T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA BİYOAKTİFLERİNİN ENKAPSÜLASYONU İÇİN HİBRİT SİSTEMLER GELİŞTİRİLMESİ

Canan Yağmur KARAKAŞ

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Eş Danışman

Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM

Mart, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA BİYOAKTİFLERİNİN ENKAPSÜLASYONU İÇİN HİBRİT SİSTEMLER GELİŞTİRİLMESİ

Canan Yağmur KARAKAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 08/03/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ	Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM
Yıldız Teknik Üniversitesi	Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman	Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Salih KARASU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üye. Fatih BOZKURT, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Gürbüz GÜNEŞ, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üye. Gülay ÖZKAN, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Gıda Biyoaktiflerinin Enkapsülasyonu İçin Hibrit Sistemler Geliştirilmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Canan Yağmur KARAKAŞ

İmza

Bu çalışma, YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı (Gıda Metabolizma Etkileşimi), TÜBİTAK 2211/A Yurtiçi Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 120O315 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Hayalleri olan tüm küçük kız çocuklarına…

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve eğitim hayatım boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan gurur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ'a,

Bilimsel çalışmalarımdaki teşvik ve yönlendirmeleriyle, araştırmamın her aşamasında desteklerinden dolayı değerli tez eş danışmanım Öğr. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM'a.

Tez çalışmam süresince, Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına ve tez savunmamda yer alan değerli jüri üyesi hocalarıma,

Laboratuvar imkan ve alt yapılarından faydalanmamı sağlayarak tavsiyelerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ'a ve MTT ve yara iyileşme testlerindeki katkı ve desteklerinden dolayı sayın Öğr. Gör. Dr. Ali ŞAHİN'e,

Özellikle çalışmalarım sırasında büyük destek gördüğüm, laboratuvar çalışmalarım ve analizler sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili Arş. Gör. Öznur SAROĞLU'na ve KMB-116'nın ışığı canım laboratuvar arkadaşlarıma,

Beni her defasında yüreklendiren, düşmeme izin vermeyen, düştüğümde yeniden ayağa kaldıran ve desteklerini esirgemeyen canım arkadaşlarım Ayşe Betül BİNGÖL başta olmak üzere organize işler ekibi ve diğer tüm arkadaş ve dostlarıma,

Beni bugünlere yetiştiren, her türlü zorluklara rağmen sevgilerini ve maddi manevi desteklerini asla esirgemeyen, varlıklarından cesaret ve güç aldığım canım Annem, Babam, Anneannem ve Kardeşlerim Candan ve Berat'a,

Yaşasalardı benimle gurur duyacak, sıcak sevgi ve şefkatlerini hala hissettiğim, beni büyüten merhum canım Babaannem Hacer, merhum Halit ve Şevki Dedem ve çok sevdiğim Havva ve Seval teyzem ve Emin dayıma,

Varlığıyla bana güç ve mutluluk veren ve hayatıma en kritik anda giren canım kedim Ceviz'e,

Ayrıca, doktora tez çalışmamda finansal destekleri için YÖK 100/2000 Doktora Burs Programına, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (2211/A Yurtiçi Doktora Burs Programı ve 120O315 numaralı 3501 Kariyer Geliştirme Projesi) teşekkürlerimi sunarım.

Mart, 2024

Canan Yağmur KARAKAŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR **v**

SİMGE LİSTESİ **x**

KISALTMA LİSTESİ **xi**

ŞEKİL LİSTESİ **xii**

TABLO LİSTESİ **xv**

ÖZET **xvi**

ABSTRACT **xvii**

1 GİRİŞ **1**

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 5

1.3 Hipotez 6

2 GENEL BİLGİLER **8**

2.1 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu 8

2.1.1 *Lactobacillus plantarum* 8

2.1.2 Enkapsülasyon 9

2.2 Propolisin Enkapsülasyonu 13

2.2.1 Propolis 13

2.2.2 Lipozom 14

2.2.3 Elektrospinleme Sistemi 16

2.2.4 Yara ve Ağız Yaraları İyileşmesi 17

2.2.5 Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık 18

3 MATERYAL VE YÖNTEM **20**

3.1 Materyal 20

3.2 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu 21

3.2.1 *L. plantarum* ELB90'ın W1/O/W2 Çift Emülsiyonunda Kapsüllenmesi 21

3.2.2 Emülsiyon Dolgulu Bead Üretimi 22

3.2.3 Kapsülleme Verimliliği (%EE) ve Canlı Bakterilerin Sayımı 22

3.2.4 Çift Emülsiyon ve Emülsiyon Dolgulu Beadlerin Mikro Yapısı 23

3.2.5 FTIR Analizi 23

3.2.6 Beadlerin Jel Mukavemeti 24

3.2.7 Simüle Edilmiş GI Koşulları Altında Serbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Canlılığı 24

3.2.8 Serbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Isıl İşlemden Sonra Canlılık Oranı 24
3.2.9 İstatistiksel Analiz 26
3.3 Potansiyel Bir Yara İyileştirici Malzeme Olarak Lipozomal PE Yüklü Jelatin-Zein Nanofilmlerinin Çift Eksenli Elektrospinlenmesi 25
3.3.1 PE Ekstraktının Analizleri 25
3.3.2 Lipozomların Hazırlanması ve Karakterizasyonu 26
3.3.3 PE'nin Lipozomlarda Kapsülleme Verimliliği (%EE) 27
3.3.4 Lipozomların Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntülemesi 28
3.3.5 Elektrospinleme ile Çift Eksenli ve Tek Eksenli Lipozomal Nanofilmlerin Hazırlanması 28
3.3.6 Lipozomal Nanofilmlerdeki PE Yükleme Miktarı 30
3.3.7 Nanofilmlerin Tekstür Analizi 30
3.3.8 SEM, Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM) ve STEM ile Nanofilmlerin Morfolojik Analizi 30
3.3.9 Nanofilmlerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik (DSC) Analizi 31
3.3.10 Nanofilmlerin FTIR Analizi 31
3.3.11 Nanofilmlerin Şişme ve Bozulma Analizi 31
3.3.12 Lipozomal PE'nin Nanofilmlerden Salınımı (%) 32
3.3.13 Nanofilmlerin in vitro ve ex vivo Mukoadezif Özellikleri 32
3.3.14 Yara Örtü Malzemesi Olarak Kullanılmak için Çift Eksenli Lipozomal PE Yüklü Nanofilmlere Yapılan Analizler 34
3.4 Tek Eksenli PE Yüklü Lipozomal Nanofilmler için Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık Analizleri 35
3.4.1 in vitro Simule Sindirim Koşullarında PE ve PE Yüklü Nanofilmlerin Biyoerişilebilirliğinin Belirlenmesi 35
3.5 Caco-2 Hücreleri ile in vitro Biyoyararlanımın Belirlenmesi 36
3.5.1 Hücrelerin Bakım Prosedürleri 36
3.5.2 Sitotoksisitenin Ölçülmesi 36
3.5.3 Caco-2 Hücreleri ile Biyoyararlanımın Belirlenmesi 37
3.6 UPLC-MS-MS analizi 39
3.7. İstatiksel Analiz 41
4 BULGULAR VE TARTIŞMA **41**
4.1 Probiyotik Enkapsülasyonu 41
4.1.1 Çift Emülsiyonun ve Emülbeadlerin Mikro Yapısı 41
4.1.2 Beadlerin Kapsülleme Verimliliği (%EE) ve Jel Gücü 44

4.1.3 FTIR Analizi 45
4.1.4 Simüle Edilmiş GI Sindirimi Altında Serbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Yaşayabilirliği 47
4.1.5 Termal İşlemden Sonra Serbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Yaşayabilirliği 49
4.2 PE Yüklü Lipozomların ve Lipozomal Tek Eksenli ve Çift Eksenli Nanoliflerin Üretimi ve Karakterizasyonu 51
4.2.1 PE'nin Toplam Fenolik, Toplam Flavaonoid Madde ve Antioksidan Aktivitesi Analizleri 51
4.2.2 Lipozomların Üretilmesi, Karakterizasyonu ve Kapsülleme Verimliliği (%EE) 52
4.2.3 Filmler için Yükleme Kapasitesi ve Kapsülleme Verimliliği (% EE) 53
4.2.4 Lipozomların ve Lipozom Yüklü Tek Eksenli ve Çift Eksenli Nanoliflerin Morfolojik Analizleri 54
4.2.5 FTIR ve DSC Analizleri 59
4.2.6 Mekanik Analizler 64
4.2.7 Çift Eksenli Nanofilmlerin Kullanıldığı Yara İyileşme Analizleri 70
4.2.8 Tek Eksenli Lipozomal PE İçerem Nanofilmlerin Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık Analizinde Değerlendirilmesi 76
4.2.9 Caco-2 Biyoyararlılık Analizi 81
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **86**
5.1 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu 86
5.2 Yara Örtüsü Olarak Çift Eksenli Lipozomal Liflerin Kullanım Potansiyeli 86
5.3 Lipozomal PE Yüklenen Nanoliflerden Fenolik Maddelere Ait in vitro Biyoerişilebilirlik ve Caco-2 Biyoyararlılık Sonuçları 87
KAYNAKÇA **89**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **104**

SİMGE LİSTESİ

a	Ağırlık
rpm	Dakikada devir sayısı
dk	Dakika
h	Hacim
µ	Mikro
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ppm	Milyonda bir birim
ppb	Milyarda bir birim
mA	Miliamper
nm	Nanometre
a*	Kırmızılık-yeşillik
kV	Kilovolt
L*	Parlaklık
R^2	Regresyon katsayısı
s	Saat
sn	Saniye
ºC	Santigrat Derece
b*	Sarılık-Mavilik
cm	Santimetre
ºC	Santigrat derece
W	Su
ΔE	Toplam Renk Farklılığı İndeksi
O	Yağ
g	Yer çekimi kuvveti
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ABTS	2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazolline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Varyans Analizi
CLSM	Konfokal lazer mikroskobu
ÇM	Çekme mukavemeti (tensile strenght)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FE-SEM	Alan emisyon tarama mikroskobu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GC/MS	Gaz Kromatografisi/kütle Spektrometresi
HPLC/DAD	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/Diyot dizisi
PGPR	Polyglycerol Polyricinoleate
SEM	Taralamalı Elektron Mikroskobu
STEM	Taramalı transmisyon elektron mikroskobu
T80	Tween 80
TE	Troloks Eşdeğeri
TFC	Toplam flavonoid içerik
TPC	Toplam fenolik içerik
UK	Uzama kırılması (elongation at break)
UPLC-MS	Ultra performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
UV/VIS	Ultraviyole/Görünür Işık

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Emülsiyonların (W1/O) ve ikincil emülsiyonların (W1/O/W2) oluşumu (Has ve Sunthar, 2020) 11

Şekil 2.2 Elektrospinleme ile nanofilm üretim Prosesi (Karakaş, 2017)..... 12

Şekil 2.3 Elektrospreyleme sistemi (Steipel vd., 2019)..... 12

Şekil 2.4 Elektrohidrodinamik sistemi 13

Şekil 2.5 Lipozom yapısı (Jesorka ve Orwar, 2008). 15

Şekil 2.6 Biyoerişilebilirlik ve biyorarlılık şeması..... 19

Şekil 3.1 PE yüklü lipozomların üretimi 27

Şekil 3.2 Çift eksenli (sol) ve tek eksenli (sağ) yöntemle lipozom yüklü nanofilm üretim şeması 29

Şekil 3.3 Lipozomal PE yüklü çift eksenli (Co-axial) ve tek eksenli (Blend) nanofilm üretim şeması..... 29

Şekil 3.4 Nanofilmlerin invitro mukoadezyon ölçümleri (sol- proba yapıştırılan nanolif, orta-musin disk)..... 32

Şekil 3.5 ex-vivo mukoadezyon sistemi..... 33

Şekil 3.6 in vitro biyoerişilebilirlik aşamaları 36

Şekil 3.7 in vitro Biyoyararlanım Modeli. (a) Caco-2 hücre hattının ikili membran modeline ekilmesi, membran yüzeyini kaplaması ve 21 günlük farklılaşma süresi sonunda oluşturduğu yapı, (b) Transepitelyal Elektrik Direnci (TEER) ölçümü. 39

Şekil 4.1 (a1-2) Optik mikroskop görüntüleri (40X); (a3-4) W1/O/W2 çift emülsiyonunun floresan mikroskopi görüntüleri (20X); (b1-2) Çift emülsiyonun konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) görüntüleri, ölçek çubuğu 10 µm (B1) ve 5µm'yi (B2) temsil eder; (c) Emülbeadlerin floresan mikroskopi görüntüsü (5X), (d) Emülbeadlerin üst üste çakışmalı CLSM görüntüleri. 42

Şekil 4.2 Emülbeadlerin ve emülsiyonsuz kontrol beadlerin optik mikroskop görüntüleri (solda) ve SEM görüntüleri (ortada ve sağda). İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler ve B-C0, kitosan kaplaması olmayan emülsiyon içermeyen beadlerdir. 44

Şekil 4.3 Saf aljinat, kitosan, inülin, ayçiçek yağının FTIR spektrumları; ve emülbead ve emülsiyonsuz beadler. İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler ve B-C0 ve B-C1, emülsiyon içermeyen kitosan kaplı ve kaplanmamış beadlerdir. 47

Şekil 4.4 in vitro gastrointestinal koşulların bağırsak adımından sonra emülbead ve emülsiyonsuz beadlerde serbest bakterilerin ve kapsüllenmiş bakterilerin hayatta kalma oranları (%). İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler,

B-C0 ve B-C1, emülsiyon içermeyen kitosan kaplı ve kaplanmamış beadlerdir. 48

Şekil 4.5 Termal işlemden sonra (72°C 3 dk ve 65°C 30 dk) emülbeadlerin ve emülsiyonsuz beadlerde serbest bakterilerin ve kapsüllenmiş bakterilerin hayatta kalma oranları (%). İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler, B-C0 ve B-C1, emülsiyon içermeyen kitosan kaplanmamış ve kitosan kaplı beadlerdir 50

Şekil 4.6 Tek eksenli (BF1: L1 lipozom, BF2: L2 lipozom, BF3: L3 lipozom, BF4: L4 lipozom içerir ve BF kontrol:lipozom içermez) ve çift eksenli (CF1: L1 lipozom, CF2: L2 lipozom, CF3: L3 lipozom, CF4: L4 lipozom içerir ve CF kontrol:lipozom içermez) filmlerin SEM görüntüleri (40.000x) (Ls=lipozom içermeyen filmler) 55

Şekil 4.7 (a) L2, (b) L4, (c) PE içermeyen kontrol lipozomların (L4 kontrol) TEM görüntüleri 56

Şekil 4.8 Fast yeşil ile boyanmış çift eksenli lipozomal lif (CF4) (a1) Polimerlerinin, (a2) Nil kırmızısı ile boyanmış Lipozomların konfokal mikroskopi ve taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) görüntüleri, (a3) a1 ve a2'nin çakıştırılmış görüntüsü. (b) Nil kırmızısı ile lipozomları boyanmış nanofilmin 3 boyutlu görüntüsü (c) Nil kırmızısı lipozomları ve Fast yeşil ile lifleri boyanmış nanofilmin 3 boyutlu çakıştırılmış görüntüsü. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla lipozomlar ve polimerlerdir. (d) ve (e) Lipozomal lifin çekirdek/kabuk yapısının STEM görüntüleri. 58

Şekil 4.9 Fast yeşil ile boyanmış tek eksenli lipozomal lif (BF4) (a1) Polimerlerinin, (a2) Nil kırmızısı ile boyanmış Lipozomların konfokal mikroskobu görüntüleri, (a3) a1 ve a2'nin çakıştırılmış görüntüsü (b) Nil kırmızısı ile lipozomları boyanmış nanofilmin 3 boyutlu görüntüsü (c) Nil kırmızısı lipozomları ve Fast yeşil ile lifleri boyanmış nanofilmin 3 boyutlu çakıştırılmış görüntüsü 59

Şekil 4.10 Çift eksenli (CF2, CF4, CF4 kontrol) (sol), tek eksenli filmlerin (BF2, BF4, BF4 kontrol) (sağ) ve filmleri oluşturan polimerlerin ve lipozomu oluşturan PE ve lesitinin FTIR spektrumları 61

Şekil 4.11 (a) Nanofilmleri oluşturan polimerlerin ve lipozomu oluşturan PE ve lesitinin, (b) çift eksenli (CF2, CF4) ve (c) tek eksenli nanofilmlerin (BF2, BF4) DSC termogramları 63

Şekil 4.12 Çift eksenli filmler için çekme mukavvemeti (ÇM) ve uzama kırılması (UK) grafikleri 66

Şekil 4.13 Tek eksenli filmler için çekme mukavvemeti (ÇM) ve uzama kırılması (UK) grafikleri 67

Şekil 4.14 Çift eksenli filmler için ex-vivo mukoadezyon sonuçları 68

Şekil 4.15 Tek eksenli filmler için ex-vivo mukoadezyon sonuçları 69

Şekil 4.16 Nanoliflerin in vitro müsin yöntemi ile mukoadezyon işi. Tek eksenli filmler BF1: L1 lipozom, BF2: L2 lipozom, BF3: L3 lipozom, BF4: L4

lipozom içerir ve çift eksenli filmler CF1: L1 lipozom, CF2: L2 lipozom, CF3: L3 lipozom, CF4: L4 lipozom içerir. 70

Şekil 4.17 Liposomal PE (L4) yüklü çift eksenli nanofilmin (CF4) (a) Şişme oranı (%), (b) Bozunma oranı (%), (c) PE salım oranı (%) 71

Şekil 4.18 PBS (fosfat tamponlu salin, pH 7.4) (sol) ve AB (asetat tamponu, pH 4.5) (sağ) içine 37 ± 0,5 °C'de 15 dakika, 1 saat, 6 saat ve 24 saat süreyle daldırılmış CF4 nanofilmin mikro yapıları 73

Şekil 4.19 Lipozomal propolis ekstraktı (PE) yüklü lifin (CF4) Escherichia coli (gram-negatif, ATCC 25922), Pseudomonas aeruginosa (gram-negatif, ATCC 27853) ve Staphylococcus aureus'a (gram-pozitif, ATCC 29213) karşı inhibisyon zonları (37°C'de 24 saat inkübasyon) 74

Şekil 4.20 Elektrospinleme ile üretilen lipozomal PE yüklü çift eksenli nanofiliflere kültürlenen HFF-1 fibroblast hücrelerinin MTT test sonuçları. F3-F4: sırasıyla L3-L4 lipozomları ile yüklenen nano lifler, F4B: boş L4 lipozomları (propolis olmadan) ile yüklenen nano lifler. 2D pozitif kontrol grubu. Değerler ortalama ± standart sapma (n = 3) olarak verilmiştir. 75

Şekil 4.21 CF4 nanolif (CF4: L4 lipozomlarla yüklü nanolif) üzerinde büyütülmüş HFF-1 hücrelerinin SEM görüntüleri..... 76

Şekil 4.22 Mide sindirimi aşaması sonrası lipozomlar (sol), Bağırsak sindirimi aşaması sonrası lipozomlar (sağ), her iki ölçek 20 µm'yi gösterir. 81

Şekil 4.23 Caco-2 hücrelerine karşı PE, L4 ve BF4'ün MTT analizi ile ölçülen sitotoksik etkisi 82

Şekil 4.24 Biyoyararlanım süresi sonunda kaydedilen transepitelyal elektrik direnci (TEER) değerleri. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. 83

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 Emülbeadler ve emülsiyon içermeyen beadlerin parçacık boyutu, jel gücü kapsülleme etkinliği 41

Tablo 4.2 Propolis ekstraktını (PE) toplam fenolik, toplam flavaonoid madde ve antioksidan aktivitesi 51

Tablo 4.3 Lipozomal PE formülasyonlarının, boyut, PDI, yüzey yükü ve %enkapsülasyon etkinliği (EE) 53

Tablo 4.4 Tek eksenli ve çift eksenli filmler için yükleme kapasitesi ve kapapsülleme verimliliği 53

Tablo 4.5 *In vitro* biyoerişilebilirlik analizi sindirim basamaklarında serbest PE nin fenolik madde değişimi 79

Tablo 4.6 *In vitro* biyoerişilebilirlik analizi sindirim basamaklarında liposomal PE yüklü nanolif (BF4) ve liposomal PE (L4) örneklerinden salınan PE'nin fenolik madde değişimi 80

Tablo 4.7 Caco-2 biyorarlılık analizi sonucu apikal (üst) ve bazolateral (alt) fazın PE lif, PE fenolik bileşen kompozisyonu 85

ÖZET

Gıda Biyoaktiflerinin Enkapsülasyonu için Hibrit Sistemler Geliştirilmesi

Canan Yağmur KARAKAŞ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Eş-Danışman: Öğ. Gör. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM

Biyoaktif bileşiklerin gastrointestinal (GI) şartlara karşı dayanımını sağlayarak biyoyararlılığını (BY) ve biyoerişilebilirliğini (BE) arttırarakgıda ve sağlık gibi alanlarda kullanıma elverişi hale getirebilecek enkapsülasyon sistemleri geliştirmek oldukça önemlidir. Bu çalışmada probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus plantarum* ELB90 ve fonksiyonel vedoğal bir gıda bileşeni propolis ekstraktının (PE) hibrit sistemlerle enkapsülasyonu araştırılmıştır. Çalışmanın ilk kısmında *L. plantarum* ELB90, emülsiyon ve hidrojel şeklinde iki farklı kapsülleme yönteminin birleştirildiği bir teknikle elektrospreylenerek üretilmiştir. Bu amaçla bakteri yüklenen çift emülsiyon (W1/O/W2) aljinat jel parçacıkları (emülbeadler) içerisine kapsüllenmiştir. Beadler, Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) ve jel gücü analizi ile karakterize edilmiş ve termal işleme ve simüle edilmiş GI koşullara maruz bırakılması sonrasında serbest ve kapsüllenmiş hücrelerin canlılığı değerlendirilmiştir. Sindirimin bağırsak aşamasından sonra en yüksek canlılığı kitosan kaplı emülbeadler sağlamış, hayatta kalma oranı %84 (8,70 log CFU g^{-1})

olarak elde edilmiş ve emülbeadler termal şartlara karşı da bakterileri daha fazla korumuştur (5.90–6.90 log CFU g^{-1}).

Çalışmanın diğer kısmında PE enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. PE öncelikle yüksek kapsülleme verimliliğiyle (%68-93) farklı lipozomal formülasyonlarda (65 ila 370 nm) kapsüllenmiştir. Lipozomal PE, çift eksenli ve tek eksenli elektrospinleme ile nanoliflere yüklenmiştir. Lipozomal PE'nin nanoliflere yüklenmesi, liflerin hem termal (DSC) hem de tekstürel özelliklerini geliştirmiş ve mukoadezifliğini arttırmıştır. Çift eksenli nanolifler ağız içi yaralarının iyileştirilmesinde potansiyelini değerlendirmek üzere sitotoksisite (MTT) analizi ve hücre adezyonu analizlerine tabi tutulmuştur. Lipozomal PE yüklenen nanofliflerde en yüksek antimikrobiyal etki *Staphylococcus aureus*'a karşı gözlenmiştir. Lipozomal nanolifler fosfat (PBS) ve asetat (AB) tamponunda hızla şişmiş (0-3 saat) ve liflerin morfolojisi SEM ile görüntülenmiştir. Lipozomal PE yüklü nanolifler, insan derisi fibroblast (HFF-1) hücrelerinin canlılığını arttırmış hücre proliferasyonunu desteklemiştir. Tek eksenli nanolifler ise *in vitro* simüle GI siteminde ve Caco-2 hücreleri ile BE ve BY analizlerine tabi tutulmuştur.

Bu çalışma, probiyotik bakteri içeren emülbead sisteminin, sadece hidrojel kullanılan sisteme göre daha başarılı bir koruma sağladığını, ayrıca PE yüklü lipozomal nanoliflerin mukoadezif özellik gösteren potansiyel yara iyileştirme malzemesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir. PE'nin lipozoma ve ardından nanofilmlere yüklenmesinin PE'nin BY ve BE'sinin arttırdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: enkapsülasyon, probiyotik bakteri, elektrospinleme, yara örtüsü, biyoyararlılık

ABSTRACT

Development of Hybrid Systems for the Encapsulation of Food Bioactives

Canan Yağmur KARAKAŞ

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe KARADAĞ

Co-supervisor: Lect. Dr. Ruşen METİN YILDIRIM

It is very important to develop encapsulation systems aiming to increase the bioavailability (BA) and bioaccessibility (BC) of bioactive compounds by ensuring their resistance to gastrointestinal (GI) conditions and to make them suitable for use in areas such as food and health. In this study, hybrid encapsulation systems for *Lactobacillus plantarum* ELB90, a probiotic bacteria, and propolis extract (PE), a functional food component, were investigated. Firstly, *L. plantarum* ELB90 was encapsulated into double emulsion (W1/O/W2) loaded alginate beads by electrospraying. Beads were characterized by FT-IR and gel strength analysis, and the viability of free and encapsulated cells was evaluated by exposure to thermal treatment and simulated GI conditions. After the intestinal stage of digestion, chitosan-coated emulbeads provided the highest survival rate (84%, 8.70 log CFU g^{-1}), and the emulbeads provided higher protection to the bacteria under thermal processing conditions.

PE was encapsulated initially in different liposomal formulations (65 to 370 nm) yielding high encapsulation efficiencies (68-93%). Liposomal PE was then

incorporated into nanofibers by co-axial and blend electrospinning. Loading PE into liposomal nanofibers improved thermal and textural properties and elevated mucoadhesiveness. Co-axial liposomal PE-loaded nanofibers were subjected to wound healing analyzes to be potentially exhibited in the healing of oral wounds. The highest antimicrobial effect of fibers was determinedagainst *Staphylococcus aureus*. Nanofibers were rapidly swollen (0–3 h) in phosphate (PBS) and acetate (AB) buffer. Liposomal PE-loaded nanofibers promoted cell proliferation and increased the viability of human skin fibroblast (HFF-1) cells. Blend PE-loaded nanofiberswere additionaly subjected to in vitro simulated GI tract and Caco-2 cells and compared to free PE, encapsulated system provided higher BC and BA values,

This study showed that the emulbead system containing probiotic bacteria enables a more successful protection than the hydrogel-only system for functional foods, and PE-loaded liposomal nanofibers can be used as potential oral wound healing materials with mucoadhesive properties and that loading PE into the liposome and then into the nanofilms increases the BA and BC of PE.

Keywords: encapsulation, probiotic bacteria, electrospinning, wound dressing, bioavailability

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Probiyotik bakterilerin ağız yoluyla alımının, gastrointestinal sistemdeki (GI) spesifik bozuklukların hafifletilmesi (Cook vd., 2013; Ahmad vd., 2018) ve çeşitli sağlık yararları (Nami vd., 2018; Kechagia vd., 2018) açısından önemli özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Ancak bu faydaların gösterilebilmesi için hücrelerin GI sisteme -özellikle kolona- canlı olarak ulaşması gerekir (Misra vd., 2021). Midenin düşük pH'ı ve gıdalara eklenen bakterilerin gıda işleme sırasında maruz kaldığı sıcaklık, bağırsağa ulaşan canlı mikroorganizmaların sayısını büyük ölçüde azaltabilir, dolayısıyla oral uygulamanın etkinliğini azaltabilir. Kapsülleme, probiyotik bakterilerin fonksiyonel yiyecek ve içecek üretiminde mevcut olan yüksek sıcaklık, pH ve su aktivitesi gibi olumsuz çevresel koşullara direnç göstermeleri için etkili bir fiziksel bariyer sağlamakla kalmaz, aynı zamanda üst GI sistem boyunca koruyarak kolona kadar yüksek canlılık oranıyla ulaşmasını da sağlar (Afzaal vd., 2020; Zhang vd., 2021). Prebiyotikler düşük asitliğe ve ince bağırsak enzimleri tarafından sindirime dirençli olduğundan, probiyotiklerin canlılığını korumak ve hatta geliştirmek için kapsülleme matrisinde kullanılmaları, simbiyotik bir ürün oluşması nedeniyle değerli bir fonksiyonel gıda olarak kullanımı ilgi çeken yöntemlerdendir (Duman ve Karadag, 2021; Juárez-Trujillo vd., 2021; Rashidinejad vd., 2022). Taşıyıcı olarak sodyum aljinat ve çapraz bağlayıcı olarak kalsiyum klorür kullanan iyonik jelasyon kapsülleme yöntemleri, kapsülleme sisteminde sızıntıya, daha yüksek difüzyon hızına ve mide asidi ve safra tuzları gibi zorlu koşullarda parçalanmaya karşı duyarlı hale getiren geniş gözenekli yüzeylere sahip olma gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, bu beadler zıt yüklü biyopolimer (örneğin kitosan) ile kaplanır ve/veya besleme çözeltisi, aljinat çözeltisinin pektin (Karakas vd., 2022), jelatin (Liv d., 2019), karragenan (Afzaal vd., 2020), zein (Laelorspoen vd., 2014) gibi diğer polimerlerle karıştırılmasıyla formüle edilebilir. Aljinat beadlerinin elektrospreyleme yoluyla ekstrüzyonu, toplayıcı solüsyon içinde genellikle daha küçük boyut dağılımına sahip parçacıkların oluşturulmasına olanak tanır (Karakas vd., 2022) ve geleneksel

ekstrüzyon damlatma tekniğiyle karşılaştırıldığında yüksek viskoziteli besleme çözeltilerinin kullanılmasını mümkün kılar (Zaeim vd., 2017). Probiyotik bakterilerin kapsüllenmesi için, karageenanla güçlendirilmiş aljinat hidrojel boncukları (Afzaal vd., 2020), inülin ilaveli elektrospinlenmiş kompozit PVA nanofilmleri (Duman ve Karadag, 2021), bakteri yüklü emülsiyonun (W/O) spreyle kurutulması (Liu vd., 2015), probiyotik bakteri yüklü çift emülsiyonların (W1/O/W2) kompleks koaservasyonu dahil olmak üzere birçok yöntem önerilmiştir (Juárez-Trujillo vd., 2021; Gao vd., 2022). Yapılan bazı çalışmalarda, probiyotiklerin çift emülsiyonların iç su fazında kapsüllenmesinin, bunların *in vitro* sindirim koşullarında hayatta kalma yeteneklerini arttırdığını (Zhang vd., 2021; Qin vd., 2021) ve biyoaktif bileşikler için farklı polimerlerle güçlendirilmiş aljinat taneciklerinin, amaçlanan kolon hedefli dağıtım sistemi için etkili bir yöntem olabileceğini gösterilmiştir (Karakas vd., 2022; Agarwal vd., 2015; Su vd., 2011). Yeni yapılan iki çalışmada Frakolaki vd. (2020) ve Ding vd. (2022) *Bifidobacterium subsp. lactis* (BB-12) ve *Lactobacillus reuteri*'yi, W1/O/W2 çift emülsiyonunda ekstrüzyon işleminden önce farklı polimerler tarafından stabilize ederek kapsüllemişler ve depolama sırasında ve simüle edilmiş GI koşulları altında hücrelerin canlılığını koruduğunu raporlamışlardır. Ancak literatürde *Lactobacillus plantarum* ELB90'ın çift emülsiyon (W1/O/W2) sistemi içine ardından da ekstrüzyon ve elektrospreyleme yöntemiyle ile enkapsülasyonuna ve karakterizasyonuna ve ayrıca termal şartlara ve GI şartlarına karşı dayanımı araştıran çalışmaya rastlanmamıştır.

Propolis (bal arısı tarafından toplanan karmaşık reçineli bitki ürünü), yüksek polifenolik içeriği nedeniyle eski zamanlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde pek çok araştırmacı, propolisin geniş spektrumdaki biyoaktif özelliklerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak kullanımına odaklanmaktadır (Busch vd., 2017). Propolis sadece polifenoller açısından zengin değildir, aynı zamanda terpenoidler, steroidler, basit şekerler (karbonhidratlar), amino asitler (protein), vitaminler ve mineraller de içerir (Choi vd., 2006). Propolisin başlıca aktif bileşenleri kafeik asit fenil ester (CAPE), krisin, drupanin, kardonol, pinobanksin, galagin ve pinocembrin gibi flavonoidlerdir. Propolisteki bu fito-bileşikler, antialerjik, anti-diyabetik, serbest radikal süpürücü,

antimikrobiyal ve antienflamatuar gibi çok çeşitli sağlığı geliştirici özelliklere katkıda bulunur ve ayrıca renoprotektif, dermal koruyucu, gastroprotektif ve hepatoprotektif aktiviteler gösterir (Yen vd., 2017). Propolisin kullanıldığı en önemli alanlardan biri de yara iyileşme çalışmalarıdır (Eskandarinia vd., 2018; Voss vd., 2018; Freires vd., 2016). Propolis ekstraktlarının (PE'lerin), cerrahi ağız içi yaralarında epitelyal onarımı teşvik ettiği (Magro-Filho ve Carvalho, 1994; Zulhendri vd., 2021) ağız ülserleri ve diş pulpasındaki kollajenin miktarını, tipini ve yoğunluğunu arttırdığı ve ayrıca ağızdaki cerrahi yaralarda iyileşmenin inflamatuar aşamasında mast hücrelerinin üretimini azalttığı (Barroso vd., 2012) rapor edilmiştir. Oral tekrarlayan aftöz ülserden (RAU) şikayeti olan hastalar, niozomal propolis yüklü oromuko yapışkan filmler ile tedavi edildiğinde, ilaç verilen grupta ülser boyutunda küçülme başlangıcının, uygulamanın ikinci ve üçüncü günlerinde elde edildiği raporlanmıştır. Plasebo grubunda bu günlerde ülser boyutunda herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Müdahale grubundaki hastaların yarısında ülserin ilk 5 gün içinde tamamen iyileştiği gözlenirken, plasebo grubundaki hiçbir hastada aynı tedavi günlerinde ülser iyileşmesi kaydedilmemiştir (Arafa vd., 2018). Hem nutrasötik hem de farmasötik uygulamalarda PE'nin ana dezavantajı suda çözünürlüğünün düşük olmasıdır. Örneğin propoliste bulunan kafeik asit fenetil ester gibi oldukça aktif moleküller ve flavonoidlerin çoğu suda çözünmez, bu da terapötik etkinliğinde çok önemli bir rol oynar (Mendez-Pfeiffer vd., 2021). Kapsülleme (Tzankova vd., 2019; Zhang vd., 2018), propolisin çözünürlük dezavantajına bir çözüm olabilir. Ancak kapsülleme sisteminde kullanılan taşıyıcı malzemelerin gıda ve ilaç uygulamalarında güvenle kullanılabilmesi için toksik olmaması, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu olması gerekmektedir. Lipozomlar, su içeren sistemi çevreleyen eşmerkezli fosfolipid çift katmanlarından oluşan fosfolipid veziküllerdir. Fosfolipid kuyrukları genellikle iki hidrofobik uzun yağ asidi zincirinden oluşur ve su molekülleri ile etkileşimleri en aza indirmek için yağ asidi zincirlerinin hidrofobik etkileşimleri tarafından kendiliğinden oluşturulur (Kumar vd., 2019). Fosfolipidler amfifiliktir ve yüksek biyouyumluluğa sahiptir ve bu nedenle farmasötik formülasyonlarda kullanılmaya son derece uygundur. Hidrofobik moleküller çift katmanlı membrana yerleştirilebilirken, hidrofilik moleküller sulu merkezde tutulabilir (Xia vd., 2016; Hou vd., 2018; Zhang vd., 2016). Bu nedenle lipozomlar,

bir bölgeye hedefli ilaç dağıtımında çok önemli etkinlik ve biyouyumluluk sağlayan model biyomembranlar olarak kabul edilir (Perche vd., 2013). Lipozomlar, toksik olmamaları, biyouyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir olmalarının yanı sıra kapsüllenmiş ilaçların etkinliğini arttırabilme, stabilite sağlama ve toksisiteyi azaltma gibi özelliklerinden dolayı çokça tercih edilen enkapsülasyon sistemlerindendir. Biyoaktif bileşikler, stabilitelerini arttırmak ve olumsuz çevresel koşullardan korunmak için lipidler ve/veya polimerik matrisler içinde kapsüllenebilirler. Hidrofilik ve lipofilik biyoaktif bileşiklerin stabilitesi, lipozomlarda kapsüllenmeleri ile arttırılabilir. Son yıllarda, hidrofilik ve lipofilik molekülleri kapsülleyebilme potansiyelleri lipozomları çeşitli uygulamalar için faydalı kıldığı için, lipozomlar bir dizi farklı molekülün kapsüllenmesi ve taşınması için özel ilgi görmüştür. Gıda endüstrisinde, enzimler, proteinler, vitaminler, aromalar ve antioksidanları taşımak için lipozomlar kullanılmıştır (Ota vd., 2018). Zein, mısır bitkisinde bulunan, farklı moleküler ağırlıklara sahip proteinlerin bir karışımıdır ve etanol, asetik asit ve sulu metanol gibi farklı çözücülerden elektrospinlenebilen ve alkolde çözünür prolamin proteinlerinin bir sınıfıdır. Biyobozunurluk ve biyouyumluluğun yanı sıra zein, düşük hidrofilikliğe, yüksek elastikiyete ve film oluşturma özelliklerine sahiptir (Lai vd., 2011; Torres-Giner vd., 2009). Zein, gıda kaplamaları, ilaç formülasyonlarında yardımcı maddeler ve giysiler dahil olmak üzere çok çeşitli ticari ürünlerin imalatında kullanılır. Son zamanlarda, özellikle biyomedikal alanda çeşitli uygulamalar için zeinin nanolif filmlere elektrospinlenmesi ve yeni nesil ilaç dağıtım sistemlerinin yapı iskelesi ve matrisi olarak kullanımı artarak ilgi çekmeye devam etmektedir (Jiang vd., 2010; Nie vd., 2012). Kollajenin kısmi hidrolizinden kolayca elde edilen bir biyopolimer olan jelatin, biyouyumluluğu, biyobozunabilirliği ve kolay bulunabilirliği nedeniyle FDA onaylı en yaygın kullanılan biyopolimerlerden biridir (Feng vd., 2017). Biyoaktif kapsülleme, aktif paketleme ve doku mühendisliği uygulamaları için asetik asit, formik asit ve etil asetat gibi farklı çözücülerden (Okutan vd., 2014) elektrospinlenebilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan zein çözeltisi nanolif oluşturabilirken, düşük konsantrasyonda hazırlanmasıyla da nanopartiküller elde edilmektedir. Saf zein nanolifleri önceki çalışmalarda başarılı bir şekilde üretilmiş olmasına rağmen, nanoliflerin zayıf mekanik özelliklere ve solvent direncine sahip olduğu bulunmuştur (Zhang vd., 2015). Zein ve diğer

biyopolimerlerin hibrit elektrospinlenmesi, problemleri çözmek için uygun bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir. Zein ve ipek fibroinin hibrit elektrospinlenmesinin, ipek fibroin içeriği arttıkça zein nanoliflerinin mekanik mukavemetini iyileştirdiği bildirilmiştir (Yao vd., 2009). Wang ve Chen (2012) hordein matrisinde dağılan hidrofobik zeinin, hordein nanoliflerinin hem su hem de etanol içindeki ıslak stabilitesini önemli ölçüde iyileştirdiğini ve elektrospinlenmiş saf zein veya hordein nanoliflerinin mekanik özelliklerini güçlendirdiğini bildirmiştir (Wang vd., 2012). Bu nedenle, hibrit elektrospinleme ile jelatin nanoliflerin su direncini artırmak için zeinin jelatin ağ içinde homojen bir şekilde dağılabileceğini varsayılabilir (Deng vd., 2018). Literatürde, zein nanoliflerin elektrospinleme işlemi çoğunlukla etanol/su karışımı çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirilmekte olup, hızlı kabuk oluşumu ve çözücünün çok hızlı buharlaşarak lif çekirdeğinin çökmesi nedeniyle şerit benzeri lif morfolojisi ile sonuçlanmıştır. (Selling vd., 2007; Miyoshi vd., 2005). Bununla birlikte, asetik asit gibi yüksek kaynama noktalarına sahip solvent sistemleri kullanılarak yuvarlak şekilli zein nanolifleri elde edilebilir (Kayaci ve Uyar, 2012). Çalışmamızda, solvent sistemi olarak asetik asit kullanılarak zein ve jelatin nanoliflerinin elektrospinleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Nanolifler içine belli oranlarda lipozom eklenerek oran ve morfoloji optimizasyonu gerçekeştirilmiştir. Aynı zamanda propolis eklenmiş lipozom üretimi için de optimizasyon yapılmış, propolis çözünür hale gelene kadar formülasyon denemeleri yapılmıştır. Fakat literatürde propolis ekstraktının (PE) lipozom içine enkapsüle edildiği ve ardından çift eksenli ve tek eksenli yöntemle zein/jelatin nanolifler içine konulması ve karakterizasyonu ayrıca yara örtüsü olarak kullanımı ve biyorarlılığını araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır, bu yönüyle yapılan çalışma yenilikçi bir yaklaşım içermektedir.

