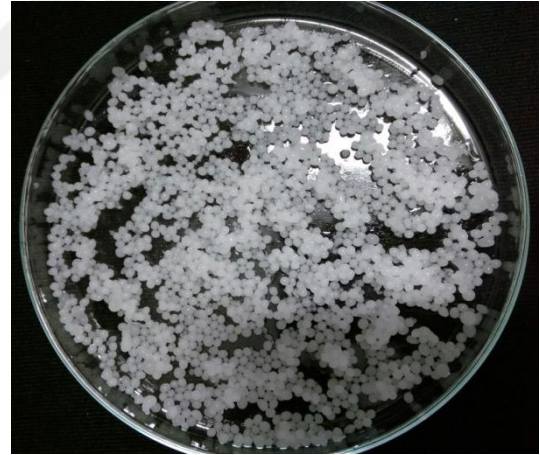
Şekil 4.4. Uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi

4.3. Biberiye Uçucu Yağının Mikroenkapsülasyonu

Çalışma kapsamında farklı büyüklüklerde ve bileşim oranlarında enkapsüle formlar hazırlanmıştır. Bu kapsamda hazırlanan formlara ilişkin görüntüler Şekil 4.5-4.6’ da verilmiştir.



Şekil 4.5. Boş kapsül



Şekil 4.6. Dolu kapsül

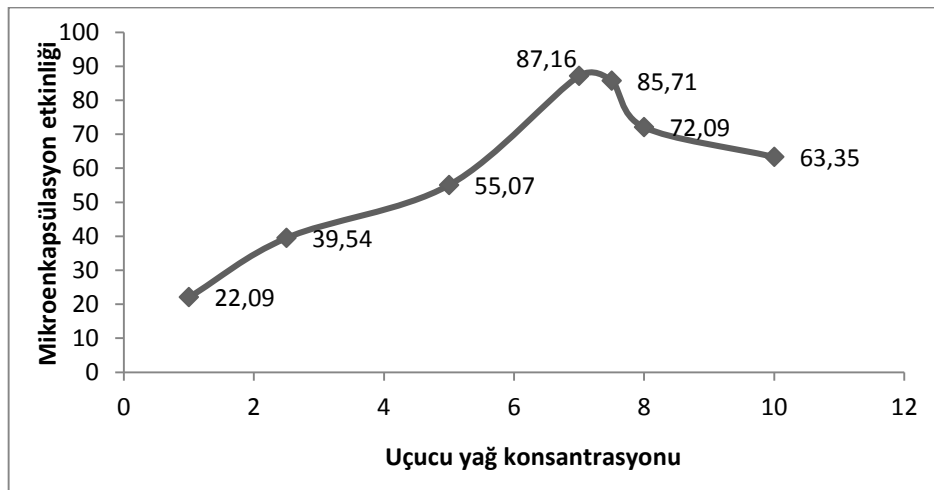
Biberiye yağının uçucu olmasından kaynaklanan kısa süreli etkisinin elimine edilmesi, sistemik metabolizmasının yüksek olması nedeniyle mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde yağ/su emülsiyon yöntemi ve aljinat-nişasta uygulaması ile biberiye uçuğu yağı kaplanarak mikrokapsül elde edilmiştir. Farklı bileşim oranları denemeleri sonunda boyut ve etkinlik bakımından en iyi sonuçlar baz alınarak mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.4. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Farklı (% 1-10) uçucu yağ konsantrasyonlarında emülsifikasyon yöntemi ile mikroenkapsülasyon işlemi sonrasındaki etkinlik değerleri incelenmiştir. En yüksek mikroenkapsülasyon etkinliğinin elde edildiği mikrokapsül tespit edilerek konsantrasyon belirlemesi gerçekleştirilmektedir. Bu işlemde elde edilen veriler Çizelge 4.3’ te gösterilmiştir. Mikroenkapsülasyon etkinliğine karşı uçucu yağ konsantrasyonu ise Şekil 4.7’ de verilmiştir. Etkinlik sonuçlarına göre farklı uçucu yağ konsantrasyonlarında elde edilen mikrokapsüllerin farklı etkinliklere sahip olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4. 3. Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ mikroenkapsülasyonu sonucu elde edilen etkinlik verileri

Örnek	Uçucu yağ konsantrasyonu (%)	Pik alanı	0,5 g kapsülde bulunması gereken uçucuyağ miktarı (g)	Miktar (%)
A	1	561,43	0,01	22,09±4,42
B	2,50	2571,55	0,01	39,54±1,58
C	5	7132,55	0,03	55,07±11,03
D	7	15829,00	0,04	87,16±13,43
E	7,50	16696,75	0,04	85,71±1,12
F	8	15067,58	0,04	72,09±9,30
G	10	16403,48	0,05	63,35±3,43



Şekil 4.7. Konsantrasyona bağlı mikroenkapsülasyon etkinlikleri

Elde edilen analiz verilerine göre en iyi mikroenkapsülasyon etkinliği $87,16 \pm 13,43$ değeriyle % 7 biberiye uçucu yağ konsantrasyonunun kullanıldığı mikrokapsülden elde edilmiştir. Uçucu yağ konsantrasyonunun artışına paralel olarak % 7 konsantrasyona kadar artış belirlenirken, bu aşamadan sonraki artan konsantrasyona rağmen mikroenkapsülasyon etkinliklerinde belirgin bir düşüş olduğu gözlenmiştir.

Literatürde çeşitli bitkilere ait uçucu yağların aljinat başta olmak üzere çeşitli duvar materyalleri ile enkapsüle edilerek, uçucu bileşenlerin olumlu etkilerinden faydalanmak için gerçekleştirilen pekçok çalışma mevcuttur.

Xiao et al. [92], duvar materyali olarak aljinat ve kitozan, merkez materyal olarak portakal uçucu yağını kullanarak uçucu yağ mikroenkapsülasyonu gerçekleştirmişlerdir. Farklı oran ve kombinasyon denemeleri içeren çalışmalarında % 2,0 w/v sodyum aljinat, % 1,5 w/v kalsiyum klorür ile 1,5:1,0 çekirdek materyal: duvar materyali oranı, % 0,1 w/v Tween 80 ve % 0,1 w/v gliseril monostearat kullanarak optimum koşulları sağlamışlardır. Bu koşullar altında elde edilen en yüksek enkapsülasyon etkinliğini % 76,1 olarak tespit etmişlerdir.

Hosseini et al. [108], kekik uçucu yağının sağlık üzerindeki antioksidatif ve antimikrobiyal aktivitelerinden daha uzun süre faydalanmak için kitozan kaplama materyali içerisinde kekik uçucu yağını enkapsüle etmişlerdir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda uygulanan uçucu yağın enkapsülasyon etkinliğini % 21-47 olarak belirlemişlerdir.

Benavides et al. [109], antioksidatif ve antimikrobiyal özellikleri ile öne çıkan ancak uçucu olması nedeniyle kolaylıkla buharlaşabilen kekik bitkisine ait uçucu yağdan daha etkin bir şekilde yararlanabilmek için iyonik jelasyon yöntemi kullanarak uçucu yağ aljinat ile kapsüllemişler ve enkapsülasyon etkinliğini yaklaşık % 85 olarak tespit etmişlerdir.

Jiamrungraksa et al. [110], antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan havlıcan bitkisine ait uçucu yağını aljinat materyali ile kaplayarak % 40,8 enkapsülasyon etkinliği belirlemişlerdir.

Soliman et al. [91], kekik, tarçın ve karanfil uçucu yağlarının volatilizasyonunu önlemek amacıyla aljinat mikroküreleri içerisine bu uçucu yağları kapsüllemişlerdir. Farklı uçucu yağ ve aljinat konsantrasyonlarını denedikleri çalışmalarında optimum koşullar altında enkapsülasyon etkinliğini % 90-94 olarak tespit etmişlerdir.

