T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA BİYOAKTİFLERİ İÇİN LİPOZOMAL NANOLİF ENKAPSÜLASYON SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Nagihan KALINTAŞ ÇAĞLAR

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Temmuz, 2025

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA BİYOAKTİFLERİ İÇİN LİPOZOMAL NANOLİF ENKAPSÜLASYON SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Nagihan KALINTAŞ ÇAĞLAR tarafından hazırlanan tez çalışması 24.06.2025 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
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

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

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Aslı CAN KARACA, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

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

Dr. Öğr. Üyesi Başak Ebru ÖZCAN, Üye
Kırklareli Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Gıda Biyoaktifleri için Lipozomal Nanolif Enkapsülasyon Sistemlerinin 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.

Nagihan KALINTAŞ ÇAĞLAR

İmza

Bu çalışma, TÜBİTAK 2211/A Yurtiçi Doktora Burs Programı, TÜBİTAK 2250 Lisansüstü Bursları Performans Programı ve TÜBİTAK 122O666 ve 120O315 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

Yol arkadaşım eşime ve canım oğlum Mustafa Mahir'e

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca akademik bilgi birikimini benimle sabırla ve özveriyle paylaşan danışman hocam Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ'a,

Çalışmam boyunca bana destek olan tüm Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümü değerli öğretim üyeleri, araştırma görevlisi meslektaşlarım ve tez savunmamda yer alan hocalarıma,

Akademik kariyerimiz boyunca stresimizi bölüşerek ilerlediğimiz, laboratuvar çalışmalarında da bana destek olan meslektaşım ve sevgili eşim Y. Müh. Ahmet Furkan ÇAĞLAR'a

Yine laboratuvar çalışmalarında bana destek olan Arş. Gör. Dr. Öznur SAROĞLU, TÜBİTAK BİÇABA programı kapsamında aramıza katılan Feyzanur İZCİLER, İnci Sümeyye BEKİROĞLU ve tüm KMB-116 laboratuvar arkadaşlarıma,

Bu uzun yolda derdimi paylaşan bana hep destek olan biricik dostlarım Dr. Şeyma TOK, Yüksek Şehir Plancısı Hatice Betül BİYİKLİ, Özge TÜRKSOY, Kübra ÇELEBİ, Uzm. Dt. Cansu YIKICI ÇÖL, Uzm. Dr. Gizem ÇAĞLAR ÜNSAL'a ve meslektaşlarım Arş. Gör. Nur ÖZSOY, Dr. Öğr. Üyesi Başak Ebru ÖZCAN, Dr. Öğr. Üyesi Elif Merve KAHRAMAN ve Öğr. Gör. Beyza ÖZDEM, Y. Müh. Mehmet Tahir PALA başta olmak üzere tüm UBYO ailesine,

Akademik kariyerim boyunca bana sabırla ve her zaman sevgiyle yaklaşan desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen canım annem Hülya KALINTAŞ, canım babam Tamer KALINTAŞ, küçük kardeşim Avni Eren KALINTAŞ, ablam Elif KALINTAŞ DUMAN, grafik tasarımı bilgileriyle de bana destek olan abim Fatih DUMAN ve biricik yiğenim Masal Mina DUMAN'a,

Kavuşmayı heyecanla beklediğim, varlığıyla bana güç veren, benimle birlikte tez yazıp, savunmaya giren canım oğlum Mustafa Mahir ÇAĞLAR'a,

Ayrıca, doktora tez çalışmamda finansal destekleri için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (2211/A Yurtiçi Doktora Burs Programı, 2250 Lisansüstü Bursları Performans Programı, 120O315 numaralı 3501 Kariyer Geliştirme Projesi, 122O666 numaralı 1002 Hızlı Destek Projesi) teşekkürlerimi sunarım.

Nagihan KALINTAŞ ÇAĞLAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ **x**

KISALTMA LİSTESİ **xi**

ŞEKİL LİSTESİ **xii**

TABLO LİSTESİ **xiv**

ÖZET **xv**

ABSTRACT **xvii**

1 GİRİŞ **1**

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 4

1.3 Hipotez 5

2 GENEL BİLGİLER **6**

2.1 Gıda Biyoaktiflerinin Enkapsülasyonu 6

2.1.1 Fenolik Bileşiklerin Enkapsülasyonu 6

2.1.2 Biyoaktif Hidrolizatların Enkapsülasyonu 7

2.1.3 Lipozomlar 12

2.1.4 Elektroeğirme Yöntemi 20

3 MATERYAL VE YÖNTEM **28**

3.1 Materyal 28

3.2 Karadut Ekstraktının Enkapsülasyonu 30

3.2.1 Karadut Ekstraktının Eldesi ve Karakterizasyonu 30

3.2.2 Lipozom Üretimi ve Karakterizasyonu 34

3.2.3 Elektrospinleme ile Tek Eksenli Lipozomal Nanoliflerin Üretilmesi 35

3.2.4 SEM ve Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM) ile Nanoliflerin Morfolojik Analizi 37

3.2.5 Nanoliflerin FT-IR ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik (DSC) Analizi 37

3.2.6 Nanoliflerin Mekanik Özellikleri 37

3.2.7 Nanoliflerin *in vitro* ve *ex vivo* Mukoadhesif Özellikleri 38

3.2.8 Tek Eksenli KE Yüklü Lipozomal Nanolifler için Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık Analizleri 39

3.3 Glutenin Hidrolizatının Enkapsülasyonu 42

3.3.1 Glutenin hidrolizatının (GH) Eldesi ve Karakterizasyonu 42

3.3.2 Lipozom Üretimi ve Karakterizasyonu 44

3.3.3 GH Yüklü Lipozomların Enkapsülasyon Verimliliği (%EE) 44

3.3.4 Lipozomların TEM ile Görüntülenmesi 45

3.3.5 Elektrospinleme ile Tek ve Çift Eksenli Lipozomal Nanoliflerin Üretilmesi 45

3.3.6 GH Yüklü Liflerin Yükleme Kapasitesi (%YK) 46

3.3.7 SEM ve Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM) ile Nanoliflerin Morfolojik Analizi 47

3.3.8 Nanoliflerin DSC ve Termogravimetrik Analizleri 47

3.3.9 Nanoliflerin FT-IR Analizleri 47

3.3.10 Nanoliflerin *in vitro* ve *ex vivo* Mukoadhesif Özellikleri 47

3.3.11 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin *in vitro* simule sindirim koşullarında Stabilitelerinin Belirlenmesi 48