1.2 Tezin Amacı

Biyoaktif özeliği yüksek fonksiyonel bileşiklerden olan propolis ve probiyotik bakterinin stabilitelerini korumak, gastrointestinal (GI) şartlara karşı dayanımını arttırarak biyoyararlılığını ve biyoerişilebilirliğini arttırmak ve çeşitli gıda ve medikal sistemlerinde kullanımına elverişi hale getirmek için iç içe hibrit sistemler oluşturarak bu sistemlerin karakterizasyonları gerçekleştirmek ve toksisistelerini araştırarak yenilikçi enkapsülasyon sistemleri geliştirmektir. Probiyotik bakteriler

su/yağ/su (W1/O/W2) şeklinde olan iki fazlı emülsiyon sistemleri ile enkapsüle edilip ardından elektrospreyleme işlemi ile aljinat bazlı hidrojeller içine koyulması ile hibrit bir system oluşturulmuş ve bu systemin içindeki bakterilerin GI şartlarına ve gıda üretimi esnasında kullanılan sıcaklıklar olan 65ºC ve 72ºC'de canlı kalımlarını arttırmak hedeflenmiştir.

Aynı zamanda, PE'nin enkapsülasyonu için, gıda ve sağlık alanında kullanılmak üzere, tek başına kullanıldığında bazı kısıtlamalara sahip lipozomların dezavantajlarının üstesinden gelmek için lipozomlar polimerik iskeleler içine konmuştur. Polimerik iskele olarak 2 farklı sistem tasarlanmıştır. Lipozomlar zein ve jelatin polimerleri ile harmanlayarak tek eksenli elektrospinleme tekniği ile nanofilm içine konulmuş ve çekirdek-kabuk sistemi geliştirmek için çift eksenli elektrospinleme tekniği ile çekirdek sisteminin içine konularak elektropüskürtme teknolojisi ile lipozomların etrafına polimer kaplayarak çok katmanlı nanolif elde edilmiştir. Tüm bu teknikler için kullanılan polimerler Food-Grade polimerler olup gıda olarak kullanımları serbest polimerlerdir. Aynı zamanda bu hibrit enkapsülasyon sisteminin içine enkapsüle edilen PE'nin biyoyararlılığının ve biyoerişilebilirliğinin (*in vitro* ve hücre modelinde) birlikte değerlendirilmesi ve sitotoksisite testlerinin yapılması hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Laktik asit bakterilerinin (LAB) bir bölümü olan, çeşitli fermente gıdalardan ve insan gastrointestinal (GI) sistemlerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum*'un rahatsız bağırsak sendromu semptomlarında doza bağlı bir azalma ve koroner kalp damar rahatsızlıkları açısından belirli risk faktörlerinde azalma sağlama gibi kanıtlanmış sağlık etkileri mevcuttur. Bu çalışmada bu bakteriyi gıda sistemlerine entegre edilmek, sıcaklık gibi üretim şartlarına dayanması ve GI sisteminden geçişte canlılığını koruyarak yeterli sayıda bakterinin kalın bağırsağa ulaştırılmasını hedefleyen bir iç içe/hibrit enkapsülasyon sistemi tasarlanması hedeflenmiştir,. Ayrıca yine bu çalışmada, polifenoller, terpenoidler, steroidler, açısından oldukça zengin olan ve bu içerdiği fito-bileşiklerin, antialerjik, anti-diyabetik, serbest radikal süpürücü, antimikrobiyal ve antienflamatuar gibi çok çeşitli sağlığı geliştirici özellikleri olan ve ayrıca renoprotektif, dermal koruyucu,

gastroprotektif ve hepatoprotektif aktiviteler gösteren propolis ekstraktı (PE)'nın enkapsülasyonu da hedeflenmiştir. PE sayılan tüm bu faydalara sahip olmasına rağmen suda çözünmez ve düşük biyoyararlılığa sahiptir. Bu çalışmada, PE'nin öncelikle bir lipozomal sistemle enkapsüle edilmesi, daha sonra da lipozomların sulu çözeltilerinin stabilite sorunlarının ise lipozomların lif yapılara entegre edilmesi ile aşılması ve bu şekilde PE'nin biyoyararlılığını ve biyoerişilebilirliğini arttırılması hedeflenmiştir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu

2.1.1 *Lactobacillus plantarum*

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermantasyonunun son ürünü olarak laktik asit üreten, gram pozitif, katalaz negatif bakterilerin bir grubunu oluşturur. 220'den fazla geçerli tür ile Lactobacillus türleri temel LAB grubundan biridir (Felis ve Dellaglio, 2007). *Lactobacillus plantarum* gıdalar (süt ürünleri, fermente et, sebzeler, meyveler ve içecekler), insan ve hayvanların solunum, gastrointestinal ve genital yolları gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunabilir (Al-Tawaha ve Meng, 2018). Bu her yerde bulunan özellik, *Lb plantarum*'un adaptasyon yeteneklerini ve metabolik yolak çeşitliliklerini gösterir (Fiocco vd., 2010). *Lb plantarum*'un sağlıkla ilgili bilinen faydaları farklı probiyotik formülasyonların geliştirilmesine izin vermiştir ve antibakteriyel özellikleri, biyokoruma teknolojisinde olduğu gibi gıda güvenliği açısından ilgi çekicidir (Seddik vd., 2017). Birkaç *Lb plantarum* izolatının mide sindirimi sonrası hayatta kalma ve insanların ve diğer memelilerin bağırsak yollarında kolonileşme yeteneği olduğu kanıtlanmıştır (De Vries vd., 2006; Liv d., 2019). Bazı çalışmalar, bilinen faydalarının yanı sıra, *Lb plantarum* tüketiminin fekal Enterobacteriaceae taşıyıcılığını azalttığını, koroner arter hastalığı için belirli risk faktörlerini azalttığını ve IBS semptomlarında doza bağlı bir azalmaya yol açtığını göstermiştir (De Vries vd., 2006). Probiyotik bakterilerin bahsedilen sağlık faydalarını göstermeleri için kalın bağırsağa canlı olarak yaklaşık 10^7 log kob miktarından daha yüksek bir seviyede ulaşması gerekir (Afzaal vd., 2020). Dolayısıyla, probiyotik bakterilerin midedeki yüksek asidik ortamlara ve ince bağırsaktaki yüksek safra tuzlarına toleranslı bir taşıma sistemi aracılığıyla uygulanması en doğru stratejilerden biridir (Zhang vd., 2021). Probiyotik bakteriler gıda takviyelerine eklendiğinde, gıda işleme sürecinde meydana gelen termal koşullara da dayanıklı olmaları istenir (Gao vd., 2022). Bu nedenle enkapsülasyon teknikleri, probiyotiklerin gıda işleme ve gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında ortaya çıkan olumsuz dış koşullara dayanmaları için etkili fiziksel bariyer sağlar. sağlayan

2.1.2 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, biyoaktif bileşikleri kapsüllemek için önemli bir teknolojidir. Nanokapsülasyon ile biyoaktif bileşiklerin, biyoyararlanımları geliştirilebilir ve hedeflenen bölgede kontrollü salım sağlanabilir. Ayrıca, herhangi bir biyoaktif bileşiğin vücuttaki çeşitli bölgelere iletilmesi, partikül boyutu nano ölçeğe düşürülerek doğrudan arttırılır. Bunun nedeni, partikül büyüklüğünün nano ölçekli aralığa indirgenmesinin biyoaktifin reaktivitesini ve işlevselliğini birçok kat arttıran yüzey/hacim oranını ve en boy oranını arttırmasıdır. Biyoaktif bileşenin enkapsüle edilmesiyle hedeflenmiş kontrollü salınım sağlandığı için biyoyararlanımı, suda çözünürlüğü, fizikokimyasal stabilitesi geliştirilebilir (Seethu vd. 2020). Biyoaktif bir bileşiğin enkapsüllenerek gıdalar yoluyla veya tek başlarına oral yolla vucüda verilmesinin bazı avantajları vardır. Gıdalardaki nutrasötik dağıtım sistemleri ve besin takviyeleri, aşağıdaki amaçlar için geliştirilmiş olan kapsülleme sistemleri ile avantaj kazanmaktadır. Bu avantajlar şöyle sıralanabilir:

(1) Çözünürlüğü az olan polifenoller gibi bileşiklerin kapsülleme yolu ile çözünürlüğünü arttırmak ve pasif olarak biyoyararlılığı çok düşük olan bu biyoaktiflerin geçirgenliğini (bağırsak mukozası ve / veya hücre zarı yoluyla iletim) teşvik etmek,

(2) Gıda üretimi ve raf ömrü gibi süreçlerde bozulmadan kalabilmek için biyoaktif bileşiklerin stabilitesini arttırmak, gastrointestinal (GI) sistemde asitler, bazlar veya enzimlerden kaynaklan bozulmayı engellenerek biyoaktif stabilitesini korumak, Örneğin, terapötik peptitler ve proteinler midenin asidik koşullarında bozunur ve gastrointestinal salgılanan enzimler tarafından hidrolize edilir. Enkapsülasyon sistemleri biyolojik çevre ile istenmeyen etkileşimlerin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Örneğin, birçok polifenol, biyolojik olarak erişilebilirliklerini ve biyoaktivitelerini engelleyebilecek insan GI sistem içindeki metabolik enzimler tarafından kimyasal olarak dönüştürülür) (Brunu vd. 2013).

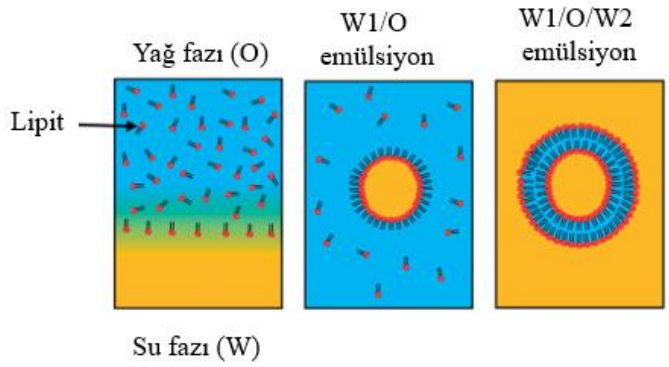
(3) Biyoaktif bileşenin istenmeyen bir tadı ve kokusu varsa, enkapsülasyon sayesinde, tat alıcıları ile etkileşimlerini engelleyerek acı gibi istenmeyen tatları maskelemek (Coupland ve Hayes 2014),

(4) Biyoaktifin salım hızını kontrol etmek, gerektiği durumlarda ani salım (burst), sürekli (sustained) veya hedef (target) olarak aktif salım sağlamak.

Bazı biyoaktiflerin, kan dolaşımındaki konsantrasyonunda dalgalanmalar, minimal etkili bir konsantrasyonun altında veya maksimum (toksik) bir konsantrasyonun üzerinde bulunması oldukça istenmeyen bir durumdur. Ek olarak, sürekli salım profili, diyabet gibi kronik hastalıklar için özellikle önemlidir, çünkü ilacın veya etkin biyoaktifin günde birkaç kez alımının azaltılarak tek doza düşürülmesi söz konusu olabilir (Simon, 2016). Probiyotiklerin canlılığını korumak için en iyi yöntemlerden biri kapsüllemedir. İdeal bir kapsülleme teknolojisi, probiyotikleri üst Gİ sistemde bozulmaya karşı korumalıdır ve ardından kolonda probiyotik bakteriler serbest bırakıldığında ise canlı kalmaya devam etmelidirler (Zhang vd., 2021). Mikrokapsüller, doğrudan gıdaya veya ilaç bileşenleriyle entegre edildiğinden doğal bileşenlerden yapılmış olmalı, gıda kalite özelliklerini olumsuz etkilememeli ve endüstriyel ölçekte üretilmesi mümkün olmalıdır. Kalsiyum aljinat mikrojelleri, probiyotikleri kapsüllemek, korumak ve dağıtmak için en yaygın kullanılan mikrokapsüllerden biridir çünkü tüm bu gereksinimleri karşılarlar (Cook vd., 2012). Üst Gİ sistemde (ağız, mide ve ince bağırsak) aljinat sindirilmez, ancak alt gastrointestinal sistemde (kolon) aljinat enzimler tarafından fermente edilir. Aljinatın sindirim ve fermantasyon özellikleri nedeniyle, probiyotikleri üst Gİ sistemde kapsülleyen ve tutan, ancak daha sonra bunları alt Gİ sistemde serbest bırakan mikrojellerin aljinat ile üretilmesi mümkündür.

2.1.2.1 Emülsiyon Sistemleri

Genel olarak emülsiyonlar, basit hazırlama yöntemleri ve tasarım kolaylığı nedeniyle aktif bileşenleri kapsüllemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gao vd., 2022). Çift emülsiyonlar (su-yağ-su (W1/O/W2) emülsiyonları gibi), hidrofilik bir bileşenin kapsüllenmesinde yaygın olarak uygulanmıştır (Şekil 2.1). Probiyotiklerin iç sulu fazda (W1) kapsüllenmesine yönelik emülsiyon tekniği, probiyotiklerin zorlu koşullara karşı korunmasına yarar. W1/O/W2 ikili emülsiyonları genellikle iki aşamalı işlem yoluyla üretilir. İlk önce bir yağ içinde su (W1/O) emülsiyonu üretilir ve daha sonra harici su fazı ile emülsifiye edilir (Qin vd., 2021).



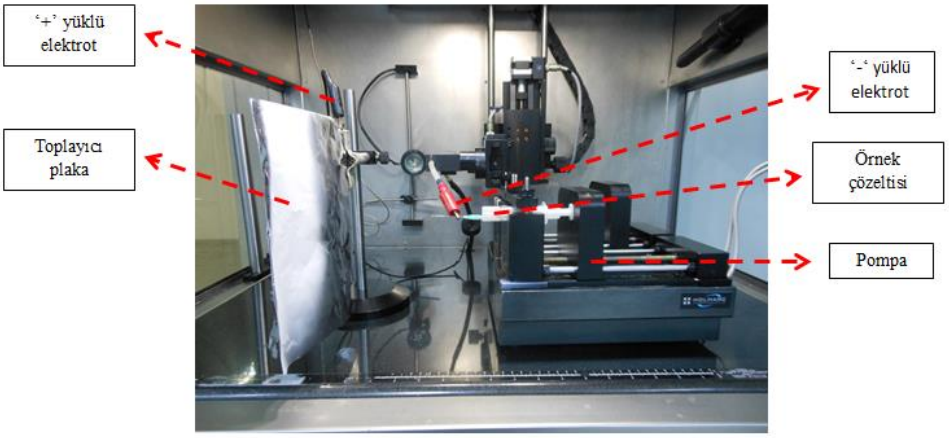
Şekil 2.1 Emülsiyonların (W1/O) ve ikincil emülsiyonların (W1/O/W2) oluşumu (Has ve Sunthar, 2020)

Emülsiyon bazlı dağıtım sistemleri, biyoaktif bileşenleri kapsüllemek, korumak ve serbest bırakmak için yaygın olarak kullanılan biyoaktif bileşenlerin oral taşıyıcılarının önemli bir sınıfıdır. Özellikle çift emülsiyon, iç sulu fazda kapsüllenen biyoaktif maddeleri daha iyi koruyabilen üç faz ve iki membrandan oluşan benzersiz bir yapıya sahiptir. Bireysel proteinler veya polisakkaritlerle karşılaştırıldığında, protein-polisakkarit ikili kompleksleri tipik olarak emülsiyon arayüzünde daha iyi stabilite sağlamanın yanı sıra emülsiyondaki biyoaktif bileşenlerin daha iyi korunmasını sağlayabilir (Huang vd., 2022).

2.1.2.2 Elektrospreyleme ve Elektrospinleme Sistemi

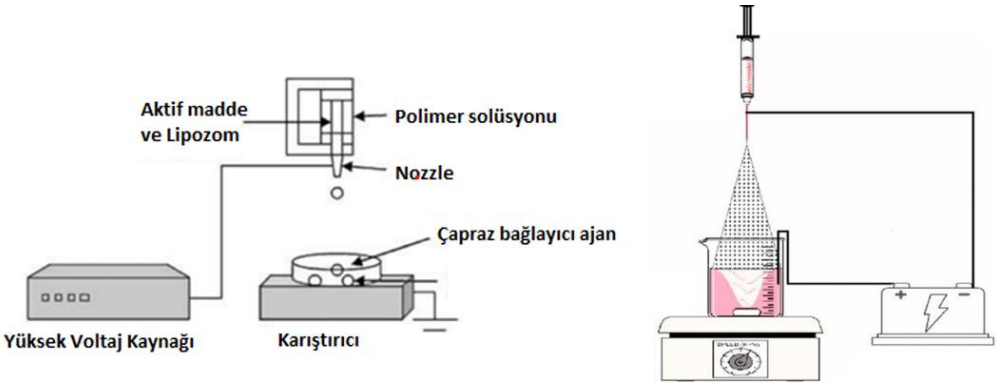
Bir elektrohidrodinamik işlem olan elektrospinleme, polimer çözeltisine yüksek potansiyel elektrik alanının uygulanmasıyla polimeri nano-mikrometrelik çaplara kadar incelterek liflere dönüştürülebilir (Şekil 2.2). Yüksek DC gerilimi, şırıngada bulunan polimer çözeltisinin pompa yardımıyla dışarı akan damlacığının üzerine etki eden yerçekimi kuvveti, yüzey gerilim kuvveti ve viskozite sürüklenmesinin etkisinin üstesinden gelmek için uygulanır. Elektrostatik kuvvetler, yapışma kuvvetlerini ortadan kaldıracak kadar güçlü hale geldiğinde, toplayıcı plakanın üzerine polimer atılmadan önce, havada çözücü madde uçurulur ve şırınga nozzle'nın ucunda oluşan koniden yüklü bir sarmal jet püskürtülür. Elektrospinleme diğer yöntemlerden farklı olarak önemli bir avantaja sahiptir, çünkü ısıya duyarlı biyoaktif bileşikleri yok etmeyen ortam koşullarında ve biyopolimerler için organik çözücüye gerek kalmayan şartlarda gerçekleştirilir. Elektrospinleme esnasında biyopolimerleri çözen su, etanol ve asetik asit gibi

çözücüler aynı zamansa gıda uygulamaları için kullanımı güvenli olan yaygın çözücülerden bazılarıdır (Karakaş, 2017).



Şekil 2.2 Elektrospinleme ile nanolif üretim Prosesi (Karakaş, 2017)

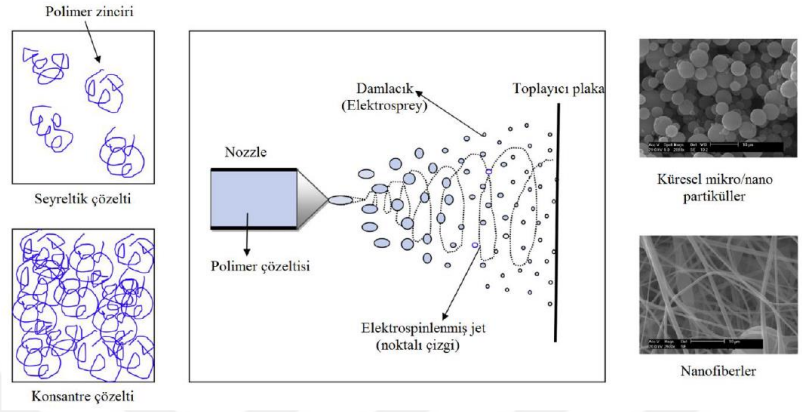
Kapsülleme için duvar malzemesi olarak kullanılan polimerlerin gıda ve ağız yoluyla alınan ilaç uygulamalarında kullanılabilmeleri için gıda güvenliği açısından uygun polimerler olması önemlidir. Elektrospinlenmeye uygun ve gıda güvenliği açısından uygunluk sağlayan biyopolimerlerden bazıları jelatin, zein, peynir altı suyu konsantresi, kitosan, pullulan, fruktooligosakkaritlerler (FOS)'dir. Uygulanan voltaj, atım hızı (mL/saat), nozzle ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe ve polimer konsantrasyonu gibi faktörler elektrospinlenmiş nanoliflerin oluşumunu ve morfolojisini etkiler (Seethu vd., 2020).



Şekil 2.3 Elektrospreyleme sistemi (Steipel vd., 2019)

Elektrohidrodinamik atomizasyon olarak da bilinen elektrosprey (ES), biyoaktif madde dağılımı olan nano partiküller üretmek için gelişmiş bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 2.3). ES, elektrospinlemeye benzer, ancak aynı deney düzeneği kullanılırken genellikle daha seyreltik polimer çözeltileriyle

gerçekleştirilir. Elektrospinleme sistemi gibi burada da yüksek voltajlı bir güç kaynağı, bir cam şırınga, bir şırınga pompası ve topraklanmış iletken yüzey (Şekil 2.4) kullanılır. Ayrıca ES, polimerler, mikro-kabarcıklar, polipleksler, amfifilik polimerler, silika ve lipitlerden oluşan parçacıklar üretmek gibi çok yönlülüğe sahiptir (Wu vd., 2012).



Şekil 2.4 Elektrohidrodinamik sistemi

Tipik olarak ES, biyoaktif yüklü çekirdek ve kapsülleyici matrisin bir aerosol spreyi oluşturularak üretilmesini içerir. Düşük akış hızısağlayan bir şırınga pompası kullanılarak, polimerik matris ve çözünmüş biyoaktif içeren çözelti, bir iğneden katı veya sıvı bir substrat üzerine veya içine püskürtülür. Onlarca kilovolt (kV) elektrik potansiyelinde bir fark yaratmak için iğne veya toplama substratına pozitif veya negatif yük uygulanması, nozzle ucunda bir Taylor konisi oluşmasına neden olur. Tek eksenli (tek iğneli) bir spreyde, püskürtülen bileşenlerin tümü işlem boyunca karışır; bununla birlikte, çok eksenli bir spreyde münferit çözeltiler (örneğin sulu fazdaki protein ve organik bir çözücü içindeki polimer), kendi kanallarını şırınga iğnesinde bırakıp Taylor konisine girene kadar karışmazlar (Steipel vd., 2019).

2.2 Propolisin Enkapsülasyonu

2.2.1 Propolis

Arıların kovanlarını onarmak ve korumak için ürettiği reçineli madde olan propolisin antimikrobiyal (Silva vd., 2012), antioksidan, antikarsinojenik ve yara iyileştirici (Eskandarinia vd., 2018; Voss vd., 2018; Freires vd., 2016) özellikleri bir çok çalışma ile araştırılmıştır ve bu özellikler polifenollerin (flavonoidler, fenolik asitler ve esterleri) varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Propolis ekstraktlarının

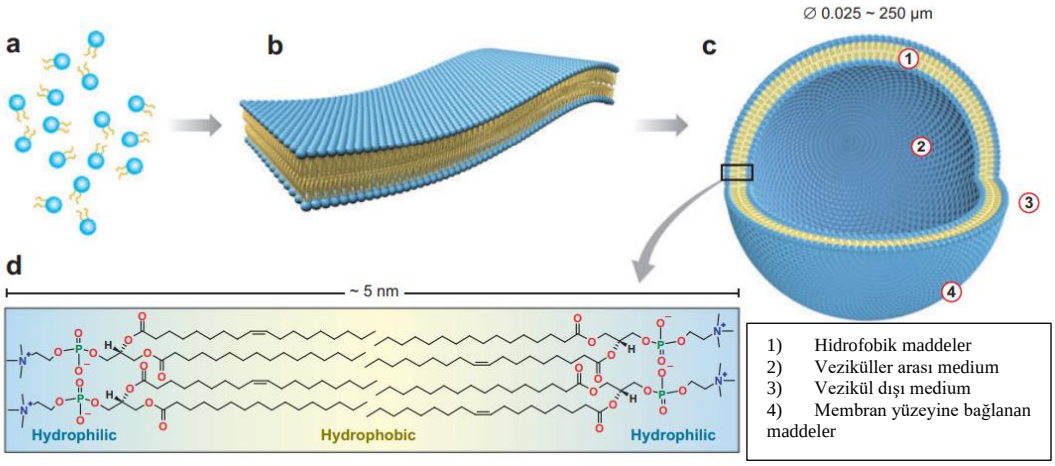
(PE) cerrahi yanak içi yaralarında epitelyal onarımı teşvik ettiği, oral ülserlerde ve diş pulpasındaki kolajenin miktarını, tipini ve yoğunluğunu arttırdığı ve aynı zamanda inflamatuar fazda mast hücrelerinin üretimini azalttığı rapor edilmiştir (Margo-Filho vd., 1994; Zulhendri vd., 2021; Barrosa vd., 2012). Oral tekrarlayan aftöz ülserden muzdarip hastalarda yapılan araştırmada, niozomal propolis yüklü muko-yapışkan filmlerle tedavi edildiklerinde, ilaç verilen grupta ülser boyutunda azalmanın başlangıcı ikinci ve üçüncü günlerde elde edilirken, plasebo grubunda, bu günlerde ülser boyutunda herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Deney grubundaki hastaların yarısında ülserin ilk 5 gün içinde tamamen iyileştiği görülürken, plasebo grubundaki hiçbir hastada aynı tedavi günlerinde ülser iyileşmesi kaydedilmemiştir (Arafa vd., 2018).

PE'nin hem nutrasötik hem de farmasötik uygulamalardaki ana dezavantajı suda düşük çözünürlüğüdür. Örneğin propoliste bulunan ve terapötik etkinliğinde önemli bir rol oynayan kafeik asit fenetil ester gibi oldukça aktif moleküller ve flavonoidlerin çoğu suda çözünmez (Mendez-Pfeiffer vd., 2021). Kapsülleme propolisin çözünürlük dezavantajına çözüm olabilir ancak kapsülleme sisteminde kullanılan taşıyıcı malzemelerin gıda ve ilaç sektöründe güvenle kullanılabilmesi için toksik olmaması, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu olması da gerekir (Tzankova vd., 2019; Zhang vd., 2018).

2.2.2 Lipozom

Lipozomlar, sulu bir fazı hapseden bir veya daha fazla lipit (genellikle doğal ve sentetik fosfolipidler) iki katmanından oluşan mikroskobik küresel yapılardır. Bazen "kesecikler" olarak da adlandırılabilirler (Has ve Sunthar, 2020). Doğal membranların analogları olarak lipozomlar genellikle saf lipitlerden veya lipit karışımlarından kendiliğinden, kendi kendine organizasyonla oluşur (Şekil 2.5) ve bu durumda tek katmanlı bir kesecik oluşur. Şekil 2.5 ‘de fosfolipit moleküllerinden (a) çift katmanlı membran yaprakçıklarına (b) ve ardından lipozomlara (c) dönüşüme kadar kendi kendine oluşma sürecinin şematik gösterimi görülmektedir. Tek bir çift katman tipik olarak ∼ 5 nm kalınlığındadır ve hidrofobik kuyrukları birbirine bakacak ve hidrofilik baş grupları iç ve dış sulu ortama (d) bakacak şekilde düzgünce düzenlenmiş ayrı ayrı lipit moleküllerinden oluşumu şekilde gösterilmiştir. Lipozom oluşumunda, hidrofilik bir baş grup ve hidrofobik bir

kuyruktan oluşan çözünmüş fosfolipid molekülleri, kendilerini çevreleyen ortamdaki çözünürlükleri azaldıktan sonra kendiliğinden bimoleküler lipit yaprakçıkları halinde birleşir (Jesorka ve Orwar, 2008). Emilim etkinliği düşük olan ilaçların oral biyoyararlanımı arttırmak için lipozom kapsülasyon sistemleri kullanılmaktadır (Alavi vd., 2017). Lipozomlarbiyouyumlu olmaları, biyobozunur olmaları, toksik olmamaları, hem hidrofilik hem de hidrofobik maddeleri kapsüllemeleri ve çeşitli hücre yüzeylerine güçlü yapışmaları nedeniyle kapsülleme sistemleri olarak büyük ilgi görmektedir (Li vd., 2019). Hem hidrofilik ajanları iç sulu çekirdeklerinde, hem de lipofilik ajanları membran bölgelerinde kapsülleme eğilimleri vardır. Genel olarak, hidrofobik ajanların kapsülleme verimliliği (EE), hidrofilik ajanlarla karşılaştırıldığında her zaman daha yüksektir çünkü hidrofobik ajanlar lipit membran yapıya sıkı bir şekilde yerleşebilirler (Has ve Sunthar, 2020).



Şekil 2.5 Lipozom yapısı (Jesorka ve Orwar, 2008).

Lipozomların en önemli dezavantajları, kolloidal stabilitelerinin düşük olması, depolama sırasında kapsüllenmiş materyallerin dışarıya sızması ve düşük su çözünürlüğüne sahip nutrasötikler için yetersiz yükleme kapasitesidir (Li vd., 2023; Tan vd., 2021). Lipozomların stabilitesini arttırmak için, fosfolipitlerin yağ bileşiminin değiştirilmesi, lipozomların yüzeyinin polimerlerle kaplanması (Klemetsrud vd., 2013) ve adsorbe olmayan bir taşıyıcı malzeme (He vd., 2019; Karadag vd., 2013) varlığında polimer kaplı lipozomların toz haline getirilmesi ve lipozomların film yapılarına (Freitas-Zompero vd., 2015; Valencia-Sullca vd., 2016) yerleştirilmesi gibi yöntemler önerilmektedir.

2.2.3 Elektrospinleme Sistemi

Elektrik alan yardımıyla polimer çözeltisinden ürün elde etme işlemi üretilen ürünün yapısına göre ikiye ayrılmakta ve ultra ince sürekli lifler üretildiğinde 'elektrospinleme', küresel partikül üretildiğinde ise 'elektrospreyleme' teknolojisi olarak adlandırılmaktadır. Bu işlemlerin tümüne ise 'elektrodinamik atomizasyon' adı verilmektedir (Drosou vd., 2017). Elektrospinleme ve elektrospreyleme için tipik kurulum dört ana bileşenden oluşur: (i) doğru akım modunda çalıştırılan bir yüksek voltaj kaynağı (1-30 kV), (ii) bir nozzle ve şırınga sistemi, (iii) bir şırınga pompası ve (iv) düz bir plaka veya dönen bir tambur şeklinde topraklanmış bir toplayıcı plaka. Elektrohidrodinamik süreç, birkaç mikrometreden onlarca nanometreye kadar değişen çaplarda üretilebildiği için polimer liflerin veya parçacıkların üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Lif veya parçacık morfolojisi ve çapı çok sayıda faktöre bağlıdır. Bu özellikler arasında polimer çözeltisinin tipi, yapısı, viskozitesi, esnekliği, elektriksel iletkenliği, polaritesi ve sıvı dispersiyonun yüzey gerilimi yer alır. Ek olarak, uygulanan elektrik alanının gücünün, şırınga-kollektör arasındaki mesafenin ve polimer çözeltisinin besleme hızının lif veya parçacık özelliklerini etkilediği bilinmektedir **(**Li ve Xia, 2004**)**.

Son yıllarda lipozomların elektrospinlenmiş liflere entegrasyonu büyük ilgi görmüş ve farklı gıda ve tıbbi alanlardaki uygulamalar için önemli potansiyel göstermiştir (Tan vd., 2018; Xu vd., 2020; Hasanbegloo vd., 2023; Feng vd., 2019). Yüksek gözenekliliğe ve yüzey-hacim oranlarına sahip lifler, aktif maddenin daha iyi yükleme kapasitesi ve kapsülleme verimliliğine, gelişmiş çözünürlüğe ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe olanak sağlar (Amjadi vd., 2020). Lipozom-nanolif entegrasyonuna yönelik son yıllarda yapılan bazı çalışmalar şöyledir: Hasanbegloo vd. (2023) yaptıkları bir çalışmada, meme kanseri tedavisi için paklitaksel yüklü lipozom yüklü kitosan (çekirdek)/poli-ε-kaprolakton (PCL)-kitosan (kabuk) nanolifleri üretmişler ve liflere lipozomun dahil edilmesiyle tümör ağırlığının azaldığını bildirmişlerdir. Mickova vd. (2012) ise, potansiyel bir ilaç dağıtım sistemi olarak, bir enzimi (yaban turpu peroksidazı) kapsüllemek, enzimin aktivitesini korumak ve gövdeyi güçlendirmek ve kök hücre aktivitesini arttırmak için fosfatidilkolin (PC) lipozomlarını polivinil alkol (PVA) (çekirdek)/PCL (kabuk) liflerine dahil etmiştir. Feng vd. (2019), somon kalsitonini-bir peptit

hormonu kapsüllemek için PC lipozomları ile gömülü PVA (çekirdek)/aljinat-polietilen oksit (PEO) (kabuk) lifleri üretmişler ve ortaya çıkan nanoliflerin, simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvısında peptidin salınımını geciktirdiğini görmüşlerdir. Feritas Zompero vd. (2015) karotenoidin UV fotostabilitesini arttırmak için PVA ve PEO karışımlarının elektrospinlenmiş liflerine ß-karoten yüklü lipozomlar eklemişlerdir. Alehosseini vd. (2019) kurkumin yüklü PC lipozomlarını zein ve jelatin karışımlarının elektrospinlenmiş liflerine eklemişler ve lipozom ilavesi, kurkuminin protein liflerindeki çözünürlüğünü arttırdığını ve kurkuminin sürekli salınımını desteklediğini raporlamışlardır. Zein ve jelatinin her ikisi de iyi biyouyumluluk, biyobozunurluk ve mukoadezifliğe sahip doğal biyopolimerlerdir ve bu polimerlerin karışımı, çeşitli uygulamalarda elektrospinlenmiş liflerin üretiminde kullanılmıştır (Surendranath vd., 2023; Ahmadi vd., 2024).

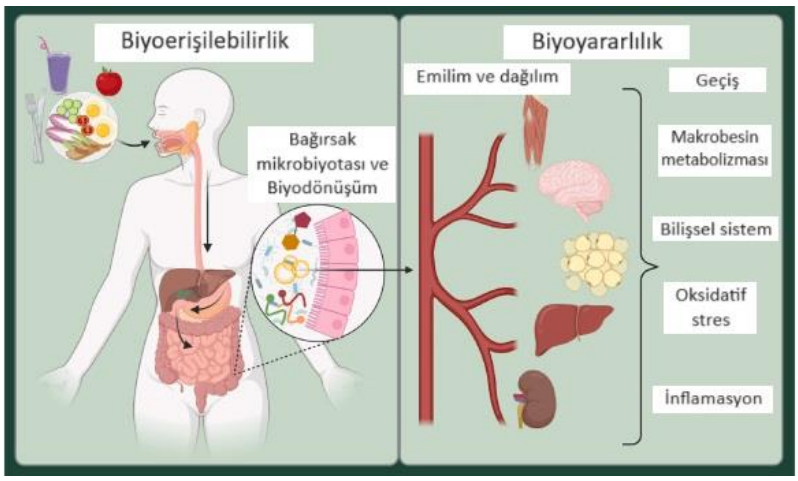
2.2.4 Yara ve Ağız Yaraları İyileşmesi

Deri, patojenlere ve çevresel faktörlere karşı vücudun ilk bağışıklık savunma hattı olarak hizmet eder ve bütünlüğü yaralar nedeniyle tehlikeye girdiğinde çeşitli enfeksiyonlar için potansiyel bir yol sağlar. Hem oral hem de kutanöz yaralarda yara iyileşmesinin benzer aşamaları meydana gelir, oral yaralar diğer yaralardan farklı olarak hızla iyileşir ve oral fibroblast ve ağız epitel hücrelerinin hızlı onarımına bağlı olarak bir miktar yara izi bırakır (Jongjitaree vd., 2022). Ağız yaraları, hastalar için günlük yaşam kalitesini düşüren çiğneme, yutma ve konuşma güçlüklerine sebep olur ve bunlar hastalar için acı verici deneyimlerdir. Ağız yaraları, bakteriler açısından zengin sürekli ıslak kalan bir ortamda meydana gelir ve sürekli olarak hem endojen tükürük salgısına hem de yiyecek veya içecekten eksojen su atımına ve ayrıca mekanik hareketlere maruz kalır (Galler vd., 2021; Vieira vd., 2022). Bu yaralara uygulanan terapötik ajanlar, ağız gargaraları, filmler, merhemler veya jeller vasıtasıyla topikal olarak uygulanır ve bu yöntemlerde tedavi edici matris, genellikle tükürüğün akması, yutulması ve ağız hareketinden zarar görür, bu da terapötik ajanların ağız yarası bölgesinde kalma süresini ve ilacın dağılımını etkiler (Sun vd., 2022). Bu nedenle, muko-yapışkan sistemlerin kullanılması, formülasyonların ağız mukozası ile uzun süreli temasını koruyabilir ve daha uzun emilim süresini beraberinde getirerek daha iyi bir etki sağlar.

2.2.5 Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık

Gıda matrislerinin yemek yeme sırasında ilk fiziksel dönüşümü ağızda meydana gelir ve çiğneme, gıdaların sindiriminin ilk adımı olarak kabul edilir. Çiğneme, yiyeceğin küçük parçalara öğütülmesi ve bu parçaların yutulabilecek bir sıvı karışımı oluşturacak şekilde tükürükle doyurulmasından oluşur. Partikül boyutunun küçültülmesi, sindirim enzimlerinin harekete geçmesi için mevcut yüzey alanını genişletir, böylece genel sindirim verimliliği ve biyoaktif bileşenlerin gastrointestinal emilimi artar (Palafox-Carlos vd., 2011). Biyoyararlanım, bir biyoktifin sindirilen, emilen ve normal metabolizmada kullanılan oranı olarak tanımlanırken biyoerişilebilirlik, GI yolaklarda sindirildikten sonra bağırsakta emilmeye hazır olan besin maddesinin miktarı olarak tanımlanır (Hedren vd., 2002). Bu tanımlara göre, biyoyararlanım biyoerişilebilirliğe bağlıdır (Şekil 2.6). Biyoaktif bileşen olan fenolik bileşiklerin ve polifenollerin çoğunluğu yiyecek ve içeceklerin tüketilmesinden sonra bağırsaktan emilir ve bağırsak duvarından geçerek kan dolaşımına karışırlar (Lafay ve Gil-Izquierdo, 2008). Her bir fenolik bileşenin biyoerişilebilirliği ve biyoyararlılığı büyük ölçüde farklılık gösterir ve oral yolla alınan bileşenlerde/gıdalarda en fazla bulunan fenolik bileşenlerin, hedef dokularda aktif metabolitlerinin en yüksek konsantrasyonda bulunmasına yol açması gerekmez. Fenolik bileşiklerin in vivo etkileri sadece gıdalarda bulunan konsantrasyonlarına bağlı değil aynı zamanda sindirim sırasında ve sonrasındaki biyoerişilebilirliğine ve biyoyararlanımlarına da bağlıdır. Gıda kaynağı ve gıdada bulunan diğer fitokimyasallar ve biyomoleküllerle kimyasal etkileşimler gibi çeşitli faktörler fenolik bileşenlerin biyoyararlılığına müdahale etmektedir (Parada ve Aguilera, 2007). Fenolik bileşikler genellikle gıda matrisini oluşturan karbonhidratlar, lipitler ve proteinler gibi farklı makromoleküllerle karışık-katı halde bulunur. Katı matrislerden fenolik bileşiklerin biyoerişilebilirliğine ilişkin araştırmalar önemlidir, çünkü yalnızca gıda matrisinden salınan ve/veya ince bağırsakta emilen bileşikler potansiyel olarak biyoyararlanımlıdır ve yararlı etkilerini gösterebilecek durumdadır (Tagliazucchi ve diğerleri, 2009). Sonuç olarak, biyoaktif bileşenlerin bağırsak epitelyal hücre bariyeri boyunca taşınması, in vivo biyoyararlanımın önemli bir belirleyicisidir. Bir bileşiğin biyoyararlanımını ölçmek için çeşitli *in vivo* ve *in vitro* yöntemler mevcuttur (Fossati vd., 2008).

Potansiyel bağırsak geçirgenliğini değerlendirmek için en yaygın kullanılan köklü yöntem, Caco-2 hücrelerinin tek katmanı boyunca bileşik akışının ölçülmesidir. Caco-2 hücreleri sıkı bağlantılar oluşturur ve mikrovilluslar geliştirir, fırça kenar enzimlerini, büyüme faktörü reseptörlerini ve başlıca biyoaktif metabolize eden enzimleri eksprese eder. Caco-2 analizlerinde iyi bir geçirgenliğe sahip bileşiklerin, insan bağırsaklarında iyi bir emilime sahip olduğu genel olarak kabul edilmiştir (Artursson, 1991). Caco-2 hücre modeli, 21 gün boyunca uygun koşullarda kültüre edildiğinde, insan bağırsak enterosit hücresini, fonksiyonel, metabolik ve biyolojik aktivite özellikleri olarak büyük oranda benzerlik gösterdiği bilinmektedir (Sambuy vd., 2005). İnsan vücudundaki bağırsak dokusuna ait emilimden sorumlu enterosit hücrelerinin en önemli özelliklerinden bir tanesi kutuplaşarak polarize olmalarıdır. Yani gıdalardan gelen besinleri alan transport proteinler (alıcılar) hücrenin bir kutbunda, bu besinleri kana veren transport proteinler (vericiler) ise diğer kutupta lokalize olmuştur. Polarize olan hücreler, insan ince bağırsak sisteminde olduğu gibi apikal (lümen veya besinlerin mideden gelerek bağırsak ile ilk temas ettiği kısım) ve bazolateral (besinlerin emildikten sonra kana verildiği kısım) bölgeler olarak özelleşmektedirler (Hidalgo vd., 1989) Bu özelliklerinden dolayı *in vivo* koşullar için hedeflenen çalışmalar öncesinde en yaygın kullanılan *in vitro* sistemdir. Caco-2 hücre modeli, besin (Gao vd., 2014), ilaç (Wilson, 1990) ve fonksiyonel maddelerin etkileri ile ilgili çalışmalarda, ayrıca biyoyararlanım çalışmaları için çok sıklıkla kullanılmaktadır (Hotz, 2005; Fairweather-Tait vd., 2007).