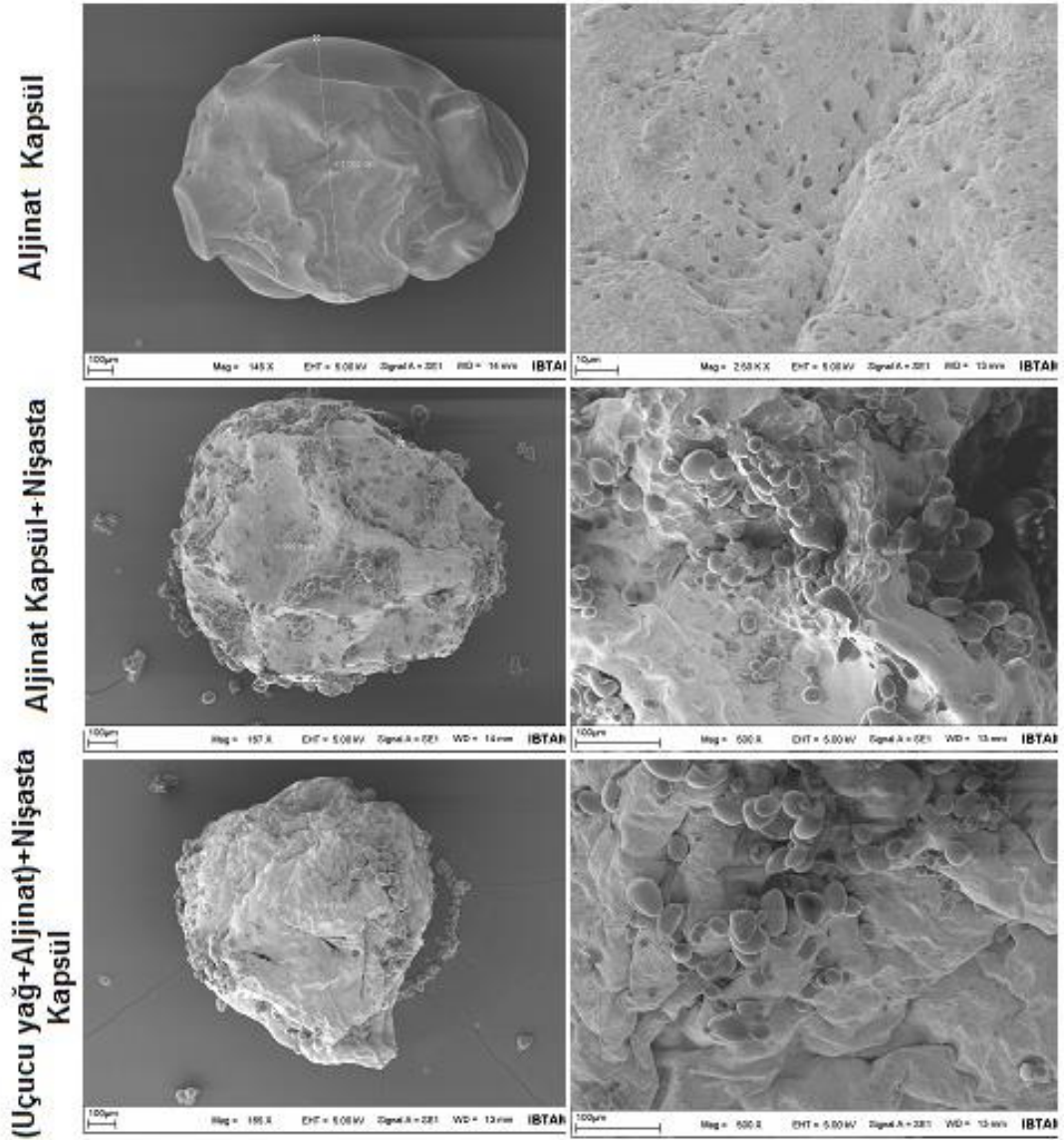
Wang et al. [111], yaptıkları çalışmada kaplama materyalleri olarak kullanılan aljinat ve nişasta arasında moleküller arası etkileşim ve moleküler uyumun çok iyi olduğunu, nişastanın artışına bağlı merkez materyalinin (salisilik asit) salınımında artış gözlemlendiğini bildirmiştir. Chan et al. [112], sadece aljinat kullanarak buğday embriyosu yağını kapsülledikleri çalışmalarında, kapsülasyon etkinliğini % 79,4 olarak saptamışken aynı çalışmada aljinat-nişasta kombinasyonu uygulandığında kapsülasyon etkinliğini % 87 olarak tespit etmişlerdir. Nişasta, yapısında barındırdığı amiloz fraksiyonunun heliks yapısı sayesinde, aroma endüstrisinde özellikle uçucu yağların enkapsülasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır.

4.5. Mikrokapsül Partikül Boyut Dağılımının ve Morfolojisinin Belirlenmesi

% 7 biberiye uçucu yağ konsantrasyonundaki kapsül ((*Aljinat+Uçucu yağ Kapsül*)+*Nişasta*) ve uçucu yağ ilave edilmeden boş olarak hazırlanmış mikrokapsüllerin (*Aljinat Kapsül*) ve nişasta ile muamele edilmiş olan boş kapsüllerin (*Aljinat kapsül+Nişasta*) yüzey morfolojilerindeki değişiklik ve partikül boyut dağılımları Quispe-Condori et al. [93], uyguladığı yöntemle göre İnönü Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan Scanning Electron Microscopy (SEM) ile belirlenmiştir (Şekil 4.8).

SEM görüntülerinde görüldüğü üzere mikrokapsüller yaklaşık 500-1000 µm boyut aralığında elde edilmiştir. Literatürde emülsiyon yöntemiyle gerçekleştirilen çalışma sonuçları ile çalışmada elde ettiğimiz veriler paralellik göstermektedir.

Xiao et al. [92], portakal uçucu yağını aljinat kullanımı ve emülsifikasyon yöntemiyle kapsülledikleri çalışmalarında, kapsüllerin ortalama boyutlarını yaklaşık 1000 µm olarak rapor etmişlerdir.



Şekil 4.8. Kapsüllere ait SEM görüntüleri

Sultana et al [88], probiyotik bakterileri aljinat ve nişasta kullanımıyla enkapsüle ederek ve bu kapsülleri yoğurt üretiminde kullandıkları çalışmalarında, enkapsülasyon esnasında aljinat/nişastanın bir aradayken jel oluşumunda sinerjistik etki gösterme eğiliminde olduklarını ve bunun sonucunda tutuklanmış bakteri hücreleri için ilave bir koruma sağladıklarını tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada elde edilen kapsüllerin boyutlarının ortalama 500–1000 µm arasında olduğu belirtilmektedir. Kapsüllerin şekil olarak genellikle küresel olduğu, ayrıca nişasta granüllerinin aljinat matriksi üzerinde yer alan boşlukları kapatarak yama görevi gördüğünü bildirmişlerdir.

Sadece aljinatın kullanıldığı boş kapsülde (*Aljinat Kapsül*) açık bir şekilde kapsül yüzeyindeki gözenekler görünmektedir. SEM görüntülerinde % 7 biberiye uçucu yağ konsantrasyonundaki ((*Aljinat+Uçucu yağ Kapsül*)+*Nişasta*) kapsüllerde ise bu gözeneklerin nişasta partikülleri ile kaplanarak kapatıldığı tespit edilmiştir.

Hosseini et al. [113], aljinat ile aljinat+nişasta kombinasyonunu duvar materyali olarak kullanıp iki farklı mikrokapsülün morfolojisini incelemişlerdir. Bu çalışma sonunda elde edilen SEM görüntülerinden sadece aljinat kullanılarak elde edilen kapsüllerin yüzey kesitlerinin daha porözlü bir yapıya sahip olduğu ancak nişasta ilave edildiğinde yüzeydeki gözeneklerin nişasta tanecikleri tarafından kapatıldığı saptanmıştır. Bu durum içerdeki merkez materyalin daha uzun süre korunduğunun, daha geç salındığının dolayısıyla yapıdan daha uzun vadede faydalandığının göstergesidir.