3.3.12 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin *in vitro* simule sindirim koşullarında Salım Özelliklerinin Belirlenmesi 49

3.4 İstatistiksel Analizler 50

4 BULGULAR VE TARTIŞMA 51

4.1 Karadut Ekstraktının Enkapsülasyonu 51

4.1.1 KE'nin Toplam Fenolik, Toplam Antosiyanin ve Antioksidan Aktivitesinin Analizleri 51

4.1.2 KE'nin Fenolik Bileşiklerinin UPLC-ESI-MS/MS ile Tanımlanması ve Miktarlarının Belirlenmesi 52

4.1.3 KE Yüklü ve Boş Lipozomların Karakterizasyonu 54

4.1.4 Boş, KE ve Lipozomal KE yüklü nanoliflerin karakterizasyonu..... 58

4.2 Glutenin Hidrolizatının Enkapsülasyonu 74

4.2.1 GH'in Hidroliz Derecesi ve Antioksidan Aktivitesinin Analizleri ... 74

4.2.2 GH Yüklü ve Boş Lipozomların Karakterizasyonu 74

4.2.3 Boş, GH ve Lipozomal GH Yüklü Tek ve Çift Eksenli Nanoliflerin Karakterizasyonu 78

4.2.4 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin in vitro simule sindirim koşullarında Stabilitelerinin Belirlenmesi 88

4.2.5 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin *in vitro* simule sindirim koşullarında Salım Özelliklerinin Belirlenmesi..... 89

5 SONUÇ 92

5.1 Karadut Ekstraktının Enkapsülasyonu 92

5.2 Glutenin Hidrolizatının Enkapsülasyonu 93

KAYNAKÇA 94

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 112

SİMGE LİSTESİ

a	Ağırlık
dk	Dakika
rpm	Dakikada devir sayısı
h	Hacim
kV	Kilovolt
µ	Mikro
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mA	Miliamper
ppm	Milyonda bir birim
nm	Nanometre
R^2	Regresyon katsayısı
s	Saat
sn	Saniye
ºC	Santigrat Derece
cm	Santimetre
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ABTS	2,2′-azinobis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit)
ANOVA	Varyans Analizi
CLSM	Konfokal lazer mikroskobu
CMC	Karboksimetilselüloz
ÇM	Çekme mukavemeti (tensile strength)
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GH	Glutenin Hidrolizatı
KE	Karadut Ekstraktı
PEK	Pektin
PEO	Polietilen oksit
PUL	Pullulan
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinilpirrolidon
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
S3G	Siyanidin-3-glukozit
TA	Toplam Antosiyanin İçerik
TE	Troloks Eşdeğeri
TF	Toplam Fenolik İçerik
UK	Uzama Kırılması (elongation at break)
UPLC- MS	Ultra performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Elektrospinning Düzeneği **20**

Şekil 2.2 Tek Eksenli ve Çift Eksenli Elektroeğirme Yöntemleri **22**

Şekil 2.3 Pullulanın Yapısı. **24**

Şekil 3.1 KE Enkapsülasyonu ve Analizleri **36**

Şekil 3.2 Nanoliflerin In Vitro Mukoadhezyon Ölçümleri **38**

Şekil 3.3 Nanoliflerin Ex Vivo Mukoadhezyon Ölçümleri **39**

Şekil 4.1 KE Yüklü Lipozomların TEM Görüntüleri **56**

Şekil 4.2 Nanolilerin SEM Görüntüleri **59**

Şekil 4.3 KE-Yüklü Nanolilflerin CLSM Görüntüleri. **60**

Şekil 4.4 Lesitin, Lipozomal KE Yüklü Nanolif, Serbest KE Yüklü Nanolif, Pullulan (PUL)/Pektin (PEK) Nanolif, Karadut Ekstraktı (KE), Pullulan Ve Pektinin FT-IR Spektrumları. **62**

Şekil 4.5 Lesitin, Lipozomal KE Yüklü Nanolif, Serbest KE Yüklü Nanolif, Pullulan (PUL)/Pektin (PEK) Nanolif, Karadut Ekstresi (KE), Pullulan ve Pektinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Termogramları. **63**

Şekil 4.6 Nanoliflerin Çekme Mukavemeti, (ÇM) (A), Uzama Kırılması, (UK) (B) Değerleri, In Vitro (C) ve Ex Vivo (D) Mukoadhezyon Özellikleri. **65**

Şekil 4.7 In Vitro Sindirilmiş Örneklerin Caco2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksisitesi **73**

Şekil 4.8 Boş (A) Ve GH Yüklü Lipozomların (B, C, D) TEM Görüntüleri **75**

Şekil 4.9 Tek Eksenli Liflerin SEM Görüntüleri. **80**

Şekil 4.10 Çift Eksenli Nanoliflerin SEM Görüntüleri **81**

Şekil 4.11 Tek Eksenli (A-C) ve Koaksiyel (D-F) Liposomal GH Yüklü Nanoliflerin Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu Görüntüleri **82**

Şekil 4.12 Pullulan, CMC, Lesitin, Fitosterol, GH (A); Tek Eksenli (B) ve Çift Eksenli Liflerin (C) FT-IR Spektrumları. **83**

Şekil 4.13 Pullulan, CMC, Lesitin, GH (A), Tek Eksenli (B) ve Çift Eksenli Liflerin (C) Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Termogramları. **84**

Şekil 4.14 Pullulan, CMC, Lesitin, Fitosterol, GH (A); Tek Eksenli (B) ve Çift Eksenli Liflerin (C) TGA Eğrileri. **86**

Şekil 4.15 In Vitro Tek Eksenli (A), Çift Eksenli (B), ve Ex Vivo Tek Eksenli (C), Çift Eksenli (D) Nanoliflerin Mukoadhezyonu. **88**

Şekil 4.16 İn Vitro Sindirim Testine Tabi Tutulan Liflerden GH'nin Kümülatif Salınımı **90**

Şekil 4.17 Lipozomal GH Yüklü Liflerin Mide Sindiriminden Sonra (A) ve Bağırsak Sindiriminden Sonra (B) Konfokal Lazer Taramalı Mikroskobi Görüntüleri. **91**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Tek Eksenli ve Çift Eksenli Elektroeğirme Yöntemiyle Elde Edilen Hibrit Nanoliflerle Ilgili Çalışmalar **26**