Şekil 2.6 Biyoerişilebilirlik ve biyorarlılık şeması

3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tezin ilk kısmı olan çift emülsiyon içine probiyotik bakteri enkapsülasyonu çalışmasında kullanılmak üzere ayçiçek yağı yerel bir süpermarketten satın alındı. Sodyum aljinat [Algogel 3001, 300–500 kDa, mannuronik-glukuronik (M/G) oranı 0,5–0,7] ve poligliserol polirisinoleat (PGPR), Cargill'den (İstanbul, Türkiye) temin edildi. Gıdada kullanılabilir kitosan laktat (%87,6 asetilasyon derecesi, pH 4,1'de viskozite = 65 cP) GTC Bio Corporation (Qingdao, Çin) tarafından bağışlanmıştır. Peynir altı suyu proteini izolatı (WPI, saflık > %90) Hardline Hipro'dan (Kavi Gıda, Kocaeli, Türkiye) sağlandı. İnülin (P95), Orafti, Beneo'dan (Artisan, Türkiye) hediye edildi. Pepsin (P7012), pankreatin (P7545), safra tuzları (P8631), Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyeri ve agar, Nil kırmızısı ve Fast yeşil, Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya),trisodyum asetat ve $CaCl_2$, Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alındı. Kullanılan diğer tüm reaktifler analitik saflıktadır. Ekşi maya örneklerinden izole edilen probiyotik özelliğe sahip *L. plantarum* ELB90, Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

Tezin ikinci ve üçüncü kısmı olan PE yüklü lipozomal nanolif üretimini hedefleyen çalışmada kullanılmak üzerelipoid S75 (%70 fosfatidilkolin), Lipoid'den (Ludwigshafen, Almanya) satın alınmıştır. Balparmak'tan (Altıparmak Gıda, İstanbul, Türkiye) propolis ekstraktını hediye etmiştir Flozein şirketindenhediye olarak alınan gıdada kullanılabilir zein ve Sigma'dan satin alınan balık jelatini (soğuk su balık derisinden jelatin), lipozomal liflerin üretiminde polimer olarak kullanılmıştır. Asetik asit (%100 anhidrat) ve etanol (%99,5, ekstra saf) sırasıyla Isolab (Türkiye) ve Tekkim'den (Türkiye) satın alınmıştır. Nil kırmızısı, Fast yeşil, glutaraldehit, MTT (3-[4,-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazolyum bromür; tiazolil mavi), müsin tip II (M2378) ve Tween 80 ise Sigma Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır. *in vitro* biyoyararlılık analizinde kullanılan Caco-2 insan kolon hücre hattı (HTB-37^{TM}) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC$^{®}$)'ndan temin

edilmiştir. Minimum esansiyel besiyeri (Minimum Essential Medium, MEM, SLM-550-500) Serox GmbH (Türkiye), esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (SH3023801), sodyum pirüvat çözeltisi (SH30239.01) ve biyoyararlanım transfer tampon çözeltisi (Earle's Balanced Salt Solution, Medium 199/EBSS, SH30253.01) ve fetal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS, SH30071.03) Cytiva/Hyclone™ (GE Life Sciences, ABD), penisilin-streptomisin (P4333), L-glutamin (G7513) çözeltileri ve 1-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenilformazan (MTT, M2003) Sigma (Almanya), 6-kuyucuklu biyoyararlanım hücre büyütme kapları (657640) Greiner Bio-One International GmbH (Avusturya) firmalarından temin edilmiştir.

3.2 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu

3.2.1 *L. plantarum* ELB90'ın W1/O/W2 Çift Emülsiyonunda Kapsüllenmesi

Bakteri stokları gliserol (400 mL L^{-1}) ile MRS sıvı besiyerinde muhafaza edilmiş, -80 °C'de saklanmış ve MRS besiyerinde ardışık iki transferle aktive edilmiştir. Hücreler, 4 °C'de 10 dakika boyunca 8600xg'de santrifüjleme yoluyla toplanmıştır. W1/O/W2 ikili emülsiyon sistemi,Juárez-Trujillo vd. (2021)' nin yönteminde bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır. İç emülsiyon fazı (W1/O) için, 288 g su kg^{-1} (bakteri dahil), 600 g ayçiçek yağı kg^{-1}, 80 PGPR g kg^{-1} ve 32 g inülin kg^{-1} karıştırılmış,.karışım 15339xg'de 5 dakika boyunca yüksek hızlı bir homojenizatör yardımıyla emülsifiye edilmiştir (UP400S; Hielscher, Teltow, Almanya). Birincil emülsiyon (W1/O), çift emülsiyonu (W1/O/W2) oluşturmak için aljinat (28,5 g kg^{-1}), WPI'den (71,4 g kg^{-1}) ve sudan oluşan W2 fazına 300 g kg^{-1} miktarında eklenmiştirKarışım tekrar yüksek hızlı homojenizatörde 15339xg'de 5 dakika homojenize edilmiş ve bu emülsiyon elektrospreyleme yoluyla jel parçacık-bead üretimi için besleme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Emülsiyon içermeyen jel parçacıklarının üretiminde kullanılacak besleme çözeltisi, son karışımda aynı miktarda (20 g kg^{-1}) aljinat, inülün ve olacak şekilde hazırlandı. Elektrospreylemenin besleme çözeltilerindeki hücre konsantrasyonu, her formülasyonda 10,5 log CFU mL^{-1} idi.

3.2.2 Çift Emülsiyon Dolgulu Jel Parçacıkların (Emulbead) Üretimi

Bead üretmek için iyonotropik jelasyon tekniği elektrosprey sistemi ile birlikte kullanılmıştır. Bu sistem, yüksek voltajlı bir güç kaynağı, bir şırınga pompası, metal iğneli bir şırınga ve manyetik karıştırıcı kullanılarak sürekli karıştırılan bir toplayıcı sistemden oluşur. Beadler, laboratuvar ölçekli bir nanolif elektropinleme ünitesi (model no. HO-NFES-0434; Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd, Kochi, Hindistan) kullanılarak besleme çözeltisinin toplayıcı çözeltiye damlama modunda elektrospreylenmesiyle üretilmiştir. Bead üretimine izin veren ilk denemelerden sonra, elektrospreyleme ünitesinin oda koşullarında (25 °C) çalışma koşulları şu şekilde belirlenmişitr: voltaj 6 kV; akım 1 μA; besleme hızı 1,2 mL sa^{-1}; ve şırınga ucu (21G) ile toplama banyosu arasındaki mesafe 9 cm.. Örnekler $CaCl_2$ (10 g L^{-1}) ve düşük moleküler ağırlıklı kitosan (2,5 g L^{-1}, 32–54 kDa) içeren toplama banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edilmiş, ardından filtre kağıdı (Whatman derecesi 4, gözenek boyutu 20–25 μm) yardımıyla beadler süzülmüş, distile su ile yıkanmış ve analize kadar +4 °C'de muhafaza edilmişitir. Üretilen beadler üretim gününde dondurulmuş (-18 °C'de 24 saat) ve 24 saat süreyle (0.0307 mbar vakum, kondansatör -50 °C'de) dondurarak kurutma cihazı kullanılarak (Martin Christ, Osterode am Harz, Almanya) liyofilize edilmiştir.

3.2.3 Kapsülleme Verimliliği (%EE) ve Canlı Bakterilerin Sayımı

Canlı hücrelerin sayısı Gao vd. (2022) ve Zhang vd. (2021)'nin yönteminde yapılan bazı değişikliklerle belirlenmişitr. Beadler (0,5 g), 15 mL trisodyum sitrat tamponunda (20 g L^{-1}, pH 8,9) çözülmüş ve gece boyunca 150 rpmçalkalayıcıda tutulmuştur. Serbest kalan hücreler, peptonlu su ile 10 kez seri olarak seyreltilerek MRS agar üzerine ekilmiş ve 37 °C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından serbest ve kapsüllenmiş suşların koloni oluşturan birimlerinin sayısı (log CFU g^{-1}) belirlenmiş ve %EE şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\%EE=(\log C/\log T)\times 100$$

C, beadlerden salınan canlı kapsüllenmiş hücrelerin hesaplanan sayısı,T, yüklenen probiyotik hücrelerin sayısına dayalı teorik hücre sayısı.

3.2.4 Çift Emülsiyon ve Emülsiyon Dolgulu Beadlerin Mikro Yapısı

Sırasıyla yağı ve emülsiyon formülasyonundaki polimerleri boyamak için kullanılan Nil kırmızısı ve Fast yeşil ile boyanmış emülsiyonların görüntülerini elde etmek için bir floresan mikroskobu (Axio Observer Z1; Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) kullanılmıştır.

Jelleşme banyosundan toplanan beadler bir optik mikroskop (CKX41; Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) altında incelenmiş ve beadlerin ortalama boyutu ImageJ (Ulusal Bilim Enstitüleri, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak en az 50 örneğe ait optik mikroskopi görüntülerinden hesaplanmıştır.

Çift emülsiyon ve emülsiyon içeren beadlerde mikro yapıyı ve yağ ve su fazının dağılımlarını gözlemlemek için bir LSM 780 konfokal mikroskopu (Carl Zeiss, Zen Software, 2012 SP1) kullanılmıştır. Yağ fazı Nil kırmızısı (561 nm), protein-polimer fazı ise Fast yeşil (488 nm) ile boyanmıştır. Tüm görüntüler Zen Softwere (sürüm 3.4, mavi baskı, Carl Zeiss) kullanılarak işlenmiştir.

Dondurularak kurutulmuş emülsiyon beadlerinin ve emülsiyon içermeyen hidrojel beadlerinin yüzey morfolojisi, bir taramalı electron mikroskobu (SEM,Quanta 450 FEG; FEI, Graz, Avusturya) ile gözlemlenmiştir. Tüm numuneler, 40 mA akım yoğunluğu kullanılarak vakum altında ince bir altın-platin tabakasıyla (Agar Manual Sputter Coater B7340; Agar Scientific, Stansted, UK) kaplanmıştır. Beadlerin morfolojisi, 500x ila 200x arasında değişen büyütmelerde düşük vakum altında ve 7 kV hızlanma voltajında analiz edilmiştir.

3.2.5 FT-IR Analizi

Dondurularak kurutulmuş emülsiyon beadlerinin ve emülsiyon içermeyen beadlerin FT-IR spektrumları FT-IR spektroskopisi (Bruker Tensor 27; Bruker GmBH, Karlsruhe, Almanya) ile karakterize edilmişitr. Ölçümler 2 cm^{-1} çözünürlükte, 4000 ila 600 cm^{-1} aralığında spektrum başına 16 taramayla gerçekleştirilmiştirAynı enstrümantal koşullar kullanılarak ölçümden önce bir arka plan hava spektrumu taranmış ve veriler OPUS, versiyon 7.2 (Bruker GmBH) kullanılarak işlenmiştir.

3.2.6 Beadlerin Jel Mukavemeti

Jel mukavemeti ölçüm yöntemi, Silva Carvalho vd. (2019) ve Karakas vd. (2022)'den uyarlanmıştır. Tek eksenli sıkıştırma testleri, bir TA-XT Plus tekstür analiz cihazı (Stable Micro Systems, Godalming, UK) ile 5- mm silindirik prob ve 5 kg'lık bir yük hücresi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Beadler, 100 µL şişe hacmine (çap, 10 mm; yükseklik, 3 mm) karşılık gelen seviyede 2 mL'lik bir cam viale (çap, 10 mm; yükseklik, 31 mm) yerleştirilmiş ve beadler 1 mm s^{-1} hızla başlangıç yüksekliğinin %70'ine ulaşana kadar sıkıştırılmıştır. Sonuçlar, numunelerin sertliğini ve sıkıştırma için gereken maksimum kuvvete karşı mukavemetini temsil eden kuvvet (g) cinsinden verilmiştir.

3.2.7 Simüle Edilmiş Sindirim (GI) Koşulları Altında Serbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Canlılığı

Simüle edilmiş ağız sıvısı (SSF), mide sıvısı (SGF) ve edilmiş bağırsak sıvısı (SIF), Minekus vd. (2014) yöntemine göre hazırlanmış ve tüm sindirim sıvıları, sterilizasyon için 0,22 µm'lik bir filtreden geçirilmiştir. Daha sonra 0,5 g bead 5 mL SSF ile karıştırılmıştır, α-amilaz (75 U mL^{-1}) ve $CaCl_2$ (0,75 mM) ilavesi sonrasında karışım 37 °C' de (pH 7) çalkalama banyosunda 2 dakika bekletilmiştir. Ağız basamağının karışımı, SGF (1:1, h/h), $CaCl_2$ (0,075 mM) ve pepsin (2000 U mL^{-1}) ile karıştırılmış ve 37 °C'de (pH 3,0) 2 saat çalkalamalı su banyosunda (100 rpm) inkübe edilmiştir. Mide basamağı karışımı, pH 7'de SIF (1:1, h/h), $CaCl_2$ (0,3 mM), pankreatin (100 U mL^{-1}) ve taze safra (10 mM) ile seyreltilmiş ve çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 2 saat süreyle daha inkübe edilmiştir. Bead içerisinde kalan hücreler, beadlerin sodyum sitrat çözeltisi ile parçalanmasından sonra açığa çıkarılmış ve her sindirim aşamasından sonra serbest ve enkapsüle sistemden geri kazanılan bakteriler MRS agara ekilerek sayılmış ve hayatta kalma oranı (%), serbest ve kapsüllenmiş bakterilerin başlangıç sayısına oranlanarak hesaplanmıştır.

3.2.8 Serbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Isıl İşlem Sonrası Canlılık Oranı

Peptonlu su içinde süspanse edilen serbest bakteriler ve beadler, pastörizasyon koşullarını temsil edecek şekilde 65 °C'de 30 dakika ve 72 °C'de 3 dakika boyunca sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Test tüplerindeki sıcaklık, termal bir ölçer kullanılarak doğrulanmıştır. Isıl işlemden sonra tüpler, oda sıcaklığına ulaşmak için

bir buzlu su banyosuna daldırılmış ve canlı hücreler MRS agara ekilerek yukarıda yönteme göre sayılmıştır.

3.3 Potansiyel Bir Yara İyileştirici Malzemesi Olarak Lipozomal PE Yüklü Jelatin-Zein Nanofilmlerinin Çift Eksenli Elektrospinleme Yöntemiyle Üretilmesi

3.3.1 Propolis Ekstraktına (PE) AitAnalizler

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu (FC) metodu ile gerçekleştirilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Toplam fenolik madde tayini için 0.2N FC reaktifi, %7.5 Na_2CO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. 0.5 mL örneğin üzerine 0.2N 2.5 mL FC reaktifi eklenmiştir. Bu karışım üzerine 2 mL Na_2CO_3 çözeltisi eklenmiş oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 760 nm dalga boyunda kontrole karşı absorbans ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin fenolik miktarı, 0.01-0.12 mg gallik asit/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi ($y=9.9837x-0.0058$, $R^2=0.991$) kullanılarak Gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden hesaplanmıştır.

Toplam flavonoid içeriği, Meda vd., 2005; Pękal ve Pyrzynska, (2014)'a göre alüminyum klorür ($AlCl_3$) kolorimetrik yöntemi ile ölçülmüştür. Uygun oranlarda seyreltilen 1 mL örneğe, 4 mL distile su, 0.3 mL %5 sodyum nitrit ($NaNO_2$) solüsyonu eklenmiştir. 5 dk sonra, tüplere 0.3 mL %10 $AlCl_3$, 6. dk'da 2 mL 1M NaOH eklenir ve son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak tüpler vortexlenir. Örneklerin absorbansı 425 (kuersetin) ve 510 (kateşin) nm'de ölçülerek, standart eğriler yardımıyla toplam flavonoid içeriği kuersetin ve kateşin eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. 0.01-0.3 mg kateşin / mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi $y=3.4378x+0.011$, $R^2=0.999$ ve 0.02-1 mg kuersetin/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi $y= 1.527x+0.0874$, $R^2=0.988$ şeklindedir.

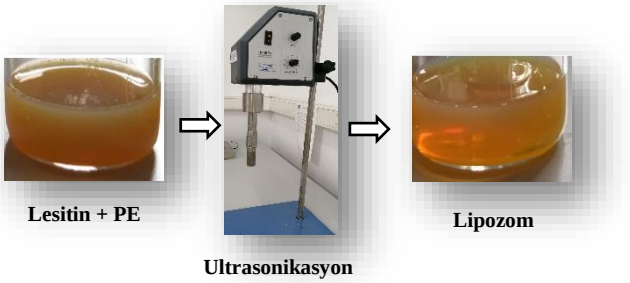
Antioksidan aktivite analizlerinde DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikal yakalama (Brand-Williams vd., 1995), FRAP (Demir iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) (Benzie ve Strain, 1996) ve ABTS [2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] radikal yakalama (Re vd., 1999) yöntemleri kullanılmıştır. DPPH analizi için uygun oranlarda seyreltilen örneklerden 0.1 mL

alınmış ve 4.9 mL DPPH çözeltisi ile karıştırılıp 20 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiş ve 517 nm'de UV-spektrofotometre (Shimadzu 150 UV-1800, Japonya) kullanılarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar literatür ile karşılaştırabilmek için mg Trolox eşdeğeri/g ve µM Trolox/g cinsinden ifade edilmiştir. Kalibrasyon grafiği 0.02-0.6 mg Trolox /mL ve 0.01-2500 µM konsantrasyon aralığında çizilmiştir, y (mg/mL) =1.6016x+0.0076 ve y (µM)= 0.0004x+0.0076, R^2=0.996 şeklindedir. ABTS stok çözeltisi 734 nm'de 0,700'lük bir absorbansa ulaşıncaya kadar saf su ile seyreltilmiştir. Uygun oranlarda seyreltilen örnekler, 0.1 mL, 2 mL ABTS eklenmiş ve 6 dk boyunca 30°C'de karanlıkta bekletilip 734 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar mg Trolox eşdeğeri/g ve µM Trolox eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir. Kalibrasyon grafiği 0.01-0.2 mg Trolox /mL ve 0.01–800 µM konsantrasyon aralığında çizilmiştir, y (mg/mL) = 3.5583x+0.0276, ve y (µM)= 0.0009x+0.0276, R^2=0.993 şeklindedir. FRAP reaktifi; 300 mM asetat tampon çözeltisi (pH 3.6), 40 mM HCl'de hazırlanan 10 mM TPTZ çözeltisi ve 20 mM $FeCI_3.6H_2O$ çözeltisini sırasıyla 10:1:1 (h/h/h) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Analiz için 100 µL örnek 900 µL su ile karıştırılmış ve 2 mL FRAP reaktifi eklendikten sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkube edilmiştir. 593 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur. Sonuçlar mg Trolox eşdeğeri/g örnek cinsinden ifade edilmiştir. Kalibrasyon grafiği 0.01-0.2 mg Trolox /mL konsantrasyon aralığında çizilmiştir, y=4.9819x+0.0263, R^2=0.992. Ayrıca $FeSO_4.7H_2O$ cinsinden de kalibrasyon eğrisi 0-1000µM konsantrasyon aralığında hazırlanmış olup y=0.0008x-0.0196, R^2=0.999 olarak bulunmuştur.

3.3.2 Lipozomların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Boş ve PE yüklü lipozomlar Shao vd., (2017) ve Karadağ vd., (2016)'nin yöntemlerine göre küçük değişiklikler yapılarak üretilmiştir. İlk olarak, %2–%5 (a/h) lesitin, PE (%0,3–%4, a/h) ve Tween 80 (%1, a/h) manyetik karıştırıcı yardımıyla etanol içerisinde çözülmüştürKarışım tamamen homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve etanol, vakum altında (40°C, 70 mmHg) döner evaporatör (Buchi-R-210, Almanya) yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kuruyan ve balon joje çeperinde film oluşturan lesitin-PE-Tween 80 karışımı ultra saf su ile çözdürülmüş ve 10000 rpm'de 5 dakika Ultra-Turrax (IKA T-18, Almanya) kullanılarak homojen

hale getirilerek bir ultrasonik prob (UP400S, Hielscher, Almanya) ile 5 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur (0,5 döngü, %60 genlik) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 PE yüklü lipozomların üretimi

Lipozomların ortalama parçacık boyutu (z ortalaması), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli, dinamik ışık saçılımı yöntemi kullanan Zetasizer Nano ZS (ZEN3601, Malvern) ile ölçülmüştür. Tüm numuneler 1000 (v/v) kat seyreltilmiş ve tüm ölçümler, taze hazırlanmış lipozomlar üzerinde numune başına üç kez tekrarlanarak yapılmıştır.

3.3.3 P Lipozomlarda PE Kapsülleme Verimliliği (%EE)

PE'nin toplam fenolik içeriği (TPC) ve toplam flavonoid içeriği (TFC), Folin-Ciocalteu (FC) analizleri sırasıyla Singleton ve Rossi (1965), Meda vd. (2005) ve Pękal ve Pyrzynska (2014)'nın yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Harici standart eğriler yardımıyla TPC değerleri gallik asit eşdeğeri (GAE) TFC ise kuersetin (QE) eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. %EE'nin belirlenmesi için PE yüklü lipozomlarda enkapsüle olmayan serbest PE Amicon® membranlı ultra santrifüj filtre (50 kDa) kullanılarak 4°C'de 4000xg'de 40 dakika santrifüj edilerek ayrılmıştır. Bu amaçla filtrenin üst kısmına 1 mL lipozom ilave edilmiş ve serbest PE filtrenin altındaki süzüntüye filtrelenmiştir, PE yüklü lipozomlar ise filtrenin üst kısmında kalmıştır. Filtrattaki serbest PE miktarı (karşılık gelen TPC), spektrofotometrik analizle tespit için düşük miktarda kalabileceğinden %EE' değerini belirlemek için her iki fazdaki (alt ve üst fazdaki)PE miktarı ölçüldü. Üst fazdaki lipozomu parçalamak ve enkapsüle olan PE'yi açığa çıkarmak için etanol ile karıştırılmış ve lesitinin çökmesi için 4000 g'de 30 dakika boyunca 4°C'de santrifüjlenmiştir. Spektrofotometrik analizler için şahit olarak kullanılması amacıyla aynı işlemler boş lipozom (PE yüklenmeyen) için de gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar tutulan kısımdaki PE'ye göre (Amicon filtrenin üst kısmı) verilmiştir, ancak değerler aynı zamanda Amicon® filtresinin alt kısmındaki serbest PE'nin hesaplanmasıyla da doğrulanmıştır.

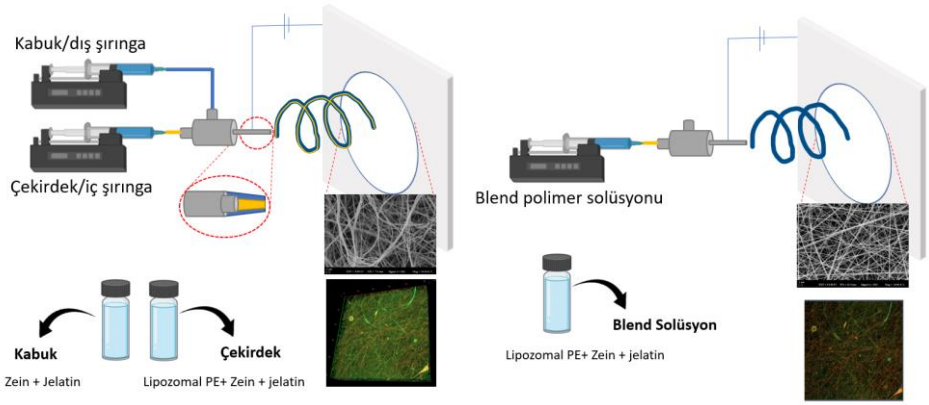
EE% = (Lipozomlardan geri kazanılan PE miktarı (TPC veya TFC)/Başlangıçta yüklenen PE miktarı (TPC veya TFC))x100

3.3.4 Lipozomların Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntülemesi

Karbon kaplı bakır gridlerin (200 mesh) üzerine bir miktar lipozomal çözelti konularak oda sıcaklığında tamamen sabitlenmesi beklenmiştir. Grid daha sonra %2'lik bir uranil asetat sulu çözeltisiyle boyandı ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Lipozom yapısının görüntüsü, dijital kamera ile donatılmış 100 kV hızlanma voltajında çalışan TEM (Hitachi HT7800, Tokyo, Japonya) ile çekilmiştir.

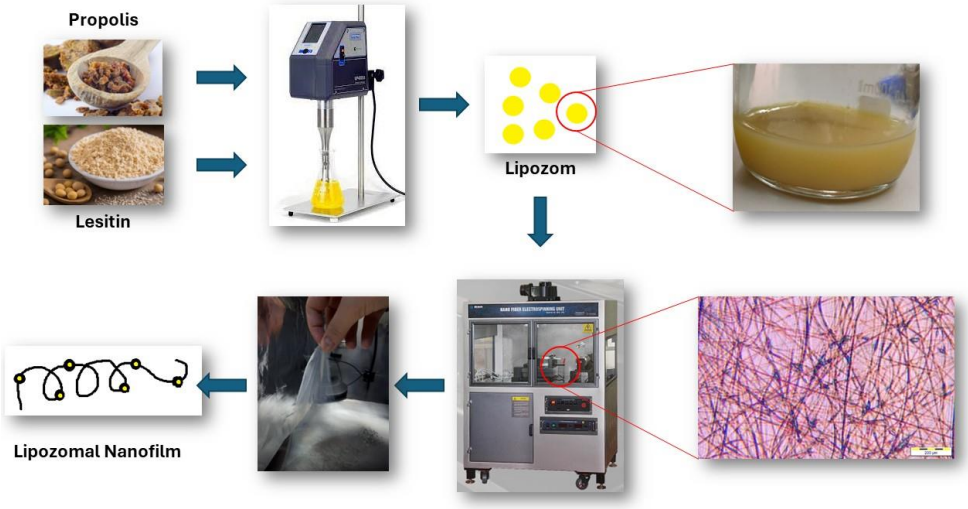
3.3.5 Elektrospinleme ile Çift Eksenli ve Tek Eksenli Lipozomal Nanoliflerin Hazırlanması

Çift eksenli nanolif üretimi için zein ve jelatin karışımı (3:1, a/a), %40'lık (a/h) bir konsantrasyonda bir asetik asit çözeltisi (%80, a/h) içinde çözülmüştür. İç şırınga çözeltisi, 3:7 (h/h) oranında sırasıyla lipozom (boş veya PE yüklü) ve zein-gelatin çözeltisinden oluşmaktadır. Dış şırınga ise yalnızca %40 (a/h) oranında zein-jelatin (3:1, a/a) çözeltisiyle hazırlanmıştır. Elektrospinleme işlemi elektrospinleme cihazında (Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd. Hindistan model no: HO-NFES-0434) gerçekleştirilmiştir. Proses parametreleri şu şekilde belirlenmiştir: 17 kV voltaj, dış şırıngada (15G–1,829 mm) 0,5 mL/saat akış hızı ve iç şırıngada (21G–0,819 mm) 0,1 mL/saat akış hızı, toplayıcı plaka ile nozül arasındaki mesafe 12 cm ve akım 5 mA. Tüm çalışmalar oda sıcaklığında (25°C) ve kabin içerisinde %50 bağıl nemde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Çift eksenli (sol) ve tek eksenli (sağ) yöntemle lipozom yüklü nanolif üretim şeması

Tek eksenli nanolif üretimi için zein ve jelatin karışımı (4:1,a/a) asetik asit içerisinde %40 (a/h)'luk çözeltisi manyetik karıştırıcı yardımıyla hazırlanmıştır ve daha sonra boş ve propolis yüklü lipozom ile 9:1, h/h oranında karıştırılarak besleme çözeltisi hazırlanmıştır. Elektrospinleme cihazı (Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd. Hindistan model no: HO-NFES-0434) ile tek eksenli lipozomal nanolif üretimi için çalışılan proses parametreleri şu şekildedir: 17 kV voltaj, 0,5 ml/saat akış hızı, toplayıcı plaka ile nozul arasındaki mesafe 12 cm ve akım 5 mA. Tüm çalışmalar oda sıcaklığında (25°C) ve %50 bağıl nemde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Lipozomal PE yüklü çift eksenli (Co-axial) ve tek eksenli (Blend) lipozomal nanolif üretim şeması

3.3.6 Lipozomal Nanoliflerdeki PE Yükleme Miktarı

Yaklaşık 0,5 g lif, 2 mL %80 (h/h) asetik asit çözeltisi ile bir çalkalayıcıda (150 rpm) gece boyunca, lifler tamamen çözünene kadar karıştırılmış, ardından çözelti etanol ile 1:1 (h/h) oranında karıştırıldı ve 7800xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştirÜst fazda TPC içeriği belirlenmiş ve hesaplanan TPC'nin yüklenen PE'nin TPC içeriğine oranla her bir gram nanolif için PE yükleme miktarı hesaplanmıştır.

3.3.7 Nanoliflerin Tekstür Analizi

Liflerin mekanik mukavemetleri, 5 kg'lık yük hücresine sahip bir Tekstür Cihazı (Stable Micro System, TAXT2Plus, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Lifler 1 mm kalınlığında şeritler halinde (60 mm x10 mm) kesildi ve ortam sıcaklığında test edilmiştir. Ortalama değer, her numune üzerinde yapılan altı ölçümden hesaplanmıştır

3.3.8 SEM, Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM) ve STEM ile Nanoliflerin Morfolojik Analizi

SEM analizi için tüm numuneler, 40 mA akım yoğunluğu kullanılarak vakum altında ince bir altın-platin tabakasıyla (Agar Manual Sputter Coater B7340, Agar Scientific, Stansted, UK) kaplanmıştır. Liflerin morfolojisi, düşük vakum, 6,5 mm mesafe ve 10 kV hızlanma voltajı altında SEM (FEI Quanta 450 FEG, Graz, Avusturya) ile analiz edilmiştir. Liflerin ortalama çapı en az 100 bölgeden boyut alınıp incelenerek Image J yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Lifler ayrıca çekirdek/kabuk yapısını görselleştirmek için taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) detektörü (Thermo Scientific Apreo 2 S LoVac) ile alan emisyon tarama mikroskobu (FE-SEM) ile analiz edilmiştir. Görüntüleme Zeiss Zen Software (2012 SP1 siyah baskı) tarafından kontrol edilen bir eş odaklı lazer mikroskobu (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) üzerinde de gerçekleştirilmiştir. Bu görüntüleme için lipozomlar, yağda çözünebilen bir boya olan Nil kırmızısıyla ve protein-polimer fazı ise Fast yeşille boyanmıştır. Nil kırmızısı ve Fast yeşil boyalar, lif üretimi öncesinde belirli miktarda etanol içerisinde çözülerek lipozom ve polimer karışımlarına damlatılmıştır.

3.3.9 Nanoliflerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik (DSC) Analizi

Liflerin termal özellikleri, nitrojen gazı akışı altında DSC (SDT Q600, TA Instruments, New Castle, DE) kullanılarak elde edilmiştir. Numune (5-8 mg) alüminyum kaplara tartılmış ve hava geçirmez şekilde kapatılmıştır. Kapatılan kaplar, 20 mL/dakika nitrojen akışı altında dakikada 10°C sıcaklık artışı ile 20-500°C arasında ısıtılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

3.3.10 Nanoliflerin FT-IR Analizi

Nanoliflerin ve diğer bileşenlerin Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları, bir FT-IR spektrofotometresi (ATR-FT-IR; Bruker Tensor 27, Karlsruhe, Almanya) kullanılarak elde edilmiştir. Tüm spektrumlar 4000-500 cm^{-1} dalga boyu aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte absorpsiyon modunda kaydedilerek alınmıştır.

3.3.11 Nanoliflerin Şişme ve Bozulma Analizi

Nanoliflerin şişme ve bozunma özellikleri, inkübasyon sırasındaki kütle değişikliklerinin izlenmesiyle belirlenmiştir. 40 mg nanolif, 20 mL fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) ve asetat tamponu (AB, pH 4.5) içine daldırılmış ve sabit sıcaklıkta ve çalkalama hızında (37°C, 70 rpm) tutulmuştur. Şişmiş lifler belirli zamanlarda alınıp, yüzeylerdeki fazla sıvı uzaklaştırıldıktan hemen sonra tartılmıştır (Wa), ölçülen bu ağırlığın liflerin başlangıç ağırlığına (Wi) oranı belirlenerek şişme oranı (%SR) hesaplanmıştır:

$$\% SR = (Wa - Wi)/Wi \times 100$$

Belirlenen zamanlarda lifler tampon çözeltilerden çıkarılarak kurumaya bırakılmıştır ve kurutulan liflerin ağırlıkları (Wt) belirlenmiştir. Bozunma oranı (%DR) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% DR = Wt/Wi \times 100$$

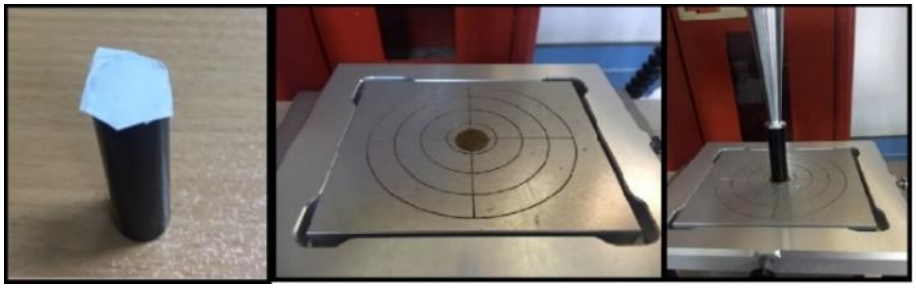
Belirlenen zamanlarda (15 dakika, 1 saat, 6 saat ve 24 saat) inkübasyon tamponlarından (PBS ve AB) çıkarılan liposomal liflerin morfolojisini gözlemlemek için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. kullanıldı.

3.3.12 Liposomal Nanoliflerdenn PE Salınımı (%)

PE'nin lipozomal liflerden salınması (%) PBS'de (pH 7.4) inkübasyon sonrasında belirlenmiştir. Analiz için en yüksek PE yüklemesine sahip liposomal nanolif (CF4) seçilmiştir. Her zaman aralığı için 20 mL PBS içeren tüplere 60 mg örnek konularak tüpler termal çalkalayıcıda (37°C, 250 rpm) inkübe edilmiş ve tüplerin içeriği 1, 2, 4, 6, 8 ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında yukarıda belirtildiği gibi Folin-Ciocalteu (FC) yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.3.13 Lipozomal Nanoliflerin *in vitro* ve *ex vivo* Mukoadezif Özellikleri

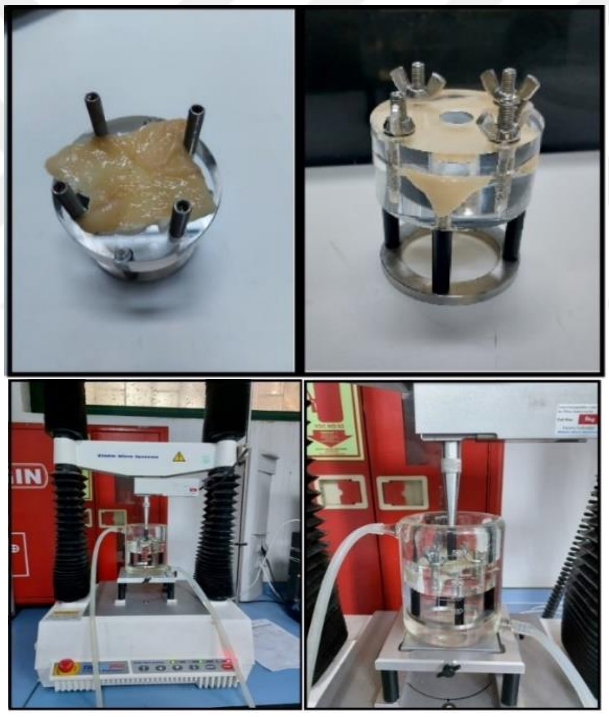
Liflerin mukoadezyonu, TA-XT2 (Stable Micro-Systems) Tekstür cihazında yapışma kuvveti (N) ve yapışma işinin (N.mm) ölçülmesiyle belirlenmiştir. *In vitro* analiz yöntemi, müsin diskleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.. Müsin diskleri hidrolik basınç makinesinde 10 ton altında 30 saniye güç uygulanarak hazırlanmıştır. Nanolifler P/10 probuna (10 mm) yapıştırılmış ve müsin diskleri metal tutucuya çift taraflı yapışkan bantla tutturulmuştur. Müsin diskleri analiz öncesinde 0,1 M PBS (pH = 7,4) ile 60 saniye boyunca ıslatılmış, fazla çözelti emici bir kağıtla uzaklaştırılmıştır. Nanoliflerin tutturulduğu prob 0,5 mm/s hızla müsin disk yüzeyine ulaşana kadar metal tutucuya doğru indirilmiş ve 100 saniye boyunca 5 kg'lık kuvvet uygulanarak müsin diskine temas ettirilmiştir (Şekil 3.4). Daha sonra, nanolifin müsin diskinden tamamen ayrılmasını desteklemek için prob 0,5 mm/s'lik sabit bir hızda kaldırılmıştır. Analizler 6 tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Mukoadezyon cihaz yazılımı kullanılarak kuvvet-mesafe grafiğinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.4 Nanoliflerin *in vitro* mukoadezyon ölçümleri (sol şekil- proba yapıştırılan nanolif, orta şekil-musin disk)

ex vivo analizde ise Moreno vd., (2018) ve Thirawong vd., (2007) belirtilen metotlar kullanılmıştır. *Ex vivo* dokusu olarak mezbaha artığı olarak yeni kesilmiş olan

koyun karkasının mide (şırdan) dokusu kullanılmıştır. Dokular analizden önce saf su ile yıkanarak sindirilmemiş gıdalar fizyolojik tuzlu suyla (%0.9 NaCl) uzaklaştırılmıştır. Mukozal membranlar, altındaki bağ dokularının ayrılmasıyla izole edilmiş ve -20ºC'de dondurulmuş ve analizden bir gece önce +4°C'de yavaş yavaş çözündürülmüş ve sonrasında analiz için 37°C' de dengeye getirilmiştir. Nanolifler silindirik proba çift taraflı bant kullanarak tutturulmuş ve mukozal mebran ise taşıyıcı kısma yerleştirilmiştir. Nanolifler mukozayla belirlenen süre ve kuvvette temas ettirilmiş, daha sonra geri çekilmiştir. Tekstür cihazının yazılımıyla, probu membrandan ayırmak için gerekli maksimum güç (F_{max}) ve probun geri çekilmesi için uygulanan toplam gücün miktarı (kuvvet-uzaklık eğrisi altındaki alan= yapışma işi Wad) hesaplanmıştır. Her örnek için Membran dokunun farklı yerlerinden 6-10 arası ölçüm yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 *ex-vivo* mukoadezyon sistemi

3.3.14 Yara Örtü Malzemesi Olarak Değerlendirmek Amacıyla Çift Eksenli Lipozomal PE Yüklü Nanoliflere Yapılan Analizler

3.3.14.1 Çift Eksenli Lipozomal Nanoliflerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Lipozomal PE yüklü lifin (CF4) antibakteriyel aktivitesi sıklıkla cilt yaralarında görülen aerobik bakterilerden olan *Staphylococcus aureus*'a (Gram-pozitif, ATCC 29213), *Escherichia coli*'ye (Gram-negatif, ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya (Gram-negatif, ATCC 27853) karşı test edilmiştir. Boş lipozom yüklü nanolif (CF4 kontrol) kontrol olarak kullanılmış ve antimikrobiyal aktivite, agar difüzyon testiyle belirlenmiştir. Nanolifler analizden önce 5 dakika süreyle UV ışığıyla sterilize edilmiştir. Kısaca, bakteri süspansiyonu (100 µL, 107 CFU/mL), besin agarından oluşan petri kaplarına yayılmış ve kesilen nanolifler üzerine yerleştirilmiştir. 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından, inhibitör etkiyi değerlendirmek için nanolifin etrafında oluşan berrak bölge ölçülmüştür. Her test aynı koşullar altında üç kez tekrarlanmıştır.

3.3.14.2 Hücre Canlılığı için MTT Sitotoksisite Testi

Lipozom yüklü liflerin (CF3, CF4 ve CF4 kontrol) sitotoksisite analizi dolaylı temas yöntemiyle belirlendi. Dolaylı analiz için, aynı boyuttaki lifler UV lamba kullanılarak 1 saat süreyle sterilize edildi ve bir hücre kültürü ortamında (DMEM) 24 saat boyunca tutuldu. Ortamın hücre canlılığı üzerindeki etkisi, 24 oyuklu plakalara ekilen HFF-1 (insan fibroblast, ATCC SCRC1041) hücreleri üzerinde test edildi. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra standart MTT (3-[4,-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür; tiazolil mavi) testi yapıldı ve hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Hücre canlılığı (%) =ODörnek/ODkontrol x100

3.3.14.3 SEM ile Hücre Yapışma Analizi

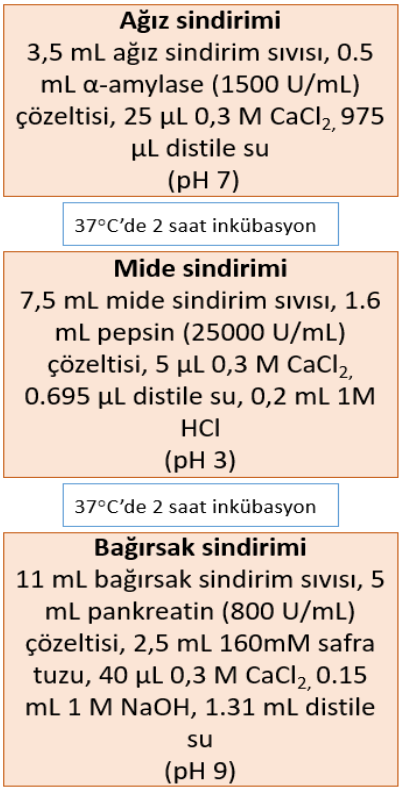
Hücre yapışma testi için, lipozomal PE yüklü nanolif (CF4), 1 saat boyunca UV lamba altında sterilize edildikten sonra kuyucuklara yerleştirilmiş,HFF-1 fibroblast hücreleri, 24 kuyucuklu düz tabanlı mikroplakaların her bir kuyucuğuna ekilmiş ve hücre bağlanması için 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücreler %2,5 glutaraldehid solüsyonu ile nanolif üzerine sabitlenmiş ve SEM analizi için bir dizi etanol solüsyonundan (%30, %50, %70, %80 ve %95)

geçirilerek saflaştırılmıştır. Ardından yukarıda belirtilen yöntem ile SEM cihazında görüntü elde edilmiştir.