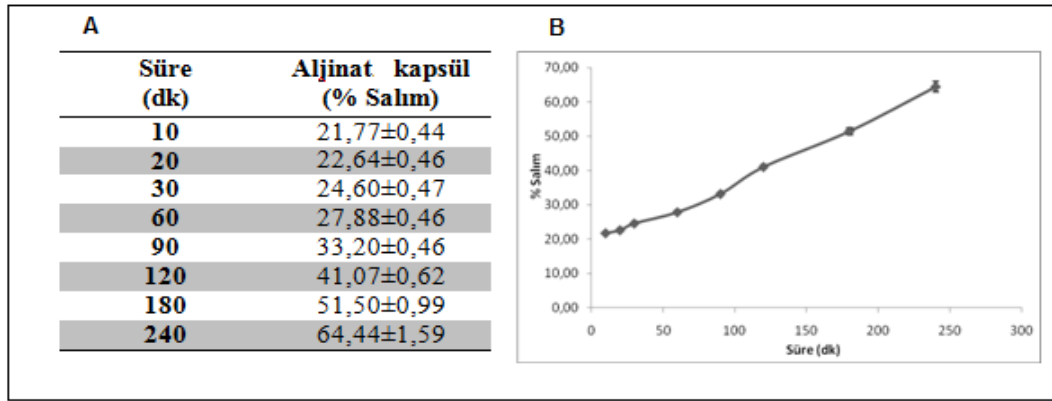
Chan et al. [112], çalışmalarında aljinatla kapsülledikleri canlı hücrelerin fiziksel özelliklerini geliştirmek için ilave olarak nişasta kullanmışlar ve nişasta ilavesinin dolgu maddesi gibi davranarak, kurutulmuş kapsüllerin mekanik dayanımını, akışkanlık ve küresel görünümünü geliştirdiğini saptamışlardır. Bu sayede kapsüllerin işleme, süreç ve tüketim esnasında arzu edilen görsel kalite, akışkanlık, küresel yapı, kırılgenlik ve yoğunluk gibi fiziksel özelliklerin geliştiği belirtilmektedir.

4.6. Mikrokapsüllerin Zamana Bağlı Uçucu Yağ Salımlarının Belirlenmesi

Son yıllarda yağ emülsiyonu ve çoklu emülsiyonların, membran akışkanlığını düzenlediği, sıkı bir yapıda olan membran bağlantı noktalarının, yağ bileşenleri ya da sürfaktanlar aracılığıyla kısa süreli açılımını uyardığı ve kapsüller üzerinde koruyucu özellik gösterdiği ve bu nedenle uygulamada belli bir artışa sebep olduğu belirtilmektedir [114]. Ağızdan uygulamanın ardından su/yağ emülsiyonları mide öz suyunda kolaylıkla yağ/su emülsiyonlarına dönüşebilmektedir. Bu haliyle gastrointestinal bölgede var olan enzimlerin etkisiyle yapı kolaylıkla bozunmakta, ortama salınmakta ve etkinliği istenen düzeyde olamamaktadır. Bu nedenle emülsiyon temelli sistemler, ağız yoluyla alınan yapıların mideden bozulmadan güvenli bir şekilde geçebilmesi ve beraberinde vücut içerisinde yüksek etkinlikte kullanımına olanak sağlayacaktır.

Enkapsüle edilmiş bileşenin salınımında çeşitli faktörler etkilidir ve bu faktörlerin başında zaman, pH değişikliği, mekanik stres, sıcaklık değişikliği, enzimatik aktivite ve ozmotik güç gelmektedir [115].

Bu bilgiler ışığında en yüksek mikroenkapsülasyon etkinliği olan % 7 biberiye uçucu yağ konsantrasyonu kullanılarak Aljinat ve Aljinat+Nişasta'yı içeren iki farklı kapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kapsüllerde zamana bağlı uçucu yağ salım miktarları belirlenmiş olup sonuçlar sırasıyla Şekil 4.9-4.10' da verilmiştir.

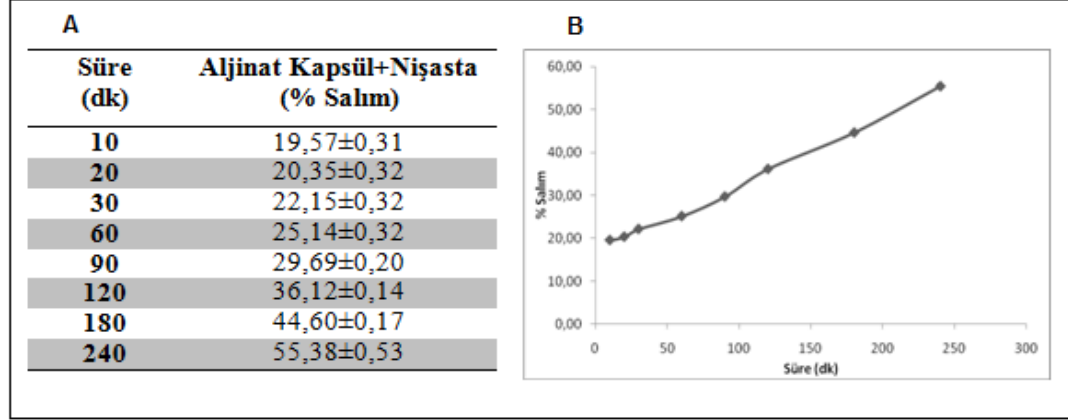


Şekil 4.9. Aljinat kapsülündeki uçucu yağın zamana bağlı A) % salınım miktarları, B)grafiksel gösterimi

Şekil 4.9' da nişasta ile muamele edilmeden hazırlanan aljinat içindeki uçucu yağın zamana bağlı salım verileri gösterilmiştir. Biberiye uçucu yağının enkapsülasyon prosesinde % 2 aljinat ve % 2 aljinat-nişasta formülasyonu ile hazırlanmış olan 2 farklı kapsül kullanılmış olup salım testinde zamana bağlı olarak oluşan salım değerleri belirlenmiştir. Sadece aljinat kullanılarak kaplanan uçucu yağdan elde edilen mikrokapsüllerin ilk olarak 10. dakika sonundaki miktarları saptanarak işlem başlatılmıştır. Enkapsül formdan serbest forma geçen biberiye uçucu yağının zamana bağlı olarak salım değerlerinin giderek arttığı ve 240. dakikaya gelindiğinde kapsüldeki uçucu yağın kümülatif toplam üzerinden % $64,44 \pm 1,59$ oranında salım göstermiş olduğu tespit edilmiştir.

Lim et al. [116], karboksimetilselülozu duvar materyali olarak kullanarak kenaf tohum yağın kapsülledikleri çalışmalarında asidik mide sindirim koşullarında mikrokapsüllerin yapılarını koruduğunu ve çekirdek materyalin kontrollü salım gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Mikroenkapsülasyon etkinliği % $51,50 \pm 2,82$ olan

kapsüllerin 2 saat sonunda mide koşullarını taklit eden mimik bir sistemde % $5,20 \pm 1,93$ ' sinin salındığını, hem mide hem de bağırsak koşullarını taklit eden mimik bir sistemde ise 4 saat sonunda salımın % $54,83 \pm 2,55$ düzeyine ulaştığını bildirmilerdir.



Şekil 4.10. Aljinat Kapsül+Nişasta'daki uçucu yağın zamana bağlı A) % $\pm$ miktarları, B) grafiksel gösterimi

Şekil 4.10' da nişasta ile muamele edilerek hazırlanan aljinat içindeki uçucu yağın zamana bağlı salım verileri gösterilmiştir. 240. dakikaya gelindiğinde kapsüldeki uçucu yağ kümülatif toplam üzerinden % $55,38 \pm 0,53$ oranında salım göstermiştir.

Nişasta ile muamele edilerek hazırlanan aljinat kapsüllerinde nişasta ilavesi, aljinat tabakası üzerinde ilave bir katman oluşturarak içerdiği uçucu yağın daha yavaş salınmasına imkan sağlamıştır. Salımı daha yavaş gerçekleşen uçucu yağ, kapsül içerisinde daha uzun süre kalarak, etkisinden daha fazla miktarda faydalanılmasına olanak sağlamaktadır.

López-Córdoba et al. [117], kurutulmuş kalsiyum aljinat matriksi içerisinde tutuklanmış yerbamate polifenollerinin salım kinetiği ve mekanizmasını inceledikleri çalışmalarında nişastanın aljinat matriks yapısında dolgu maddesi ya da tıkaç görevi gördüğünü tespit etmişlerdir.