Tablo 3.1 Fitosterol İçeriği **29**

Tablo 3.2 Tespit Edilen Fenolik Bileşiklerin Kalibrasyon Eğrileri **33**

Tablo 3.3 In Vitro Gastrointestinal Sindirim Deneyi İçin Kullanlan Sindirim Sıvıları **40**

Tablo 3.4 Liflerin Kısaltmaları **46**

Tablo 4.1 KE Fenolik Bileşiklerinin Toplam Fenolik (TF), Toplam Antosiyanin (TA), ve Antioksidan Kapasiteleri (DPPH ve ABTS) **51**

Tablo 4.2 Farklı Ultrasonikasyon Süresine Maruz Bırakılmış Boş Ve KE Yüklü Lipoozomların Zeta Potansiyeli, Boyut, PDI ve Enkapsülasyon Verimliliği (%) **55**

Tablo 4.3 Farklı Oranlarda KE Yüklü Lipoozomların Zeta Potansiyeli, Boyut, PDI ve Enkapsülasyon Verimliliği (%) **57**

Tablo 4.4 KE , Serbest KE ve Lipozomal KE ile Yüklü Nanoliflerin İn Vitro Biyoerişilebilirliği **70**

Tablo 4.5 Serbest KE, Serbest KE ve Liposomal KE Yüklü Nanoliflerin İn Vitro Biyoyararlanımı **73**

Tablo 4.6 Farklı Lesitin:Fitosterol (L:F) Oranlarında Lipozom Örneklerinin Parçacık Boyutu, Zeta Potansiyeli, Polidispersite İndeksi (PDI) Değerleri ve Kapsülleme Verimliliği (EE%) **76**

Tablo 4.7 GH ile Yüklü Lipozomların Parçacık Boyutu, Zeta Potansiyeli, Polidispersite İndeksi (PDI) ve Kapsülleme Verimliliği (EE%). **78**

Tablo 4.8 Nanoliflerin İn Vitro Sindirim Öncesi ve Sonrası Antioksidan Aktiviteleri **89**

ÖZET

Gıda Biyoaktifleri için Lipozomal Nanolif Enkapsülasyon Sistemlerinin Geliştirilmesi

Nagihan KALINTAŞ ÇAĞLAR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı
Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Fenolik bileşikler ve hidrolizatlar gibi antioksidan, antidiyabetik, antihipertansif, immünomodulatör aktivitileri olan biyoaktif bileşenlerin ağız yoluyla alım sonrasında gastronointestinal sistem koşullarına karşı dayanıksızlığı ve ince bağırsakta düşük emilimleri sağlık faydalarını büyük ölçüde kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamaları aşacak enkapsülasyon sistemlerinin tasarımı oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı, fenolik bileşikler, özellikle antosiyanin açısından zengin olan karadut ekstraktı (KE) ve model bir biyoaktif hidrolizat olarak glutenin hidrolizatı (GH), için lipozomal nanolif enkapsülasyon sistemlerinin tasarlanmasıdır. Çalışmanın ilk kısmında, lipozomal KE yüklü tek eksenli pullulan (PUL)/pektin (PEK) nanolifleri, KE'nin *in vitro* biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlanımını artırmak için geliştirilmiştir. KE (%0.8, a/h) içeren lipozomlar, ince film hidrasyonu ve ultrasonikasyon yöntemiyle 76.41±1.23 nm boyutunda üretilmiş ve KE'nin %79.40±0.99'u kapsüllenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) görüntüleri, lipozomların kusursuz lif yapısı içinde uniform dağılımını göstermiştir. Lipozomal KE yüklenmesi, serbest KE

yüklenmesine kıyasla nanoliflerin mukoadhezyonunu arttırmıştır. Lipozomal KE yüklü nanolifler, antosiyaninlerin biyoerişilebilirliğinde neredeyse iki kat artış sağlamıştır. Caco-2 hücreleri tarafından dört farklı antosiyaninin hücresel salınımı, lipozomal KE yüklü nanoliflerde önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (%3.92-10.50%).

Çalışmanın diğer kısmında ise, GH'in *in vitro* gastrointestinal sisteme karşı stabilitesini ve salım özelliklerini iyileştirebilecek, lipozomal GH yüklü, tek eksenli PUL/ karboksimetilselüloz (CMC) ve kabuk PUL/CMC, çekirdek PUL/lipozomal GH yüklü çift eksenli hibrit nanoliflerin üretilmesi amaçlanmıştır. Lesitine oranla yarı yarıya fitosterol içeren (1:0.5, a/a), 75.69±0.34 nm boyutunda ve 57.52±2.27 enkapsülasyon verimliliğine sahip 7.5 mg/mL hidrolizat yüklü lipozomlar ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. SEM ve CLSM görüntüleri, boncuk benzeri yapı içermeyen liflerde lipozomların uniform dağılımını göstermiştir. Besleme çözeltisindeki GH'nin %61.04 ila %85.22'si tek eksenli ve çift eksenli elektroeğirme yöntemleri kullanılarak liflere kapsüllenebilmiştir. GH yüklenmesi sonucu hem tek eksenli hemde çift eksenli lipozomal liflerin mukoadhesyon özelliği artmıştır. *İn vitro* sindirimin sonunda, serbest GH, başlangıçtaki ABTS ve FRAP antioksidan aktivitesinin yaklaşık %65 ve %50'sini kaybederken, liflerdeki kayıp %13 ile %35 (ABTS) ve %10 ile %25 (FRAP) arasında değişmiş olup, lipozomal lifler, serbest-GH yüklü liflere göre daha iyi koruma göstermiştir. Lipozomal nanoliflerden GH'nin salınımı (tek eksenli lipozomal lif için %21.05 ve çift eksenli lipozomal lif için %25.85) mide sindiriminin sonunda serbest GH içeren tek eksenli lifin (%42.69) yaklaşık yarısı kadar olup, bağırsak sindiriminden sonra en düşük salınım lipozomal çift eksenli nanoliflerde gözlemlenmiştir. Tasarlanan lipozomal hibrit nanoliflerin hem fenolik bileşikler hemde biyoaktif hidrolizatların taşınması için büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: antosiyanin, pullulan, peptit, mukoadhezyon, biyoerişilebilirlik

---

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ABSTRACT

Development of Liposomal Nanofiber Encapsulation Systems for Food Bioactive Compounds