3.4 Tek Eksenli PE Yüklü Lipozomal Nanolifler için Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık Analizleri

3.4.1 *in vitro* Simule Sindirim Koşullarında PE ve PE Yüklü Nanoliflerin Biyoerişilebilirliğinin Belirlenmesi

Bu amaçla, Minekus vd., (2014) tarafından tanımlanan Brodkorb vd., (2019) tarafından protokolü detaylı bir şekilde belirlenen yöntem kullanılmıştır. Serbest halde bulunan PE, PE içeren lipozomlar ve lipozamal lifler *in vitro* sindirim koşullarına maruz bırakılmıştır. PE içermeyen boş enkapsüle sistemler de aynı koşullara maruz bırakılarak analizlerde şahit numune olarak kullanılmıştır. Örnekler, ağız ortamı oluşturmak için SSF'de 2 dk karıştırılmış ve Şekil 3.6'da kısaca prensibi anlatıldığı şekilde analize devam edilmiştir. Sindirim aşamasının her basamağında alınan örnekler, santrifüjlenip, 0.45 μm filtreden süzülüp, analizlere (spektrofotometrik ve kromotografik) kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Alınan örneklerde UPLC-MS-MS analizi yapılarak fenolik kompozisyondaki değişim belirlenmiştir. Mide ve bağırsak aşamasında alınan lipozom yüklü nanolif örneklerin morfolojik analizleri konfokal mikroskop ile ayrıca gözlemlenmiştir.



Şekil 3.6 *in vitro* biyoerişilebilirlik analizi aşamaları

3.5 Caco-2 Hücreleri ile *in vitro* Biyoyararlanımın Belirlenmesi

3.5.1 Hücrelerin Bakım Prosedürleri

Caco-2 hücre hattı 75 cm^2'lik hücre büyütme kaplarında (T-75) %15 FBS, %1 esansiyel olmayan amino asit, %1 sodyum pirüvat, %1 penisilin-streptomisin ve %1 (h:h) L-glutamin çözeltileri içeren hücre besiyerinde büyütülmüştür. Hücreler, yüzey kaplama oranlarına göre pasajlanarak yeni kap ve besiyeri ortamında büyütülerek bakımları devam ettirilmiştir. İnkübasyon ortamı, %5 karbondioksit içeren 37°C inkübatör olup, tüm denemeler boyunca hücre pasajları 30-35 aralığında tutulmuştur.

3.5.2 Sitotoksisitenin Ölçülmesi

Biyoyararlanım modellerinde maddelerin test edilmesinden önce, kullanılan konsantrasyonların oluşturulan sistem için toksik olmamasının gösterilmesi önemlidir. Ayrıca verilebilecek yüksek konsantrasyonların belirlenmesi daha sonraki yapılacak enstrümental analiz ölçümleri için de önem teşkil etmektedir. Bu nedenle, MTT ajanı kullanılarak, örnek moleküller, farklı konsantrasyonlarda test

edilmiştir. MTT kullanılarak gerçekleştirilen sitotksisite testi, MTT ajanının canlı hücrelerin canlılık süresince mitokondriyal enzimleri ile kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Bu amaçla, Caco-2 hücreleri 96-kuyucuklu hücre büyütme kaplarına 4000 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 100 µL hacimde ekilmiş ve kuyucuk yüzeyini kaplamaları için genel kullanım amaçlı besiyerlerinde inkübe edilmiştir. Hücre besiyerleri, gün aşırı değiştirilerek biyoyararlanım modeline uygun şekilde kaplama sonrası süre boyunca bakımlarına devam edilmiş ve 21 günlük sürenin sonunda sitotoksisite denemesine geçilmiştir. Sitotoksisite denemesi ise biyoyararlanım modelinde kullanılacak olan EBSS besiyeri ile gerçekleştirilmiştir.

Örneklere *in vitro* GI sindirim (biyoerişilebilirlik) uygulanmış olmasından dolayı, karışım içerisinde bulunan proteazlar, 60°C sıcaklıkta 10 dk tutularak inhibe edilmiştir. Daha sonra, sindirime uğramış PE içeren zein/jelatin çift eksenli nanolif (CF4) ve nanolif içeriğindeki miktar kadar olan düşük miktarda (11,04 mg) PE örnekleri için 0.55-2.21 mg/mL, lipozomal PE (L4) örnekleri için ise 0.4-2 mg/mL aralıklarındaki konsantrasyonlar, farklılaşmış Caco-2 hücrelerine verilmiş, ardından 3 saat boyunca inkübasyonları sağlanmıştır.

Sürenin sonunda, mevcut örnek içeren besiyerleri uzaklaştırılarak 100 µL EBSS besiyeri ilavesi ile 10 µL MTT canlılık tespit ajanı (PBS içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonda) eklenmiştir. Canlı kalmış hücrelerin 4 saat boyunca MTT ajanı ile inkübasyonunun ardından mikroskop altında formazan kristallerinin oluşumları gözlenmiş ve kristallere dokunulmadan besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Ardından, 100 µL dimetil sülfoksit eklenerek formazan kristalleri pipetlenerek çözülmüş ve 570 nm dalga boyunda absorbans kaydı yapılmıştır. Herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu hücrelerinden elde edilmiş olan absorbans değeri %100 canlı kabul edilerek, örnek moleküllerin verilmiş olduğu deney grupları, kontrole göre normalize edilmiş ve sonuçlar % canlılık cinsinden verilmiştir (Morgan, 1998).

3.5.3 Caco-2 Hücreleri ile Biyoyararlanımın Belirlenmesi

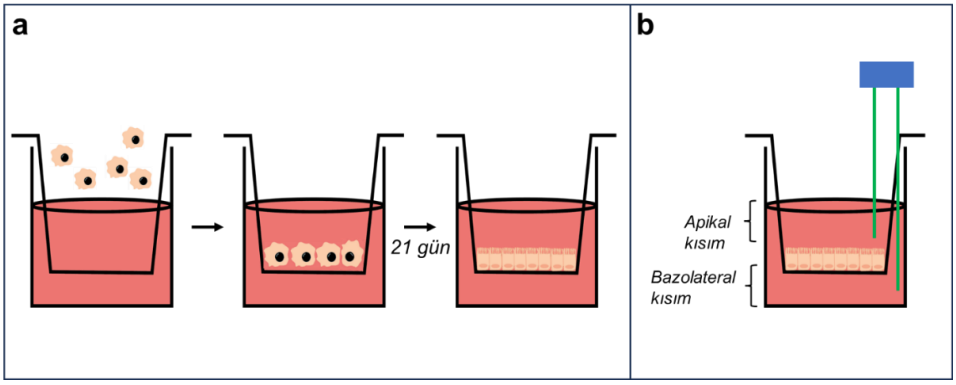
in vitro biyararlılık analizi ince bağırsak aşaması sonrası elde edilen örneklerdeki (digesta) biyoaktif bileşiklerin bağırsak enterosit hücrelerinden vücuda giriş (biyoyararlanım) parametreleri bu alanda yaygın olarak kullanılan insan kolon

epitelyal hücre sisteminin (Caco-2) özel membranlarda büyütülmesi ile araştırılmıştır. PE, lipozomal PE (L4) ve lipozomal PE yüklü nanolif (BF4) enkapsülasyon sistemleri ile çalışmaya devam edilmiştir.

Hücre kültürü çalışması Caco-2 hücreleri için, %20 sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin, %1 esansiyel olmayan amino asit karışımı, % 1 sodyum purivat içeren MEM (Essential Media) besi yeri kullanılmıştır. Hücreler, laboratuvarda 100 mm çaplı hücre kültürü kaplarında, 1.000.000 hücre/ 10 mL hazırlanmış besi yerinde, 37 ºC nemli atmosfer altında, %5 CO_2 içeren hücre inkübatöründe büyütülmüştür. Hücreler büyütülürken mycoplasma testleri rutin olarak yapılmıştır. Bu sayede bu hücre hattında en çok görülen kontaminasyon riski de kontrol edilmiştir. Caco-2 hücreleri üzerinde kullanılacak ekstraktların ve enkapsüle materyallerin (boş enkapsülasyon sistemi) hücre üzerindeki toksik etkileri olup olmadığı hem mikroskop hem de WST-8 kimyasalının biyoindirgenmesi (canlı hücrelerde NAD-NADH dönüşümü ile açığa çıkan elektronların WST-8 kimyasalını indirgemesi) sonucu açığa çıkan suda çözünebilir formazan molekülünün 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile belirlenmiştir.

Deneysel hücre hattı hazırlanırken kullanılan malzemeler ve yöntem Şekil 3.7'de belirtilmiş şekilde A ve B kısımlarında kısaca gösterilmiştir. Sistemin üst kısmı olan apikal kısım bağırsak boşluğunu, alt kısmı olan bazolateral kısım ise emilim gerçekleştikten sonra bileşenlerin nakledildiği kan dolaşımını temsil etmektedir. TEER ölçümü, apikal ve bazolateral kısımlar arasına uygulanan elektrik akımına hücrelerin gösterdiği direnç olarak ölçülmektedir.Üst kısım (apikal) besinlerin geldiği, alt kısım (bazolateral) ise besinlerin kana geçtiği bölüm olarak modellenmektedir. Deneysel hücreler hazırlanırken, ilk olarak membran üzerine 10.000 adet Caco-2 hücreleri konulmuştur. Üst taraftaki kısıma 500 µL alt kısma ise 1,5 mL hazırlanmış besi yeri ilavesi sonucunda hücrelerin büyümeleri mikroskopta düzenli olarak kontrol edilmiştir. Hücrelerin membranın tüm yüzeyini kaplaması için gerekli süre (yaklaşık 3 gün) beklendikten sonra, hücrelerin farklılaşması için toplam 21 gün süresince hücreler büyütülmeye devam edilmiştir. Çalışmanın sağlıklı şekilde gerçekleştirilmesi açısından, hücre bariyer sisteminin tam olarak istenilen düzeyde olup olmadığının takibi çok önemlidir. Hücrelerin tek bir sıra halinde boşluksuz bir yapı ve şekilde mevcut olup olmadığına hemen hemen

birçok çalışmada kullanılan (Hidalgo vd., 1989) hücre elektriksel bariyer direnci (trans epithelial electrical resistance (TEER)) değerine bakılarak karar verilmiştir (Şekil 3.7). Cihazın elektrotunun uzun olan ucu, hücrelerin bazolateral kısmının baktığı tarafa, kısa ucu ise apikal kısmının baktığı tarafa yerleştirilir ve TEER değeri ohm cinsinden ölçülür. Bu değerin, Caco-2 için en az 250 ohm/ cm^2 olması gerektiği belirtilmiştir ve bu değere hücre inkübasyonun ortalama olarak 4 günden başlayarak ulaşıldığı (Liang, vd., 2000) ve TEER değerinin 21-25. günlerde yaklaşık 900-1200 ohm/ cm^2 kadar çıktığı gözlenmiştir (Louvard vd., 1992). Bu değerler laboratuvar koşullarına göre değişmektedir. Hücrelerin tek sıra halindeki yapıları aynı zamanda kullanılacak florasans ışıma veren ve hücrelerden geçemeyecek büyüklükte olan dekstran molekülü ile de kontrol edilmiştir. Sindirim aşamasından geçmiş örnekler uygun seyreltme oranında hücrelerin apikal tarafına 500 µL transport solüsyonunda (fenol kırmızı içermeyen hücreler için tüm besin öğelerini içeren solüsyon) verilmiştir. Bazolateral kısma aynı şekilde 500 µL transport solüsyonu eklenmiş ve 3 saat sonra alt kısımdan örnekler alınmıştır. Apikal ve bazal kompartmanlardan toplanan örneklerdeki fenolik bileşenlerin miktarları UPLC-MS-MS analizi ile belirlenmiş ve başlangıçta hücrelere verilen örnek konsantrasyonlarındaki miktarları baz alınarak geçişler % olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.7 *in vitro* Biyoyararlanım Modeli. **(a)** Caco-2 hücre hattının ikili membran modeline ekilmesi, membran yüzeyini kaplaması ve 21 günlük farklılaşma süresi sonunda oluşturduğu yapı, **(b)** Transepitelyal Elektrik Direnci (TEER) ölçümü.

3.6 UPLC-MS-MS analizi

in vitro biyoyararlılık ve biyoerişebilirlik analizi sonucu PE ve PE içeren örneklerin fenolik profilleri Güzelmeric vd. (2023)'nin yöntemine göre ikili pompa, sıcaklık

kontrollü sütun bölmesi, otomatik örnekleyici ve üçlü dört kutuplu (TQ) MS/MS kütle analizörü ile donatılmış Waters® Xevo (Waters Corporation, Milford, MA, ABD) LC–MS/MS sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Ayırma için analitik bir Cortecs T3 (Waters Corporation Milford, ABD) kolonu (2.1× 150 mm, 1.6 µm) kullanıldı. Mobil faz iki çözücüden oluşmaktadır (A) asitlendirilmiş su (%0.01 asetik asit, v:v) ve (B) asetonitril: metanol (80:20, v:v). Gradyan akış hızı 0.25 µL/dak idi. Gradyan elüsyon koşulları : 0–1.30 dakika, %2 B; 1.30–35 dk, %2–%55 B; 35–37 dk, %55–%95 B; 37–37.01 dk, %95–%2 B ve 37.01–40 dk, %2 B. Kolon sıcaklığı 30°C ve enjeksiyon hacmi 5 µL. LC'den elüt edilen numuneler, çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda ESI-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. ESI-MS/MS'in iyon kaynağı ve desolvasyon sıcaklığı sırasıyla 150 ve 450°C'ye ayarlanmıştır. LC–MS/MS verileri, Target Lynx Programında (Waters®) Waters® Mass-Lynx yazılımı kullanılarak işlenmiştir. Her bir fenolik standardı, alıkonma sürelerinin, iyonizasyon modunun, öncü iyon enerjisinin, kılcal voltajın ve fragman iyonlarının ve koni voltajı, çarpışma gibi optimal MRM geçiş parametrelerinin belirlenmesi için UPLC-MS/MS sistemine ayrı ayrı enjekte edilmiştir. Metanol (2 mg/mL) içerisinde bir standart çözelti stoğu hazırlanmış ve 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/L konsantrasyonlarda kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Filtrelenen numuneler asitlendirilmiş metanol: su (1:1, v/v, %0.01 asetik asit) ile seyreltilmiştir. Standartlar olarak ise, 3.4 dimetoksi sinamik asit, apigenin, kafeik asit, CAPE (kafeik asit fenil ester), krisin, ferulik asit, galangin, kamferol, luteolin, naringenin, p-kumarik asit, pinobanksin, pinoçembrin, kuersetin, transsinamik asit kullanılmıştır.

3.7 İstatistiksel Analiz

En az iki tekrar sonucu elde edilen örneklerde tüm ölçümler üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz SPSS, versiyon 20 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Ortalama değerler arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiş ve $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Probiyotik Enkapsülasyonu

4.1.1 Çift Emülsiyonun ve Emülbeadlerin Mikro Yapısı

W1/O/W2 emülsiyonlarının optik ve floresan mikroskop görüntülerinde (Şekil 4.1 (a)), çoklu yapılar ve birkaç küçük iç su damlacığı içeren yağ kürecikleri gözlemlenebilir. Floresan ve CLSM görüntülerinde yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla yağ damlacıklarını ve proteinleri temsil etmektedir. Üst üste çakıştırılan görüntülerinde (Şekil 4.1 A4 ve B2) damlacıkların etrafındaki kırmızı renk yüzeylerde adsorbe edilen protein katmanlarını temsil ederken,içi boş koyu halkalar, ikili emülsiyondaki birincil su fazı olabilir. Şekil 4.1. C ve D'de, emülsiyon damlacıklarının mikro yapısı da incelenmiştir, Şekil 4.1.C'de beadlerin etrafında kırmızı bir katman varmış gibi görünse de, bu durum flüoresan ışığı çekirdeğe ulaşamadığı için daha ince olan kenarda oluşan polimerle kaplı yüzeyin optik bir yansımasıdır. Bununla birlikte, Şekil 4.1.D'de, yağ fazının beadler boyunca eşit dağılımı CLSM ile görselleştirilebilmiştir. Tablo 4.1'de gözlemlendiği üzere inülin ilavesi ve kitosan kaplama beadlerin parçacıkbüyüklüğünü artırmıştır.

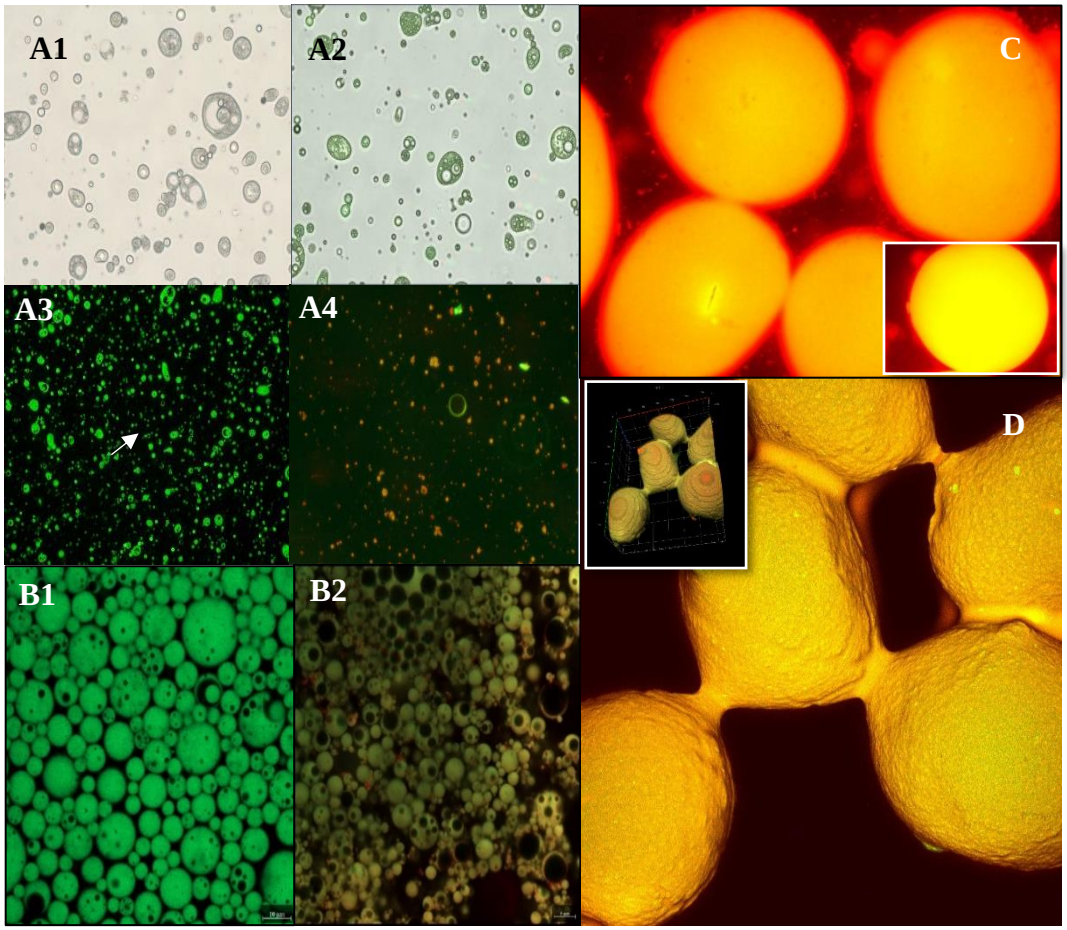
Tablo 4.1 Emülbeadler ve emülsiyon içermeyen beadlerin parçacık boyutu, jel gücü ve enkapsülasyon etkinliği

Örnek	Boyut (µm)	Jel Gücü (gel strength) (force, g)	Enkapsülasyon etkinliği (%)
I0C0	923.17 ± 28.02^{e}	20.01 ± 2.59^{b}	85.89 ± 0.05^{c}
I0C1	1030.2 ± 63.36^{d}	19.58 ± 0.96^{b}	83.66 ± 0.47^{c}
I1C0	1610.25 ± 91.00^{b}	19.00 ± 1.44^{b}	87.44 ± 0.04^{a}
I1C1	2003.15 ± 89.62^{a}	18.70 ± 0.10^{b}	86.30 ± 0.29^{b}
B-C0	981.62 ± 42.72^{d}	23.71 ± 1.16^{a}	87.08 ± 0.04^{a}
B-C1	1094.02 ± 117.06^{c}	21.40 ± 0.64^{ab}	85.95 ± 0.05^{bc}

İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler; B-C0 ve B-C1, emülsiyon içermeyen kitosan kaplı ve kaplanmamış beadlerdir. Değerler ortalama ± standart sapma (n = 3) olarak sunulur. Farklı harflere sahip örnekler önemli ölçüde farklıdır ($P < 0.05$).

Emülbeadlerde, formülasyona inülinin ilave edilmesi parçacık boyutunu kitosanla kaplanmamış beadlerde 923.17'den 1610.25 µm'ye ve kitosan kaplı olanlarda ise 1030'dan 2003 µm'ye çıkarmıştır. Mar vd., (2021), besleme

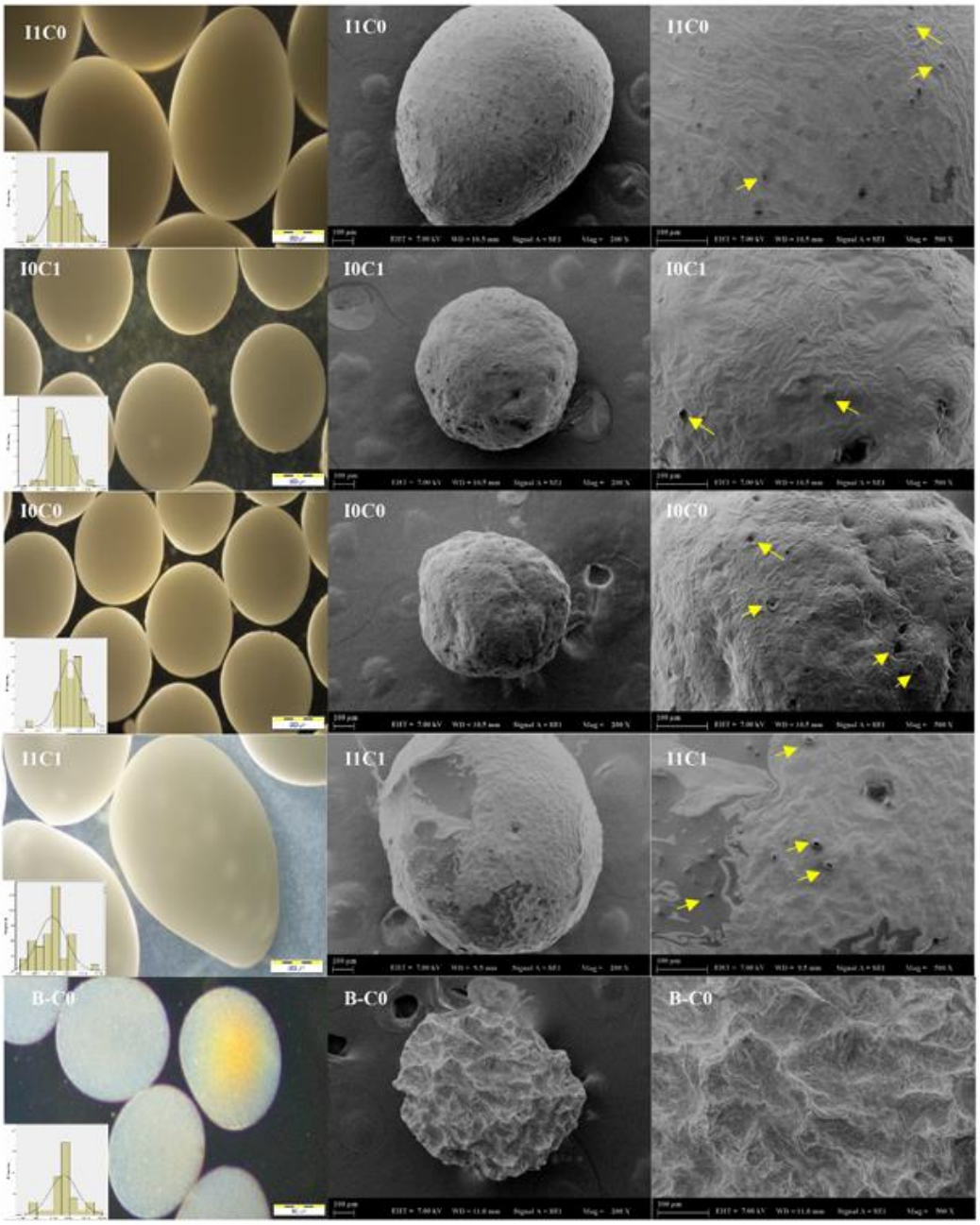
solüsyonunun viskozitesinin beadlerin parçacık boyutu üzerindeki etkisi olduğunu, dolayısıyla aljinat çözeltisine inülinin eklenmesinin viskoziteyi ve beadlerin partikül boyutunun arttrdığını bildirmiştir.



Şekil 4.1 (a1-2) Optik mikroskop görüntüleri (40X); **(A3-4)** W1/O/W2 çift emülsiyonunun floresan mikroskopi görüntüleri (20X); **(B1-2)** Çift emülsiyonun konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) görüntüleri, ölçek çubuğu 10 µm (B1) ve 5µm'yi (B2) temsil eder; **(C)** Emülbeadlerin floresan mikroskopi görüntüsü (5X), **(D)** Emülbeadlerin üst üste çakışmalı CLSM görüntüleri. Yeşil ve kırmızı renk sırasıyla yağ ve su fazlarıdır.

Kitosan kaplama ile boyutun artması, her ikisi de jelleşme ortamında birlikte bulunduğunda Ca^{2+} iyonları ve kitosan arasındaki rekabetin sonucu gerçekleşmiş olabilir, Ca^{2+} ile daha az bağlanma, daha büyük boyutlu daha gevşek bir yapı üretilmesine sebep verebilir (Karakas vd., 2022). İnülin içermeyen beadlerin (Şekil 4.2) optik mikroskop görüntüleri daha küresel bir yapıya sahipken, inülin ilavesiyle küresellikte deformasyonmeydana gelmiş ve daha fazla elipsoid beadler üretilmiştir. Emülsiyon içermeyen hidrojel beadlerle karşılaştırıldığında, besleme solüsyonuna inulin içermeyen emülsiyonun dahil

edilmesiyle beadlerin boyutu ve şekli değişmemiştir. Dondurularak kurutulmuş beadlerin morfolojisi (SEM görüntüleri) karşılaştırıldığında (Şekil 4.2), emülbeadlerin neredeyse hiç kırışıklık göstermeyen daha pürüzsüz bir yüzeye sahip oldukları, emülsiyon içermeyen hidrojel beadlerin ise yüzeyinde kırışıklar, büzülmeler, yapısında büzüşmeler olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi hidrojel matrisi içinde hapsolmuş olan suyun SEM için örnek hazırlanan dondurarak kurutma aşamasında süblimleşmesi, yapının büzülmesi ve çökmesi olabileceği önceki çalışamalarda belirtilmiştir (Ramos vd., 2018). Emülbeadlerde ise yağ damlacıklarının varlığı, emülsiyon içermeyen hidrojel beadlerde meydana gelen yapının çökmesine sebep olan güçlere karşı sistemin fiziksel olarak dayanmasını sağlamış olabilir. Bulgularımıza benzer şekilde, Li vd. (2023) O/W emülsiyonunun aljinat çözeltisiyle karıştırılmasının, yalnızca aljinatla üretilen beadlere kıyasla pürüzsüz yüzeye sebep olduğunu bildirmiştir. Dondurularak kurutulan emülsiyon beadlerde, yüzeylerde bazı yağ damlacıklarının yüzeye migrasyonu sonucu olabilecek koyu renkli çıkıntılar gözlenmiştir. Kaplanmamış beadlerde (I1C0 ve I0C0) bu çıkıntılarınsayıları daha fazladır ve bead yapısı daha fazla çökmüş veya sönmüşken, kitosan kaplı beadlerde bunların sayıları daha azdır ve yapı daha fazla korunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Emülbeadlerin ve emülsiyonsuz hidrojel beadlerin optik mikroskop görüntüleri (solda) ve SEM görüntüleri (ortada ve sağda). İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler ve B-C0, kitosan kaplaması olmayan emülsiyon içermeyen beadlerdir.

4.1.2 Beadlerin Enkapsülasyon Verimi (%EE) ve Jel Gücü

L. plantarum ELB90'ın emülbeadlerde (I0CO, I1C1, I0C1, I1C0) ve emülsiyon içermeyen hidrojel beadlerinde (B-C0 ve B-C1) enkapsülasyon verimi Tablo 1'de verilmiştir. Emülsiyon üretiminde uygulanan homojenleştirme dahil işlem adımları ve bead üretiminde uygulanan elektrosprey ekstrüzyonu, doğası gereği sert koşullar

içermediğinden (yüksek sıcaklık, yüksek basınç vb.), üretilen beadlerde yüksek bakteri canlılığı elde edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da sonuçlarımızaparalel olacak şekilde, yüksek %EE, çift katlı emülsiyonlar sistemleri (Pimentel-Gonzalez vd., 2009) ve emülbeadler (Frakolaki vd., 2020) için rapor edilmiştir. İnülin ilave edilen örneklerde %EE (%86.30-87.77), inülin içermeyen örneklere (%85.75-85.98) kıyasla bir miktar daha yüksektir. Kitosan kaplama, muhtemelen antimikrobiyal aktivitesinden dolayı formülasyonlardaki %EE'yi azaltmış olabilir, benzer bulgular Frakolaki vd. (2020) ve Yonekura vd. (2014)'nin yaptıkları çalışmalarda da elde edilmiştir.

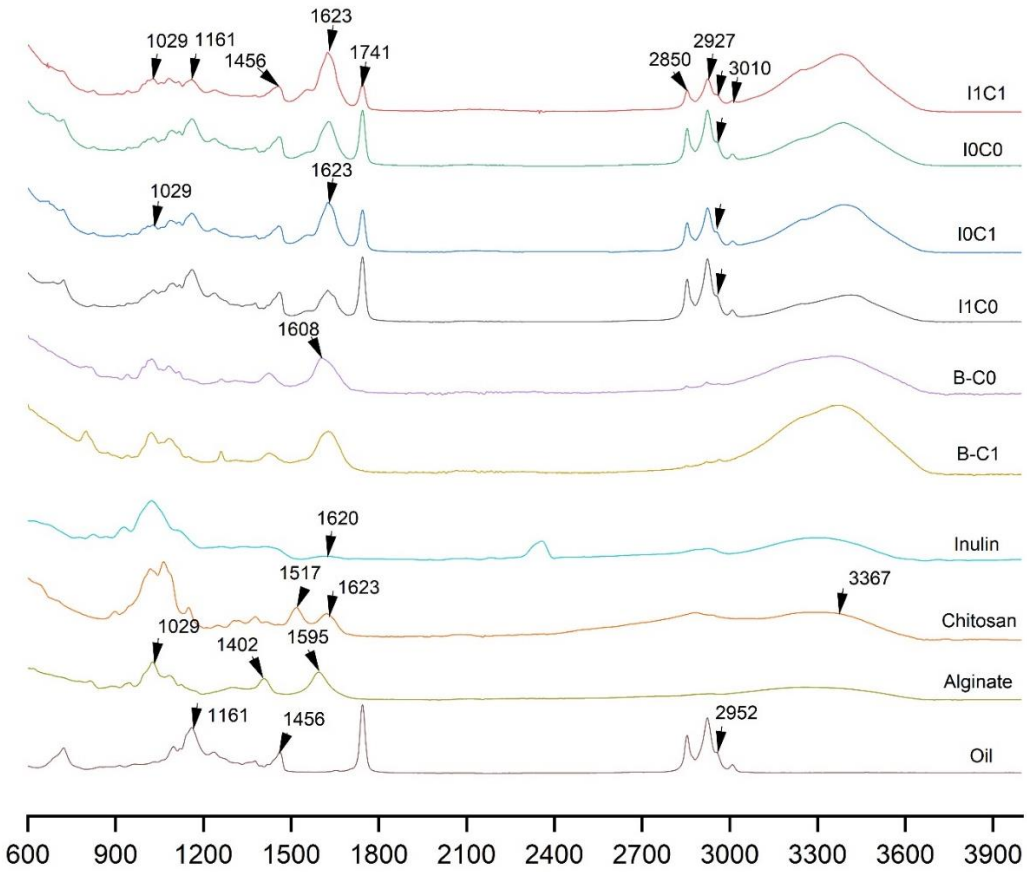
Hidrojel beadlere yüklenen emülsiyon damlacıkları, jel matrisiyle emülsiyonu stabilize etmek için kullanılan emülgatör arasındaki etkileşime bağlı olarak, aktif veya aktif olmayan dolgu maddesi olarak işlev gösterebilir. Aktif dolgu maddesi olarak işlev gösteren emülsiyon damlacıklarının, jel yapısını güçlendirmek için jel matrisine bağlanması ve uygulanan kaymaya karşı yapıyı daha dirençli hale getirmesi beklenir. Aktif olmayan dolgu maddesi ise jel yapısıyla etkileşime girmeyecektir. Bizim sistemimizde bead yapının polimeri olanaljinat ve emülsiyon bileşenleri arasında aktif almayan bir etkileşim olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, emülsiyon damlacıklarının jel matrisi ile eşleşmesi olmadığından yapıyı deforme ederek jelin deformasyona karşı daha az direnç göstermesini sağlamış olabilir (Ching vd., 2016). Sistemimizde hem aljinat hem de WPI negatif yüke sahiplerdir, bu nedenle WPI ile stabilize edilen yağ damlacıklarınının inaktif dolgu maddesi olarak hareket etmesi beklenebilir bir sonuçtur ve dolayısıyla emülbeadlerde ölçülen düşük jel mukavemeti, jel ağının olası zayıflamasından kaynaklanmış olabilirKitosan ile kaplama jel kuvvetini düşürmesine rağmen örnekler arasındaki fark önemli bulunmamıştır ($p<0.05$). Kitosan kaplamanın sebep olduğu jel mukavemetindeki azalma, kitosanın matrisi oluşturan polimer zincirlerinin moleküller arası boşluklarını işgal etmesi ve aralarındaki çekim kuvvetlerini azaltarak plastikleştirici etki göstermesine bağlı olabilir (Karakas vd., 2022; da Silva Carvalho vd., 2019).

4.1.3 FT-IR Analizi

Emülbeadin bileşenleri ile emülsiyon yüklenmeyen hidrojeller arasındaki moleküler etkileşimler FT-IR kullanılarak analiz edildi (Şekil 4.3). Ayçiçek

yağında gözlemlenen 3010, 2952, 2927, 2850, 1741, 1456 ve 1161 cm^{-1}'deki karakteristik pikler, yağın fiziksel karışımına ve polimerlere karşılık gelen dalga boyunda herhangi bir değişiklik olmaksızın tüm emülbeadlerde de tespit edilmiştir. Beadlerdeki 3010 cm^{-1}'deki bant, =C-H'nin gerilme titreşimine atfedildi ve 3000-2800 cm^{-1} bölgesinde bulunan tepe noktaları, alifatik CH_2 (metilen) ve CH_3'ün simetrik ve asimetrik C-H gerilme titreşimine atfetilmektedir (Rohman ve Cha Man, 2012).

1740 cm^{-1}'deki büyük pik, C=O çift bağ germe titreşiminden kaynaklanmaktadır. Saf aljinat tozunda, 1595 ve 1402 cm^{-1}'deki bantlar, karboksilik tuz iyonunun asimetrik ve simetrik gerilme tepe noktalarına ve iyonik bağlanmaya özgü olarak belirlenmiştir. Karboksilat gruplarının çapraz bağlanması, bu dalga boylarının kaymasına neden olur ve beadlerde 1595 cm^{-1}'deki pik, inülin ve kitosan içermeyen kontrol beadlerinde 1623 cm^{-1}'de (amid I, C-O) ve kitosan ve/veya inülin içeren beadlerde 1608 cm^{-1}'e kaydırılmıştır. Bunlar kitosan amin gruplarının aljinat ile etkileşimi ve/veya inülinin aljinat ile etkileşimi olabilir. Çalışmada kullanılan kitosan, amid I ve amid II titreşimlerine atanan 1623 ve 1571 cm^{-1} 'de iki güçlü titreşim göstermiştir. Benzer şekilde bir önceki çalışmada Atia vd. (2015), 1620 ila 1650 cm^{-1} bant bölgesinde aljinatın karboksil grubu ile etkileşime inülinin OH gruplarının dahil olduğunu göstermiştir. Aljinat tozunda görülen 1029 cm^{-1}'deki pik yoğunluğu, kalsiyumun bozulması ve bağların zayıflaması nedeniyle bead oluşumuyla azalmıştır.

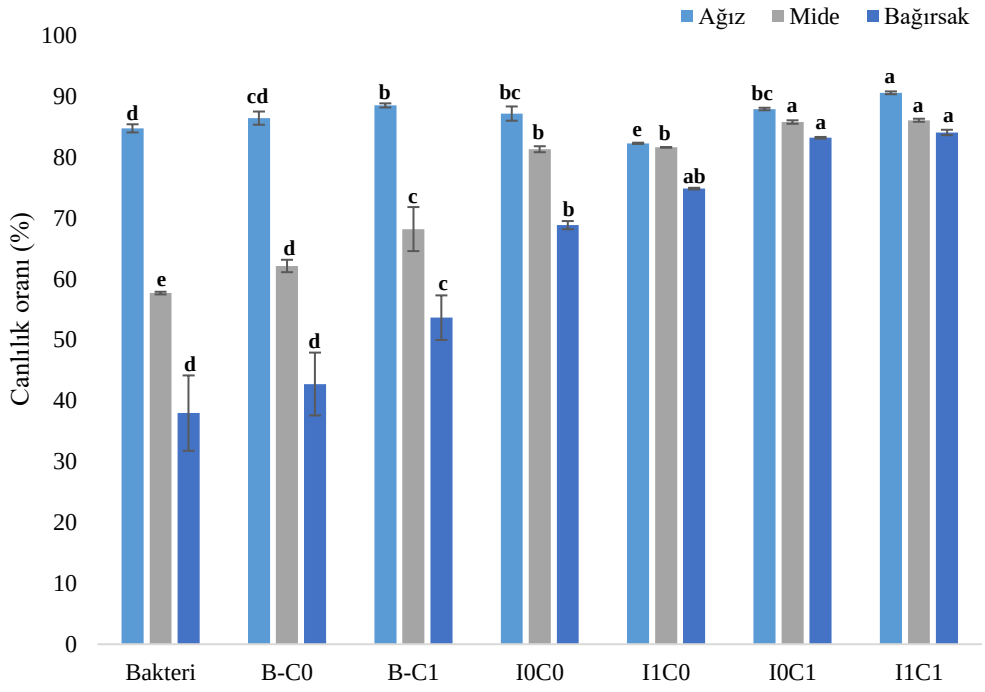


Şekil 4.3 Saf aljinat, kitosan, inülin, ayçiçek yağının FT-IR spektrumları; ve emülbead ve emülsiyonsuz beadler. İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler ve B-C0 ve B-C1, emülsiyon içermeyen kitosan kaplı ve kaplanmamış beadlerdir.

4.1.4 Simüle Edilmiş GI Sindirimine UğrayanSerbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Canlılığı

Serbest *L. plantarum* ELB90 ve emülbead ve emülsiyon içermeyen hidrojel beadlerle kapsüllenmiş bakterinin ağız, mide ve bağırsak sindirim aşamalarından sonra canlı kalma oranları (%) simüle edilmiş sindirim sistemi boyunca test edilmiştir (Şekil 4.4). Bakterilerin canlılığı ağız koşullarından etkilenmemiş, ancak mide koşullarında hem serbest bakterilerde hem de emülsiyon içermeyen kontrol beadlerinde (B-C0 ve B-C1) keskin bir azalma olmuştur, örneklerdebu örneklerde sırasıyla 4.12 ve 3.28log CFU g^{-1} miktarlarında azalma gözlenmiştir . Emülbeadlerde azalma ise 1.44 ila 1.92 log CFU g^{-1} aralığında değişmiş ve en yüksek kayıp inülin içermeyen ve kaplanmamış emülbeadlerde gözlenmiştir. Bağırsak adımından sonra, serbest bakteride, kitosan kaplı hidrojellerde ve kitosan kaplı olamayan hidrojellerde bakteri canlılığı kaybı yaklaşık olarak benzer olmuştur

(6 log CFU g^{-1}). Hansen vd. (2002) ve Li vd. (2023), hidrojel beadlerin yüksek gözenekliliği ve aljinatın düşük tamponlama özelliklerinden dolayı, aljinat jel matrisinin probiyotik bakterilerin bağırsaklara taşınması için uygun bir taşıyıcı sistem olmadığını belirtmiştir. Önceki çalışmalar ayrıca kitosan kaplamalı aljinat beadleri içinde kapsüllenmiş bakterilerin canlılığının da arttığını bildirmiştir (Cook vd., 2013; Frakolaki vd., 2020).