4.7. Biberiye Uçucu Yağının Enkapsülasyon Öncesi ve Sonrasının *in vitro* Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Kapsüllenmiş uçucu yağ ile kapsüldeki miktara denk gelen serbest uçucu yağın zamana bağlı antioksidan aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite analizlerinde DPPH ve ABTS' nin süpürme güçlerinden faydalanılmıştır.

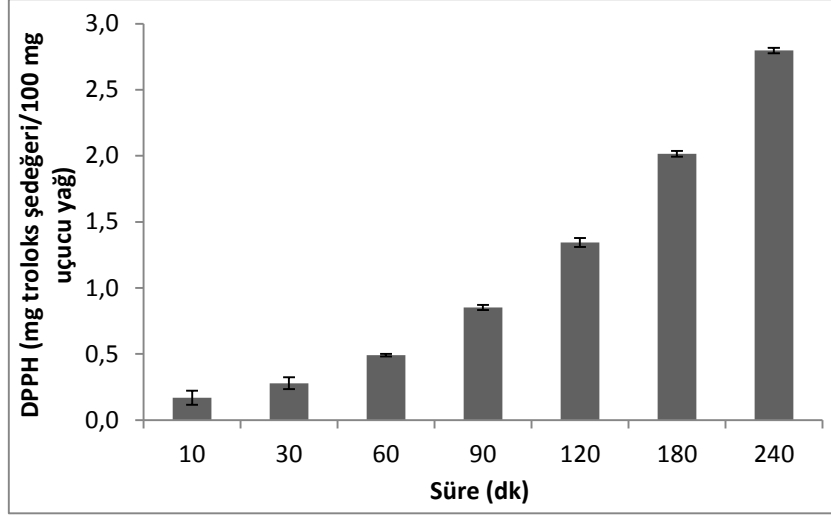
4.7.1. DPPH testi

Uçucu yağların antioksidan aktivitesi ile ilgili pekçok çalışma yapılmış ve bileşenlerin doğası ile oksidatif bozulmaya karşı direnme kapasiteleri arasındaki korelasyon ortaya konulmuştur. Uçucu yağların yüksek antioksidan aktivitelerinden H^+ verici olarak görev yapan OH^- (hidroksil) grupları ve lipid oksidasyonunda serbest radikal üretiminden koruyan fenolik bileşenler sorumludur. Fenolik bileşenlerce zengin olan uçucu yağların kapsülasyonu ile daha az uçucu yağ kullanılarak aynı düzeyde antioksidan aktivite elde etmek mümkün(mü)dür. Bu bilgilerden yola çıkılarak biberiye uçucu yağının serbest ve enkapsüle halde antioksidan aktivitesinin ne oranda korunduğunu tespit edilmiştir.

Çalışmada 100 mg biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri DPPH reaktifi kullanılarak incelenmiştir. MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında 15 dk' lık bir süre için inkübasyona bırakılarak analize hazırlanmış olan örneklerin 517 nm' deki absorbans değerleri üzerinden antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Çizelge 4.4' te analiz sonucu elde edilen zamana bağlı antioksidan aktivite verileri gösterilmiştir.

Çizelge 4. 4. Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan değişimleri

Süre (dk)	DPPH (mg TE / 100 mg uçucu yağ)
10	0,17±0,05
30	0,28±0,05
60	0,49±0,01
90	0,85±0,02
120	1,34±0,03
180	2,02±0,02
240	2,80±0,02



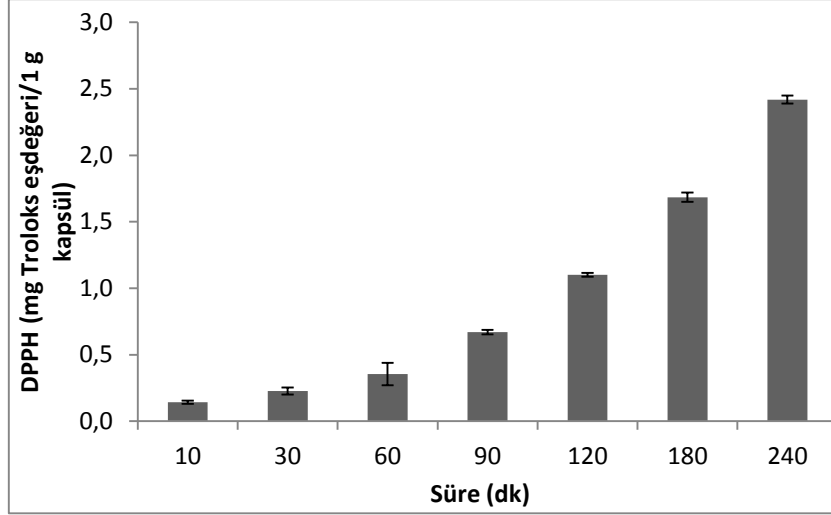
Şekil 4.11. Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan aktivitesi

1 g kapsüllenmiş biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri DPPH kullanılarak incelenmiştir. MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında 15 dk'lık bir süre için inkübasyona bırakılarak analize hazırlanmış olan örneklerin 517 nm' deki absorbans değerleri üzerinden antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Çizelge 4.5' te analiz sonucu elde edilen zamana bağlı antioksidan aktivite verileri gösterilmiştir.

Çizelge 4. 5. Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan değişimleri

Süre (dk)	DPPH (mg TE/ 1 g kapsül)
10	0,14±0,01
30	0,23±0,03
60	0,36±0,09
90	0,67±0,02
120	1,10±0,01
180	1,68±0,04
240	2,42±0,03

Kapsüldeki uçucu yağın zamana bağlı olarak salınması nedeniyle DPPH süpürme gücünde artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.12. Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı DPPH antioksidan aktivitesi

Enkapsüle uçucu yağ ile serbest yağın radikal süpürme güçlerinin birbirine oldukça benzer olduğu görülmüştür. 100 mg biberiye uçucu yağının 240 dakika sonunda belirlenen DPPH süpürme gücü $2,80 \pm 0,02$ mg/TE olarak belirlenmiştir. 1 g kapsüllenmiş biberiye uçucu yağının (Etkinlik hesabına göre 100 mg serbest uçucu yağ içermektedir.) 240 dakika sonunda belirlenen DPPH süpürme gücü ise $2,42 \pm 0,03$ mg/TE' ye eşit olduğu belirlenmiştir.

Bu verilere dayanarak mikroenkapsülasyon işlemi ile biberiye uçucu yağının 240 dakika sonunda serbest uçucu yağa göre % 86,43 oranında DPPH süpürme gücüne sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

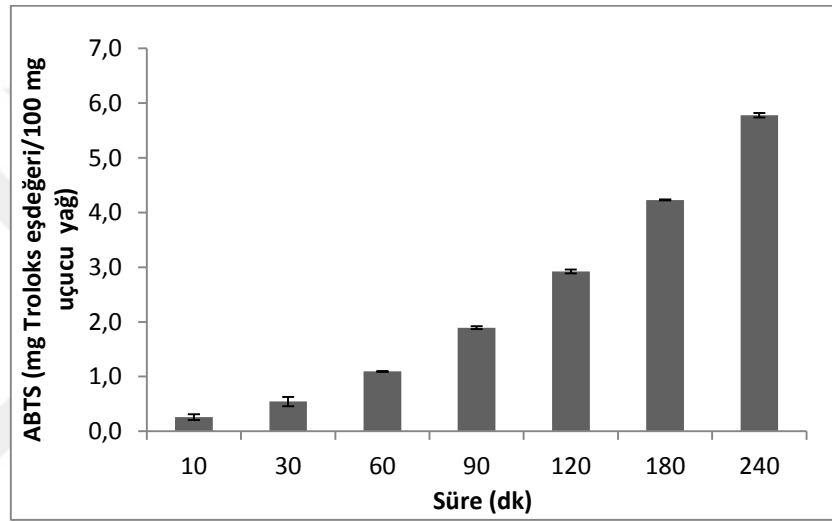
Arana-Sánchez et al. [118], β -siklodekstrin ile kapsülledikleri Meksika kekiği uçucu yağı antioksidan aktivitesinin serbest yağa göre 4-8 kat daha fazla korunduğunu belirtmişlerdir.