Nagihan KALINTAŞ ÇAĞLAR

Department of Food Engineering
Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Bioactive components with antioxidant, antidiabetic, antihypertensive, and immunomodulatory activities, such as phenolic compounds and hydrolysates, are significantly limited in their health benefits due to their instability against gastrointestinal system conditions and low absorption in the small intestine after oral intake. The design of encapsulation systems that will overcome these limitations is of great importance. The aim of this study is to design hybrid nanofiber encapsulation systems for phenolic compounds, particularly anthocyanin-rich black mulberry extract (KE) and gluten hydrolysate (GH) as a model bioactive hydrolysate. In the first part of the study, uniaxial pullulan (PUL)/pectin (PEK) nanofibers loaded with liposomal KE were developed to enhance the in vitro bioaccessibility and bioavailability of KE. Liposomes containing KE (0.8%, w/v) were produced with the size of 76.41±1.23 nm using the thin film hydration and ultrasonication method, encapsulating 79.40±0.99% of KE. Scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) images have shown the uniform distribution of liposomes within the beadless fiber structure. Liposomal KE loading has enhanced the mucoadhesion of nanofibers compared to free KE loading. Liposomal KE-loaded nanofiber has

nearly doubled the bioaccesibility of anthocyanins. The cellular release of four different anthocyanins by Caco-2 cells was found to be significantly higher in liposomal KE-loaded nanofibers (3.92-10.50%).

In the other part of the study, it was aimed to produce uniaxial PUL/ carboxymethylcellulose (CMC) and coaxial hybrid nanofibers with core PUL/liposomal GH and shell PUL/CMC, lipozomal GH-loaded, to improve the stability and release properties of GH through the gastrointestinal system. Liposomes loaded with 7.5 mg/mL hydrolysate, containing phytosterol at half the amount of lecithin (1:0.5 / w/w), with a size of 75.69±0.34 nm and an encapsulation efficiency of 57.52±2.27, were obtained using the thin film hydration method. SEM and CLSM images have shown a uniform distribution of liposomes in beadless fiber morphology. Between 61.04% and 85.22% of GH in the feeding solution was encapsulated inside the fibers utilizing uniaxial and coaxial electrospinning techniques. GH loading resulted in enhanced mucoadhesion characteristics in both uniaxial and coaxial liposomal fibers. At the end of the digestion, free GH exhibited a reduction of approximately 65% and 50% in initial ABTS and FRAP antioxidant activity, respectively, whereas the fibers had a decline ranging from 13% to 35% (ABTS) and 10% to 25% (FRAP). The liposomal fibers demonstrated superior protection relative to the free-GH loaded fibers. The release of GH from liposomal nanofibers was 21.05% for uniaxial fiber and 25.85% for coaxial fiber after the gastric digestion, almost half of the free GH-loaded uniaxial fiber release at 42.69%. The lowest release following intestinal digestion was noted in liposomal coaxial nanofibers. The developed liposomal hybrid nanofibers have significant promise for the delivery of phenolic compounds and bioactive hydrolysates.

Keywords: anthocyanin, pullulan, peptide, mucoadhesion, bioaccessibility

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Karadut (*Morus nigra* L.) meyvesi, özellikle antosiyaninler olmak üzere birçok flavonoid açısından zengindir. Ancak, potansiyel sağlık faydalarının, gıda işleme, depolama ve gastrointestinal transit sırasında kararsızlıkları nedeniyle sınırlı olduğu bilinmektedir (Gonzales vd., 2015). Sadece sınırlı miktarda polifenolün, yetersiz midede kalış süresi, düşük geçirgenlik ve/veya düşük çözünürlük nedeniyle bağırsak kanalında emilebildiği bildirilmiştir (Fang & Bhandari, 2010).

Biyoaktif peptitler ise, sağlığı olumlu yönde etkileyen ve vücutta birçok potansiyel fizyolojik işlev sergileyen protein kaynaklı parçalardır (Kaur vd., 2020). Antioksidan peptitlerin ve hidrolizatların serbest radikallerle (ROS) hızla reaksiyona girebildiği bildirilmiştir (Chakka vd., 2015). Biyoaktif peptitler, insan vücudundaki oksidatif hasarı ve buna bağlı hastalık risklerini azaltmaya yardımcı olabilecek ajanlar olarak kabul edilmektedir (He vd., 2013; Girgih vd., 2011). Ancak, biyoaktif peptitler gıda ürünlerinde, ilaçlarda veya diyet takviyesi formülasyonlarında serbest formda kullanıldığında, işleme koşulları altında düşük biyoyararlanım ve stabilite sorunları yaşayabilecekleri belirtilmiştir (Sarabandi, 2020). Mide ve bağırsaktaki olumsuz koşulların yanı sıra, bağırsak epitelinde bulunan enzimler ve epitelin üzerini kaplayan mukus tabakası biyoyararlanım seviyesini önemli ölçüde etkilemektedir (Xu vd., 2019; Amigo ve Hernández-Ledesma, 2020).

Bu sınırlamaları aşmak için farklı taşıma sistemleri önerilmektedir. Lipozomlar, toksik olmayan ve biyouyumlu taşıyıcılar olarak, hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşikleri yakalama yetenekleri sayesinde fenollerin ve biyoaktif peptitlerin enkapsülasyonunda öne çıkmaktadır (Hasan vd., 2014; Mozafari vd., 2008).

Lipozomların fenolik bileşiklerin ve biyoaktif peptitlerin biyoyararlanabilirliklerini ve stabilitelerini arttırdıkları bildirilmiştir (Chi vd., 2019; Saroglu & Karadag, 2024; Niu vd., 2016). Ancak, su bazlı dispersiyonlarda bulunan lipozomlar agregasyon, bozulma, hidroliz ve oksidasyon reaksiyonları sebebiyle stabilitelerini kaybedebilmekte, kapsüllenmiş bileşiklerin sızmasına neden olabilmektedir (Karadag vd., 2013). Son zamanlarda, iki veya daha fazla taşıyıcı sistemin birleştirildiği hibrit kapsülleme sistemleri, bir yöntemin faydalarını kullanarak diğerinin dezavantajlarını aşmak için tercih edilmektedir (Tan vd., 2021).