Şekil 4.4 *in vitro* gastrointestinal koşulların bağırsak adımından sonra emülbead ve emülsiyonsuz beadlerde serbest bakterilerin ve kapsüllenmiş bakterilerin hayatta kalma oranları (%). İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler, B-C0 ve B-C1, emülsiyon içermeyen kitosan kaplı ve kaplanmamış beadlerdir. Değerler ortalama ± standart sapma (n = 3) olarak verilmiştir. Aynı gastrointestinal sindirim adımında (ağız, mide ve bağırsak) farklı harflere sahip örnekler önemli ölçüde farklıdır ($P < 0.05$).

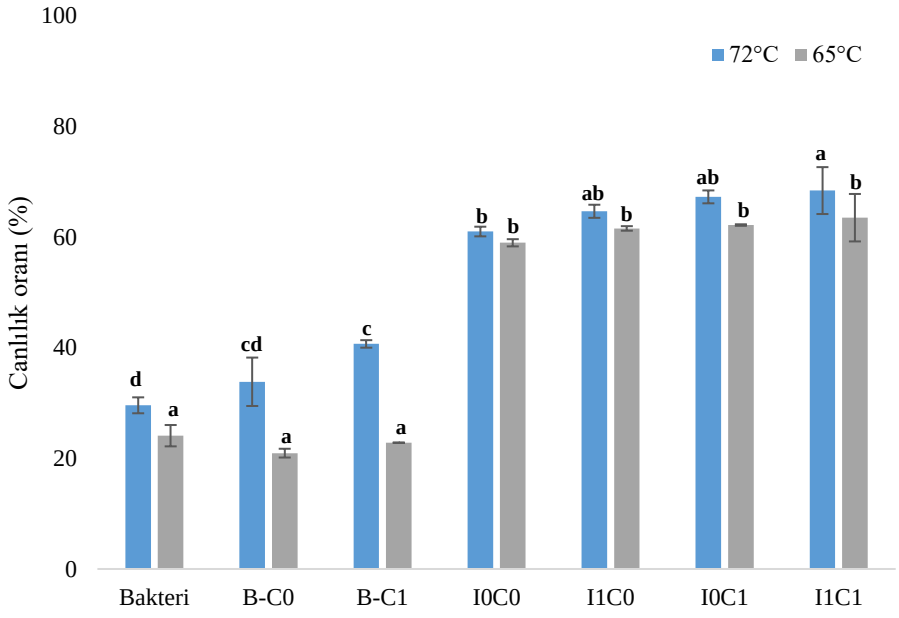
L. plantarum ELB90'ın canlılığı emülbeadlerde, özellikle kitosan kaplı numunelerde (I0C1 ve I1C1) diğer örneklere kıyasla daha yüksektir sonuç olarak başlangıçta yüklenen bakteri miktarının %84'ü bağırsak aşamasından sonra canlı kalmıştır (Şekil 17), oysa canlı kalma oranı serbest bakteriler için %38, kitosan kaplanmamış ve kitosan kaplı emülsiyon içermeyen hidrojel beadler için %43 ve %53 olmuştur. Bağırsak sindiriminin ardından, kitosan kaplı olmayan emülbeadlerde, inülin içermeyen formülasyonlar (I0C0) bakterilerin canlı kalma

oranını %69'a yükseltirken bu emülbeadlere inülin ilavesi (I1C0) bakterilerin yaşayabilirliğini (canlı kalma oranı %75) daha da geliştirdi. Prebiyotik özelliğe sahip olan inülin, insan üst bağırsak enzimleri tarafından sindirilemediği ve insan mide-bağırsak sisteminde gözlenen pH ve iyonik kuvvete karşı kararlılığı ve kalın bağırsakta şişme özellikleri nedeniyle ilaç salınım sistemlerinde tercih edilen bir polimerdir(Barclay vd., 2006). Önerdiğimiz enkapsülasyon sistemi ile, bağırsak aşamasından sonraki nihai hücre sayısı, kolonizasyon için önerilen ve bağırsak üzerinde terapötik veya fonksiyonel bir etkiye sahip olması için önerilen miktar olan 6-7 log CFU'nun üzerindedir (WHO/FAO, 2006). Bu nedenle çalışmadaki emulbead formülasyonları, *L. plantarum* ELB90 için uygun bir taşıma sistemi olarak kabul edilebilir. Bakterilerin çift emülsiyonun (W1/O) birincil su tabakasında tutulması ve etrafı yağ ile kaplanan bu damlacıklarının katı aljinat jel matrisinde stabilizasyonu, sulu ortamla doğrudan temaslarını azaltarak bakterilere ek koruma sağlamış olabilir. Emülsiyon içermeyen hidrojel beadler ile karşılaştırıldığında, emülbeadlerde probiyotik bakterilerin sindirim sıvılarına gecikmeli salımı beklenir, çünkü bakterilerin yüklendiği iç sulu faz (W1), lipit fazının (O) safra tuzu ve sindirim enzimleri tarafından hidrolizinden sonra mevcut sindirim sıvılarına maruz kalacaktır. *Bifidobacterium subsp lactis* için çift emülsiyon dolgulu aljinat hidrojellerde %86'lık hayatta kalma oranı Frakolaki vd. (2020) tarafından ve pektin jellerinde su içinde yağ emülsiyonlarındaki *Bifidobacterium lactis* V9 hücreleri için %70 hayatta kalma oranı, Gao vd. (2022) tarafından daha önce rapor edilmiştir.

4.1.5 Isıl İşleme Maruz Bırakılan Serbest ve Kapsüllenmiş Bakterilerin Canlılığı

Pastörizasyon koşullarını simüle eden ısıl işleme (72°C 3 dakika ve 65°C 30 dakika) maruz bırakıldıktan sonra emülbeadler, kontrol beadleri ve serbest bakteriler içinde kapsüllenmiş probiyotik bakterilerin hayatta kalma oranları (%) Şekil 4.5'de verilmiştir. 65°C'de 30 dakika sonra ve 72°C'de 3 dakika inkübasyonun ardından, serbest hücrelerin canlılığı 2.57 ve 3.11 log CFU mL^{-1} olmuştur,hayatta kalma oranı %24 ve %29.5'tür. Beadler kitosan ile kaplanmış olsun ya da olmasın, emülsiyon içermeyen hidrojel beadlerdeki hücrelerin canlılığı serbest bakterilere benzer şekilde (B-C0, %21 ve B-C1, %22.8) olmuştur. Kitosan kaplı hidrojel beadlerinde

(4 log CFU g^{-1}), serbest hücrelere göre (3 log CFU mL^{-1})bir miktar daha fazla canlılık gözlenmiştir. Emülbeadlerde ise 65°C'de 30 dakika inkübasyon sonrasında, nihai canlı hücre sayısı 5.9 ila 6.3 log CFU g^{-1} aralığında olmuş, hayatta kalma oranı %50 ila 64 arasında değişmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da en yüksek canlılık oranı kitosan kaplı inülinli emulbead'de (I1C1) belirlenmiştir. 72 °C'de 3 dakika inkübasyon sonrasında da benzer sonuçlar gözlenmiş, hayatta kalma oranı 6.1 ila 6.9 log CFU g^{-1} ile %61 ila %68 arasında değişmiş ve en yüksek canlılık aynı emülbead formülasyonunda (I1C1) belirlenmiştir bu sıcaklıkta bu formülasyondaki canlılık inülin ve kitosan (I0C0) içermeyen emülbeadten önemli ölçüde daha yüksektir. Emülbead formülasyonu bakterilerin dış streslere karşı daha fazla korunmasını ve kapsüllenmiş hücrelerin daha fazla canlılığını sağlamıştır. Sonuç olarak, termal kararlılık açısından hidrojel beadlerinin probiyotik kapsülleme için uygun olmadığını ve kapsülleme için yağ damlacıklarının jel matrisine dahil edildiği bir enkapsülasyon sisteminin daha uygun olduğu önerilebilir.



Şekil 4.5 Isıl işlemden sonra (72°C 3 dk ve 65°C 30 dk) emülbeadlerin ve emülsiyonsuz beadlerde serbest bakterilerin ve kapsüllenmiş bakterilerin hayatta kalma oranları (%). İnülin içeren (I1), inülin içermeyen (I0), kitosan kaplı (C1) ve kaplanmamış (C0) emülbeadler, B-C0 ve B-C1, emülsiyon içermeyen kitosan kaplanmamış ve kitosan kaplı hidrojel beadlerdir. Değerler ortalama ± standart sapma (n = 3) olarak verilmiştir. Aynı termal koşullarda farklı harflere sahip örnekler önemli ölçüde farklıdır ($P < 0.05$).

4.2 Lipozmal PE ve Lipozomal PE yüklenen Tek ve Çift Eksenli Nanoliflerin Üretimi ve Karakterizasyonu

4.2.1 PE'nin Toplam Fenolik, Toplam Flavaonoid Madde ve Antioksidan Aktivitesi Analizleri

Vaksı uzaklaştırılmış propolis ekstraktında (PE) toplam fenolik madde miktarı 280 mg GAE/g ekstrakt olarak ve toplam flavonoid madde miktarı ise 557 mg QE /g ekstrakt olarak bulunmuştur (Tablo 4.2). PE'nin DPPH radikali yakalama aktivitesi 1879.44±77.09 µM TE/g, FRAP indirgeme potansiyeli için 5728.17±305.08 µM Fe^{2+}/g ve ABTS radikali yakalama aktivetesi ise 4290.74±46.29 µM TE/g olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2 Propolis ekstraktını (PE) toplam fenolik, toplam flavaonoid madde ve antioksidan aktivitesi

	PE(1)
Toplam fenolik madde (mg GAE/g)	280.25±19.80
Toplam flavonoid madde (mg QE/g)	557.71±33.82
DPPH (µM TE/g)	1879.44±77.09
FRAP (µM Fe^{2+}/g)	5728.17±305.08
ABTS (µM TE/g)	4290.74±46.29

(1) Sonuçlar g propolis ekstraktı cinsinden verilmiştir, GAE: gallik asit eşdeğeri; QE: kuersetin eşdeğeri; CE: kateşin eşdeğeri; TE: trolox eşdeğeri

Okińczyc vd. (2021), Avrasyanın çeşitli bölgelerinden topladıkları ham propolislerle yaptıkları çalışmada ham propolise ait toplam fenolik madde miktarını 30-145 mg GAE/g ham propolis, toplam flavonoid madde miktarını 10-82 mg QE/g ham propolis olarak bulmuştur. Yuan vd. (2019), ise çeşitli propolislerden elde ettikleri etanol ekstraktlarından toplam fenolik madde miktarını 245 mg GAE/g ekstrakt, DPPH ve ABTS miktarlarını ise 1030, 2190 µM TE/g ham propolis ve FRAP'ı ise 180-1480 µM Fe^{2+}/g aralığında bulmuştur. Calegari vd. (2017), çeşitli propolis örneklerinde DPPH, ABTS ve FRAP sonuçlarını sırasıyla en yüksek 159, 439 µM TE/g ve 90-1040 µM Fe^{2+}/g aralığında bulmuşlardır.

Ham propolis verileri ile karşılaştırdığımızda sonuçlarımız propolis ekstraktı üzerinden olduğu için literatürdeki değerlerden nispeten yükseltir. Bu farklılıklar kısmen propolisin yerel özelliklerinden de kaynaklanabilir.

Ekstraktın temin edildiği firmadan alınan bilgilere göre ham propolisten ekstraksiyon verimi %50 civarındadır ve kalıntı vaks da bu çalışmada çözgen ile uzaklaştırılmıştır. Sonuçların nispeten yüksek çıkması yine bu durumla ilişkilendirilebilir.

4.2.2 Lipozomal PE Üretilmesi, Karakterizasyonu ve Kapsülleme Verimliliği (%EE)

Tablo 4.3'de % 0.3 (L1), % 0.6 (L2), % 2 (L3) ve % 4 (L4) (a/h) oranlarında PE yüklenen lipozomların formülasyonları, boyut ve yüzey yükü değerleri ile birlikte %EE değerleri verilmiştir. Lesitin:PE oranının (a/a) 3.3 olduğu formülasyonlarda boyut 64-69 nm iken, bu oranın 2.5 ve 0.8 olduğu daha fazla PE'nin yüklenebildiği L3 ve L4 formülasyonlarında ise boyut 370.46±35.28 nm'e kadar çıkmıştır. L3 ve L4 arasında daha az PE içeren örneğin boyutu daha küçük olup 261.50±18.39 nm'dir. PE lipozomun iç su kısmının yanı sıra, yüzeye de hidrofobik etkileşimlerle tutunmuş olabilir, bundan dolayı daha yüksek PE konsantrasyonunda boyut artış göstermiştir. Boyut artışına paralel olarak yüklenen PE arttıkça PDI değerleri L3 ve L4'de daha yüksektir. Yüzey yüklerine bakıldığı zaman, lipozomlarda bu değer -33.06±0.68 ve -30.93±1.11 mV aralığında değişirken, en düşük değer PE'nin en fazla yüklendiği L4 formülasyonununa aittr.

PE yükleme kapasitesinin arttırılması için lipozom formülasyonuna gıdada katkı maddesi olarak kullanımına izin verilen sürfaktan olan Tween 80 (T80) %1 (a/h) oranında eklenmiştir. Teorik olarak L2 formülasyonu ile lif aşamasında yaklaşık 1656 ppm propolis içermesi planlanan lifler, L3 ve L4 kullanımı ile 3.3 ve 6.6 kat arttırılarak 5500 ve 11000 ppm'e çıkarılabilmiştir.

Tablo 4.3 Lipozomal PE formülasyonlarının, boyut, PDI, yüzey yükü ve enkapsülasyon etkinliği (%EE)

-	Propolis miktarı (a/h)	Lesitin miktarı (a/h)	T80 miktarı (a/h)	Boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)	%EE, Toplam Fenolik	%EE, Toplam Flavonoid
L1	0.3	2	-	69.14 ±0.43^{c}	0.24 ±0.00^{c}	-33.06 ±0.68^{ab}	93.04 ±0.22^{a}	98.24 ±0.35^{a}
L2	0.6	4	-	64.36 ±4.22^{c}	0.23 ±0.03^{c}	-32.1 ±1.10^{ab}	94.16 ±0.41^{a}	97.84 ±0.01^{a}
L3	2	5	1	261.50 ±18.39^{b}	0.39 ±0.03^{b}	-33.23 ±0.38^{b}	89.70 ±1.86^{a}	85.82 ±2.91^{b}
L4	4	5	1	370.46 ±35.28^{a}	0.53 ±0.03^{a}	-30.93 ±1.11^{a}	68.01 ±4.94^{b}	76.23 ±3.46^{b}

PE: Propolis ekstraktı, T80: Tween 80, TPC: Toplam fenolik içerik; TFC: Toplam flavonoid içeriği. Değerler ortalama ± standart sapma (n = 3) olarak sunulmuştur. Aynı sütunda farklı üst simge küçük harflere sahip değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

4.2.3 Nanolifler için Yükleme Kapasitesi ve Enkapsülasyon Etkinliği (% EE)

Tek ve çift eksenli lipozomal lifler için teroik ve gerçekleşen yükleme kapasiteleri Tablo 4.4'de verilmiştir. Gerçek yükleme kapasitesinin (gyc) teorik yükleme kapasitesine (tyc) göre daha düşük olduğu görülmektedir. Teorik yükleme kapasitesine erişilememiş olmasının nedeni bir miktar PE'nin, atım sırasında besleme çözeltisi lif oluşturamadan etrafa saçıldığı için lif üretim miktarının bir miktar azalması olabilir. PE'nin enkapsülasyon etkinliği lipozomal lifler için %65.83 ile %91.90 arasında değişmiştir.

Tablo 4.4 Tek eksenli ve çift eksenli filmler için yükleme kapasitesi (Gyc) ve enkapsülasyon etkinliği (%EE)

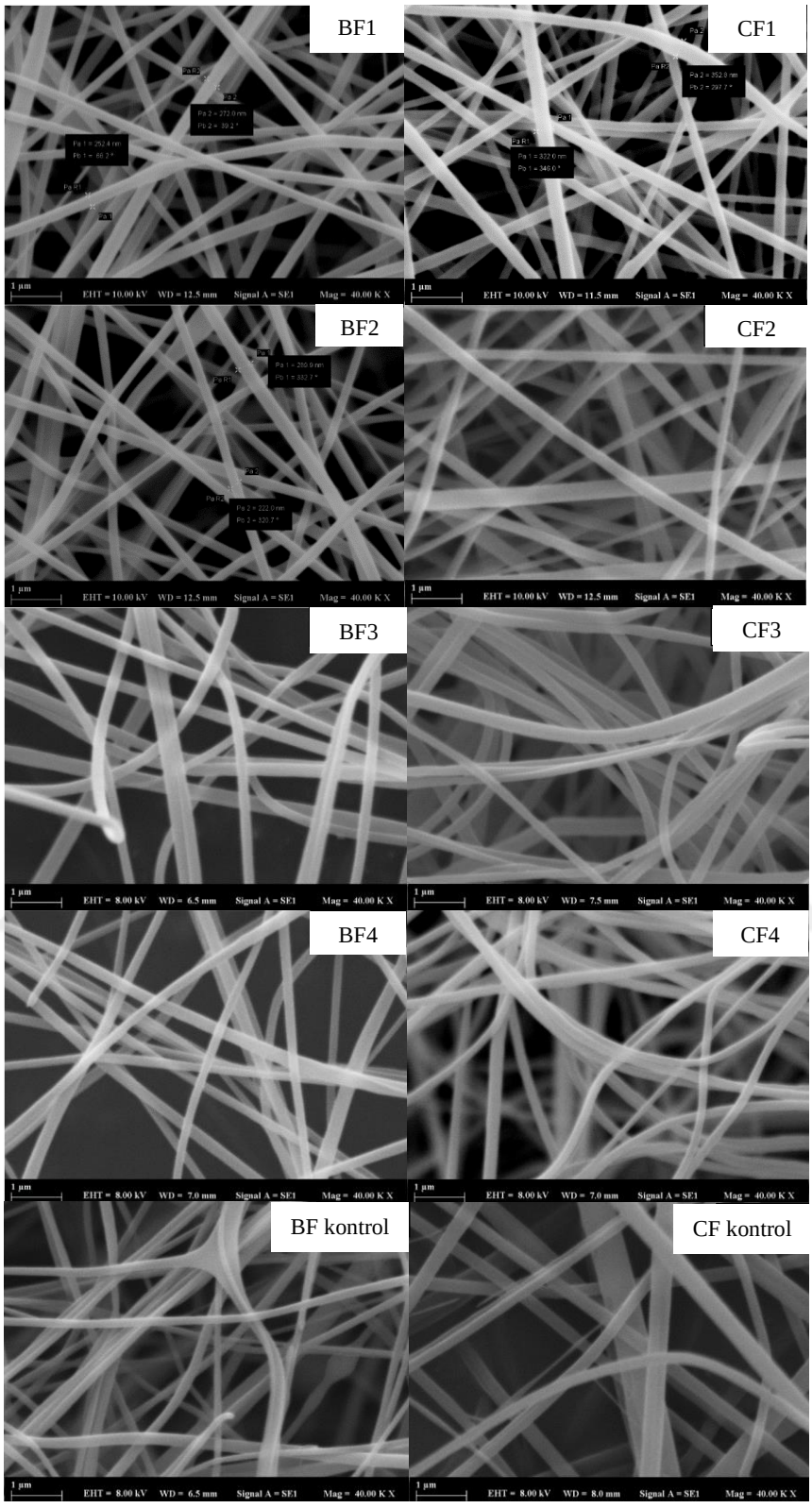
	Örnek	İçerdiği lipozom	Tyc (µg PE/g lif)	Toplam fenolik madde (µg GAE/g lif)	Gyc (µg PE/g lif)	%EE
Tek eksenli lifler	**BF1**	L1	828	150 ± 2.2^{a}	545 ±1.12^{a}	65.83±0.81^{a}
	BF2	L2	1422	284± 1.3^{a}	856 ±1.82^{a}	72.32±0.91^{a}
	BF3	L3	5520	1350 ± 10.1^{b}	4892 ±2.37^{b}	87.23±1.34^{b}
	BF4	L4	11040	2600 ± 16.5^{c}	10000 ±11.2^{c}	88.73±1.35^{b}
Çift eksenli lifler	**CF1**	L1	498	93.1±1.4^{a}	332 ±3.21^{a}	66.72±3.58^{a}
	CF2	L2	997	198.3±2.5^{b}	707 ±4.42^{b}	71.03±2.92^{a}
	CF3	L3	3324	752.5±3.5^{c}	2687 ±3.84^{c}	80.85±7.92^{b}
	CF4	L4	6648	1710.7±4.7^{d}	6110 ±4.23^{d}	91.90±2.69^{c}

*Tyc= Teorik yükleme kapasitesi (µg propolis/g lif), Gyc= Gerçekleşen yükleme kapasitesi (µg propolis/g lif), EE= Enkapsülasyon Etkinliği, GAE= gallik asit eşdeğeri

4.2.4 Lipozomların ve Lipozomal PE Yüklü Tek Eksenli ve Çift Eksenli Nanoliflerin Morfolojik Analizleri

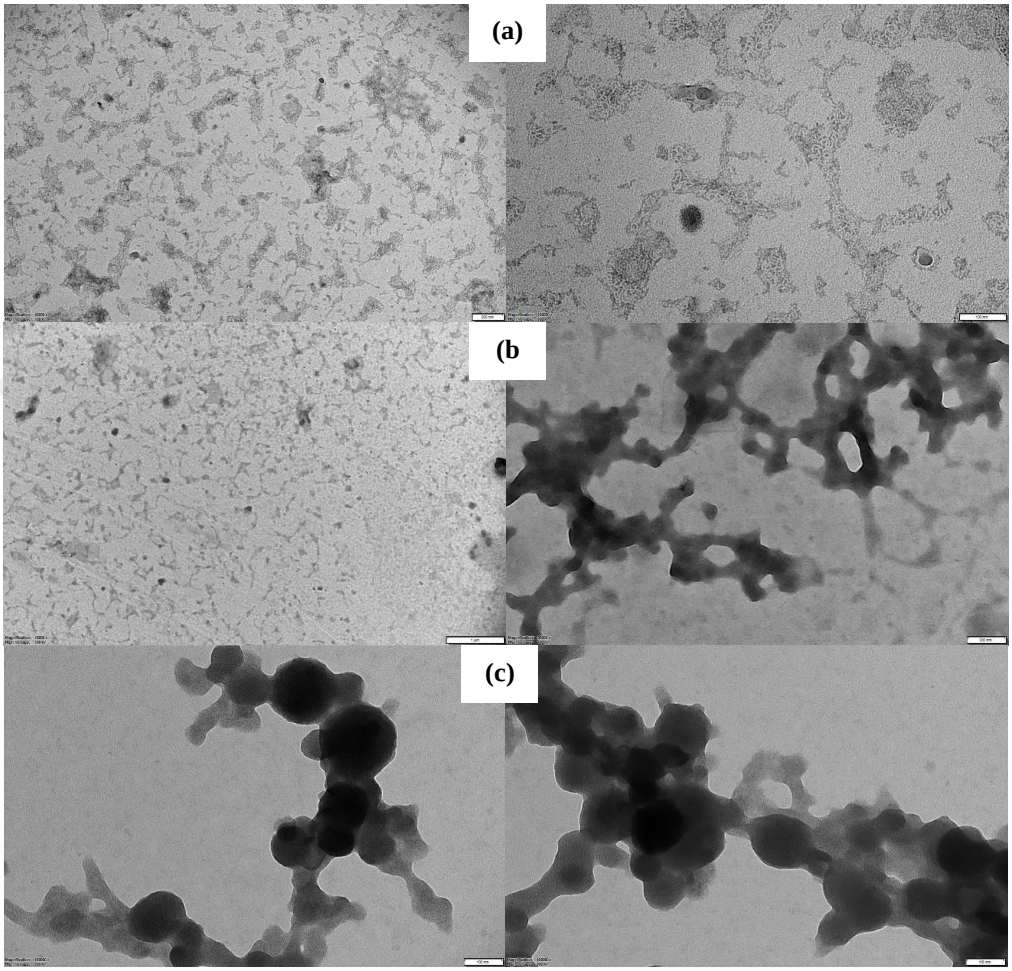
Şekil 4.6'da Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntülerinde gözlendiği gibi, lipozomlu nanoliflerde, lif kalitesini ve dayanıklılığını azalttığı bildirilen herhangi bir boncuk morfolojisi olmaksızın pürüzsüz bir yüzeye sahip tek tip yapıda morfoloji elde edilmiştir. Elektrospinleme işlemi sırasında liflerin yüzeyinde faz ayrımından kaynaklanabilecek, polimerlerin ve lipozomların uyumsuzluğunu gösteren hiçbir farklı yapı gözlenmemiştir. Elde edilen görüntülerde boyutları yaklaşık 69-370 nm olarak ölçülen lipozomların, nanolif yapılarının içine gömüldüğü gözlemlenmiştir. Görsel olarak, farklı üretim yöntemleri (tek ve çift eksenli üretim) liflerin işlenebilirliği ve morfolojisi üzerinde bir fark oluşturmamıştır. Bu da başarılı bir şekilde lipozom yüklü nanoliflerin her iki yöntemle de üretilebildiğini göstermektedir.

Laidmäe vd. (2021), nanolifler içine lipozom enkapsüle ettikleri çalışmalarında lipozom yüklemenin lif morfolojisi üzerinde fark oluşturmadığını, benzer bir şekilde SEM analizi ile göstermişlerdir. Lipozom içermeyen çift eksenli nanoliflerin (CF kontrol) boyutu 210-250 nm'den, lipozom yüklenmesi ile (CF1-4) 322-352 nm'ye artmıştır. Lipozom içermeyen tek eksenli nanoliflerde ise (BF kontrol) boyut lipozom yüklenmesi ile az da olsa lif çapında bir artış gözlemlenmiş, boyut 252-272 nm'den (BF1-4) 289 nm'a artmıştır. Nitekim, Cui vd. (2017), SiO_2-öjenol yüklü lipozomların nanoliflerin lif çapının yükleme ile arttığını göstermişlerdir.



Şekil 4.6 Tek eksenli (BF1: L1 lipozom, BF2: L2 lipozom, BF3: L3 lipozom, BF4: L4 lipozom içerir ve BF kontrol:lipozom içermeyen lif) ve çift eksenli (CF1: L1 lipozom, CF2: L2 lipozom, CF3: L3 lipozom, CF4: L4 lipozom içerir ve CF kontrol:lipozom içermeyen lif) liflerin SEM görüntüleri (40.000x)

Şekil 4.7’ de lipozomların geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri negatif boyama tekniğiyle (%2 uranil asetat) boyanarak lipozom veziküllerinin görünmesini sağlayacak kontrast oluşturulmuştur. TEM analizi ile lipozomların vezikül yapı oluşturabildiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.3).

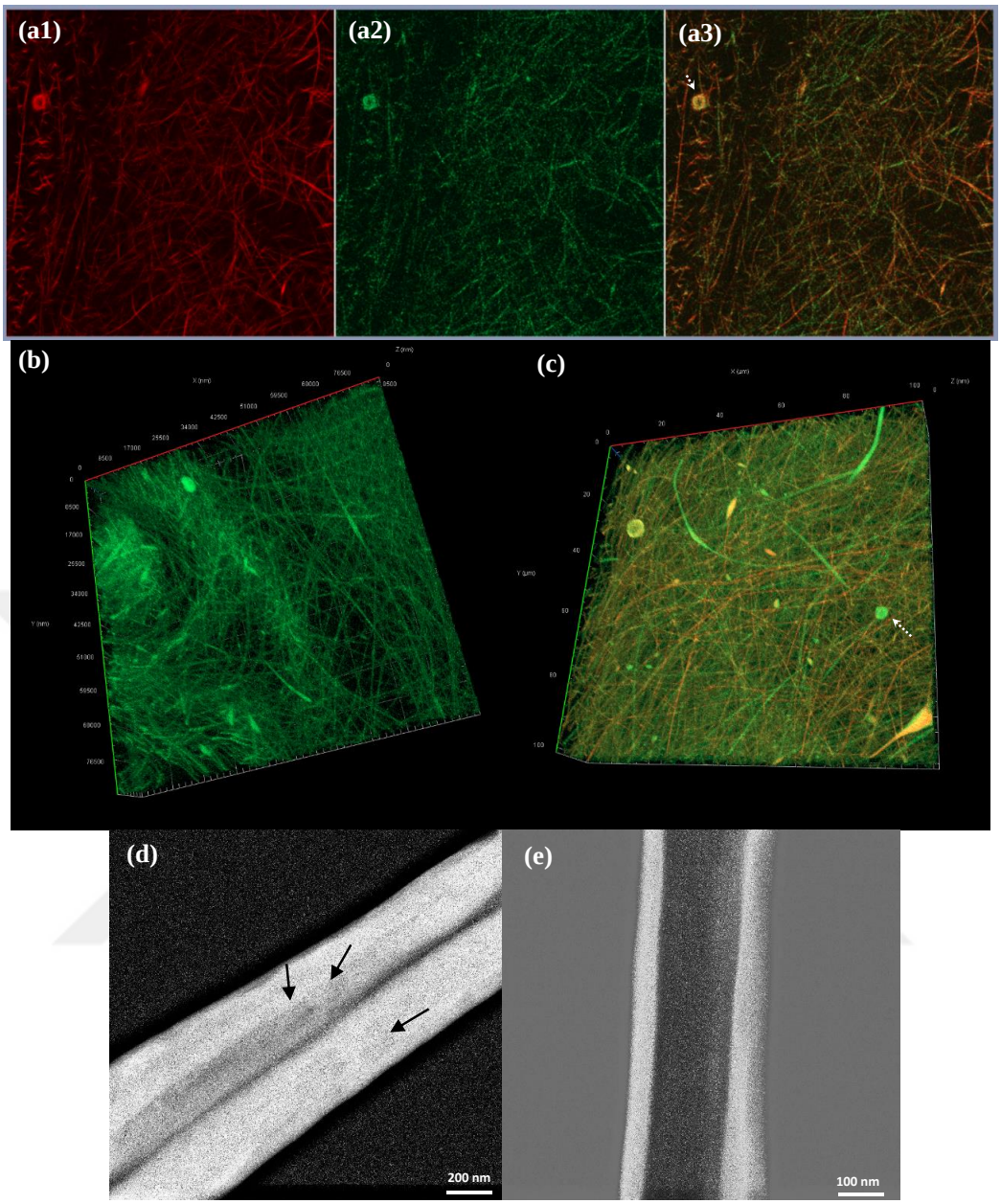


Şekil 4.7 PE içeren **(a)** L2, **(b)** L4, PE içermeyen **(c)** lipozomların (L4 kontrol) TEM görüntüleri

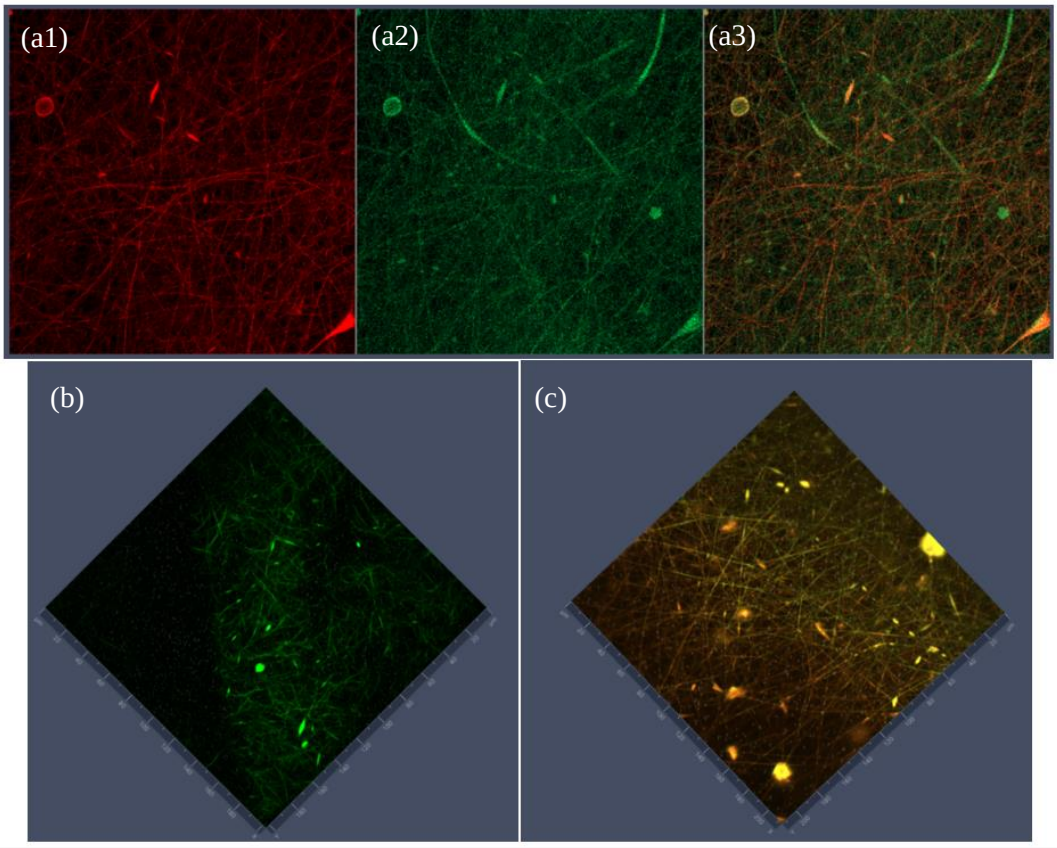
Şekil 4.8’de ise çift eksenli nanolif örneğinin (CF4) konfokal lazer mikroskobu (CLSM) ve TEM görüntüleri ve Şekil 4.9’de ise tek eksenli nanolif örneğinin (BF4) CLSM görüntüleri verilmiştir. Lipozom üretimi ve elektrospinleme işleminden önce lesitin ve polimerler iki farklı floresan boyayla (sırasıyla Nil kırmızısı ve Fast yeşil) boyanmıştır.

Lifte zein-jelatin polimerleri kırmızı şeritler olup, yeşil lipozom kesecikleri bir ip üzerinde küçük dairesel kesecikler veya bir ip üzerinde homojen olarak dağıtılmış ve sıralanmış kum taneleri olarak ayırt edilebilir şekilde gözükmektedir. SEM

görüntülerinde de görülen bazı kusurlar, CLSM görüntülerinde de lipozom keseciklerine kıyasla boyayı daha fazla yansıttıklarından daha büyük boncuklar (beyaz oklar) şeklinde görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.8 (d)'deki STEM detektörü ile alınan FE-SEM görüntüleri, lifte gömülü lipozomların varlığını doğrular düzeydedir, lipozomların çekirdeğe dahil edilmesinin liflerin çekirdek-kabuk yapılarını bozmadığı gözlenmiştir. Elektrospinleme işleminin ılımlı işlem koşulları ve besleme çözeltilerinin ayarlanabilir formülasyonu, biyoaktif bileşiklerin ve lipozomal yapıların liflere yüklenmesini sağlamıştır (Li vd., 2022). Her ne kadar Şekil 4.8 (e)' de, lipozomlar ve polimerler arasındaki kontrast yeterli olmasa da, daha koyu keseciklerin varlığı yüzeysel olarak algılanabilir (siyah oklar) düzeydedir.



Şekil 4.8 (a1) Fast yeşil ile polimerlerin boyandığı çift eksenli lipozomal lif (CF4), **(a2)** Nil kırmızısı lipozomların boyandığı lif ve **(a3)** a1 ve a2'nin çakıştırılmış konfokal mikroskopi (CLSM) görüntüsü **(b)** Nil kırmızısı ile lipozomları boyanmış nanolifin 3 boyutlu CLSM görüntüsü **(c)** Nil kırmızısı lipozomları ve Fast yeşil ile polimerleri boyanmış nanolifin 3 boyutlu çakıştırılmış CLSM görüntüsü. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla lipozomlar ve polimerlerdir. **(d)** ve **(e)** Lipozomal lifin çekirdek/kabuk yapısının taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) görüntüleri.



Şekil 4.9 (a1) Fast yeşil ile polimerlerin boyandığı tek eksenli lipozomal lif (BF4), **(a2)** Nil kırmızısı lipozomların boyandığı lif ve **(a3)** a1 ve a2'nin çakıştırılmış konfokal mikroskopi (CLSM) görüntüsü. **(b)** Nil kırmızısı ile lipozomları boyanmış nanolifin 3 boyutlu CLSM görüntüsü **(c)** Nil kırmızısı lipozomları ve Fast yeşil ile polimerleri boyanmış nanolifin 3 boyutlu çakıştırılmış CLSM görüntüsü. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla lipozomlar ve polimerlerdir.

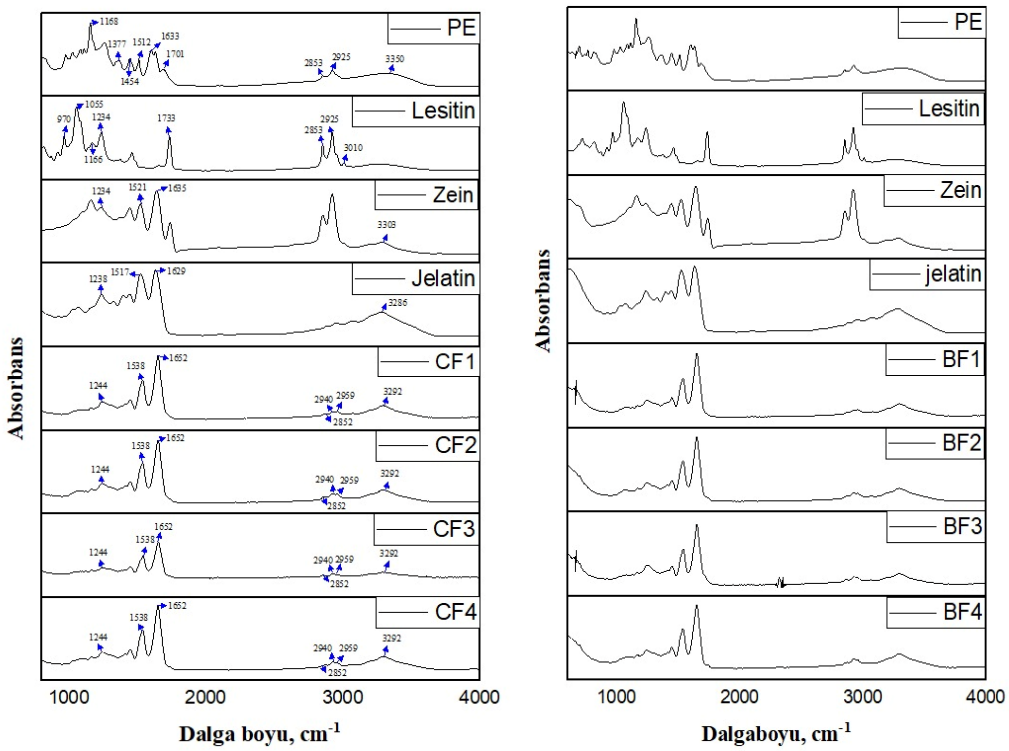
4.2.5 FT-IR ve DSC Analizleri

Kapsülleme sisteminin bileşenleri arasındaki etkileşimi değerlendirmek için lipozomal PE yüklü çift eksenli (CF1-4), tek eksenli (BF1-4) nanoliflerin ve bunları hazırlamak için kullanılan bileşenlerin FT-IR spektrumları Şekil 4.10'da verilmiştir. Fenolik gruplar O-H gerilme titreşimi nedeniyle PE' de 3350 cm^{-1}'de geniş bir bant oluşur. Lesitin, trigliserit kısmıyla ilişkili CH_3 gruplarının asimetrik gerilme titreşimine atfedilebilecek 3010 cm^{-1}'de bir pike sahiptir. 2925 ve 2853 cm^{-1}'deki bantlar, hem PE'de hem de lesitinde gözlemlenen asimetrik ve simetrik C-H gerilme titreşimlerine karşılık gelir. PE'nin bu absorpsiyon bantları içerdiği wax kalıntılarıyla ilişkili olabilir. Propolisin lipozom fosfolipid çift katmanında tutulmasının, propolis flavonoidinin aromatik halkaları ile fosfolipid açil zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerden kaynaklanabileceği rapor

edilmiştir (Lombardo vd., 2016). Propolisin 1701 ve 1168 cm^{-1}'deki absorpsiyon bantları bir karboksilik grubun varlığına işaret etmektedir. Propolisin içerdiği diğer bantlar muhtemelen propolisin içerdiği asitler, flavonoidler, triterpenoidler, furanoid, tanenler, kininler, kumarinler, şekerler ve fenoller gibi diğer bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Tiri vd., 2022). Karboksilik grupların varlığı, bileşiklerin hidrojen bağı yoluyla diğer gruplarla bağlanmasına yardımcı olur. Bu bağlamda propolisin muhtemelen hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı yoluyla lipozom çift katmanında tutulduğu da söylenebilir (Ramli vd., 2021). Propolisin lipozom fosfolipit çift katmanında tutulmasının, propolis flavonoidinin aromatik halkaları ile fosfolipid açil zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Lombardo vd., 2016). Propolisin 2925 cm^{-1} ve 2853 cm^{-1}'de bulunan bantları sırasıyla CH_3'ün simetrik uzantılarına ve CH_2'nin asimetrik uzantılarına karşılık gelmektedir. Bu emilim bantları propolisin wax kalıntılarıyla ilişkili olabilir ayrıca 1701 cm^{-1} (C=O), 1633 cm^{-1} (C=C), 1454 cm^{-1} (aromatik C–H) ve 1377 cm^{-1} (aromatik C–O) absorbsiyon bantları varlığıyla ilişkilendirilmiştir (Ramli vd., 2021). Lesitin'de 1733 cm^{-1}'de gözlenen güçlü bir pik, simetrik C=O ester titreşimleri ve 1234 ve 1166 cm^{-1}'deki bantlar PO_2 titreşiminden, 1055 ve 970 cm^{-1}'deki tepe noktaları ise fosfatidilkolin'in uç bölgesine ait kolin grubunun (N^+CH_3) asimetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Saroğlu vd., 2022). PE'nin 1701 ve 1168 cm^{-1}' deki absorpsiyon bantları, bir karboksilik grubun varlığını gösterir ve tüm lipozomal PE yüklü liflerde 1170 cm^{-1}'de gözükmektedir. Spesifik olarak, 1701 cm^{-1}'deki absorpsiyon bandı, karboksil gruplarının (–COOH) gerilme titreşimleriyle ilişkilidir ve 1633 ve 1600 cm^{-1}'deki iki bant, C=C ve/veya C=O'nun amino asitler ve flavonoidlerden oluşan gruplarının aromatik gerilme titreşimlerine atfedilebilir. 1512 cm^{-1}'deki bant, C=C gerilmesinin aromatik halka deformasyonlarıyla, 1454 ve 1377 cm^{-1} ise C–H bükülmesi ve aromatik C–O gerilme titreşimleriyle ilişkilidir (Ramli vd., 2022; Razavizadeh vd., 2020).