4.7.2. ABTS testi

Çalışmada 100 mg biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri ABTS kullanılarak incelenmiştir. MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında 6 dk' lık bir süre için inkübasyona bırakılarak analize hazırlanmış olan örneklerin 739 nm' deki absorbans değerleri üzerinden antioksidan aktiviteleri tespit edilmiştir. Çizelge 4.6' da analiz sonucu elde edilen zamana bağlı antioksidan aktivite verileri gösterilmiştir.

Çizelge 4. 6. Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan değişimleri

Süre (dk)	ABTS (mg TE/ 100 mg uçucu yağ)
10	0,26±0,05
30	0,54±0,09
60	1,09±0,01
90	1,89±0,02
120	2,92±0,03
180	4,23±0,01
240	5,78±0,04

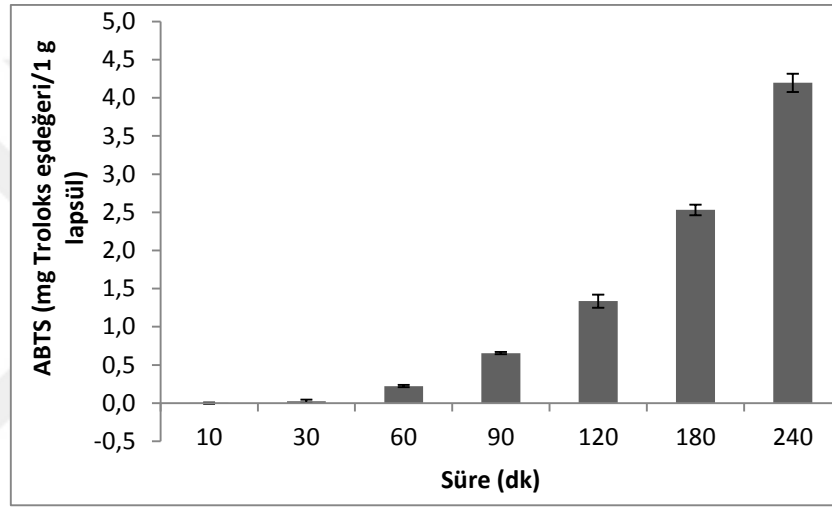


Şekil 4.13. Serbest biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan aktivitesi

1 g kapsüllenmiş biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri ABTS kullanılarak incelenmiştir. MULTISCAN GO marka ELİSA cihazında 6 dk' lık bir süre için inkübasyona bırakılarak analize hazırlanmış olan örneklerin 739 nm' deki absorbans değerleri üzerinden antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Çizelge 4.7' de analiz sonucu elde edilen zamana bağlı antioksidan aktivite verileri gösterilmiştir.

Çizelge 4. 7. Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan değişimleri

Süre (dk)	ABTS (mg TE / 1 g kapsül)
10	0,00±0,01
30	0,02±0,02
60	0,22±0,01
90	0,65±0,01
120	1,34±0,09
180	2,53±0,07
240	4,20±0,12



Şekil 4.14. Enkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının zamana bağlı ABTS antioksidan aktivitesi

100 mg biberiye uçucu yağının (serbest) 240 dakika sonunda belirlenen ABTS süpürme gücü $5,78 \pm 0,04$ mg/TE olarak belirlenmiştir. 1 gr kapsüllenmiş biberiye uçucu yağının (Etkinlik hesabına göre 100 mg serbest uçucu yağ içermektedir). 240 dakika sonunda belirlenen ABTS süpürme gücü ise $4,20 \pm 0,12$ mg /TE' ye eşit olduğu saptanmıştır. Bu veriler ışığında enkapsüle biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki serbest uçucu yağa göre % 72,67 oranında ABTS süpürme gücüne sahip olduğu belirlenmiştir.

Kapsüllenmiş uçucu yağın zamana bağlı olarak salınması nedeniyle DPPH aktivitesinde olduğu gibi ABTS süpürme gücünde de artışın meydana geldiği saptanmıştır. Böylece kapsüldeki uçucu yağ ile serbest yağın radikal süpürme güçlerinin oldukça benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ

Mikroenkapsülasyon, gıda sektöründe sıvı, katı ve gaz bileşenlerin çeşitli kaplama materyalleri ile kaplandığı bir tekniktir. Başlıca gıda maddesinin dış etkenlere karşı korunması (nem, sıcaklık, hava ve ışık gibi), buharlaşarak kaybolmasının önlenmesi, fiziksel özelliklerinin daha iyi korunması, taşınmasının kolaylaştırılması, doğru yerde ve doğru zamanda kontrollü salınımının gerçekleştirilmesi, arzu edilmeyen tat/kokunun maskelenmesi ve başka bileşenlerle reaksiyona girmesinin önlenmesi gibi farklı amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır [27].

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) yapısındaki sağlık açısından çok faydalı olan fenolik bileşikler ve uçucu yağ özelliklerinden dolayı tıbbi ve aromatik olarak kullanılan bir bitkidir. Literatürde biberiye türlerinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal, antioksidan, radikal süpürücü ve sitotoksik aktivite gösterdiği [13-15], ayrıca karaciğer dokusunda ksenobiyotikleri metabolize eden ya da apoptozis, tümör yayılımı, hücre içi sinyal iletimi gibi çeşitli enzimatik sistemlerin sentezlenmesi ve/veya aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı [16,17] belirtilmektedir.

Biberiye uçucu yağı ile ilgili bahsedilen tüm bu özellikler tamamen enkapsüllenmemiş, serbest formuna ait önemli bilgiler olup enkapsülasyona uğradıktan sonra nasıl bir etki gösterdiğine dair bir bulguya rastlanılmamıştır.

Biberiye yağının uçucu olmasından kaynaklanan kısa süreli etkisinin elimine edilmesi, sistemik metabolizmasının yüksek olması ve bahsi geçen bu faydalarının incelenmesi nedeniyle mikroenkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde yağ/su emülsiyon yöntemi yardımıyla ve de çözünürlük açısından uygun bir materyal olan aljinat-nişasta kullanımı ile biberiye uçuğu yağı kaplanarak mikrokapsül elde edilmiştir.

Ana hedefler kapsamında tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bir bütün halinde sunulmuş ve maddeler halinde öngörülen hedeflerin başarısı değerlendirilmiştir.

HEDEF I: Biberiye bitkisine ait uçucu yağın uygun koşullarda elde edilmesi, uçucu yağa ait bileşenlerin belirlenmesi ve karakterizasyonunun sağlanması.

GERÇEKLEŞME: Kuru biberiye bitkisinden Clavenger düzeneğinde yağ/su distilasyonu yöntemi kullanılarak her distilasyon uygulamasından sonra yaklaşık % 1 biberiye uçucu yağı elde edilmiştir.

Bitki uçucu yağının bileşen analizi GC-FID ile gerçekleştirilmiş ve yapıda en fazla bulunan bileşenin 1-8-cineole olduğu saptanmıştır. Ayrıca hesaplamalarda kullanılmak üzere belli konsantrasyonlarda hazırlanan uçucu yağ içeriği baz alınarak standart bir kalibrasyon eğrisi ve denklemi elde edilmiştir.

GC-MS analizi yardımıyla biberiye uçucu yağının yapısında bulunan bileşenler ve miktarları (%) belirlenmiştir. Biberiye uçucu yağında toplam 50 adet bileşen tespit edilmiş olup, en fazla miktarda 1,8-cineole (% 22,69), borneol (% 13,09), α -pinene (% 10,76), camphor (% 8,56), camphene (% 4,15) tespit edilmiştir.

HEDEF II: Enkapsülasyonda kaplama materyali olarak aljinat kullanımının, nişastanın ikincil kaplama materyali olarak uygunluğunun ve uçucu yağ kullanım oranlarının saptanması ile enkapsüle yapının karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi.

GERÇEKLEŞME: Aljinat-nişasta farklı kombinasyonları kaplama materyali olarak test edilmiş ve etkinlik değeri bakımından en uygun olan % 2 aljinat-% 1 nişasta oranının uygun kaplama materyali olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca uçucu yağ farklı konsantrasyonlarda kaplama materyali ile birlikte denenmiş ve % 7' lik konsantrasyonun en yüksek etkinlik başarısına ulaştığı saptanmıştır (% 7 uçucu yağ konsantrasyonunda etkinlik değeri % $87,16 \pm 13,43$).