Elektroeğirme (elektrospinning), yüksek kapsülleme verimliliği, kullanım kolaylığı ve maliyet etkinliği nedeniyle ilaç dağıtım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan basit bir tekniktir. Ancak, nanolif taşıma sistemlerinin en büyük zorluğu, yüklü bileşenin hızlı salınımını kontrol etmektir (Li vd., 2014). Dahası, lipozomların stabilitesi özellikle tek eksenli elektroeğirme sürecinden etkilenebilmektedir (Mickova vd., 2012; Pires vd., 2019). Çift eksenli elektrospinning yaklaşımı da lipozomların stabilitesini korumak ve uzun süreli salınımlarını artırmak için tercih edilmektedir (Li vd., 2014; Mickova vd., 2012; Jiang vd., 2014; Feng vd., 2019). Çift eksenli elektrospinning veya çekirdek-kabuk elektrospinning, nanoliflerin üretimi için ikinci nesil bir tekniktir. Kabuk çözeltisi, genellikle döndürülebilir bir polimerik malzemeden oluşan dış iğne aracılığıyla uygulanırken, iç iğne tarafından iletilen çekirdek çözeltisi çeşitli polimerler veya kapsüllenmiş maddeler içerebilir. Feng vd. (2019) ve Li vd. (2014) önce somon kalsitonini lipozomlara hapsedip, pektinle kapladıktan sonra, tek ve çift eksenli elektrospinning tekniklerini kullanarak PVA ve sodyum aljinat polimer liflerine enakpsüle etmişlerdir. Pektin kaplama ve çift eksenli elektrospinning işleminin, peptitin stabilitesini ve salınım özelliklerini artırdığı bildirmişlerdir. Lipozomları nanoliflere entegre etmekte, bütünlüklerini ve işlevselliklerini koruyarak, yüklü bileşenlerin lif matrislerinden hızlı bir şekilde salınımını önleyebilmekte (Tan vd.,, 2021) ve lipozomların gıda uygulamaları için antimikrobiyal gıda ambalajı (Alehosseini vd., 2019; Cui vd., 2018), antioksidan stabilizasyonu (de Freitas Zômpero vd., 2015), kolon hedefli peptid iletimi (Feng vd., 2019), yenilebilir yara iyileştirme malzemesi (Karakas vd., 2023) ve diyet takviyeleri olarak oral filmler gibi geliştirilmiş işlevselliklerle kullanımını genişletebilmektedir.

Ağızdan ilaç salınım sistemi tasarlarken, gastrointestinal kanaldaki mukus tabakasına yapışan ve onunla etkileşime giren mukoadhezyonlu polimerler tercih edildiğinde, bu polimerler yüklü bileşiğin kalış süresini uzatabilmekte ve sürekli salınımı kolaylaştırabilmektedir (Andrews vd., 2009). Lipozomların polimerik hidrojellere (Jøraholmen et al., 2019), yenilebilir filmlere (Montero vd., 2019) ve nanoliflere (Karakas vd., 2023) dahil edilmesinin, mukoadhesif özelliklerini arttırdığı bildirilmiştir.

Gıda uygulamalarında lipozomal nanolifler hakkında yapılan önceki çalışmalarda, çoğunlukla polietilen oksit (PEO), polivinil alkol (PVA) (de Freitas Zômpero vd., 2015; Feng vd., 2019) ve polivinilpirrolidon (PVP) (Cui vd., 2017) gibi sentetik polimerler kullanılmış, sınırlı sayıda çalışmada ise kitosan (Cui vd., 2018) ve zein-jelatin (Alehosseini vd., 2019; Karakas vd., 2023) gibi biyopolimerler de incelenmiştir.

Pullulan (PUL) genellikle tercih edilen biyobozunur, biyouyumlu ve Food-grade bir biyopolimerdir. Pullulan, α-(1, 6) glikozidik bağlarla bağlı tekrarlayan maltotrioz birimlerinden oluşan temel bir yapıya sahiptir. Maltotrioz üniteleri ise α-(1, 4) glikozidik bağlarıyla birbirine bağlanan glikoz monomerlerinden oluşur. Bu özel bağlanma modu pullulana esnek bir yapı, suda iyi çözünme ve lif oluşturma yeteneği kazandırmaktadır (Liu vd., 2016). Pektin (PEK) ise elektroeğirme yönteminde kullanılmak için uygun bir polimer değildir ancak karboksil grupları (Thirawong vd., 2007) gibi birçok H-bağlama grubu, içerdiği için mukoadhezyon özellikleri sağlayabilmektedir. Aynı zamanda proteazlar ile amilaza karşı direnci sayesinde, üzüm antosiyaninleri (Karadag vd., 2024) gibi kapsüllenmiş malzemeleri sindirim süreci boyunca koruyabildiği bildirilmiştir. Li vd., (2023), PUL/PEK nanoliflerinin simüle edilmiş gastrointestinal sıvıdaki parçalanabilirliğini araştırmış, liflerin mide sıvısı altında yapısını koruduğunu, bağırsak sıvısında erimeye ve parçalanmaya başladığını ve hedeflenmiş ilaçlar veya biyoaktif taşıma alanlarının geliştirilmesi için belirli bir potansiyele sahip olduğunu aktarmışlardır. Öte yandan, karboksimetil selüloz (CMC), elektrospinning için uygun olmasa da, pullulan ile uyumlu, suda çözünebilen ve mukoadhezyon özelliğe sahip bir polimerdir (Brako vd., 2018). CMC'nin COO^{-1} grupları ile pullulanın -OH grupları arasında hidrojen bağlarının oluşmasının, elde edilen filmin malzeme

özelliklerini iyileştirebileceği ve böylece elektrospinning işlemi için uygunluğunu arttırabileceği düşünülmektedir (Shao vd., 2018).

Çalışmamızın ilk kısmında, karadut ekstraktı (KE) yüklü lipozomların üretimi için çeşitli sonikasyon süreleri denenerek optimizasyon yapılmıştır. PUL/PEK biyopolimer karışımları kullanılarak tek eksenli nanolif üretimi gerçekleştirilmiştir. Nanolifler için belirli oranda lipozomal KE yüklenerek oran ve morfoloji optimizasyonu sağlanmıştır. İkinci kısmında glutenin hidrolizatı (GH) yüklü lipozomların üretimi için çeşitli fitosterol miktarları denenerek lipozomların enkapsülasyon verimliliği yükseltilmiştir. PUL/CMC biyopolimer karışımı kullanılarak tek eksenli ve çift eksenli elektroeğirme yöntemlerinin proses parametreleri optimize edilip nanolif üretimleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde, KE ve GH'ın lipozomların içerisine hapsedilip ardından sadece food grade biyopolimerler tercih edilerek tek ve çift eksenli elektroeğirme yöntemleri kullanılarak nanoliflerin içerisi gömüldüğü, elde edilen liflerin *in vitro* biyoerişilebilirlik, biyoyararlılık, gastrointestinal sistem koşullarına karşı stabilite ve salım karakteristiklerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır, bu yönüyle çalışmamız yenilikçi bir yaklaşım içermektedir.