Zeinde 3303 cm^{-1}'de ve jelatinde 3286 cm^{-1}'de gözlemlenen pik O–H ve N–H gerilmesinden kaynaklanır ve nanoliflerde jelatin ile zein arasındaki hidrojen bağı etkileşimlerinden dolayı liflerde kendisini 3292 cm^{-1}'de göstermiştir (Deng vd., 2019). İki absorpsiyon bandı 2852 ile 2940 cm^{-1} arası, alifatik protein gruplarının C–H gerilme titreşimlerine atfedilir ve liflerde kendisini yaklaşık 2959 cm^{-1}'de

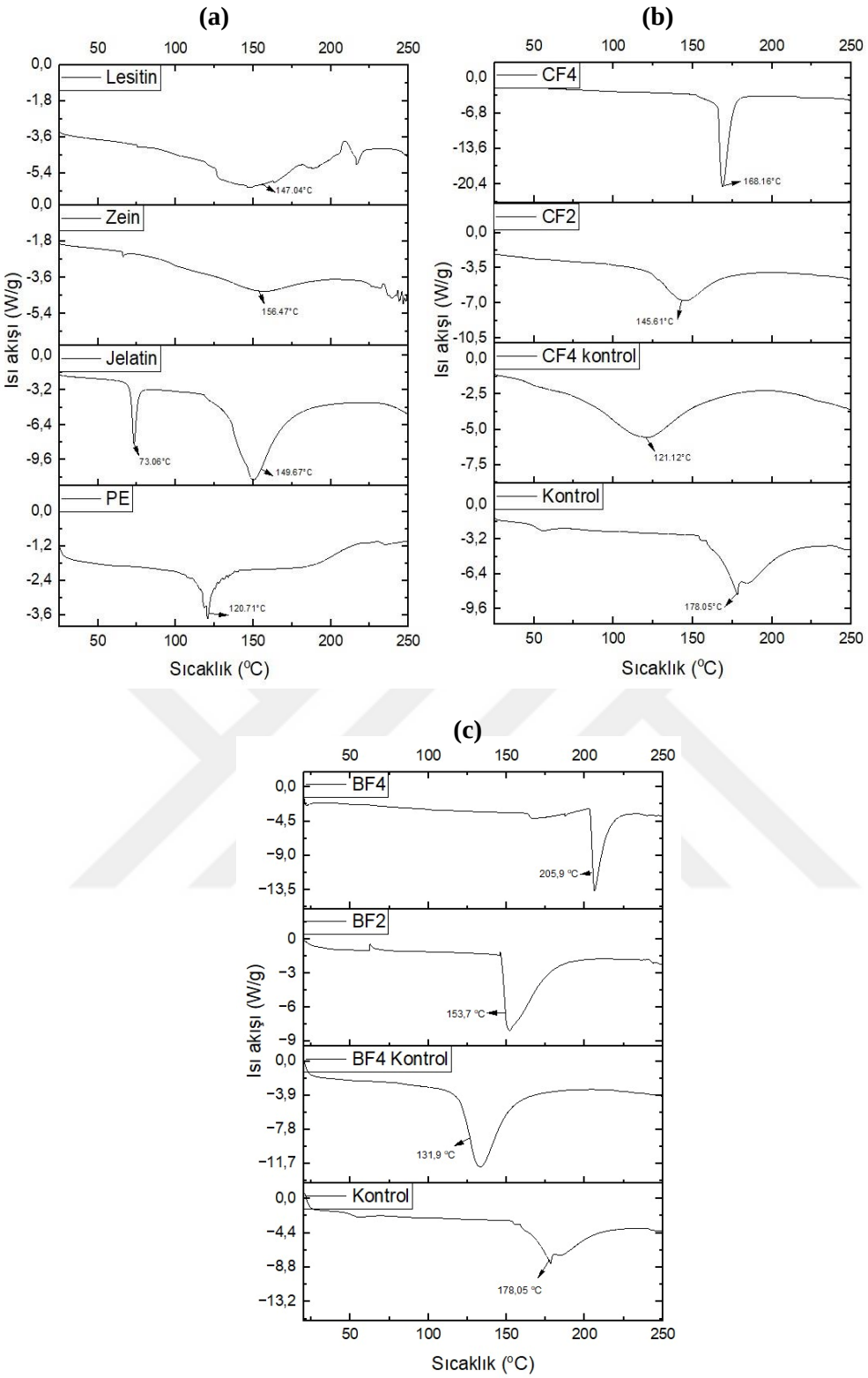
göstermiştir (Wu vd., 2023). Jelatin ve zeini tanımlayan karakteristik absorpsiyon bantları 1629 ve 1635 cm^{-1}'de amid I'in C=O gerilme titreşimleriyle 1517 ve 1521 cm^{-1}'de amid II'nin N-H bükülmesiyle ilişkili olup 1238 ve 1234 cm^{-1} ise amid III gruplarına karşılık gelir (Wang vd., 2022). Lipozomal PE yüklü liflerin spektrumunda proteinlerin bu ana fonksiyonel grupları, 1652, 1538 ve 1244 cm^{-1}'e kaymıştır; bu lif içindeki gruplar ile liposomal yüzey fonksiyonel grupları arasındaki etkileşimi gösterebilir. Polimerlerde (jelatin-zein) 3305 cm^{-1}'de görülen bant örneklerde 3292 cm^{-1}'de gözlenmiştir, bu durum elektrospinleme işlemi sırasında jelatin ve zein arasındaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarının etkileşimini göstermektedir (Wang vd., 2022).



Şekil 4.10 Çift eksenli (CF1-4) (sol şekil), tek eksenli nanofilmlerin (BF1-4) (sağ şekil) ve lifleri oluşturan polimerlerin ve lipozomu oluşturan PE ve lesitinin FT-IR spektrumları

DSC analizi, lif karakterizasyonunun bir parçası olarak ve formülasyona bağlı olarak numunelerin termal özelliklerindeki değişimi araştırmak için gerçekleştirilmiştir. Lipozomal liflerin ve bunların bileşenleri olan zein, jelatin, lesitin ve propolisin DSC termogramları Şekil 4.11'de verilmiştir. Lesitin, erime ve bozunma nedeniyle 147.04 ve 213.74°C'de endotermik zirve gösterir (Vedovatto

vd., 2020). Saf jelatin 70 ile 213.74°C arasında su desorpsiyonunu göstermektediri. 100°C (73.06°C) ve 150 ile 200°C (149.67°C) arasındaki erime pikleri daha önce jelatin için de rapor edilmiştir (Wang vd., 2014). Zein, 156.47°C'de endotermik bir erime piki göstermiştir. Yalnızca zein ve jelatinden oluşan lif örneğinde erime piki 178.05°C'ye kaymıştır bu da zein-jelatif nanolifinsaf zein ve jelatinden termal olarak daha termostabil bir yapıya sahip olduğunu göstrebilir (Gültekin-Özgüven vd., 2016). Bu lif örneğinin boş lipozom (CF4 kontrol) veya PE yüklü lipozomla (CF2 ve CF4) yüklenmesi her durumda erime pikini düşürmüştür. Sadece polimerlerle hazırlanan lipozom içermeyen lif (kontrol) boş lipozomla (CF4 kontrol) yüklendiğinde erime piki 178.05°C'den daha düşük bir sıcaklığa (121.12°C) kaymıştır (Şekil 4.11.b). Lipozomal PE (CF4) ile yüklendiğinde ise 168.16°C'lik 'de keskin bir erime piki görülmüştür bu durum hidrofobik PE'nin lipozom yüzeyinde birikerek polimerlerle etkileşime girmesi ve aynı zamanda lif yapısının içerisinde bir miktar lipozomda kapsüllenmemiş PE'nin varlığına da işaret edebilir (Ali vd., 2014). Tek eksenli filmlerde L4 (PE) içeren lipozomun yüklü olduğu BF4 nanolifinin erime noktası 205.9 °C iken BF2'de bu değer 153.7 °C olmuştur (Şekil 4.11.c). Çift eksenli liflerde olduğu gibi tek eksenli liflerde de daha fazla propolis yüklenmesi erime sıcaklığını daha yüksek bir değere kaydırmıştır. Boş lipozom içeren BF4 kontrol nanolifi ise 131.9 °C ile en düşük erime sıcaklığına sahiptir. Ansarifar vd. (2021) ve İnanç Horuz ve Belibağlı (2018) kekik esansiyel yağı ve karotenoidler gibi hidrofobik bileşikleri kapsüllerken zein liflerinin erime piklerinin enkapsülasyonla daha yüksek sıcaklıklara kaydığını bildirmişlerdir. Boş lipozomların veya PE yüklü lipozomların nanoliflere yüklenmesi, daha fazla sayıda endotermik tepe noktasının oluşmasına yol açmamıştır, bu durum nanolifler ile PE yüklü lipozomları içeren çözeltilerin karışabilirliğini gösterir (Razavizadeh ve Niazmand, 2020). Erime sıcaklığının artması ve pikin keskinleşmesi propolisin kristal halinde nanolifler içerisindeki varlığını gösterir. Ayrıca, sıcaklık artışı boyunca BF4 ve CF4 için keskin tepe noktalarının varlığı nanolif içinde bulunan PE'nin kristal yapıya sahip olduğunu doğrular (Torkamani vd., 2018).



Şekil 4.11 (a) Nanolifleri oluşturan polimerlerin ve lipozomu oluşturan PE ve lesitinin, **(b)** çift eksenli (CF2, CF4, CF4 kontrol) ve **(c)** tek eksenli nanofilmlerin (BF2, BF4, BF4 kontrol) DSC termogramları. Kontrol: Lipozom yüklenmemiş nanolif, CF2 kontrol ve BF2 kontrol: PE yüklenmemiş lipozom içeren, CF2, CF4, BF2, BF4: Sırasıyla L2,L4 lipozomal PE lerin yüklendiği çift ve tek eksenli nanolifler.

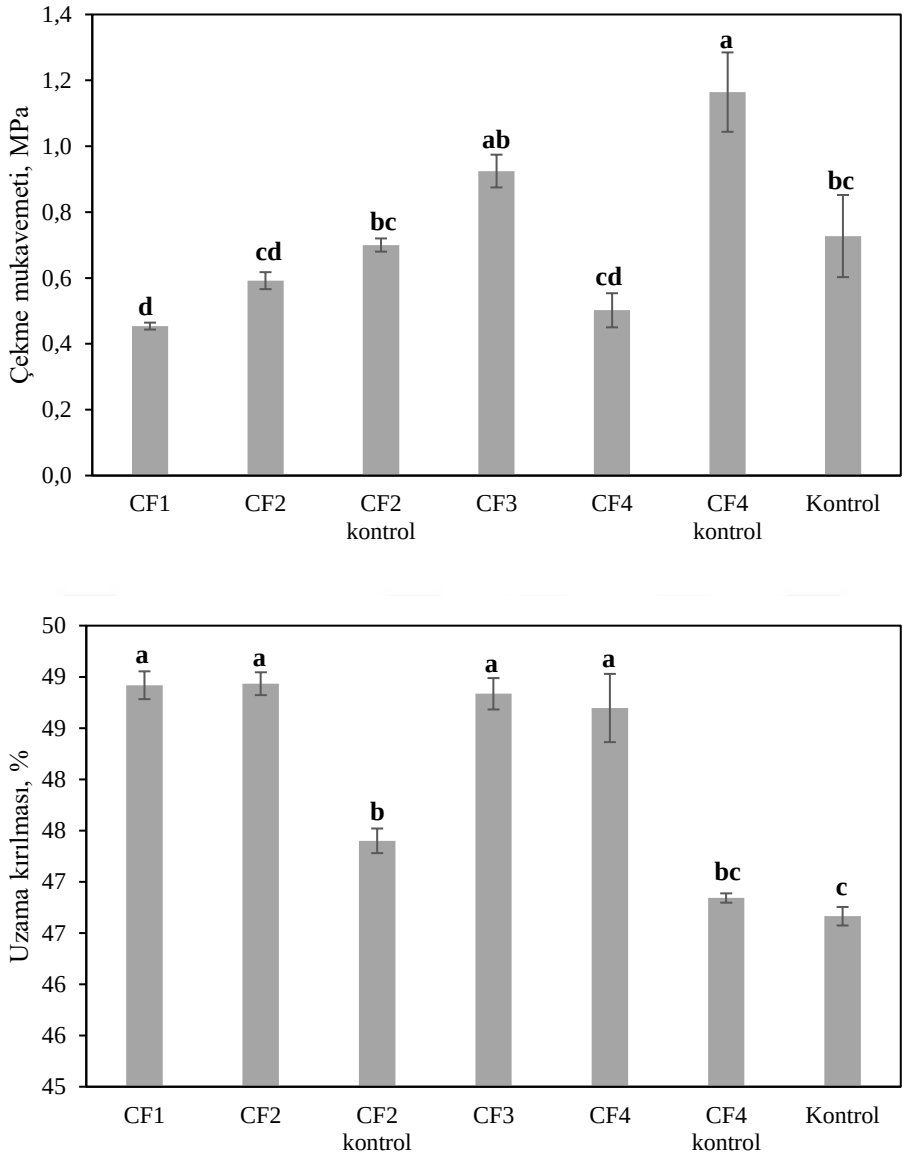
4.2.6 Mekanik Analizler

4.2.6.1 Filmlerin Çekme Mukavemeti ve Uzama Kırılması Analizleri

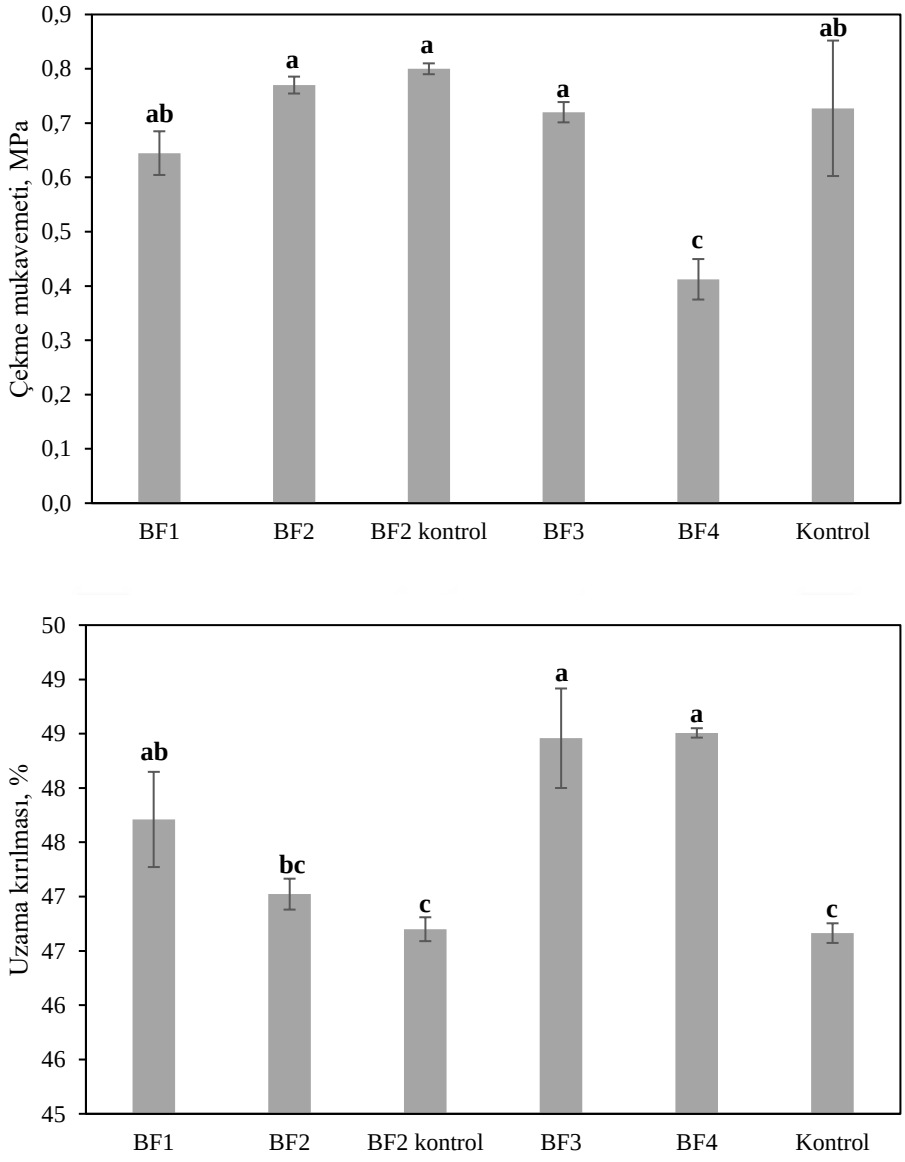
Çekme mukavemeti (ÇM-Tensile Strength) ve uzama kırılması (UK-Elongation at Break), liflerin mekanik özellikleriyle ilgili parametrelerdir. Çift eksenle üretilen liflerin ağız yara örtüsü olarak kullanımı değerlendirileceğinden mekanik analizler bu bağlamda yorumlanmıştır (Şekil 4.12). Tek eksenli ve çift eksenli filmlerin mekanik analizleri benzer eğilim göstermiştir. Ağız yaraları için kullanılabilecek yara örtülerinin dinamik ağız ortamında olası dış etkilerden (çiğneme, konuşma, yutma, dil hareketi vb.) kaynaklanan kırılmalara/kopmalara dayanabilecek uygun mekanik dayanıklılığa sahip olması istenir (Preis vd., 2014; Rohani Shirvan vd., 2019). PE içermeyen lipozomal liflerle (CF2 kontrol ve CF4 kontrol) karşılaştırıldığında, daha yüksek lesitin içeriği ve life gömülü lipozom formülasyonuna Tween 80'in dahil edilmesi, numunelerin ÇM'sini yükseltmiştir. Tween 80'in plastikleştirici etkisi, polimer zincirleri arasındaki serbest hacmi artırarak interpolimer etkileşimlerini etkileyebilir (Ilevbare vd., 2012), plastikleştirici varlığının filmlerin ÇM değerini azalttığı bildirilse de, bu özellik yüzey aktif maddenin ürün içindeki konsantrasyonuna bağlıdır. Polimerik malzemedeki nihai plastikleştirici miktarı düşük veya yüksek olduğunda, sırasıyla az veya çok fazla etkileşim olabilir, dolayısıyla ÇM artabilir (Gonçavles vd., 2019). Plastikleştiricinin türünün de, filmlerin mekanik özellikleri açısından önemli olduğu bildirilmiştir, örneğin yapılan bir çalışmada zein filmlerine %5-15 konsantrasyonunda soya lesitininin eklenmesinin, lesitinin hidrofobik yapısından dolayı ÇM değerlerini arttırdığı rapor edilmiştir (Wei vd., 2022). Boş lipozomal lifler ve bunların PE yüklü karşılıkları (CF2 kontrol ve CF2; CF4 kontrol ve CF4) arasındaki ÇM değerinde ölçülen fark, PE yüklemesinin numunelerin ÇM değerini azalttığını göstermektedir. ÇM değerlerindeki azalma, lifler arası etkileşimin azaldığı ve polimerlerin moleküller arası kuvvetlerinin zayıfladığını gösterebilir ve genel olarak filmlerin sertliğini azaltarak liflerin esnekliğini ve elastikiyetini iyileştirir. Bu durum zayıf moleküller arası etkileşimler altında daha büyük deformasyona izin verir ve sonuç olarak UK değerinde artışa neden olur (Li vd., 2022). PE yüklü olmayan lipozomla hazırlanan CF4 kontrol örneği dışındaki tüm lipozomal lifler, sadece polimerle hazırlanan liflere (kontrol) kıyasla anlamlı

derecede yüksek ($p < 0.05$) UK değerlerine sahip olmuştur. Benzer şekilde Ge vd. (2019) ve Li vd. (2022) lipozomal içeren lifler üretmişler ve her iki çalışmada lipozomların eklenmesinin liflerin UK değerlerini arttırdığını bildirmiştir.

Örneklerimizde UK değeri, PE yüklü lipozomal liflerde (CF1-CF4), PE içermeyen lipozomal liflere (CF2 kontrol ve CF4 kontrol) kıyasla her zaman daha yüksektirPE, fenolik maddelerin yanı sıra reçine, mum ve diğer hidrofobik bileşenlerden oluşur. PE içeren lipozomların eklenmesi muhtemelen jelatin ve zein monomerleri arasındaki etkileşimin azalmasına ve polimer zincir-zincir etkileşimlerinin inhibisyonuna yol açmış ve bu da liflerin UK'sindeki artışla birlikte daha düşük ÇM'ye yol açmış olabilir. Eskandarinia vd. (2018), ayrıca propolis içeren mısır nişastası filmlerinin daha düşük ÇM ve daha yüksek UK değerlerine sahip olduğunu bulmuşlardır. Polimer ağına hidrofobik bileşiklerin eklenmesi, liflerde heterojen bir yapı ve süreksiz alanlar oluşturabilir ve bu da sonuçta filmin ÇM'sinin azalmasına yol açabilir (Li vd., 2020). Örneklerin FT-IR analizinde (Şekil 4.11), serbest PE'de 1633 ve 1512 cm^{-1}'de gözlemlenen pikler, liposomal PE'nin jelatin-zein lifi içerisine gömüldüğü zaman 1652 ve 1538 cm^{-1}'de kendini göstermiştir. PE ile polimerler arasındaki etkileşim, liflerin mekanik özelliklerde değişikliklere yol açabilir. Burada elde edilen sonuçlara göre, lipozomal PE'nin jelatin-zein liflerine yerleştirilmesinin hem ÇM'yi azalttığı hem de UK değerlerini arttırdığı, dolayısıyla mekanik özellikleri iyileştirdiği ve hem üreticiler hem de tüketiciler tarafından işlenmesi sırasında dış streslere karşı daha dayanıklı hale geldiği sonucuna varılabilir. Tek eksenli (BF1-4) ve çift eksenli (CF1-4) filmlerde (Şekil 4.13) de her formülasyonda liflere propolis yüklemesi kontrol filmlerine göre filmlerin UK değerini arttırmıştır. Bu nedenle, jelatin/zein nanoliflerinin zayıf esneklik ve süneklik özelliklerini geliştirmek için PE yüklü lipozom ilavesi uygun bir yöntem olabilir.



Şekil 4.12 Çift eksenli lifler için çekme mukavvemeti (ÇM) ve uzama kırılması (UK) grafikleri



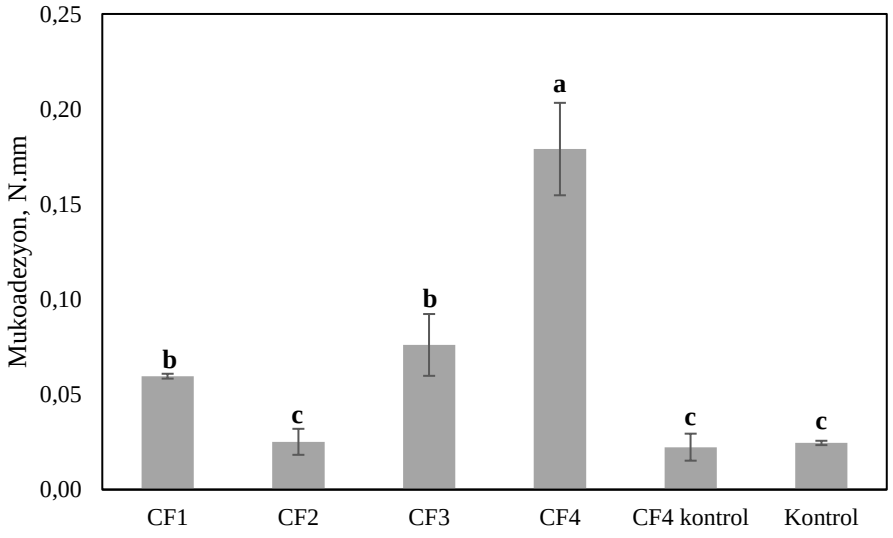
Şekil 4.13 Tek eksenli lifler için çekme mukavvemeti (ÇM) ve uzama kırılması (UK) grafikleri

4.2.6.2 *ex-vivo* Mukoadezyon Analizi

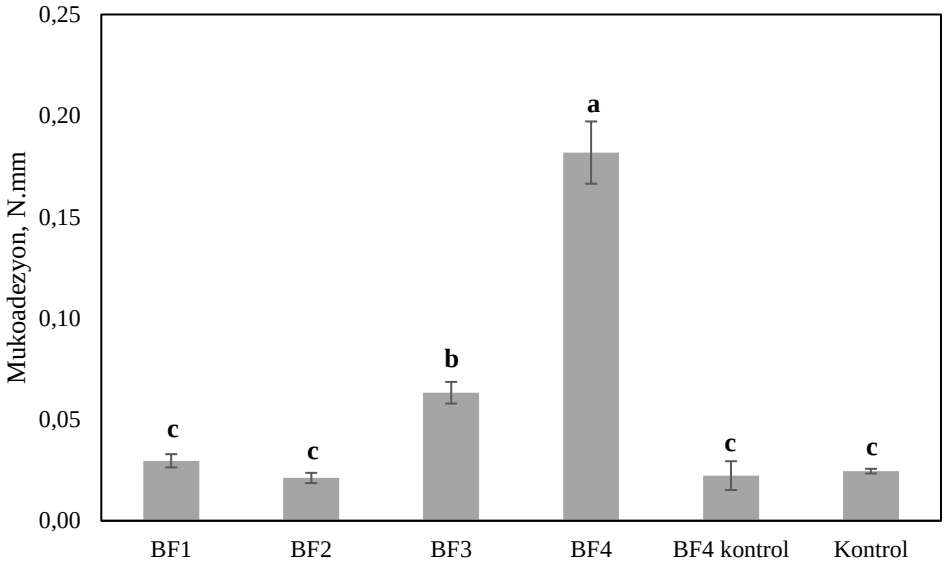
Nanoliflerde *ex-vivo* mukoadezyon çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre lifteki lipozom ve propolis miktarı arttıkça mukoadezyon işinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.14-4.15). Mendes vd. (2018), kitosan nanaolifleri içine fosfolipit yapılar ilave ettiğinde (1:1) fosfolipitlerin varlığının kitosan liflerin mukoadezyon özelliğini arttırdığını görmüşlerdir. Hem sadece polimer lifi (kontrol) hem de boş lipozom yüklü liflerle (CF4 kontrol-BF4 kontrol)

karşılaştırıldığında özellikle lipozomlara PE yüklenmesinin mukoadhezyon özelliği arttırdığı gözlenmiştir (CF4 ve BF4).

Mukoadezyonun, bir polimerik matrisin hidrofilikliğinden ve şişme yeteneğinden etkilendiği bilinmektedir. Genel olarak, kararlı polimerik matrisler için, matrisin daha yüksek esnekliği ve hidrasyon hızının, polimerin mukozal alanla etkileşime girebilen daha geniş yüzey alanıyla sonuçlanacağı ve dolayısıyla mukoadhezyonu destekleyeceği belirlitmektedir (Mendes vd., 2018). Zein hidrofobik jelatin ise hidrofilik polimerlerdir (Torkamani vd., 2018). Bunun yanında lif üretim yöntemi de filmlerin mukoadezyon özelliklerinde farklılığa sebep olmuştur. Çift eksenli yöntemle üretilen nanoliflerin mukoadezyon işi (Şekil 4.14), tek eksenli nanoliflerin mukoadezyon işinden bir miktar daha yüksek sonuç vermiştir. Çift eksenli yöntemde dış besleme enjektöründe sadece polimerler yer alırken, tek eksenli (Şekil 4.15) lif üretim yönteminde enjeksiyonda polimer ve lipozom karışım halinde bulunmaktadır. Mukoza dokusuyla temas eden kabuk kısmında daha çok polimerin bulunmasının çift eksenli lifin mukoadhezifliğini arttırdığı düşünülebilir.



Şekil 4.14 Çift eksenli lifler için *ex-vivo* mukoadezyon sonuçları

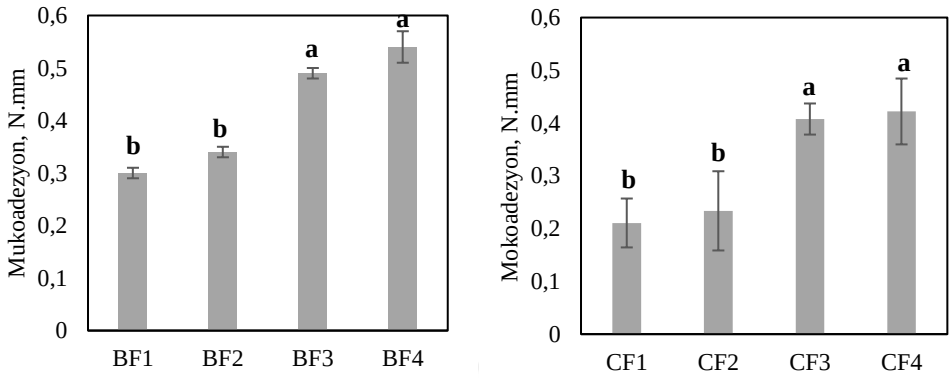


Şekil 4.15 Tek eksenli lifler için *ex-vivo* mukoadezyon sonuçları

4.2.6.3 *in vitro* Mukoadezyon Analizi

Mukus, glikoproteinler, lipidler, inorganik tuzlar ve sudan oluşur. Müsin, büyük miktarlarda serin, treonin ve prolin içeren bir glikoproteindir. (Ribeiro vd, 2016). Polimer ve müsin özellikleri göz önüne alındığında, mukoadezyonu en iyi açıklayan teori, hidrojen bağlarının ve van der Waals kuvvetlerinin varlığına dayanan adsorpsiyondur (Smart, 2005). Nanoliflerde *in vitro* mukoadezyon çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre mukoadezyon işi 0.21-0.54 N.mm arasında değişmiştir. Şekil 4.16'dan de görüleceği üzere tek eksenli liflerde lipozomal PE oranı arttıkça mukoadezyon işi de önemli düzeyde artış göstermiştir. Çift eksenli nanoliflerde CF1 ve CF2 örneklerinin mukoadhezyon işi CF3 ve CF4' den daha azdır. Aynı lipozom formülasyonunu (L1-4) içeren tek eksenli (BF1-4) ve çift eksenli (CF1-4) lifler karşılaştırıldığında ise yöntem farklılığının mukoadezyon işinde önemli farka sebep olmadığı gözlenmiştir. Polimer seçimi salınım mekanizmasında önemli bir rol oynar, seçilen polimerlerin sürdürülebilir bir salınım sağlaması için musine yapışması istenir (Pandey vd., 2021). Yapılan bir çalışmada lipozomal formülasyonun kontrollü bir salınım sağladığı tespit edilirken, mukoadezif formülasyonunun, mukozal dokuyla teması uzatarak, daha yüksek miktarda aktif madde kullanım ihtiyacını ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir (Karimunnisa & Atmaram, 2013). Daha yüksek oranda lipozomal PE içeren lifler hem çift hem de tek eksenli yöntemle

üretildikleri zaman mukoza dokuya daha yüksek yapışabilirlik göstermiştir. Benzer olarak Rosseto vd., (2021) de ürettiği propolis yüklü filmlerin yapışkanlığının (adhesiveness) filmlerin içine yüklenen propolis miktarı ile arttığını belirtmiştir.

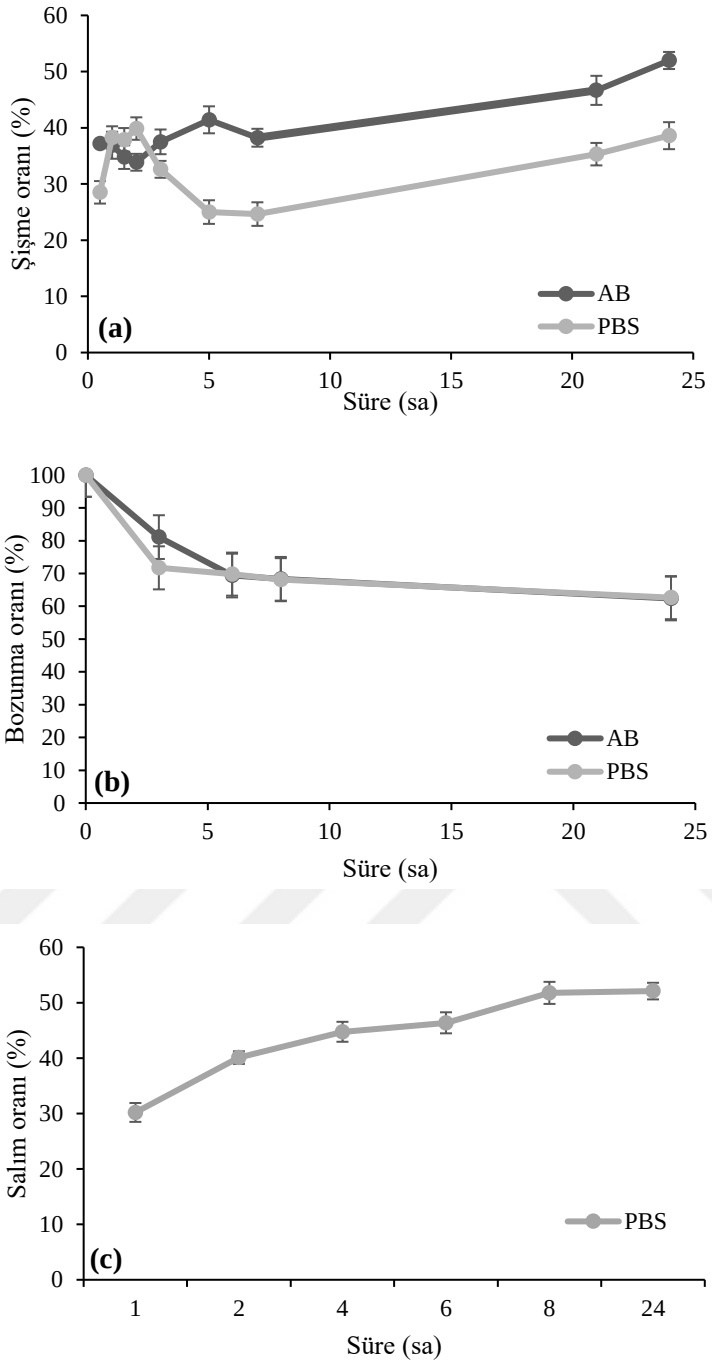


Şekil 4.16 Nanoliflerin *in vitro* müsin yöntemi ile mukoadezyon işi. Tek eksenli lifler BF1: L1 lipozom, BF2: L2 lipozom, BF3: L3 lipozom, BF4: L4 lipozom içerir. Çift eksenli filmler CF1: L1 lipozom, CF2: L2 lipozom, CF3: L3 lipozom, CF4: L4 lipozom içerir.

4.2.7 Çift Eksenli Nanofliflerin Kullanıldığı Yara İyileşme Analizleri

4.2.7.1 Salım ve Şişme-Bozunma Analizleri

Şişme kapasitesi, yara iyileşmesi için nanolif sisteminin cilt yüzeyiyle temas ettiğinde suyun polimerik filmler tarafından emilme hızı hakkında bir fikir verir (Deb vd., 2018). Şekil 4.17'de en yüksek PE'ye sahip lipozomal nanofilm olan CF4'ün asetat (pH 4.5) ve fosfat tamponlarında (pH 7.4) şişme davranışı incelenmiştir. Lipozomal nanolifler ilk şişme aşamasında (5 saat) suyu hızla emmiş ve şişme hızı zamanla düzgün bir şekilde artmıştır ve 24 saatlik süre boyunca sürekli şekilde propolis salımı gerçekleşmiştir. Asetat tamponda fosfat tampona göre daha yüksek bir şişme oranı, gözlenmiştir. Zein ve lesitinin hidrofobik yapısından dolayı lipozomal nanoliflerin suda tamamen çözünmesi beklenmez ancak jelatinin hidrofilik özelliğinden dolayı nanolifin suyu emerek şişmesi beklenir. Salım grafiği incelendiğinde 2. saatte PBS tamponda zirve yaptığı görülmüştür (Şekil 4.17). Şişmenin zirve yaptığı saat aralığı, salınımın arttığı aralığa karşılık gelmiştir.



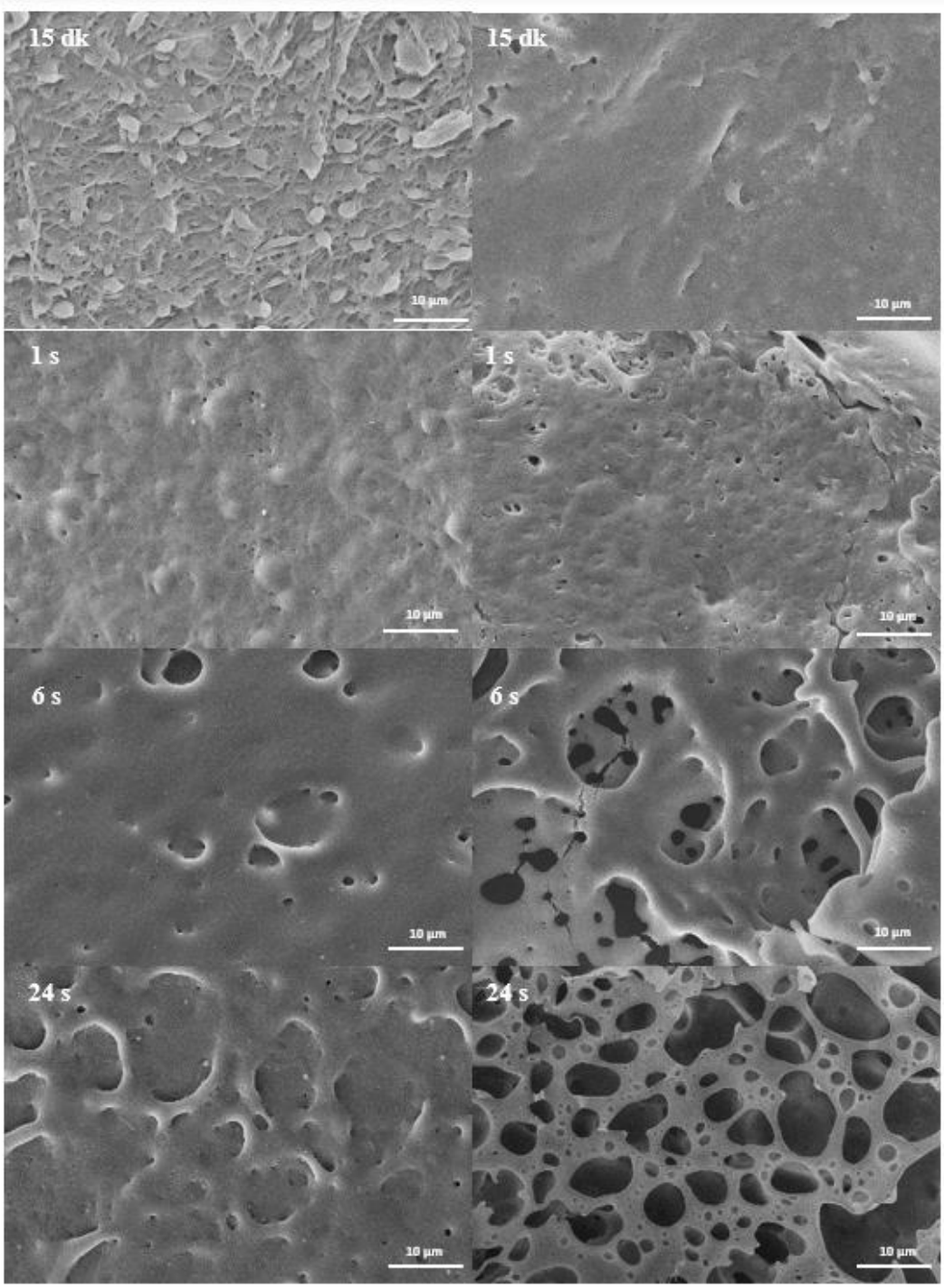
Şekil 4.17 Liposomal PE (L4) yüklü çift eksenli nanolifin (CF4) **(a)** Şişme oranı (%), **(b)** Bozunma oranı (%), **(c)** PE salım oranı (%)

PBS içerisinde PE'nin liposomal liften 1 saat sonraki salınımı, başlangıçta yüklenen miktarın yalnızca ~%30'u iken ve 24 saat inkübasyon sonrasında bile ancak %50'sine ulaşmıştır. Biyoaktif bileşiklerin şişmiş liflerden gecikmeli salınımı önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Wongsasulak vd., 2014; Aranci vd., 2020). Nanoliflerden PE salım grafiği şişme ve bozunma grafiği ile (Şekil 4.17.a ve b)

beraber incelendiğinde, nanoboyuttaki lifler tampon çözeltiler içinde şişerek birleşmiş böylece nanolifin birim hacmi başına düşen toplam yüzey alanımiktarı azalmıştır. PE'nin salınacağı toplam yüzey alanının azalması salımının gecikmesine neden olmuş olabilir. Bu durum, 60 ila 120 dakika sonra salım profili ile kanıtlandığı gibi, şişmiş liflerden propolis salımını önemli ölçüde geciktirilmiştir. Wongsasulak vd. (2014), α-tokoferolü zein-kitosan nanoliflerine kapsüllemiş ve 60 dakika sonra şişmenin ve aynı zamanda salımın arttığını belirlemiştir.