Enkapsüle edilen uçucu yağların morfolojik yapıları SEM ile incelenmiş, kabuk materyali olarak *aljinat- boş kapsül*, *aljinat-nişasta boş kapsül* ve *aljinat-nişasta-uçucu yağ kapsüllerinden* alınan kesit görüntüleri sonucu yüzey yapılarında (por oluşumu, gözeneklerin nişasta tarafından kapatılması, yapı stabilitesi) önemli değişikliklerin varlığı saptanmıştır.

HEDEF III: Kapsüllerde zamana bağlı uçucu yağ salım miktarlarının belirlenmesi.

GERÇEKLEŞME: Enkapsüle formdaki uçucu yağın serbest halde salım oranı hakkında fikir edinebilmek için insan vücudundaki bağırsak ortam koşulları simüle edilerek, ortamda uçucu yağın salım oranları saptanmıştır. Bu amaçla *aljinat-uçucu yağ* ve *aljinat-nişasta-uçucu yağ* formülasyonlarına göre hazırlanan kapsüllerdeki zamana bağlı salım oranları belirlenmiştir.

Nişasta ile muamele edilmeden hazırlanan aljinat içindeki uçucu yağın zamana bağlı salım verilerinde 240. dakikaya gelindiğinde kapsüldeki uçucu yağın kümülatif toplam üzerinden % $64,44 \pm 1,59$ oranında salındığı saptanmıştır.

Nişasta ile muamele edilerek hazırlanan aljnat içindeki uçucu yağın ise 240. dakikaya gelindiğinde kapsüldeki uçucu yağın kümülatif toplam üzerinden % 55,38 ± 0,53 oranında salım gösterdiği tespit edilmiştir.

Aljnat-nişasta-uçucu yağ formülasyonuna göre hazırlanan kapsüllerin salımı geciktirerek, uçucu yağın ortamda daha uzun süre kalmasına katkı sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. Nişasta katkısı, aljnat tabakası üzerinde ilave bir katman oluşturarak, içerdiği uçucu yağın daha yavaş ve daha uzun bir sürede salınmasına olanak sağlamıştır.

HEDEF IV: Kapsüllenmiş uçucu yağ ile kapsüldeki miktara denk gelen serbest uçucu yağın zamana bağı antioksidan aktivitelerinin (DPPH ve ABTS) belirlenmesi.

GERÇEKLEŞME: Çalışmada 100 mg biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri DPPH reaktifi kullanılarak 15 dk' lık bir inkübasyon sonucunda 517 nm' deki absorbans değeri üzerinden belirlenmiştir. Aynı şekilde 1 g kapsüllenmiş biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri DPPH kullanılarak tespit edilmiştir. Kapsüldeki uçucu yağın zamana bağı olarak salınması nedeniyle DPPH süpürme gücünde artış meydana gelmiştir.

Benzer şekilde 100 mg biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri ABTS reaktifi kullanılarak 6 dk' lık bir inkübasyon sonucunda 739 nm' deki absorbans verileri saptanmıştır. Aynı şekilde 1 g kapsüllenmiş biberiye uçucu yağının 240 dakika sonundaki antioksidan aktivite değeri ABTS reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Mikroenkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağının 240 dk sonunda serbest uçucu yağa göre sırasıyla % 86,43 ve % 72,67 oranında DPPH ve ABTS süpürme gücüne sahip olduğu saptanmıştır.

Bu veriler ışığında *aljnat-nişasta-uçucu yağ* formülasyonuna uygun kapsül üretiminin bitkinin uçucu yağını daha uzun süre koruyabileceğı, salınımının daha geç olması nedeniyle uçucu yağın olumlu etkilerinden daha fazla ve etkin bir şekilde faydalanılabileceğı ve kapsüllendiğı takdirde antioksidan aktivitesinin daha uzun süre korunabileceğı sonucuna ulaşılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Tian, L.W., Yang, C.R., Zhang, Y. J. (2010). Phenolic compounds from the fresh leaves of *Eucalyptus maiden*. *Helvetica Chimica Acta*. 93, 2194-2202.
- [2] Boukhris, M., Boozes, M., Feki, I., Jemai, H., El Feki, A., Sayadi, S. (2012). Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Hér. In alloxan induced diabetic rats. *Lipids Health Dis*. 11, 81, 1-10.
- [3] Esmaeili, D., Mobarez, A.M., Tohidpour, A. (2012). Anti-*Helicobacter Pylori* activities of shoya powder and essential oils of *Thymus Vulgaris* and *Eucalyptus Globulus*. *The Open Microb. J*. 6, 65-69.
- [4] Jaganathan, S. K., Mazumdar, A., Mondhe, D., Mandal, M. (2011). Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. *Cell Biol. Int*. 35, 6, 607-615.
- [5] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol*. 46, 46–475.
- [6] Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E., Couladis, M. (2010). Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules*.15, 2759–2770.
- [7] Platel, K., Srinivasan, K. (2004). Digestive stimulant action of spices: A myth or reality. *Indian J Med. Res.* .119, 167-179.
- [8] Parris, N., Cooke, P.H., Hicks, K.B. (2005). Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *J. Agr. Food Chem*.53, 4788–4792.
- [9] Kohlert, C., van Rensen, I., Marz, R., Schindler, G., Graefe, E.U., Veit, M. (2000). Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta Medica*. 66, 495-505.
- [10] Sengezer, E., Gungor, T. (2008). Esansiyel yağlar ve hayvanlar üzerindeki etkileri. *Lalahan Hayvan Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 48, 2, 101-110.
- [11] Schrooyen, P.M.M., Meer van der, R., Kruif, C.G.D. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceed. Nutr. Soci*. 60, 475–479.
- [12] Nedovica, V., Kalusevica, A., Manojlovicb, V., Levica, S., Bugarskib, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci*. 1, 1806 – 1815.
- [13] Rožman, T., Jeršek, B. (2000). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta Agr. Slovenica*. 93,1, 51 – 58.
- [14] Cordeiro, A.M.T.M., Medeiros, M.L., Santos, N.A., Soledade, L.E.B., Pontes L.F.B.L., Souza, A.L., Queiroz, N., Souza, A.G. (2013). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. Thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils. *J. Therm. Anal. Calor*. 113, 889–895.

- [15] Slameňova, D., Horvathova, E., Kovačikova, Z., Kozics, K., Hunakova, L. (2011). Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H₂O₂ and DMNQ. *Food Chem.* 129, 64–70.
- [16] Muñoz-Muñoz, J.L., Garcia-Molina, F., Ros, E., Tudela, J., García-Canovas, F., Rodriguez-Lopez, J.N. (2011). Prooxidant and antioxidant activities of rosmarinic acid. *J. Food Biochem.* 37, 396–408.
- [17] Perez-Fons, F., Aranda, F. J., Guillen, J., Villalain, J., Micol, V. (2006). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipids membranes. *Archives Biochem. Biophysics.* 453, 224–236.
- [18] Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Int. J. Food Sci. Techn.* 41, 1–21.
- [19] Souza, J.M., Caldas, A.L., Tohidi, S.D., Molina, J., Souto, A.P., Fangueiro, R., Zille, A. (2014). Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 691-698.
- [20] Laohasongkram, K., Mahamaktudsanee, T., Chaiwanichsiri, S. (2011). Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. *Procedia Food Science.* 1, 1660 – 1665.
- [21] Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40, 1107–1121.
- [22] Koç, M., Sakin, M., Kaymak-Ertekin, F. (2010). Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi.* 16,1, 77-86.
- [23] Augustin, M.A., Sanguansri, L., Margetts, C., Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients. *Food Aust.* 53, 220-223.
- [24] Silva, P.T., Fries, L.L.M., Menezes, C.R., Holkem, A.T., Schwan, C.L., Wigmann, É.F., Bastos, J.O., Silva, C.B. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, Santa Maria, 44, 7, 1304-1311.
- [25] Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L., Alves, A. (2013) . Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications- A review. *Trends Food Sci. & Tech.* 31, 138-155.
- [26] Dubey, R., Shami, T.C., Bhasker Rao, K.U. (2009). Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Sci. J.* 59, 1, 82-95.
- [27] Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Techn.* 23, 1361–1394.