1.2 Tezin Amacı

Çalışmamızda sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen fenoliklerce zengin karadut ekstraktı (KE) ve biyoaktif hidrolizatlara model olarak glutenin hidrolizatının (GH), gastroinstestinal sistem koşullarına karşı stabilitesini ve salım özelliklerini iyileştirerek *in vitro* biyoyararlılığını, biyoerişilebilirliğini arttırmayı hedefleyen hibrit bir enkapsülasyon sistemi olarak tüm bileşenlerinin doğal gıda katkı maddeleri olan tek ve çift eksenli lipozomal nanolif geliştirilmesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Tasarlanan hibrit enkapsülasyon sistemlerinde, sulu dipsersiyon şeklinde bulunan lipozomların termodinamik dengesizliklerine çözüm olarak, lipozomlar nanoliflerin içerisine 2 farklı şekilde (tek ve çift eksenli elektroeğirme yöntemleri) gömülmüştür. Liflerin üretilmesinde kullanılan biyopolimerlerin seçiminde ise mukoadhesif özelliğe sahip olan karobsimetil selülöz (CMC) ve pektin (PEK) lif yapma özelliği bilinen pullulan (PUL) ile birlikte kullanılmıştır. Lipozomal KE, PUL/PEK nanoliflerin içerisine tek eksenli elektroeğirme yöntemi kulllanılarak

hapsedilmiş, simüle edilmiş gastrointestinal sindirime ve *in vitro* Caco-2 hücre monolayer modeline tabi tutulmuş, fenolik bileşiklerdeki değişiklikler analiz edilmiştir. Lipozomal GH ise, PUL/CMC nanoliflerin içerisine hem tek eksenli elektroeğirme yöntemiyle hemde PUL/CMC kabuk, PUL/lipozomal GH çekirdek çözeltileri kullanılarak çift eksenli elektroeğirme yöntemiyle nanoliflerin içerisine gömülmüştür. Elde edilen lifler simüle edilmiş gastrointestinal sindirime tabi tutulmuş ve hidrolizatların antioksidan kapasitesindeki değişiklikler ile salınım özellikleri analiz edilmiştir. Tüm liflerin uygulama potansiyelini değerlendirmek için, taramalı elektron mikroskobu (SEM), konfokal lazer mikroskobu (CLSM) ile morfoloji, fizikokimyasal özelliklerin değerlendirilmesine ek olarak mekanik ve mukoadhesif özellikleri, Fourier dönüşüm kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve termogravimetrik analizi (TGA) kullanılarak değerlendirilmiştir.

1.3 Hipotez

Çalışmada, fenolik bileşikler özellikle antosiyaninler açısından zengin olan, antidiyabetik, antioksidan, antiinflamatuar ve antihiperlipidemik aktiviteler gibi bir çok sağlık faydası bulunan karadut ekstraktı ve antioksidan, antidiyabetik ve antikanser özellikleri bulunan glutenin hidrolizatının enkapsülasyonları hedeflenmiştir. Bütün bu sağlık faydalarına rağmen, bu aktif gıda bileşenleri, ağız yoluyla serbest olarak alınması sonucu stabilite ve düşük biyoyararlılık sorunlarıyla karşılaşmaktadır. Bu çalışmada, KE ve GH öncelikle lipozomların içerisine hapsedilmiş, lipozomal sistemlerin stabilite sorunlarının giderilmesi için nanolif yapılarının içerisine gömülmüş, tercih edilen mukoadhesif biyopolimerlerle KE ve GH'in biyoerişilebilirliği, biyoyararlılığı ve gastrointestinal sisteme karşı stabilitesinin arttırılması amaçlanmıştır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Gıda Biyoaktiflerinin Enkapsülasyonu

2.1.1 Fenolik Bileşiklerin Enkapsülasyonu

Fenolik bileşikler, doğal bileşiklerin en büyük gruplarından biridir ve yapısal çeşitlilikleri ile ilgili olarak geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine (antioksidan, anti-inflamatuar, anti-alerjik, antiviral, antikanser, antimikrobiyal, antimutajenik ve kardiyoprotektif vb.) sahiptir (Bucić-Kojić vd., 2020). Fenolik bileşiklerin en önemli biyolojik aktivitlerinden biri olan yüksek radikal temizleme etkisi, hidrojen atomları ve elektronlarını bağışlayabilme kapasitelerinden kaynaklanmaktadır (Zeb, 2020). Fenolik bileşikler, flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilbenler ve lignanlar olarak alt gruplara ayrılırlar. Antosiyaninler ise, flavonoidler olarak bilinen büyük ve yaygın bitki bileşenleri grubunun altı alt grubundan biridir. Kimyasal olarak antosiyaninler, lineer bir üç karbon zinciriyle bağlanmış iki benzen halkası, C6–C3–C6 temel iskeletine sahiptir (Wilska, 2007). Literatürde 600'den fazla farklı antosiyanin ve türevi bildirilmiştir (Veitch ve Grayer, 2008).

Bunlar, çoğu meyve, sebze, çiçek ve bazı tahıl tanelerinin parlak ve çekici turuncu, kırmızı, mor ve mavi renklerinden sorumludur. Renk verme özelliklerine ek olarak, antosiyaninler güçlü antioksidan aktivite sergiler ve bu da nöronal hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, iltihaplanma ve benzeri birçok hastalığın önlenmesine yardımcı olmaktadır (Yousuf vd., 2016).