4.2.7.2 Bozunma Analizi (SEM)

Bozunma oranı da şişme ile benzer bir eğilim göstermiş, ilk 5 saatte lif miktarı hızla azalmış, ardından azalmadaki hız yavaşlamıştır (Şekil 4.17). Bozunma analizinin lif kütlesi ile takibinin yanı sıra belirli zaman aralıklarında PBS (pH:7.4) ve AB (pH:4.5) tamponlarından alınan örneklerin morfolojisi SEM ile görüntülenmiştir (Şekil 4.18). SEM görüntüleri ile kanıtlandığı gibi, lif yapısı zamanla PBS ortamında agglomere olduğundan, PE salımı bu tampon çözeltide daha yavaş ilerlemiştir. AB'de ise lif yapıları parçalanmış, porlar oluşmuş ve muhtemelen içerisindeki liposomal PE'yi daha hızla ortama salmıştır.

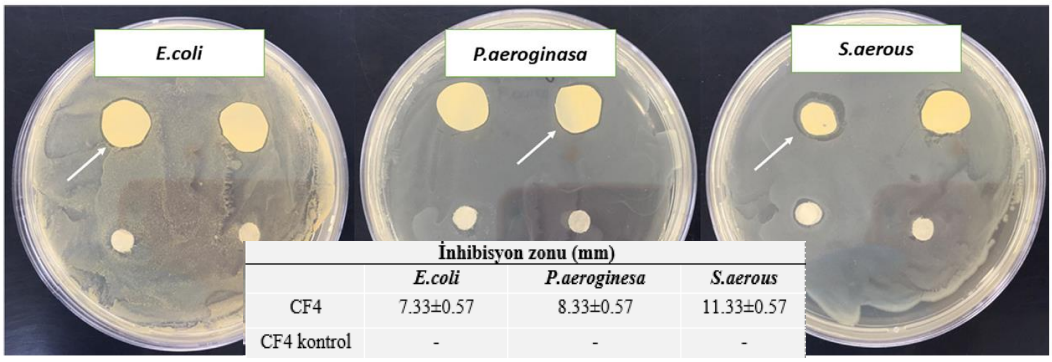


Şekil 4.18 PBS (fosfat tampon, pH 7.4) (sol) ve AB (asetat tampon, pH 4.5) (sağ) içine 37 ± 0,5 °C'de 15 dakika, 1 saat, 6 saat ve 24 saat süreyle daldırılmış CF4 lipozomal nanolifinin mikro yapıları

4.2.7.3 Antimikrobiyal Analizler

Bu çalışmada en yüksek oranda propolis ekstraktı içeren liposomal (L4) nanolif olan CF4'ün antimikrobiyal etkisine bakılmıştır. En fazla inhibisyonun *S.aerousa*

karşı olduğu görülmüştür. Onu sırasıyla *P.aeroginasa* ve *E.coli* takip etmiştir (Şekil 4.19). Propolisin çeşitli çalışmalarda yaralarda sık bulunan bakteriler olan *E. coli* (Gram-negatif; ATCC 25922), *Pseudomonas aeroginosa* (Gram-negatif; ATCC 27853), *S. aureus* (Gram- pozitif; ATCC 25023)'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Al-Waili, 2018; Sharaf vd., 2013; Vică vd., 2021).



İnhibisyon zonu (mm)			
	E.coli	*P.aeroginesa*	*S.aerous*
CF4	7.33±0.57	8.33±0.57	11.33±0.57
CF4 kontrol	-	-	-

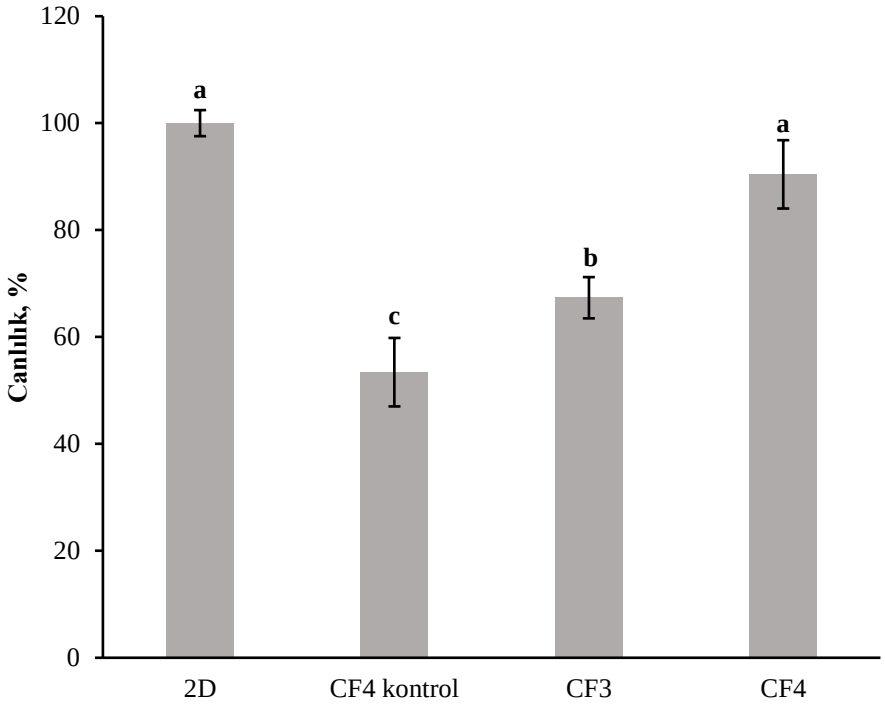
Şekil 4.19 Lipozomal propolis ekstraktı (PE) yüklü lifin (CF4) *Escherichia coli* (gram-negatif, ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negatif, ATCC 27853) ve *Staphylococcus aureus*'a (gram-pozitif, ATCC 29213) karşı inhibisyon zonları (37°C'de 24 saat inkübasyon).

Vică vd. (2021), yaptıkları çalışmada propolisin antimikrobiyal aktivitelerini incelemişler ve propolisin orijini (konsantrasyonundan bağımsız olarak) ile mikrobiyal aktivite arasında hiçbir bağlantı bulunmadığını ancak kullanılan mikrobiyal suşların inhibisyon zonlarının çaplarını etkilediğini görmüşlerdir. Propolisin esas olarak gram-negatif bakterilerden daha duyarlı olan gram-pozitiflere karşı aktif olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Moradkhannejhad vd., 2018). Gram negatif bakteriler, kimyasal olarak daha karmaşık ve daha yüksek yağ içeriği olan hücre duvarına sahiptir. Bu durum, onların daha yüksek olan antimikrobiyal dirençlerini açıklayabilir. Propolisin antimikrobiyal özellikleri, esasen flavonoidler ve sinnamik asit türevi gibi farklı bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada da bu bilgiler paralelinde propolis, bir gram pozitif bakteri olan *S.aerousa* karşı daha antimikrobiyal özellik göstermiştir.

4.2.7.4 Sitotoksisite (MTT) Analizi ve Hücre Adezyonu

Yapılan çalışmalar, propolisin, yara iyileşmesinde (epitelizasyon) yer alan bazı biyolojik mekanizmaları destekleyen doğal bir antibakteriyel, antifungal ve antiviral ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Voss vd., 2018; Freires vd.,

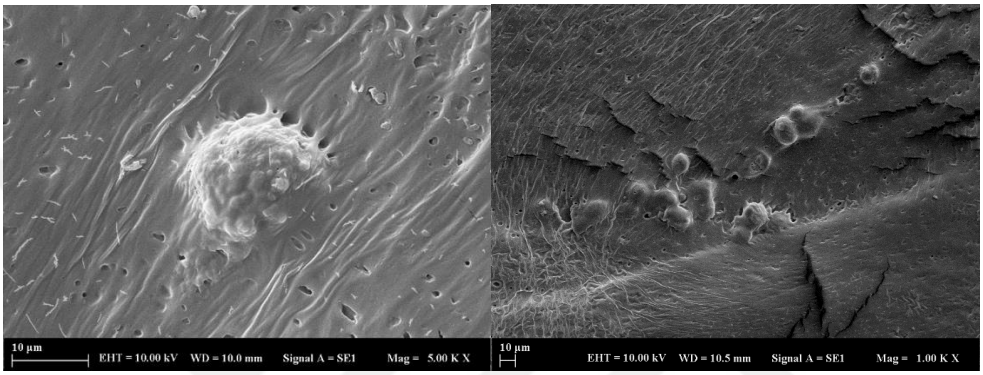
2016; de Almeida-Junior vd., 2023). Yara örtü malzemesi olarak kullanımı düşünülen propolis yüklü filmlerin üretiminde kullanılan biyopolimerlerin toksik olmama, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve kolay işleme gibi özellikleri mevcuttur. Bu etkiler beraber değerlendirildiğinde yara örtüsü olarak kullanımı değerlendirmek istenen propolis yüklü lipozomal nanoliflerin deri fibroblast hücreleri ile olan etkileşimleri MTT testi ile belirlenmiş (Şekil 4.20) ve nanofilmlere fibroblast hücre yapışabilirliği SEM görüntüleme ile de ayrıca gözlemlenmiştir.



Şekil 4.20 Elektrospinleme ile üretilen lipozomal PE yüklü çift eksenli nanoliflere kültürlenen HFF-1 fibroblast hücrelerinin MTT test sonuçları. CF3-CF4: sırasıyla L3-L4 lipozomları ile yüklenen nanolifler, CF4 kontrol: boş L4 lipozomu (propolis olmayan) yüklenen nanolifler. 2D pozitif kontrol grubu. Değerler ortalama ± standart sapma (n = 3) olarak verilmiştir. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

Şekil 4.20'de pozitif kontrol grubuna (2D) kıyasla liflerin fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksisite etkileri gözlenmiştir. Propolis içermeyen lipozomal lifin (CF4 kontrol) hücrelerin yaklaşık %50' sini öldürdüğü gözlenirken liflere propolis eklenmesinin hücre canlılığını arttırdığı ve PE içeriği daha yüksek olan lipozamal lifte (CF4), canlılığın daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Zein ve jelatinin biyouyumlu polimerler oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir

(Mamidi vd., 2018; Deng vd., 2019), bizim çalışmamızda da hücrelerin %50 sinden fazlası canlı kalmıştır. Hücre canlılığının PE ile artması, liposomal PE yüklenen jelatin/zein nanoliflerin hücre proliferasyonunu destekleme yeteneği sergilemesi ile kendimi göstermektedir. Bu sonuçlar, filmlerin üzerinde gelişme gösteren hücrelerin görüntülendiği SEM görüntüleri (Şekil 4.21) ile de doğrulanmıştır. MTT test sonuçları ile beraber değerlendirildiğinde lipozomal PE yüklenen nanoliflerin fibroblast proliferasyonu için biyouyumlu olduğu söylenenebilir.



Şekil 4.21 CF4 nanolif (CF4: L4 lipozomlarla yüklü nanolif) üzerinde büyütülmüş HFF-1 hücrelerinin SEM görüntüleri

4.2.8 Tek Eksenli Lipozomal PE İçerem Nanoliflerin Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık Analizinde Değerlendirilmesi

4.2.8.1 *in vitro* Biyoerişilebilirlik

Bu çalışmada, serbest PE, lipozomal PE (L4), ve lipozomal PE yüklenen tek eksenli nanolif (BF4) örnekleri *in vitro* sindirim koşullarına uğratılmış ve sindirim adımlarında fenolik maddelerin değişimi UPLC-MS-MS ile takip edilmiştir. Ağız, mide ve ince bağırsak sindirim aşamalarının her basamağında alınan örnekler santrifüjlenmiş ve üst fazlar analizlenmiştir. BF4 örneğinde ise ilaveten bağırsak fazında santrifüj tüpünde alt fazda kalan ve bozulmayan lif parçalanıp fenolik madde analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.5'de verilmiştir. Tablodaki toplam fenolik madde miktarı, tanımlanan maddelerin toplamı şeklindedir. Sindirime uğramayan lipozomal nanolifteki sindirim öncesi fenolik madde miktarı 1503.05±17.24 µg/g lif şeklinde ölçülmüştür. Nanoliften ağız aşamasında salınan toplam fenolik madde miktarı 55.79±4.60 µg/g lif iken, mide aşamasından sonra bu değer 66.95±11.07 µg/g lif olmuştur. Salınımın en

önemli kısmı ince bağırsak aşamasında gerçekleştirilmiş olup salınan toplam fenolik madde miktarı 1368.40±75.20 µg/g lif şeklindedir. Santrifüj tüpünün alt fazında kalan ve teorik olarak kalın bağırsağa geçip mikrobiyota tarafından metabolize edileceği kabul edilen fenolik madde miktarı ise 1894.50±42.00 µg/g lif şeklindedir. İnce bağırsakta üst faza salınan madde miktarının başlangıç madde miktarına oranı, % geri kazanım (GK), şeklinde değerlendirilmektedir. Lipozomal nanolifte enkapsüle edilen PE için toplam fenolik madde açısından % GK oranı %91.05 olmuştur. Diğer örneklerden,-lipozomal PE'de %GK değeri %64.68 iken, bu değer serbest ekstraktta yalnızca %4.08 olabilmiştir (Tablo 4.6). PE'nin suda çözünürlüğü oldukça düşüktür, özellikle mide sıvısının düşük pH'sında fenolik bileşikler proton kazanarak daha hidrofobik yapıya sahip olurlar ve sudaki çözünürlükleri düşer. Bundan dolayı mide fazında 2 saatlik inkübasyon sonrasında çözünürlükte artış gözlenmemiş olabilir. Bağırsak fazında hem artan pH'nın etkisi hem de ortamdaki enzimler ve safra tuzu vasıtası ile ekstraktın önemli kısmını oluşturan reçine, vaks ve diğer hidrofobik yapılara bağlı bulunan fenolik maddeler esktrakte edilebilir (Bouayed vd., 2011; González-Montiel vd., 2022). Benzer şekilde, Ozdal vd. (2019), çalışmalarına çeşitli propolis türlerinin simule gastrointestinal sindirim sonrası ağız, mide ve bağırsak aşamasında fenolik tayinlerini yapmış ve bağırsak fazından sonra fenolik ve flavonoid miktarının önemli miktarda arttığını belirtmişlerdir.. Ancak flavonoidlerin, özellikle flavonol grup bağlı olanların yüksek pH değerlerinde yapılarının bozulduğu bilinmektedir. Jurasekova vd. (2014), galangin, kaempferol ve kuersetinin yüksek pH değerlerinde stabil olmadığını belirtmiştir. Enkapsüle sistemler (lipozomal PE ve lipozomal lif), PE'nin sudaki ve sindirim sıvılarındaki çözünürlüğünü arttırmasının yanısıra aynı zamanda fenolik maddeleri sindirim koşullarına karşı korumuş ve bundan dolayı yüksek miktarda %GK değerleri sağlanmış olabilir. Nanoliflerde fenolik asitlerin (örn., kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit) bağırsak sıvısının üst fazındaki serbest haldeki miktarı, sindirim sıvısının alt fazında kalan miktardan oldukça fazla iken, flavonoidler (örn, CAPE, chrysin, galangin, kaempferol, pinobaksin, pinocembrin) bağırsak sıvısının alt fazında daha fazla miktarda tespit edilmiştir. Bu durumda sindirim sırasında büyük molekül ağırlıklı bileşikler parçalanalarak fenolik asitlere dönüşebileceği gibi, PE den salınan flavonoidler enkapsüle sistemin bileşenleri tarafından

korunmuş ve tutulmuş da olabilir. % GK değeri, luteolin hariç flavonoidler için % 9-28 arasında değişirken, fenolik asitler için bu değer %120-508 arasında değişmiştir. İnce bağırsakta salınan madde miktarının başlangıç madde miktarına oranı olan % GK değerindeki bu artış vaks yapılarına bağlı olan bileşenlerin sindirim sonrası ortaya çıkmasıyla fenolik ve flavonoid asitlerin serbest kalmasına bağlı artmış olabileceği gibi büyük moleküllü CAPE gibi fenolik ve flavonoid bileşenlerin daha küçük boyutlu fenolik asitlere dönüşmesi de %GK'yı arttırmış olabilir (Ozdal vd. (2019); Bouayed vd. (2011); González-Montiel vd. (2022)). Toplam fenolik madde BF4 için sindirim öncesi 1503.05 ±17.24 µg/g lif iken sindirim sonrası bağırsak üst faz ve alt fazda sırasıyla 1368.40 ±75.20 µg/g ve 1894.50 ±42.00 µg/g lif olmuştur. Bu sonuçlara göre toplam fenolik madde miktarı sindirim sonrası artmıştır. Gastrointestinal sindirim sırasında fenolik bileşikler enzimlerle etkileşime girebilir veya pH değişimleri nedeniyle konformasyonlarını değiştirebilir ve bu değişkenler bileşiklerin uyguladığı biyoaktiviteyi değiştirebilir (Saliba vd., 2023).

Tablo 4.5 *In vitro* biyoerişilebilirlik analizi sindirim basamaklarında serbest PE nin fenolik madde değişimi

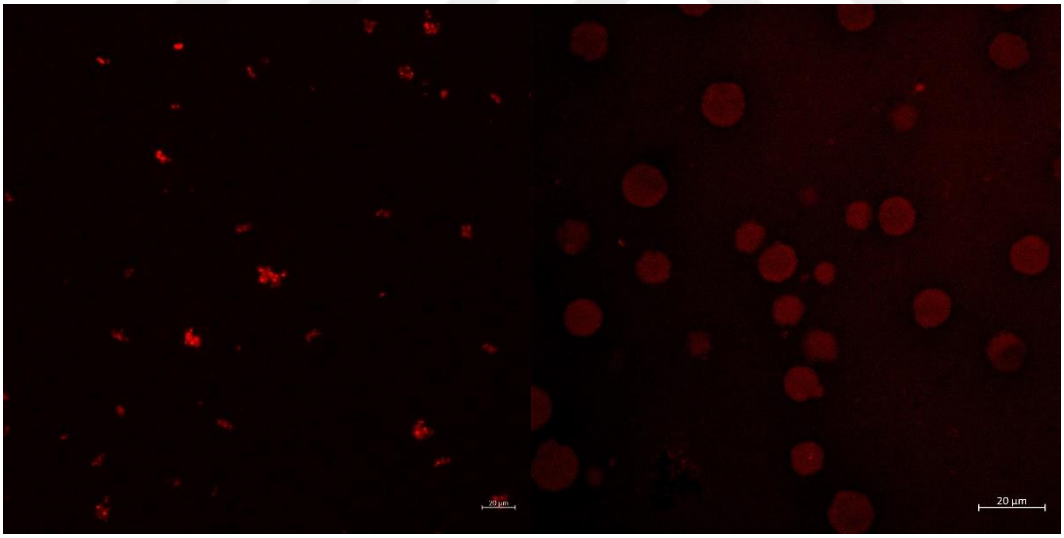
	Toplam fenolik madde (ppm, µg/g)	**3.4 Dimetoksi Sinamik Asit**	**Apigenin**	**Kafeik Asit**	**CAPE (Kafeik asit fenil ester)**	**Krisin**	**Ferulik Asit**	**Galangin**	**Kamferol**	**Luteolin**	**Naringenin**	**p-kumarik asit**	**Pinobanksin**	**Pinoçembrin**	**Kuersetin**	**Transsinamik asit**
Sindirim öncesi	***56563.38 ±636.79***	***4243.32 ± 67.85***	***1799.28 ± 51.19***	***3708.54 ± 91.77***	***6247.56 ± 11.07***	***4330.98 ± 90.63***	***1274.52 ± 67.99***	***7926.48 ± 25.50***	***2010.90 ± 192.88***	***594.12 ± 84.57***	***1023.90 ± 62.94***	***1841.10 ± 30.77***	***5934.36 ± 269.64***	***12420.24 ±24.50***	***1452.30 ± 33.70***	***1755.78 ± 227.62***
Ağız	609.79 ±225.17	89.65 ±49.37	-	147.55 ±103.36	1.12 ±0.12	-	45.31 ±43.64	75.24 ±4.76	2.38 ±0.38	53.01 ±20.84	-	45.31 ±9.23	41.82 ±6.01	5.31 ±0.56	37.62 ±1.54	65.45 ±3.92
Mide	722.38 ±30.91	153.85 ±13.15	-	196.22 ±6.85	-	-	52.73 ±15.24	36.64 ±6.64	-	23.92 ±3.92	3.50 ±2.10	62.80 ±6.29	81.54 ±11.05	21.96 ±0.42	54.41 ±11.61	34.83 ±4.83
Bağırsak	1552.45 ±31.89	315.94 ±118.74	-	100.42 ±45.03	2.38 ±0.38	56.78 ±11.75	41.68 ±0.00	84.20 ±17.34	55.38 ±44.20	19.72 ±9.72	40.42 ±9.93	103.36 ±20.56	298.60 ±28.95	292.59 ±23.50	23.22 ±3.22	117.76 ±3.36
% GK	2.74 ± 0.06	7.45 ±2.80	-	2.71 ±1.21	0.04 ±0.01	1.3 1 ±0.27	3.27 ±0.00	1.06 ±0.22	2.75 ±2.20	3.32 ±3.32	3.95 ±0.97	5.61 ±1.12	5.03 ±0.49	2.36 ±0.19	1.60 ±1.60	6.71 ±0.19

%GK: geri kazanım

Tablo 4.6 *In vitro* biyoerişilebilirlik analizi sindirim basamaklarında lipozomal PE yüklü nanolif (BF4) ve lipozomal PE (L4) örneklerinden salınan PE'nin fenolik madde değişimi

		Toplam fenolik madde (ppm, µg/g)	**3.4 Dimetoksi Sinamik Asit**	**Apigenin**	**Kafeik asit**	**CAPE (Kafeik asit fenil ester)**	**Krisin**	**Ferulik asit**	**Galangin**	**Kaempferol**	**Luteolin**	**Naringenin**	**p-kumarik asit**	**Pinobanksin**	**Pinoçembrin**	**Kuersetin**	**Transsinamik asit**
BF4	***Sindirim öncesi***	***1503.05 ±17.24***	***110.22 ±1.76***	***46.80 ±1.33***	***96.44 ±2.38***	***162.37 ±0.29***	***112.68 ±2.35***	***32.89 ±1.77***	***206.5 ±0.66***	***52.24 ±5.01***	***15.45 ±2.20***	***26.54 ±1.63***	***47.80 ±0.80***	***154.22 ±7.01***	***327.42 ±0.63***	***37.75 ±0.87***	***45.86 ±5.92***
	Ağız	55.79 ±4.60	7.58 ±1.64	-	9.61 ±5.35	0.21 ±0.01	-	14.70 ±1.28	5.13 ±0.47	0.95 ±0.11	1.45 ±0.25	-	7.18 ±2.12	0.83 ±0.29	1.11 ±0.53	2.22 ±0.24	4.82 ±0.53
	Mide	66.95 ±11.07	4.07± 2.07	-	9.92 ±5.44	-	0.95 ±0.15	20.03 ±5.09	5.41 ±0.51	-	1.86 ±0.02	-	9.56 ±1.76	3.42 ±0.16	3.85 ±0.01	3.16 ±0.88	4.72 ±0.01
	Bağırsak (üst faz)	1368.40 ±75.20	133.40 ±24.60	-	239.30 ±47.30	-	10.10 ±3.90	484.70 ±4.10	57.90 ±8.30	-	24.10 ±5.90	-	243.60 ±15.20	55.60 ±18.30	55.60 ±0.20	10.70 ±0.70	67.50 ±2.30
	Bağırsak (alt faz)	1894.50 ±42.00	169.72 ±10.80	-	80.55 ±18.75	108.30 ±12.00	317.85 ±3.45	3.00 ±0.05	147.60 ±12.30	52.50 ±27.00	43.80 ±9.60	40.65 ±9.15	1.20 ±0.20	415.95 ±10.05	538.95 ±2.85	24.60 ±4.61	60.75 ±2.85
	%GK	91.05 ±4.75	120.91 ±22.30	-	248.18 ±49.06	-	8.97 ±3.46	146.27 ±12.37	28.09 ±4.03	-	156.02 ±38.19	-	508.89 ±1.75	26.90 ±11.86	17.22 ±0.06	28.34 ±8.3	147.86 ±5.04
L4	***Sindirim öncesi***	***6012.19 ±68.98***	***440.88 ±7.06***	***187.22 ±5.32***	***385.78 ±9.54***	***649.48 ±1.15***	***450.72 ±9.43***	***131.58 ±7.07***	***824.20 ±2.65***	***208.97 ±20.06***	***61.80 ± 8.80***	***106.18 ±6.55***	***191.21 ± 3.20***	***616.90 ± 28.04***	***1291.69 ± 2.55***	***151.02 ± 3.50***	***183.47 ±23.67***
	Mide	708.65 ±19.08	193.65 ± 8.04	-	206.27 ±9.97	0.55 ±0.08	2.02 ±0.53	89.07 ±15.31	8.21 ±0.86	-	4.84 ±1.84	8.90 ±1.41	77.88 ±5.48	72.34 ±1.98	13.76 ±2.44	2.59 ±1.85	28.57 ±6.55
	Bağırsak	3881.18 ±838.73	742.73 ± 7.96	44.48 ±12.16	237.59 ±115.94	188.12 ±85.98	387.66 ±101.89	181.19 ±38.40	38.85 ±6.62	11.80 ±16.25	14.99 ±0.21	134.82 ±33.04	193.03 ±13.60	931.43 ±197.69	624.37 ±182.30	14.32 ±2.27	135.79 ±35.56
	%GK	64.55 ±13.9	168.3 ±1.80	23.77 ± 6.50	61.60 ±30.0	28.95 ± 3.23	94.74 ±14.5	136.69 ±28.97	4.71 ±0.80	5.64 ±1.77	24.27 ± 0.33	126.6 ± 1.02	100.8 ±17.1	150.9 ±46.4	48.34 ±14.1	9.48 ±1.50	74.36 ±19.4

in vitro sindirim sonrası mide ve bağırsak aşamalarından sonra lipozomların yapılarını görüntülemek için lipozomlar nil kırmızısı ile boyanarak nanolif elde edilmiştir. Sindirime uğratılan bu nanoliflerin mide ve bağırsak aşaması sonrası konfokal mikroskopi görüntüleri incelenmiştir. Lipozomların hem mide hem de bağırsak ortamında nanoliften salındığı gözlenmektedir (Şekil 4.22). Mide aşamasından sonra lipozomların yapısını koruduğu, nispeten küçük boyutlarını muhafaza ettikleri, bağırsak açamasında ise safra tuzları ve pH'nın da etkisiyle su alarak şişmeye başladığı ancak halen yuvarlak yapılara sahip oldukları görülebilir. Görüntüler *in vitro* biyoerişilebilirlik sonuçları ile kıyaslandığında (Tablo 4.6), mide aşamasında L4 lipozomun toplam fenolik içeriği 708.65±19.08 µg/g ölçülürken bağırsak aşamasından sonra ise 3881.18 ±838.73 µg/g olarak ölçülmüştür. Aynı trend L4 içeren BF4 nanofilminde de gözlemlenmiştir. Mide aşamasından sonra 66.95±11.07 olan toplam fenolik içeriği bağırsak aşamasında 1368.40±75.20 µg/g olmuştur. Bu sonuçlar lipozomların midede açılmadığını bağırsak aşamasından sonra önce şiştiğini ardından içindeki PE'yi salmaya başladığını göstermektedir



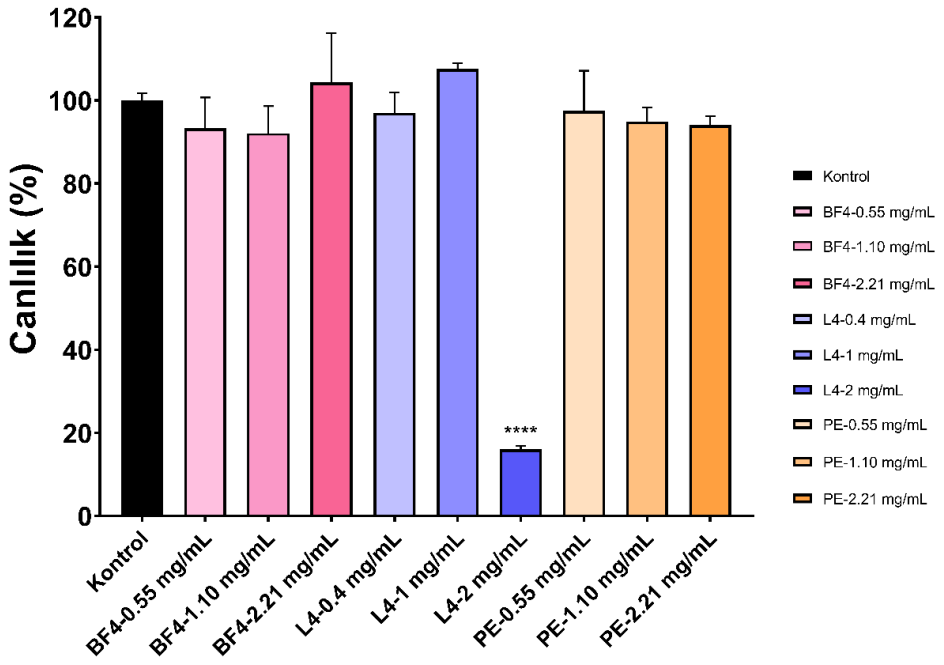
Şekil 4.22 Mide sindirimi aşaması sonrası lipozomlar (sol), Bağırsak sindirimi aşaması sonrası lipozomlar (sağ), her iki ölçek 20 µm'yi gösterir.

4.2.9 Caco-2 Biyoyararlılık Analizi

4.2.9.1 Sitotoksik Etkiler

Bir önceki aşamada sindirime uğratılan BF4 (lipozomal PE içeren lif), L4 (lipozomal PE) ve serbest ekstrakt örneklerinin farklılaşmış Caco-2 hücreleri

üzerinde gösterdikleri toksik etki Şekil 4.23'de gösterilmektedir. Farklı konsantrasyonlarda 6 saat inkübe edilen Caco-2 hücreleri MTT sitotoksisite testine tabi tutulmuş ve canlılıkları ölçülmüştür. Sonuçlar herhangi bir işlem uygulanmayan kontrol grubunun %100 canlı kabul edilerek elde edilen verilerin normalizasyonu ile bulunmuş ve ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Elde edilen olan bulgulara göre, 6 saatin sonunda BF4 ve PE örneklerinin hiçbir konsantrasyonu toksik etki göstermezken ($p>0.05$), L4 örneğinde 2 mg/mL konsantrasyonda anlamlı canlılık kaybı saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçlardan yola çıkılarak BF4 ve PE örneklerine herhangi bir seyreltme uygulanmaksızın 2.21 mg/mL, L4'e ise 20 katlık bir seyreltme uygulamasıyla sırasıyla 1 ve 12.5 mg/mL olarak biyoyararlanım modeline uygulanmasına karar verilmiştir.

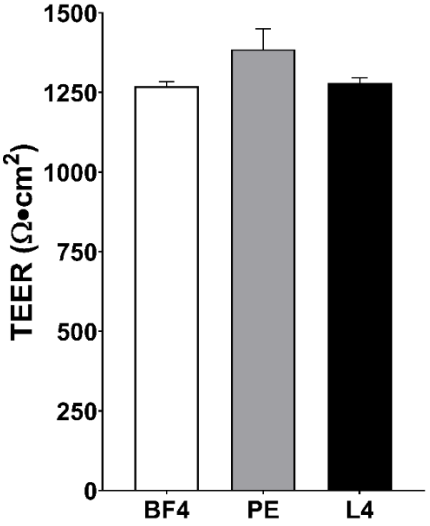


Şekil 4.23 Caco-2 hücrelerine karşı PE, L4 ve BF4'ün MTT analizi ile ölçülen sitotoksik etkisi

4.2.9.2 Biyoyararlanım Seviyelerinin Belirlenmesi

Metot kısmında anlatıldığı gibi ikili membran sistemde hazırlanan Caco-2 hücrelerinin 21 gün boyunca farklılaşarak insan bağırsak modelinin oluşturulması sağlanmıştır. Deneye başlamadan önce hücreler EBSS transport çözeltisi ile 60 dk inkübe edilerek hücrelerin çözeltiye alışmaları sağlanmıştır. Sonrasında tüm hücrelere ait TEER ölçümleri ile hücreler arasındaki olası istenmeyen geçiş

noktalarının olup olmadığı ve tek katmanlı yapıyı sağlayıp sağlayamadıkları kontrol edilmiştir. TEER değerleri tüm membran sistemlerinde kabul edilen değer olan 250 Ω.cm^2'nin üzerinde gözlenmiştir. TEER değerleri 6 saatlik biyoyararlanım süresinin sonunda da ölçümleri gerçekleştirilmiş ve 250 Ω.cm^2 sınır değerinin üzerinde oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 Biyoyararlanım süresi sonunda kaydedilen transepitelyal elektrik direnci (TEER) değerleri. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4.2.9.3 UPLC-MS-MS sonuçları

PE ve PE içeren lipozom ve nanofilm sistemlerinde tanımlanan aktif fenolik bileşiklerin varlığı ve konsantrasyonu, simüle edilmiş ağız, mide ve bağırsak fazı içeren sindirim koşullarına maruz bırakıldıktan sonra, PE'nin sahip olduğu fenolik bileşenlerin stabilitelerini ve biyoerişilebilirliklerini anlamak amacıyla Caco-2 *in vitro* biyorarlılık analizine tabi tutulmuştur. Caco-2 in vitro biyorarlılık analizi sonucunda apikal faz ve bazolateral fazdan alınan örnekler UPLC-MS-MS'de fenolik profillerince analiz edilmiştir. Tablo 4.7'de görüldüğü üzere serbest PE 'nin Caco-2 hücrelerinden sadece transsinnamik asit basereterol faza geçmiş diğer fenolik bileşenler hücrelerden geçememiştir. Lipozomal PE'de fenolik bileşenlerden sadece pinocembrin ve pinobanksin alt faza geçerken Lipozomal PE içeren nanolifte transsinamik asit, p-Kumarik asit, kafeik asit ve 3,4 dimetoksi sinamik asit bazolateral faza geçebilmiştir. Bu da fenolik profil açısından en iyi biyorarlılığa lipozomal PE yüklü nanoliflerin sahip olduğunu gösterir.

Lipozomlar sahip oldukları fosfolipid yapıları sayesinde hücre zarlarından daha kolay geçerek biyorarlılığı arttıran enkapsülasyon ajanlarıdır (Ozkan vd., 2020). Bağırsak epitel hücreleri olan Caco-2 hücre lümenlerinden geçiş genellikle pasif difüzyon yolu ile olur (Neilson vd., 2017). İzoflavonoidlerin ve flavanonların gibi fenolik bileşenlerin bazı formları daha lipofiliktir ve bu özelliklerinden dolayı bağırsak geçirgenliklerinin daha fazla olduğu söylenebilir (de Alencar vd., 2023). PE'de ise bu fenolik bileşenler vakslara bağlandığından sindirim sistemleri tarafından elimine edilemeyen waks bileşenleri fenolikleri tutar ve difüze olmasını engellemiş olabilirken aynı zamanda fenolik bileşenler pH alkaliye doğru gittikçe çözünür hale gelmiş olması da biyoyararlılığını arttıran nedenlerdendir.

Tablo 4.7 Caco-2 biyorarlılık analizi sonucu apikal (üst) ve bazolateral (alt) fazın PE lif, PE fenolik bileşen kompozisyonu

	Örnekler	Toplam fenolik madde (ppm, µg PE/g)	Transsinamik Asit	p-Kumarik Asit	Kafeik Asit	Ferrulik Asit	3.4 Dimetoksi Sinamik Asit	Krisin	Pinoçembrin	Apigenin	Naringenin	Pinobanksin
Apikal (üst faz)	PE	1637.08 ±263.67	411.20 ±142.75	98.90 ±15.20	102.98 ±16.60	94.22 ±4.53	188.76 ±18.10	219.75 ±37.82	156.54 ±26.35	18.31 ±3.94	31.80 ±0.39	314.58 ±2.05
	BF4	1299.67 ±59.76	277.70 ±162.32	210.16 ±131.09	154.48 ±24.66	473.38 ±29.46	157.18 ±28.26	6.21 ±2.12	0	0	0	20.52 ±6.47
	L4	703.58 ±55.77	7.39 ±1.70	52.08 ±15.41	52.06 ±15.11	2.12 ±0.3	132.74 ±24.25	110.98 ±7.74	134.21 ±2.45	0	13.13 ±0.30	198.83 ±6.78
Bazolateral (alt faz)	PE	87.35 ±34.50	87.35 ±34.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF4	70.57 ±15.52	39.69 ±4.91	5.12 ±0.72	5.25 ±0.13	0	20.49 ±5.75	0	0	0	0	0
	L4	26.27 ±3.52	0	0	0	0	0	0	4.75 ±0.12	0	0	21.51 ±3.65

L4: %4 PE içeren lipozom, BF4: L4 içeren tek eksenli nanofilm, PE: Propolis ekstraktı

85

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Probiyotik Bakteri Enkapsülasyonu

Probiyotik potansiyeli olduğu bilinen *Lactobacillus plantarum* ELB90 bakterisi çift emülsiyon (W1/O/W2) sisteminin ilk fazına (W1/O) yüklenmiş ve daha sonra bu ilk emülsiyon aljinat içerem W2 fazında disperse edilmiştir. Elde edilen nihai emülsiyon Ca^{2+} ile elektospreyleme tekniği ile jelleştirilerek bead-boncuk şeklinde kapsüller elde edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda probiyotik bakteri emülsiyon içermeyen aljinat hidrojelleri ile de enkapsüle edilmiş, tüm boncuklar aynı zamanda kitosan ile de kaplanmıştır. Çifte emülsiyonun elektrosprey beadlere dahil edilmesi, emülsiyon içermeyen aljinat beadlerine kıyasla daha az buruşuk ve pürüzsüz yüzeyli ve daha düşük jel kuvvetli yapılarla sonuçlanmıştır. Çifte emülsiyonun iç su fazında inulin olması ve beadlerin kitosanla kaplaması parçacıkların boyutunu arttırmış ve küresellikten kısmen uzaklaştırmıştır. Emülsiyonla doldurulmuş beadler, simüle edilmiş *in vitro* gastrointestinal koşullara ve termal işlem koşullarına maruz bırakıldığında, serbest bakteri ve emülsiyonsuz hidrojel enkapsüle bakteriye kıyasla bakterilerin hayatta kalma oranı sindirim sıvılarında %84'e kadarve termal koşullarda ise %68'e kadar çıkmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, probiyotiklerin gıdaya eklenmesi için daha etkili taşınım sistemlerinin tasarlanmasına ve geliştirimesine imkan verebilir.