- [28] Calvo, P., Castaño, Á.L., Hernández, M.T., González-Gómez, D. (2011). Effects of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1273–1280.
- [29] Chew, S.C., Nyam, K.L. (2016). Microencapsulation of kenaf seed oil by co-extrusion technology. *J. Food Eng.* 175, 43–50.
- [30] Geethadevi, R., Maheshwari, V. (2015). Anti bacterial assessment on Bamboo and Tencel fabrics with herbal oil by micro-encapsulation technique. *Res. J. Chem. Env.* 19, 8, 33–42.
- [31] Scalia, S., Coppi, G., Iannuccelli, V. (2011). Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter, butyl methoxydibenzoylmethane: In vivo skin penetration studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 345–350.
- [32] Lam, P.L., Lee, K.K.H., Wong, R.S.M., Cheng, G.Y.M., Cheng, S.Y., Yuen, M.C.W., Lam, K.H., Gambari, R., Kok, S.H.L., Chui, C.H. (2012). Development of hydrocortisone succinic acid/and 5-fluorouracil/chitosan microcapsules for oral and topical drug deliveries. *Bioorg. & Med. Chem. Letters.* 22, 3213–3218.
- [33] Carvalho, I.T., Estevinho, B.N., Santos, L. (2015). Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products – a review. *Int. J. Cosm Sci.* 1–11.
- [34] Alonso, M.L., Laza, J.M., Rosa, M., Alonso, R.M., Jiménez, R.M., Vilas, J.L., Fañanás, R. (2014). Pesticides microencapsulation. A safe and sustainable industrial process. *J. Chem. Technol Biotechnol.* 89, 1077–1085.
- [35] Hyon, J., Seo, C., Yoo, I., Song, S., Kang, Y. (2016). Glassy photonic inks encapsulated in core-shell microcapsules for local electric field sensors. *Sensors and Actuators.* 223, 878–883.
- [36] Kunz, B., Kruckeberg, S., Weissbrodt, J. (2003). Chancen und grenzen der mikroverkapselung in der modernen lebensmittelverarbeitung. *Chem.-Ing.-Tech.* 75, 1733–1740.
- [37] Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 52, 4, 291–311.
- [38] Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechn.* 23, 182–186.
- [39] Fernandes, R.V.B., Borges, S.V., Botrel, D.A., Silva, E.K., Gomes da Costa, J.M., Queiroz, F. (2013). Microencapsulation of Rosemary Essential Oil: Characterization of Particles. *Drying Techn: An International Journal.* 31, 11, 1245–1254.
- [40] Rocha, G.A., Fávaro-Trindade, C.S., Grosso, C.R.F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *F Biproduct. Process.* 90, 37–42.

- [41] Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104, 467–483.
- [42] Chen, M.J., Chen, K.N. (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.). *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley- Blackwell, USA. 83–107.
- [43] De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* 20, 4, 292–302.
- [44] Özcan, T., Altun, B. (2013). Süt Ürünlerinde Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu I: Enkapsülasyon Teknikleri. *U. Ü. ZİRAAT FAKÜLTESİ DERGİSİ*. 27, 2, 93-104.
- [45] Chan, E.S. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*. 84, 1267–1275.
- [46] Rodea-González, D.A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M.E., Vernon-Carter, E.J., Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *J. Food Eng.* 111, 102–109.
- [47] Onwulata, C.I. (2011). Microencapsulation and functional bioactive foods. *J. Food Proces. Preserv.* 1745-4549.
- [48] Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends. *Trends Food Sci. & Techn.* 15, 330–347.
- [49] Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Jia, C., Xia, S., Zhang, X. (2011). Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *J. Food Eng.* 104, 455–460.
- [50] Santos, M.G., Bozza, F.T., Thomazini, M., Favaro-Trindade, C.S. (2015). Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chem.* 171, 32–39.
- [51] Anwekar, H., Patel, S., Singhai, A.K. (2011). Liposome- as drug carriers. *Int. J. of Pharm. & Life Sci.* 2, 7, 945-951.
- [52] Coimbra, M., Isacchi, B., Bloois, L., Torano, J.S., Ket, A., Wu, X., Broere, F., Metselaar, J.M., Rijcken, C.J.F., Storm, G., Bilia, R., Schiffelers, R.M. (2011). Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int. J. Pharm.* 416, 433– 442.
- [53] Cui, H., Zhao, C., Lin, L. (2015). The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Cont.* 56, 128-134.

- [54] Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., Bruna, J.E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem.* 196, 968–975.
- [55] Capela, P., Hay, B., Shah, N.P. (2007). Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Res. Int.* 40, 10, 1261–1269.
- [56] Ding, W.K., Shah, N.P. (2009). Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein. *J. Food Sci.* 74,6, 231–236.
- [57] Agunu, A., Yusuf, S., Andrew, G.O., Zezi, A.U., Abdurahman, E.M. (2005). Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. *J. Ethnopharm.* 101, 27–30.
- [58] Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.* 48, 3144–3152.
- [59] Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2000). GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2576–2581.
- [60] Yang, Y., Song, X., Sui, X., Qi, B., Wang, Z., Li, Y., Jiang, L. (2016). Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. *Ind. Crop Produc.* 80, 141–147.
- [61] Napoli, E.M., Siracusa, L., Saija, A., Speciale, A., Trombetta, D., Tuttolomondo, T., Bella, S.L., Licata, M., Virga, G., Leone, R., Leto, C., Rubino, L., Ruberto, G. (2015). Wild Sicilian Rosemary: Phytochemical and Morphological Screening and Antioxidant Activity Evaluation of Extracts and Essential Oils. *Chem. & Biodiv.* 12.
- [62] Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J., Zu, Y.G., Liu, X.L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Env. Toxicol. Pharm.* 3, 2, 63–68.
- [63] Santana-Méridas, O., Polissiou, M., Izquierdo-Melero, M.E., Astraka, K., Tarantilis, P.A., Herraiz-Peñalver, D., Sánchez-Vioque, R. (2014). Polyphenol composition, antioxidant and bioplaguicide activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. *Indust. Crop Prod.* 59, 125–134.
- [64] Oluwatuyi, M., Kaatz, G.W., Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochem.* 65, 3249–3254.
- [65] Zabot, G.L., Moraes, M.N., Carvalho, P.I.N., Meireles, M.A.A. (2015). New proposal for extracting rosemary compounds: Process intensification and economic evaluation. *Ind. Crop Produc.* 77, 758–771.

- [66] Stokke, B.T., Draget, K.I., Smidsrod, O., Yuguchi, Y., Urakawa, H., Kajiware, K. (2000). Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. Ca-Alginate Gels. *Macromol.* 33, 1853.
- [67] Khong, T.T., Aarstad, O.A., Skjåk-Bræk, G., Draget, K.I., Vårum, K.J. (2013). Gelling Concept Combining Chitosan and Alginate, Proof of Principle. *Biomacromol.* 14, 2765–2771.
- [68] Kumar, M., Tamilarasan, R., Sivakumar, V. (2013). Adsorption of Victoria blue by carbon/Ba/alginate beads: Kinetics, thermodynamics and isotherm studies. *Carbohydrate Polymers.* 98, 505–513.
- [69] Yang, J.S., Xie, Y.J., He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers.* 84, 33–39.
- [70] Lee, K.Y., Mooney, D.J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polymer Sci.* 37, 106–126.
- [71] Mei, L., Xie, R., Yang, C., Ju, X.J., Wang, W., Wang, J.Y., Chu, L.Y. (2013). pH-responsive Ca-alginate-based capsule membranes with grafted poly(methacrylic acid) brushes for controllable enzyme reaction. *Chem. Eng. J.* 232, 573–581.
- [72] Han, Y., Zeng, Q., Li, H., Chang, J. (2013). The calcium silicate/alginate composite: preparation and evaluation of its behavior as bioactive injectable hydrogels. *Acta Biomater.* 9, 9107–9117.
- [73] Jeon, O., Samorezov, J.E., Alsberg, E. (2014). Single and dual crosslinked oxidized methacrylated alginate/PEG hydrogels for bioadhesive applications. *Acta Biomater.* 10, 47–55.
- [74] Kamoun, E.A., Mohy Eldin, M.S., Kenawy, E.R.S., El-Meligy, M.A., Tamer, T.M. (2015). Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. *Arabian J. Chem.* 8, 38–47.
- [75] Cataldo, S., Cavallaro, G., Gianguzza, A., Lazzara, G., Pettignano, A., Piazzese, D. (2013). Kinetic and equilibrium study for cadmium and copper removal from aqueous solutions by sorption onto mixed alginate/pectin gel beads. *J. Env. Chem. Eng.* 1, 1252–1260.
- [76] Soltani, R.D.C., Khorramabadi, G.S., Khataee, A.R., Jorfi, S. (2014). Silica nanopowders/alginate composite for adsorption of lead (II) ions in aqueous solutions. *J. Taiwan Ins. Chem. Eng.* 45, 973–980.
- [77] Draget, K., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from Algae. Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. *Proper. Produc. Patents.* 1-30.
- [78] Moe, S., Draget, K.I., Skjåk-Braek, G., Smidsrod, O. (1995). Alginates. In: *Food polysaccharides and their applications*, pp. 245 Stephen, A.M., Ed., New York, Marcel Decker.