Karadutlar, flavonoidlerin, özellikle antosiyaninlerin çok zengin kaynaklarıdır. Karadut (*Morus nigra* L.), *Morus* cinsine ait olup Asya, Avrupa, Afrika ve Kuzey Amerika'da doğal olarak yetişmektedir. Farklı fitokimyasalları insan sağlığı üzerinde biyolojik aktiviteye sahip iyi bir kaynağı olarak tanınmış olup, aynı zamanda küresel meyve üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır (Khalifa, Zhu,

Li ve Li, 2018). Karadut Türkiye'de de önemli bir tarım ürünü olarak yüzyıllardır yetiştirilmektedir. Türkiye'de yaklaşık 2,3 milyon dut ağacı bulunmakta ve yılda yaklaşık 65.000 ton dut meyvesi üretilmektedir (İpek vd., 2012). Türkiye'nin ana dut üretim alanları Karadeniz bölgesi ile doğu ve orta Anadolu bölgeleridir (Ozrenk vd., 2010), burada hasat dönemi Haziran ile Ağustos ayları arasındadır (Elmacı ve Altuğ, 2002). Ayrıca, Türkiye'de yetiştirilen dut ağaçlarının %95'i beyaz (M. alba), %3'ü kırmızı (*M. rubra*) ve %2'si siyahtır (*M. nigra*) (Ercisli ve Orhan, 2007). Son zamanlarda, dut meyvesinin antidiyabetik, antioksidan, antiinflamatuar ve antihiperlipidemik aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergilediği bildirilmiştir (Kamiloglu vd., 2013). Bu biyolojik aktiviteler, bazı çeşitlerde bulunan antosiyaninler de dahil olmak üzere polifenol bileşenlerinden kaynaklanmaktadır (Bae ve Suh, 2007). Huo vd. (2023), karadutlarda siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-rutinozit başta olmak üzere, 11 farklı antosiyanin 20 farklı fenolik bileşen tespit etmiştir. İncelenen karadutların güçlü bir antioksidan kapasite gösterdiğini bildirmiştir. Kamiloglu vd. (2013) ise Türkiye'de yetişen karadutlarda klorojenik asit, rutin ve siyanidin-3-O-glukoziti sırasıyla en yüksek oranda bulunan fenolik asit, flavonol ve antosiyanin olarak bildirmiştir.

Ancak, sıcaklık, pH, oksijen, ışık ve enzimler gibi yaygın işleme koşullarına karşı kararsızlıkları ve düşük sulu çözünürlükleri nedeniyle, çoğu fenolik bileşiğin gıda matrisine entegrasyonu hala zorludur (Bora vd., 2018; Wei vd., 2017). Ayrıca, gastrointestinal sıvıdaki düşük çözünürlükleri ve yine gastrointestinal kanaldaki yetersiz kalış süreleri nedeniyle, oral biyoyararlanımları da düşük düzeylerdedir (Peanparkdee ve Iwamoto, 2020). Son olarak, bazı fenolik bileşiklerin acı tadı ve hoş olmayan kokusu, yiyeceklerin duyusal özelliklerini olumsuz etkileyebilmektedir (Maqsoudlou vd., 2020). Tüm bu olumsuzları aşmak için, fenolik bileşiklerin çeşitli dağıtım sistemleri ve taşıyıcılarla kapsüllenmesi, stabilitelerinin arttırılıp raf ömürlerini uzatabilir aynı zamanda doğru zamanda ve hedef konumda serbest bırakarak aktivitelerini koruyabilir (Zhang vd., 2023).

2.1.2 Biyoaktif Hidrolizatların Enkapsülasyonu

Biyoaktif peptitler, sağlık üzerinde olumlu etki sağlayan ve vücutta çok sayıda potansiyel fizyolojik fonksiyon gösteren protein türevli parçalardır (Kaur vd., 2020). Genellikle 2 ile 20 aminoasit büyüklüğünde yapılar olan biyoaktif peptitler, enzimler veya asitlerle muamele edilerek, mikrobiyal fermantasyon veya

gastrointestinal sindirim işlemi sonucu proteinlerden salınmaktadır (Möller vd., 2008). Bu bileşiklerin antihipertansif (Miralles vd., 2018), antitrombotik (Chang vd., 2017), antidiyabetik (Kehinde ve Sharma, 2020), antimikrobiyal (Heymich vd., 2021), antioksidan (Ibrahim vd., 2018) gibi birçok aktiviteleri ve immünomodülatör etkisi (Santiago-López vd., 2016) olduğu bildirilmiştir.

Antioksidan peptitler ve hidrolizatların ise serbest radikallerle (ROS) hızla reaksiyona girebildiği bilinmektedir (Chakka vd., 2015). Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi ROS oluşumu, solunum sırasında aerobik organizmalar için kaçınılmaz bir sonuçtur. Kontrolsüz üretilen serbest radikaller çok kararsızdır ve vücuttaki diğer kimyasal gruplar veya maddelerle hızla reaksiyona girerek hücre veya doku hasarına yol açarlar (Je vd., 2007; Li ve Li, 2013). İnsanlarda ROS oluşumu, hücresel DNA, proteinler ve lipidlerin oksidatif hasarına neden olabilmektedir (Seifried vd., 2007). Aşırı reaktif serbest radikalleri uzaklaştıracak antioksidan eksikliği durumunda, vücutta kardiyovasküler, kanser, nörodejeneratif, Alzheimer ve inflamatuar hastalıklar gelişebilmektedir (Shui ve Leong, 2006). Bu bağlamda, biyoaktif peptitler insan vücudunun oksidatif hasarını ve ilişkili hastalık risklerinin azaltmasına yardımcı olacak ajanlar olarak görülmektedir (He vd., 2013; Girgih vd., 2011). Çok sayıda çalışma, lipid peroksidasyonunun da birçok kronik hastalığın oluşumunda rol oynadığını ortaya konulmuştur (Ramana vd., 2019). Özellikle gıdalardaki lipid peroksidasyonu, gıdaların besin değerlerini etkilemekle birlikte , oluşan potansiyel olarak toksik reaksiyon ürünlerinin tüketilmesini takiben hastalık riski söz konusu olabilmektedir. Gıdaların oksidatif bozulmalarını önlemek ve ciddi hastalıklara karşı koruma sağlamak için gıda maddelerinde ve canlı vücudunda meydana gelen lipid oksidasyonu ve serbest radikallerin oluşumunu engellemek önemlidir.

Buğday dünya çapında en çok tüketilen gıda gruplarından biridir. Araştırma ekibimiz tarafından da buğday toplam proteinin %85'ini oluşturan glutenin alt iki fraksiyonu olan gliyadin ve gluteninin farklı ticari proteazlarla (flavorzyme, subsitilin ve savinaz) muamele edilmesi sonucu elde edilen hidrolizatların teknolojik özelliklerine ve biyoaktivitelerine odaklanılmıştır. Çalışmada gluteninden elde edilen farklı hidrolizatların antioksidan, antidiyabetik ve antikanser aktivitesi olduğu belirlenmiştir (Bozkurt vd., 2021).