5.2 Yara Örtüsü Olarak Çift Eksenli Lipozomal Liflerin Kullanım Potansiyeli

Propolis ekstraktı (PE) yüklü lipozomlar, ince film hidrasyon ve ultrasonikasyon yöntemiyle üretilmiştir. PE'nin yükleme oranını arttırabilmek için için lipozom formülasyonlarına Tween 80 eklenmişitir. Elektrospinleme ile çift eksenli lipozomal lnanofilmlerin üretiminde çekirdek malzemesi olarak lipozomal PE ve zein/jelatin polimerleri, kabuk malzemesi olarak ise yalnızca zein/jelatin polimerleri kullanılmıştır. CLSM ve FE-SEM görüntülerinin kanıtladığı gibi lipozomlar, lif yapısına gömüldüklerinde yapılarını korumuşlardır. PE yüklü lipozomlarla yüklenen çift eksenli nanofilmler, daha düşük ÇM ve daha yüksek UK

değerleri göstermiştir ve bu durum liposomal liflerin artan esnekliği ile ilgilidir. Daha yüksek liposomal PE yüklenebilen lifler, daha yüksek mukoadezyon özellik sergilemişlerdir. Lipozomal lif, asidik bir ortam olan AB (pH:4.5)'ye kıyasla PBS (pH: 7.4) tampon çözeltide daha düşük şişme oranı ve erozyon değerlerine sahip olmuştur. Liflerden salınan PE miktarı, 24 saat sonunda başlangıç miktarının yaklaşık %50'sine ulaştı. Lipozomal PE yüklü çekirdek/kabuk lifi içeren nanofilm özellikle *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir, ve biyouyumluluğu hücre canlılığındaki artış ile doğrulanmıştır. İnsan deri fibroblast hücrelerinin (HFF-1) PE yüklü lipozomal nanofilmlere bağlanması, bu filmlerin potansiyel biyouyumlu bir yara iyileştirme malzemesi olarak önerilebileceğini göstermiştir.

5.3 Lipozomal PE Yüklenen Nanoliflerden Fenolik Maddelere Ait *in vitro* Biyoerişilebilirlik ve Caco-2 Biyoyararlılık Sonuçları

Fenolik bileşiklerin sağlığı geliştirici etkileri olduğu bilinmektedir ancak stabiliteleri ve suda çözünürlükleri ile ilgili problemlerin yanı sıra biyoerişilebilirlikleri ve biyoyararlanımlarının düşük olması nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Bu sınırlamalar, fenolik bileşiklerin kapsülleme teknikleriyle kapsüllenmesiyle aşılabilir. Bu çalışmada, PE'nin önce lipozomlara ardından nanofilmlere kapsüllemenin, biyoerişilebilirlik ve biyoyararlanım açısından fenolik bileşiklerin sindirilebilirlik özellikleri üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır. İnce bağırsakta salınan madde miktarının başlangıç madde miktarına oranına göre değerlendirildiğinde, toplam fenolik madde için %GK oranının %91.05 olduğu gözlenmiştir. Lipozomal PE nanoliflerin %GK değerleri, lipozomal PE ve serbest PE'nin %GK değerleri ile karşılaştırıldığında daha fazla fenolik maddenin bağırsak ortamında bulunduğu söylenebilir. Lipozomal PE'de %GK değeri %64.68 iken, bu değer serbest ekstraktta yalnızca %4.08 idir. Caco-2 sonuçlarında ise serbest PE 'nin Caco-2 hücrelerinden sadece transsinnamik asit basereterol faza geçmiş diğer fenolik bileşenler hücrelerden geçememiştir. Lipozomal PE'de fenolik bileşenlerden sadece pinoçembrin ve pinobanksin alt faza geçerken Lipozomal PE içeren nanofilmde transsinamik asit, p-Kumarik asit, kafeik asit ve 3,4 dimetoksi sinamik asit bazolateral faza geçmiştir. Bu da fenolik profil açısından en iyi biyorarlılığı lipozomal PE yüklü nanofilmlerin sahip olduğunu

gösterir. Sonuç olarak Nanofilm içine lipozomal sistemle enkapsüle edilen propolisin biyorarlılığı diğer formlarına göre artmıştır.

KAYNAKÇA

Afzaal, M., Saeed, F., Saeed, M., Azam, M., Hussain, S., Mohamed, A. A., & Anjum, F. M. (2020). Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal and thermal conditions. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1899-1912.

Agarwal T, Narayana SGH, Pal K, Pramanik K, Giri S &, Banerjee I. (2015). Calcium alginate-carboxymethyl cellulose beads for colon-targeted drug delivery. *Int J Biol Macromol* 75:409-417

Ahmad, A., Yap, W. B., Kofli, N. T., & Ghazali, A. R. (2018). Probiotic potentials of Lactobacillus plantarum isolated from fermented durian (Tempoyak), a Malaysian traditional condiment. *Food science & nutrition*, 6(6), 1370-1377.

Ahmadi, S. S., Aminzare, M., Azar, H. H., Nikfarjam, N., Roohinejad, S., Greiner, R., & Tahergorabi, R. (2024). Application of electrospun zein/polyvinyl alcohol nanofibers incorporating thymoquinone and electrosprayed resveratrol nanoparticles on the shelf life of fresh rainbow trout fillet and inoculated Escherichia coli O157: H7. *Food Control*, 155, 110089.

Alavi, M., Karimi, N., & Safaei, M. (2017). Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Advanced pharmaceutical bulletin*,7(1): 3.

Alehosseini, A., Gómez-Mascaraque, L. G., Martínez-Sanz, M., & López-Rubio, A. (2019). Electrospun curcumin-loaded protein nanofiber mats as active/bioactive coatings for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 87, 758-771.

Ali, S., Khatri, Z., Oh, K. W., Kim, I. S., & Kim, S. H. (2014). Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. *Macromolecular Research*, *22*, 971-977.

Al-Tawaha, R., & Meng, C. (2018). Potential benefits of Lactobacillus plantarum as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Adv. Environ. Biol*, 12, 16-27.

Al-Waili, N. (2018). Mixing two different propolis samples potentiates their antimicrobial activity and wound healing property: A novel approach in wound healing and infection. *Veterinary world*, *11*(8), 1188.

Amjadi, S., Almasi, H., Ghorbani, M., & Ramazani, S. (2020). Preparation and characterization of TiO2NPs and betanin loaded zein/sodium alginate nanofibers. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100504.

Ansarifar, E., & Moradinezhad, F. (2021). Preservation of strawberry fruit quality via the use of active packaging with encapsulated thyme essential oil in zein nanofiber film. *International Journal of Food Science & Technology*, *56*(9), 4239-4247.

Arafa, M. G., Ghalwash, D., El-Kersh, D. M., & Elmazar, M. M. (2018). Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. *Scientific reports*, 8(1), 18056.

Aranci, K., Uzun, M., Su, S., Cesur, S., Ulag, S., Amin, A., & Gunduz, O. (2020). 3D propolis-sodium alginate scaffolds: influence on structural parameters, release mechanisms, cell cytotoxicity and antibacterial activity. *Molecules*, *25*(21), 5082.

Artursson, P. (1991). Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. Crit. Rev. Ther. *Drug Carrier Syst*. 8, 305–330.

Atia A, Gomaa A, Fliss I, Beyssac E, Garrait G &, Subirade M. (2016). A prebiotic matrix for encapsulation of probiotics: physicochemical and microbiological study. *J Microencapsul* 33(1):89-101.

Balanč B, Kalušević A, Drvenica I, Coelho MT, Djordjević V, Alves VD &, Bugarski B. (2016). Calcium–alginate–inulin microbeads as carriers for aqueous carqueja extract. *J Food Sci* 81(1):E65-E75.

Barclay T, Ginic-Markovic M, Cooper P &, Petrovsky N. (2016). Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *J Excip Food* 1(3):1132.

Barroso, P. R., Lopes-Rocha, R., Pereira, E. M. F., Marinho, S. A., de Miranda, J. L., Lima, N. L., & Verli, F. D. (2012). Effect of propolis on mast cells in wound healing. *Inflammopharmacology*, 20, 289-294.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, *239*(1), 70-76.

Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food chemistry*, *128*(1), 14-21.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., & Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.

Bruno, B. J., Miller, G. D., & Lim, C. S. (2013). Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery, Therapeutic Delivery, 4(11), 1443–1467.

Busch, V. M., Pereyra-Gonzalez, A., Šegatin, N., Santagapita, P. R., Ulrih, N. P., & Buera, M.D.P. (2017). Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. *LWT*, 75, 227-235.

Ching, S.H., Bansal, N., & Bhandari B. (2016). Rheology of emulsion-filled alginate microgel suspensions. *Food Res Int.* 80:50-60

Choi, Y.M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M.,& Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, 162(1), 56-67.

Cook, M.T., Tzortzis, G., Khutoryanskiy, V.V., & Charalampopoulos, D. (2013). Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan–alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *J Mater Chem B* 1(1):52-60

Coupland, J. N., & Hayes, J. E. (2014). Physical approaches to masking bitter taste: Lessons from food and pharmaceuticals, *Pharmaceutical Research*, 31(11), 2921–2939.

Cui, H., Yuan, L., Li, W., & Lin, L. (2017). Antioxidant property of SiO2-eugenol liposome loaded nanofibrous membranes on beef. *Food Packaging and Shelf Life*, *11*, 49-57.

da Silva Carvalho, A. G., da Costa Machado, M. T., Barros, H. D. D. F. Q., Cazarin, C. B. B., Junior, M. R. M., & Hubinger, M. D. (2019). Anthocyanins from jussara (Euterpe edulis Martius) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation. *Powder Technology*, 345, 283-291.

de Alencar, S. M., de Oliveira Sartori, A. G., Dag, D., Batista, P. S., Rosalen, P. L., Ikegaki, M., & Kong, F. (2023). Dynamic gastrointestinal digestion/intestinal permeability of encapsulated and nonencapsulated Brazilian red propolis: Active compounds stability and bioactivity. *Food Chemistry*, 411, 135469.

de Almeida-Junior, S., Ferraz, M. V. F., de Oliveira, A. R., Maniglia, F. P., Bastos, J. K., & Furtado, R. A. (2023). Advances in the phytochemical screening and biological potential of propolis. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *37*(5), 886-899.

de Freitas Zômpero, R. H., López-Rubio, A., de Pinho, S. C., Lagaron, J. M., & de la Torre, L. G. (2015). Hybrid encapsulation structures based on β-carotene-loaded nanoliposomes within electrospun fibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 475-482.

de Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), 1018-1028.

Deb, A., Mandurnekar, A. A., Rani, V., Chauhan, T., Mishra, B., & Chawla, R. (2018). Formulation and evaluation of curcumin loaded nanofilms for the treatment of wounds. *SPER Journal of Pharmaceutical and Biological Reasearch*, *1*, 5-9.

Deng, L., Li, Y., Feng, F., & Zhang, H. (2019). Study on wettability, mechanical property and biocompatibility of electrospun gelatin/zein nanofibers cross-linked by glucose. *Food Hydrocolloids*, *87*, 1-10.

Deng, L., Zhang, X., Li, Y., Que, F., Kang, X., Liu, Y., & Zhang, H. (2018). Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 75, 72-80.

Ding X., Xu Y., Wang Y., Xie L., Liang S., Li D., & Zhan X., (2022). Carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan complex nanogels stabilized double emulsions incorporated into alginate hydrogel beads for the encapsulation, protection and delivery of probiotics. *Carbohydr Polym* 289:119438.

Drosou, C. G., Krokida, M. K., & Biliaderis, C. G. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying technology*, 35(2), 139-162.

Duman, D., & Karadag, A. (2021). Inulin added electrospun composite nanofibres by electrospinning for the encapsulation of probiotics: characterisation and assessment of viability during storage and simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 927-935.

Eskandarinia, A., Rafienia, M., Navid, S., & Agheb, M. (2018). Physicochemical, antimicrobial and cytotoxic characteristics of corn starch film containing propolis for wound dressing. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 3345-3351.

Fairweather-Tait, Wortley, Harvey, & Glahn. (2007). The use of solubility, dialyzability, and Caco-2 cell methods to predict iron bioavailability. *International journal for vitamin and nutrition research*, 77(3), 158-165.

Fedi, A., Vitale, C., Ponschin, G., Ayehunie, S., Fato, M., & Scaglione, S. (2021). *In vitro* models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review. *Journal of controlled release*, 335, 247-268.

Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*, 8(2), 44.

Feng, K., Li, C., Wei, Y. S., Zong, M. H., Wu, H., & Han, S. Y. (2019). Development of a polysaccharide based multi-unit nanofiber mat for colon-targeted sustained release of salmon calcitonin. *Journal of colloid and interface science*, 552, 186-195.

Feng, X., Ng, V. K., Mikš-Krajnik, M., & Yang, H. (2017). Effects of fish gelatin and tea polyphenol coating on the spoilage and degradation of myofibril in fish fillet during cold storage. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 89-102.

Fiocco, D., Capozzi, V., Collins, M., Gallone, A., Hols, P., Guzzo, J., & Spano, G. (2010). Characterization of the CtsR stress response regulon in Lactobacillus plantarum. *Journal of bacteriology*, 192(3), 896-900.

Fossati, L., Dechaume, R., Hardillier, E., Chevillon, D., Prevost, C., Bolze, S., & Maubon, N. (2008). Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International journal of pharmaceutics*, 360(1-2), 148-155.

Frakolaki, G., Katsouli, M., Giannou, V., & Tzia, C., (2020). Novel encapsulation approach for Bifidobacterium subsp. lactis (BB-12) viability enhancement

through its incorporation into a double emulsion prior to the extrusion process. *LWT- Food Sci Technol* 130:109671.

Freires, I. A., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European journal of medicinal chemistry*, 110, 267-279.

Galler, K. M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M., & Feuerer, M. (2021). Inflammatory response mechanisms of the dentine–pulp complex and the periapical tissues. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1480.

Gao, H., Ma, L., Sun, W., McClements, D. J., Cheng, C., Zeng, H., & Liu, W. (2022). Impact of encapsulation of probiotics in oil-in-water high internal phase emulsions on their thermostability and gastrointestinal survival. *Food Hydrocolloids*, 126, 107478.

Gao, S., Yin, T., Xu, B., Ma, Y., & Hu, M. (2014). Amino acid facilitates absorption of copper in the Caco-2 cell culture model. *Life sciences*, 109(1), 50-56.

Gonçalves, W., Mabuchi, T., & Tokumasu, T. (2019). Nucleation and growth of cavities in hydrated Nafion membranes under tensile strain: a molecular dynamics study. *The Journal of Physical Chemistry C, 123*(47), 28958-28968.

González-Montiel, L., Figueira, A. C., Medina-Pérez, G., Fernández-Luqueño, F., Aguirre-Álvarez, G., Pérez-Soto, E., ... & Campos-Montiel, R. G. (2022). Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts during *in vitro* digestion. *Applied sciences*, *12*(15), 7892.

Guzelmeric, E., Özdemir, D., Sen, N. B., Celik, C., & Yesilada, E. (2023). Quantitative determination of phenolic compounds in propolis samples from the Black Sea Region (Türkiye) based on HPTLC images using partial least squares and genetic inverse least squares methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 229, 115338.

Gültekin-Özgüven, M., Karadağ, A., Duman, Ş., Özkal, B., & Özçelik, B. (2016). Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (Morus nigra) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies. *Food chemistry*, *201*, 205-212.

Hansen, L.T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y.L., & Paulson, A.T., (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol*, 19(1):35-45

Has, C., & Sunthar, P. (2020). A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. Journal of liposome research, 30(4), 336-365.

Hasanbegloo, K., Banihashem, S., Dizaji, B. F., Bybordi, S., Farrokh-Eslamlou, N., Abadi, P. G. S.,& Irani, M. (2023). Paclitaxel-loaded liposome-incorporated chitosan (core)/poly (ε-caprolactone) /chitosan (shell) nanofibers for the treatment of breast cancer. International *Journal of Biological Macromolecules*, 230, 123380.

He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhu, Q., Chen, Z., & Wu, W. (2019). Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta pharmaceutica sinica B*, 9(1), 36-48.

Hedren, E., Diaz, V., & Svanberg, U., (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots deter-mined by an *in vitro* digestion method. *Eur J Clin Nutr* 56(5):425–30.

Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(2), 736-749.

Horuz, T. İ., & Belibağlı, K. B. (2018). Nanoencapsulation by electrospinning to improve stability and water solubility of carotenoids extracted from tomato peels. *Food chemistry, 268,* 86-93.

Hotz, C. (2005). Evidence for the usefulness of *in vitro* dialyzability, Caco-2 cell models, animal models, and algorithms to predict zinc bioavailability in humans. *International journal for vitamin and nutrition research*, 75(6), 423-435.

Hou, S., Yang, Y., Zhou, S., Kuang, X., Yang, Y., Gao, H., Wang, Z., Liu, H. (2018). Novel SS-31 modified liposomesfor improved protective efficacy of minocycline against drug-induced hearing loss. *Biomater. Sci.*, 6, 1627–1635.

Huang, W., Zou, T., Li, S., Jing, J., Xia, X., Liu, X. (2013). Drug-loaded zein nanofibers prepared using a modified coaxial electrospinning process. *Aaps Pharmscitech*, 14(2), 675-681.

Huang, X., Tu, R., Song, H., Dong, K., Geng, F., Chen, L., & Wu, Y. (2022). Gelatin-EGCG-high methoxyl pectin ternary complex stabilized W1/O/W2 double emulsions loaded with vitamin C: Formation, structure, stability, *in vitro* gastrointestinal digestion. *International Journal of Biological Macromolecules,* 216, 891-905.

Ilevbare, G. A., Liu, H., Edgar, K. J., & Taylor, L. S. (2012). Effect of binary additive combinations on solution crystal growth of the poorly water-soluble drug, ritonavir. *Crystal growth & design*, *12*(12), 6050-6060.

Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu. Rev. Anal. Chem*., 1, 801-832.

Jiang, Q. R., Reddy, N., & Yang, Y. Q., (2010). Cytocompatible crosslinking ofelectrospun zein fibers for the development of waterstable tissueengineering scaffolds. *Acta Biomater*. 2010;6:4042–51.

Jongjitaree, S., Koontongkaew, S., Niyomtham, N., Yingyongnarongkul, B. E., & Utispan, K. (2022). The Oral Wound Healing Potential of Thai Propolis Based on Its Antioxidant Activity and Stimulation of Oral Fibroblast Migration and Proliferation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Juárez-Trujillo, N., Jiménez-Fernández, M., Franco-Robles, E., Beristain-Guevara, C. I., Chacón-López, M. A., & Ortiz-Basurto, R.I., (2021). Effect of three-stage encapsulation on survival of emulsified Bifidobacterium animalis subsp. Lactis during processing, storage and simulated gastrointestinal tests. *LWT- Food Sci Technol* 137:110468.

Jurasekova, Z., Domingo, C., García-Ramos, J. V., & Sánchez-Cortés, S. (2014). Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related

flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *16*(25), 12802-12811.

Kanjanapongkul, K., Wongsasulak, S., & Yoovidhya, T., (2010). Prediction ofclogging time during electrospinning of zein solution: scalinganalysis and experimentalverification. *Chem Eng Sci*. 65:5217–25.

Karadag, A., Özçelik, B., Sramek, M., Gibis, M., Kohlus, R., & Weiss, J. (2013). Presence of electrostatically adsorbed polysaccharides improves spray drying of liposomes. *Journal of food science*, 78(2), E206-E221.

Karakas, C. Y., Ordu, H. R., Bozkurt, F., & Karadag, A. (2022). Electrosprayed chitosan-coated alginate–pectin beads as potential system for colon-targeted delivery of ellagic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(3), 965-975.

Karakaş C. Y., (2017). *Algal Biyoaktif Yüklü Nanopartiküllerin Elektrosprey ve Mikroemülsiyon Teknikleriyle Üretimi ve Karakterizasyonu* (Master Thesis, Yüksek lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

Karimunnisa, S., & Atmaram, P. (2013). Mucoadhesive nanoliposomal formulation for vaginal delivery of an antifungal. *Drug development and industrial pharmacy*, *39*(9), 1328-1337.

Kayaci, F., Uyar, T. (2012). Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. *Carbohydrate polymers*, 90(1), 558-568.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*.

Klemetsrud, T., Jonassen, H., Hiorth, M., Kjøniksen, A. L., & Smistad, G. (2013). Studies on pectin-coated liposomes and their interaction with mucin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 158-165.

Kumar, P., Huo, P., Liu, B. (2019). Formulation strategies for folate-targeted liposomes and their biomedical applications. *Pharmaceutics*, 11(8), 381.

Laelorspoen, N., Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., & Devahastin, S., (2014). Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus in zein–alginate core–shell microcapsules via electrospraying. *J Funct Foods* 7:342-349.

Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A., (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev* 7:301–11.

Lai, L.F., & Guo, H. X., (2011). Preparation of new 5-fluorouracilloaded zeinnanoparticles for liver targeting. *Int J Pharm.* 404:317–23.

Laidmäe, I., Meos, A., Kjærvik, I. A., Ingebrigtsen, S. G., Škalko-Basnet, N., Kirsimäe, K., & Kogermann, K. (2021). Electrospun amphiphilic nanofibers as templates for in situ preparation of chloramphenicol-loaded liposomes. *Pharmaceutics*, *13*(11), 1742.

Li, C., Bai, M., Chen, X., Hu, W., Cui, H., & Lin, L. (2022). Controlled release and antibacterial activity of nanofibers loaded with basil essential oil-encapsulated

cationic liposomes against Listeria monocytogenes. *Food Bioscience, 46*, 101578.

Li, D., & Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?. *Advanced materials*, 16(14), 1151-1170.

Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., & Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *European journal of medicinal chemistry*, 164, 640-653.

Li, Q., Lin, H., Li, J., Liu, L., Huang, J., Cao, Y., & Zhou, M., (2023). Improving probiotic (Lactobacillus casei) viability by encapsulation in alginate-based microgels: Impact of polymeric and colloidal fillers. *Food Hydrocoll* 134:108028.

Li, X. Y., Chen, X. G., Cha, D. S., Park, H. J., & Liu, C. S., (2009). Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties. *J Microencapsul* 26(4):315-324.

Li, X., Tu, Z. C., Sha, X. M., Ye, Y. H., & Li, Z. Y. (2020). Flavor, antimicrobial activity, and physical properties of composite film prepared with different surfactants. *Food Science & Nutrition*, *8*(7), 3099-3109.

Li, Y., Liu, T., Zhao, M., Zhong, H., Luo, W., & Feng, F. (2019). *In vitro* and in vivo investigations of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional sourdough. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 1893-1903.

Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S. S., Cui, S. W., Ma, J., & Wang, Q., (2015). Protection of heat-sensitive probiotic bacteria during spray-drying by sodium caseinate stabilized fat particles. *Food Hydrocoll* 51:459-467.

Lombardo, D., Calandra, P., Barreca, D., Magazù, S., & Kiselev, M. A. (2016). Soft interaction in liposome nanocarriers for therapeutic drug delivery. *Nanomaterials*, *6*(7), 125.

López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., & Lagaron, J. M., (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocoll* 28(1):159-167.

Louvard, D., Kedinger, M., & Hauri, H. P. (1992). The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annual review of cell biology*, 8(1), 157-195.

Ma, L., Wan, Z., & Yang, X., (2017). Multiple water-in-oil-in-water emulsion gels based on self-assembled saponin fibrillar network for photosensitive cargo protection. *J Agric Food Chem* 65(44):9735-9743.

Magro-Filho, O., & de Carvalho, A. C. P. (1994). Topical Effect of Propolis in the Repair of Sulcoplasties by the Modified Kazanjian Technique Cytological and Clinical Evaluation. *The Journal of Nihon University School of Dentistry*, 36(2), 102-111.

Mamidi, N., Romo, I. L., Gutiérrez, H. M. L., Barrera, E. V., & Elías-Zúñiga, A. (2018). Development of forcespun fiber-aligned scaffolds from gelatin–zein

composites for potential use in tissue engineering and drug release. *MRS Communications*, *8*(3), 885-892.

Mar, J. M., da Silva, L. S., Rabello, M. D. S., Biondo, M. M., Kinupp, V. F., Campelo, P. H., & Sanches, E. A., (2021). Development of alginate/inulin carrier systems containing non-conventional Amazonian berry extracts. *Food Res Int* 139:109838.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91(3), 571-577.

Mendes, M., Sousa, J. J., Pais, A., & Vitorino, C. (2018). Targeted theranostic nanoparticles for brain tumor treatment. *Pharmaceutics*, *10*(4), 181.

Mendez-Pfeiffer, P., Juarez, J., Hernandez, J., Taboada, P., Virués, C., Valencia, D., & Velazquez, C. (2021). Nanocarriers as drug delivery systems for propolis: A therapeutic approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 65, 102762.

Mickova, A., Buzgo, M., Benada, O., Rampichova, M., Fisar, Z., Filova, E., ... & Amler, E. (2012). Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules*, 13(4), 952-962.

Minekus, M., Alminger, M, Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., & Brodkorb, A., (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food–an international consensus. *Food Funct* 5(6):1113-1124.

Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 340-351.

Miyoshi, T., Toyohara, K., Minematsu, H. (2005). Preparation of ultrafine fibrouszein membranes via electrospinning. *Polymer International*, 54(8), 1187–1190

Moradkhannejhad, L., Abdouss, M., Nikfarjam, N., Mazinani, S., & Heydari, V. (2018). Electrospinning of zein/propolis nanofibers; antimicrobial properties and morphology investigation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *29*, 1-10.

Moreno, J. A. S., Mendes, A. C., Stephansen, K., Engwer, C., Goycoolea, F. M., Boisen, A., & Chronakis, I. S. (2018). Development of electrosprayed mucoadhesive chitosan microparticles. *Carbohydrate polymers*, 190, 240-247.

Morgan, D. M. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Polyamine protocols*, 179-184.

Nami, Y., Haghshenas, B., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., & Eslami, S., (2018). Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. *LWT* 98:85–93.

Neilson, A. P., Goodrich, K. M., & Ferruzzi, M. G., (2017). Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods. In Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease (pp. 301-319). Academic Press.

Nie, W., Yu, D. G., Branford-White, C., Shen, X. X., & Zhu, L. M., (2012). Electrospun Zein/PVP fiber composite and its application in drug delivery. *Mater Res Innov*. 16:14–8.

Okińczyc, P., Widelski, J., Szperlik, J., Żuk, M., Mroczek, T., Skalicka-Woźniak, K., ... & Kuś, P. M. (2021). Impact of plant origin on eurasian propolis on phenolic profile and classical antioxidant activity. *Biomolecules*, *11*(1), 68.

Okutan, N., Terzi, P., Altay, F. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids,* 39, 19-26.

Ota, A., Istenič, K., Skrt, M., Šegatin, N., Žnidaršič, N., Kogej, K., & Ulrih, N. P. (2018). Encapsulation of pantothenic acid into liposomes and into alginate or alginate–pectin microparticles loaded with liposomes. *Journal of Food Engineering*, 229, 21-31.

Ozdal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O., & Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International*, *122*, 528-536.

Ozkan, G., Kostka, T., Esatbeyoglu, T., & Capanoglu, E. (2020). Effects of lipid-based encapsulation on the bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Molecules*, *25*(23), 5545.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of food science*, 76(1), R6-R15.

Pandey, M., Choudhury, H., binti Abd Aziz, A., Bhattamisra, S. K., Gorain, B., Su, J. S. T., & Yip, K. Y. (2021). Potential of stimuli-responsive in situ gel system for sustained ocular drug delivery: Recent progress and contemporary research. *Polymers*, *13*(8), 1340.

Parada, J., & Aguilera, J. M., (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* 72(2):R21–R32.

Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7, 1776-1782.

Perche, F., & Torchilin, V.P., (2013). Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumortargeting. *J. Drug Deliv*. 705265.

Pimentel-González DJ, Campos-Montiel RG, Lobato-Calleros C, Pedroza-Islas R and, Vernon-Carter EJ. (2009), Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int* 42(2):292-297.

Preis, M., Knop, K., & Breitkreutz, J. (2014). Mechanical strength test for orodispersible and buccal films. *International journal of pharmaceutics*, *461*(1-2), 22-29.

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*(9-10), 1231-1237.

Qin, X. S., Luo, Z. G., & Li, X. L. (2021). An enhanced pH-sensitive carrier based on alginate-Ca-EDTA in a set-type W1/O/W2 double emulsion model stabilized with WPI-EGCG covalent conjugates for probiotics colon-targeted release. *Food Hydrocolloids*, 113, 106460.

Ramli, N. A., Ali, N., Hamzah, S., & Yatim, N. I. (2021). Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis. *Heliyon*, *7*(4).

Ramos, P. E., Silva, P., Alario, M. M., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Cerqueira, M. A., & Vicente, A.A., (2018). Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. *Food Hydrocoll* 77:8-16.

Rashidinejad, A., Bahrami, A., Rehman, A., Rezaei, A., Babazadeh, A., Singh, H., & Jafari, S. M., (2022) Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 62(9):2470-2494.

Razavizadeh, B. M., & Niazmand, R. (2020). Characterization of polyamide-6/propolis blended electrospun fibers. *Heliyon*, *6*(8).

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(9-10), 1231-1237.

Ribeiro, S. D., Meneguin, A. B., Prezotti, F. G., Boni, F. I., Cury, B. S. F., & Gremião, M. P. D. (2016). Cellulose triacetate films obtained from sugarcane bagasse: Evaluation as coating and mucoadhesive material for drug delivery systems. Carbohydrate polymers, 152, 764-774.

Rohman, A., & Che Man, Y. B., (2012). Quantification and classification of corn and sunflower oils as adulterants in olive oil using chemometrics and FTIR spectra. *Sci World J*, 250795.

Rosseto, H. C., de Toledo, L. D. A. S., dos Santos, R. S., de Francisco, L. M. B., Vecchi, C. F., Esposito, E., & Bruschi, M. L. (2021). Design of propolis-loaded film forming systems for topical administration: The effect of acrylic acid derivative polymers. *Journal of Molecular Liquids*, *322*, 114514.

Saliba, A. S. M. C., de Oliveira Sartori, A. G., Batista, P. S., do Amaral, J. E. P. G., da Silva, N. O., Ikegaki, M., & de Alencar, S. M. (2023). Simulated gastrointestinal digestion/Caco-2 cell transport: Effects on biological activities and toxicity of a Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 403, 134330.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology*, 21, 1-26.

Saroglu, O., Atalı, B., Yıldırım, R. M., & Karadag, A. (2022). Characterization of nanoliposomes loaded with saffron extract: *in vitro* digestion and release of crocin. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *16*(6), 4402-4415.

Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). Lactobacillus plantarum and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9, 111-122.

Seethu, B. G., Pushpadass, H. A., Emerald, F. M. E., Nath, B. S., Naik, N. L., & Subramanian, K. S. (2020). Electrohydrodynamic Encapsulation of Resveratrol Using Food-Grade Nanofibres: Process Optimization, *Characterization and Fortification, Food and Bioprocess Technology*, 13(2), 341-354.

Selling, G. W., Biswas, A., Patel, A., Walls, D. J., Dunlap, C., Wei, Y. (2007). Impact ofsolvent on electrospinning of zein and analysis of resulting fibers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 208(9), 1002–1010

Shao, X. R., Wei, X. Q., Zhang, S., Fu, N., Lin, Y. F., Cai, X. X., & Peng, Q. (2017). Effects of micro-environmental pH of liposome on chemical stability of loaded drug. *Nanoscale research letters*, 12, 1-8.

Sharaf, S., Higazy, A., & Hebeish, A. (2013). Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *59*, 408-416.

Shirvan, A. R., Bashari, A., & Hemmatinejad, N. (2019). New insight into the fabrication of smart mucoadhesive buccal patches as a novel controlled-drug delivery system. *European Polymer Journal*, *119*, 541-550.

Simon, L., (2016). Controlled-release technology: Pharmaceutical. In D. Edgren, H. Leeper, K. Nichols, & K. Wrights (Eds.). In Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology (pp.1–18). New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Smart, J. D. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced drug delivery reviews*, *57*(11), 1556-1568.

Steipel, R. T., Gallovic, M. D., Batty, C. J., Bachelder, E. M., & Ainslie, K. M. (2019). Electrospray for generation of drug delivery and vaccine particles applied *in vitro* and in vivo, *Materials Science and Engineering: C*, 110070.

Su, R., Zhu, X. L., Fan, D. D., Mi, Y., Yang, C. Y., & Jia, X., (2011). Encapsulation of probiotic Bifidobacterium longum BIOMA 5920 with alginate–human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Int J Biol Macromol* 49(5):979-984.

Sun, J., Chen, T., Zhao, B., Fan, W., Shen, Y., Wei, H., & Yang, C. (2022). Acceleration of oral wound healing under diabetes mellitus conditions using bioadhesive hydrogel. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(1), 416-431.

Surendranath, M., Ramesan, R. M., Nair, P., & Parameswaran, R. (2022). Electrospun Mucoadhesive Zein/PVP Fibroporous Membrane for Transepithelial Delivery of Propranolol Hydrochloride. *Molecular Pharmaceutics*, 20(1), 508-523.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A., (2009). *In vitro* bio-accessibility and antiox-idant activity of grape polyphenols. *Food Chem.*, 120(2):599–606.

Tan, C., Wang, J., & Sun, B. (2021). Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 48, 107727.

Thirawong, N., Nunthanid, J., Puttipipatkhachorn, S., & Sriamornsak, P. (2007). Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: an *in vitro* evaluation using texture analyzer. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1), 132-140.

Tiri, R. N. E., Gulbagca, F., Aygun, A., Cherif, A., & Sen, F. (2022). Biosynthesis of Ag–Pt bimetallic nanoparticles using propolis extract: Antibacterial effects and catalytic activity on NaBH4 hydrolysis. *Environmental Research*, *206*, 112622.

Torkamani, A. E., Syahariza, Z. A., Norziah, M. H., Wan, A. K. M., & Juliano, P. (2018). Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from Momordica charantia fruit within zein/gelatin shell core fibers via coaxial electrospinning. *Food bioscience*, *21*, 60-71.

Torres-Giner, S., Ocio, M. J., Lagaron, J. M., (2009). Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blend obtained by electrospinning. *Carbohydr Polym.* 2009;77:261–6.

Tzankova, V., Aluani, D., Yordanov, Y., Kondeva-Burdina, M., Petrov, P., Bankova, V., & Yoncheva, K. (2019). Micellar propolis nanoformulation of high antioxidant and hepatoprotective activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 364-372.

Valencia-Sullca, C., Jiménez, M., Jiménez, A., Atarés, L., Vargas, M., & Chiralt, A. (2016). Influence of liposome encapsulated essential oils on properties of chitosan films. *Polymer International*, 65(8), 979-987.

Vedovatto, S., Facchini, J. C., Batista, R. K., Paim, T. C., Lionzo, M. I. Z., & Wink, M. R. (2020). Development of chitosan, gelatin and liposome film and analysis of its biocompatibility *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *160*, 750-757.

Vică, M. L., Glevitzky, M., Tit, D. M., Behl, T., Heghedűş-Mîndru, R. C., Zaha, D. C., & Bungău, S. (2021). The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. *Food Bioscience*, *41*, 101014.

Vieira, B. M., de Almeida Neto, N. D., Simões, L. E., Feres-Filho, E. J., Gaspar-Elsas, M. I. C., & Xavier-Elsas, P. (2022). Effects of oral wound on the neutrophil lineage in murine bone-marrow: Modulation mechanism hindered by chlorhexidine. *International Immunopharmacology*, 105, 108544.

Volpe, D. A., Faustino, P. J., Ciavarella, A. B., Asafu-Adjaye, E. B., Ellison, C. D., Yu, L. X., & Hussain, A. S. (2007). Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24(1), 39-47.

Voss, G. T., Gularte, M. S., Vogt, A. G., Giongo, J. L., Vaucher, R. A., Echenique, J. V., & Fajardo, A. R. (2018). Polysaccharide-based film loaded with vitamin C and propolis: A promising *device to accelerate diabetic wound healing. International* journal of pharmaceutics, 552(1-2), 340-351.

Wang, D., Sun, J., Li, J., Sun, Z., Liu, F., Du, L., & Wang, D. (2022). Preparation and characterization of gelatin/zein nanofiber films loaded with perillaldehyde, thymol, or ε-polylysine and evaluation of their effects on the preservation of chilled chicken breast. *Food Chemistry*, *373*, 131439.

Wang, X., Luo, Z., & Xiao, Z. (2014). Preparation, characterization, and thermal stability of β-cyclodextrin/soybean lecithin inclusion complex. *Carbohydrate polymers*, *101*, 1027-1032.

Wang, Y., & Chen, L. (2012). Fabrication and characterization of novel assembled prolamin protein nanofabrics with improved stability, mechanical property and release profiles. *Journal of Materials Chemistry*, 22(40), 21592-21601.

Wei, D., Zhou, F., Wang, H., Liu, G., Fang, J., & Jiang, Y. (2022). Effects of Surfactants on Zein Cast Films for Simultaneous Delivery of Two Hydrophilic Active Components. *Materials*, *15*(8), 2795.

WHO/FAO, Probiotics in foods. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation: FAO Food and Nutrition Paper, 85. ISBN: 92-5-105513-0 (2006).

Wilson, G., Hassan, I. F., Dix, C. J., Williamson, I., Shah, R., Mackay, M., & Artursson, P. (1990). Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: an *in vitro* model of the intestinal epithelial cell barrier. *Journal of controlled release*, 11(1-3), 25-40.

Wongsasulak, S., Pathumban, S., & Yoovidhya, T. (2014). Effect of entrapped α-tocopherol on mucoadhesivity and evaluation of the release, degradation, and swelling characteristics of zein–chitosan composite electrospun fibers. *Journal of Food Engineering*, *120*, 110-117.

Wu, X., Liu, Z., He, S., Liu, J., & Shao, W. (2023). Development of an edible food packaging gelatin/zein based nanofiber film for the shelf-life extension of strawberries. *Food Chemistry*, *426*, 136652.

Wu, Y., Duong, A., Lee, L.I., & Wyslouzil, B.E. (2012). Electrospray Production of Nanoparticles for Drug/Nucleic Acid Delivery, *Intech Europe*, 12, 4.

Xia, T., He, Q., Shi, K., Wang, Y., Yu, Q., Zhang, L., Zhang, Q., Gao, H., Ma, L., & Liu, J., (2016). Losartan Loaded Liposomes Improve the Antitumor Efficacy of Liposomal Paclitaxel Modified with pH Sensitive Peptides byInhibition of Collagen in Breast Cancer. *Pharm. Dev. Technol*. 23, 1–29.

Xu, Y., Chu, Y., Feng, X., Gao, C., Wu, D., Cheng, W., & Tang, X. (2020). Effects of zein stabilized clove essential oil Pickering emulsion on the structure and

properties of chitosan-based edible films. *International journal of biological macromolecules*, 156, 111-119.

Yao, C., Li, X., Song, T., Li, Y., & Pu, Y. (2009). Biodegradable nanofibrous membrane of zein/silk fibroin by electrospinning. *Polymer international*, 58(4), 396-402.

Yen, C. H., Chiu, H. F., Wu, C. H., Lu, Y. Y., Han, Y. C., Shen, Y. C., & Wang, C. K. (2017). Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *LWT*, 84, 281-289.

Yildirim, R. M., & Arici, M., (2019). Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread. *LWT- Food Sci Technol* 112:108224.

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I., (2014). Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. *J Funct Foods* 6:205-214.

Yuan, J., Lu, Y., Abula, S., Hu, Y., Liu, J., Fan, Y., & Liu, C. (2013). Optimization on preparation condition of propolis flavonoids liposome by response surface methodology and research of its immunoenhancement activity. *Evidence-based complementary and alternative medicine, 2013*.

Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodaee, R., & Tromp, R. H., (2017). Electrospray assisted fabrication of hydrogel microcapsules by single- and double-stage procedures for encapsulation of probiotics. *Food Bioprod Process* 102:250-259.

Zhang, H., Fu, Y., Niu, F., Li, Z., Ba, C., Jin, B., & Li, X. (2018). Enhanced antioxidant activity and *in vitro* release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocolloids*, 81, 104-112.

Zhang, J., Chen, Y.Li, X., Liang, X., Luo, X., (2016). The influence of different long-circulating materials on thepharmacokinetics of liposomal vincristine sulfate. *Int. J. Nanomed*. 11, 4187–4197.

Zhang, Y., Cui, L., Chen, Y., Zhang, H., Zhong, J., Sun, Y., & Kong, W., (2015). Zein-based nanofibres for drug delivery: classes and current applications. *Current pharmaceutical design*, 21(22), 3199-3207.

Zhang, Y., Lin, J., & Zhong, Q., (2015). The increased viability of probiotic Lactobacillus salivarius NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Res Int* 71:9-15.

Zhang, Z., Gu, M., You, X., Sela, D. A., Xiao, H., & McClements, D. J., (2021). Encapsulation of bifidobacterium in alginate microgels improves viability and targeted gut release. *Food Hydrocoll* 116:106634.

Zulhendri, F., Felitti, R., Fearnley, J., & Ravalia, M. (2021). The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *Journal of oral biosciences*, 63(1), 23-34.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Karakaş, C. Y., Yıldırım-Metin, R., & Karadag, A. "Encapsulation of probiotic bacteria by electrospraying in a double emulsion (W1/O/W2) loaded alginate beads to improve the gastrointestinal survival and thermal stability" 17th Nanoscience and Nanotechnology Conference, 22-26 Agust, 2023, İzmir, Turkey, oral presentation, p.p. 251.

Makaleler

1. Karakaş, C. Y., Yildirim, R. M., & Karadag, A. (2023). Encapsulation of Lactobacillus plantarum ELB90 by electrospraying in a double emulsion (W1/O/W2) loaded alginate beads to improve the gastrointestinal survival and thermal stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(7), 3427-3436.

2. Karakas, C. Y., Ustundag, C. B., Sahin, A., & Karadag, A. (2023). Co-axial electrospinning of liposomal propolis loaded gelatin-zein fibers as a potential wound healing material. *Journal of Applied Polymer Science*, 140(46), e54683.