- [79] Donati, I., Holtan, S., Morch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M., Skjak-Braek, G. (2005). New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromol.* 6, 1031–1040.
- [80] Brownlee, I.A., Allen, A., Pearson, J.P., Dettmor, P.W., Havler, M.E., Atherton, M.R., Onsøyen E. (2005). Alginate as a Source of Dietary Fiber. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 45, 497-510.
- [81] Pawar, S.N., Edgar, K.J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials.* 33, 3279-3305.
- [82] Woranucha, S., Yoksana, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers.* 96, 578– 585.
- [83] Simpson, N.E., Grant, S.C., Blackband S.J., Constantidinis, I. (2003). NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials.* 24, 4941-4948.
- [84] Fujiwara, G.M., Campos, R., Costa, C.K., Dias, G.J.F., Miguel, O.G., Miguel M.D., Marques, F.A., Zanin, S.M.Z. (2013). Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 49, 3, 537-547.
- [85] Vicini, S., Castellano, M., Mauri, M., Marsano, E. (2015). Gelling process for sodium alginate: New technical approach by using calcium rich micro-spheres. *Carbohydrate Polymers.* 134, 767–774.
- [86] Liu, X., Qian, L., Shu, T., Tong, Z. (2003). Rheology characterization of sol–gel transition in aqueous alginate solutions induced by calcium cations through in situ release. *Polymer.* 44, 407–412.
- [87] Chan, L.W., Lim, L.T., Heng, P.W.S. (2000). Microencapsulation of oils using sodium alginate. *J. Microencap.* 17,6, 757-766.
- [88] Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 47-55.
- [89] Chang, C.P., Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 32, 257-262.
- [90] Tan, L.H., Chan, L.W., Heng, P.W.S. (2009). Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. *J. Microencap.* 26, 3, 263-271.

- [91] Soliman, E.A., El-Moghazy, A.Y., Mohy El-Din, M.S., Massoud, M.A. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and *in Vitro* Evaluation of Antifungal Activity. *J. Encap. Adsorp. Sci.* 3, 48-55.
- [92] Xiao, Z., He, L., Zhu, G. (2014). The preparation and properties of three types of microcapsules of sweet orange oil using alginate and chitosan as wall material. *Flavour Fragr. J.* 29, 350-355.
- [93] Quispe-Condori, S., Marleny, D.A., Temelli, F. (2011). "Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying". *LWT Food Sci. Techn.* (Article in press)
- [94] Maji, T. K., Baruah, I., Dube, S., Hussain, M.R. (2007). Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology.* 98, 4, 840–844.
- [95] Hosseini, M.S., Hosseini, H., Mohammadifara, M.A., Mortazaviana, M.A., Mohammadia, A., Khosravi-Daranib, K., Shojaee-Aliabadia, S., Dehghanc, S., Khaksara, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules.* 62, 582– 588.
- [96] Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). Kinetics and mechanism of antioxidant action using the dpph free radical method. *LWT Food Science and Technology.* 30, 609–615.
- [97] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* 26, 1231–1237.
- [98] Tavassoli, S.K., Mousavi, S.M., Emam-Djomeh Z., Razavi S.H. (2011). Chemical composition and evaluation of antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *African J. Biotechn.* 10, 63, 13895-13899.
- [99] Saber Miresmailli, S., Bradbury, R., Isman, M.B. (2006). Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Manag. Sci.* 62, 366–371.
- [100] Rahman, L., Kukerja1, A.K., Singh, S.K., Singh, A., Yadav1, A., S P S Khanuja1, S.P.S. (2007). Qualitative analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in Uttaranchal Hills, India. *J. Spi. Arom. Crops.* 55, 16, 55–57.
- [101] Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Valentina Coroneo, V., Cabras, P. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agr. Food Chem.* 52, 11, 3530–3535.
- [102] Diab, Y., Auezova, L., Chebib, H., Chalchat, J.C., Figueredo, G. (2002). Chemical composition of Lebanese rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil as

a function of the geographical region and the harvest time. *J. Ess. Oil Res.* 14, 449–452.

[103] Jaganmohan, R.L., Meenakshi, S., Raghavan, D., Abraham, K.O. (1997). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact of drying on its flavor quality. *J. Food Qual.* 21, 107, 115.

[104] Serrano, E., Palma, J., Tinocco, T., Venancio, F., Martins, A. (2002). Evaluation of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from different zones of “Alentejo” (Portugal). *J. Ess. Oil Res.* 14, 87-92.

[105] Porte, A., De, O., Godoy, R.L., Lopes, D., Koketsu, M., Goncalves, S.L., Torquillo, H.S. (2000). Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Ess. Oil Res.* 12, 577-580.

[106] Larrañ, S., Ringuelet, J.A.; Carranza, M.R., Henning, C.P., Re, M.S., Cerimele, E.L., Urrutia, M.I. (2001). In vitro fungistatic effect of essential oils against *Ascosphaera apis*. *J. Ess. Oil Res.* 13, 122-124.

[107] Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F.J., Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via super critical fluid extraction. *J. Food Prot.* 68, 4, 790-795.

[108] Hosseini, S.F., Zandi, M., Rezaei, M., Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydrate Polymers.* 95, 50-56.

[109] Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chem.* 204, 77-83.

[110] Jiamrungraksa, T., Charuchinda, S. (2010). Preparation and characteristics of galangal essential oil/alginate microcapsules. *J. Metal. Material. Mineral.* 20, 2, 89-92.

[111] Wang, Q., Hu, X., Du, Y., Kennedy, J.F. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers.* 82, 3, 842-847.

[112] Chan, E.S., Wong, S.L., Lee P.P., Lee, J.S., Ti, T.B., Zhang, Z. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers.* 83, 1, 225-232.

[113] Hosseini, S.M., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A., German, J.B., Mortazavian, A.M., Mohammadi, A., Darani, K.K., Aliabadi, S.S., Khaksar, R. (2014). Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydrate Polymers.* 103, 573-580.

[114] Xiaoyang, L., Jianping, Q., Yunchang, X., Xi, Z., Shunwen, H., Ying X., Yi L., Wei W. (2013). Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *Int. J. Nanomed.* 8, 23–32.

- [115]** Sözer, N., Kokini, J.L. (2012). The applications of nanotechnology, *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Pico Y (ed), Academic Press, Oxford, UK, 145-170.
- [116]** Lim, W.T., Nyam, K.L. (2016). Characteristics and controlled release behaviour of microencapsulated kenaf seed oil during in-vitro digestion. *J. Food Eng.* 182, 26-32.
- [117]** López-Córdoba, A., Deladino, L., Martino, M. (2014). Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. *Carbohydrate Polymers.* 99, 150–157.
- [118]** Arana-Sánchez, A., Estarroñ-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E.N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., Lugo-Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in b-cyclodextrin. *Letter App Microbiol.* 50, 585–590.

7. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Fatma Sezer ÖZTÜRK

Doğum Yeri ve Tarihi: Yeşilyurt, 20.08.1989

Adres: Yeşilyurt / MALATYA

E-Posta: fatmasezerozturk@hotmail.com

Lisans: İnönü Üniversitesi, Gıda Mühendisliği