Ancak incelenen çalışmalarda, biyoaktif peptitlerin gıda ürünü, ilaç ya da gıda takviyesi formulasyonunda serbest halde kullanılması durumunda biyoyararlılık ve proses koşullarında stabilite sorunları yaşayabilecekleri belirtilmiştir (Sarabandi, 2020). Bu sorunlar şu şekilde sıralanabilir:

a) Peptitlerin sindirim sistemi proteazları ve peptidazları tarafından hidrolize edildiğinde yapısal bütünlüklerini ve işlevlerini kaybetme riski bulunmaktadır (Udenigwe, 2014; Picariello vd., 2013). Biyoaktif peptitlerin oral yoldan alınması sırasında, sistemik dolaşıma ulaşmadan önce en az 40 farklı enzimin etkisine maruz kaldığı belirtilmektedir. Birçok çalışmada biyoaktif peptit ya da hidrolizatın *in vitro* olarak sindirim sistemi enzimleriyle muamele edilmesi sonucu aktivitelerinde yüksek ya da düşük oranda azalma olduğu bildirilmiştir (Ao ve Li, 2013; Megías vd., 2009; Song vd., 2020; Fernández-Musoles vd., 2013; Zhu vd., 2014; Chen ve Li, 2012; Yap ve Gan, 2020). Ao ve Li (2013) yaptığı çalışmada alkalaz ile muamele edilmiş kazein hidrolizatlarını negatif ve pozitif fraksiyonlara ayırmıştır. NCF (negatif yüklü fraksiyon) ve PCF'nin (pozitif yüklü fraksiyon) TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) değerleri sırasıyla 2.16 ± 0.04 mM ve 2.15 ± 0.03 mM olarak belirlenmiştir. NCF ve PCF'nin ORAC (oksijen radikalı absorbsiyon kapasitesi) değerleri ise sırasıyla 428.44 ± 34.55 μmol TE/g ve 477.59 ± 5.86 μmol TE/g olarak bildirilmiştir. NCF'deki prolin içeriği, PCF'dekinden daha yüksek bulunmuştur, bu nedenle NCF'nin daha iyi sindirim direncine sahip olduğu yorumu yapılmıştır. NCF ve PCF'nin TEAC değerlerinin 2 saatlik simüle edilmiş mide sindirimi sırasında önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Daha fazla tripsin ve kimotripsin sindirimi ile, NCF'nin TEAC değeri GI sindiriminin sonunda 2.128 ± 0.035 mM'ye yükselmiştir, ancak sindirilmemiş NCF ile önemli bir fark gözlemlenmemiştir (p>0.05). Bununla birlikte, simüle edilmiş bağırsak sindiriminde PCF'nin TEAC değeri azalmıştır. GI sindiriminin sonunda TEAC değeri, sindirilmemiş PCF'ninkinden daha düşük olduğu bildirilmiştir. ORAC değerleri incelendiğinde gastrointestinal sindirim sırasında ilk 2 saat içinde azalma görülürken son iki saatte artışlar gözlemlenmiştir. Megías vd. (2009), ayçiçeği protein hidrolizatlarının gastrointestinal sistem enzimleri ve Caco-2 hücrelerine karşı

dayanıklılıklarını araştırmıştır. 30 dakika alkalazla muamele edilen hidrolizat şelatlama aktivitesinin stabilitesini belirlemek için mide sıvısı ve bağırsak sıvısı simulasyonları ile inkübe edilmiştir. Mide sıvısı simulasyonu sırasında aktivite artarken, bağırsak sıvısı sebebiyle düşüş gözlemlenmiştir. Hidrolizatların kısmen parçalandığı, bağırsak sıvısının daha yüksek bir parçalanmaya sebep olduğu bu sebeple enkapsülasyonun mantıklı bir çözüm olucağı belirtilmiştir. Daha önce 3 saat pepsin ve pankreatin ile elde edilmiş ACE inhibisyonuna sahip protein hidrolizatları ve hidrolizattan tanımlanmış FVNPQAGS peptidinin Caco-2 ekstraktlarıyla muamele edilmesi sonucu stabiliteleri belirlenmiştir. Aynı zamanda 5 dakika alkalazla muamele edilen hidrolizatlarda aynı şekilde test edilmiştir. Her iki hidrolizattaki ACE inhibe edici aktivite, 2 saat inkübasyondan sonra yaklaşık %60 azalmıştır. Sonuç olarak ayçiçeği hidrolizatlarındaki ACE inhibe edici aktivite sergileyen peptitlerin, yalnızca gastrointestinal sistem enzimlerine maruz kaldığında değil, aynı zamanda Caco-2 hücreleri tarafından üretilen peptidazlarla da stabilitelerini belirli oranlarda kaybettiği gözlemlenmiştir. Song vd. (2020), pamuk tohumunu alkalaz ile muamele ederek hidrolizatlar elde etmiş, elde ettikleri hidrolizatları 5 farklı fraksiyona ayırmıştır. Antioksidan aktiviteye sahip fraksiyonların aynı zamanda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve aralarında korelasyon olduğu bildirilmiştir. Hidrolizatların DPPH aktiviteleri gastrointestinal enzimlerle maumele sonucu düşmüştür. Fakat ABTS radikal süpürme aktivitelerinde artışa sebep olmuştur. Pepsin ve tripsinin hidrolizi ile küçük peptidler ve amino asitler oluşur, ürünlerin daha hidrofilik hale gelmesini ve ABTS*+ ile kolayca reaksiyona girmesini sağlayabilir. In vitro sindirim sonrasında antimikrobiyal aktivitenin görülmediği belirlenmiştir. Fernández-Musoles vd. (2013), daha önce ayrıntılı olarak tanımladıkları hidrolizattan elde ettikleri peptitlerin (RRWQWR ve iki ana fragmanından RWQ ve WQ) stabilitesini, Caco-2 hücrelerini kullanarak araştırnıştır. Üç peptidinde, fırça kenarlı peptidazların etkisine duyarlı olduğu bildirilmiştir. Prolin kalıntısı içerenler bazı peptid dizileri, Caco-2 fırça kenarlı peptidazların etkisine daha dirençli iken N-terminal ucunda kösin bulunduranların hidrolize karşı oldukça hassas olduğu bildirilmiştir. Zhu vd. (2014), geleneksel yöntemlerle elde edilmiş jambondan elde edilen

antioksidan peptitlerin alkali koşullar altında antioksidan aktivitelerini hızla kaybettiğini bildirmiştir. Simüle edilmiş iki aşamalı sindirim sisteminin sonuçları, antioksidan aktivitenin pepsin muamelesiyle arttığını, ancak tripsin ile daha fazla hidrolizle azaldığını göstermiştir. Pepsin, peptitleri daha küçük fraksiyonlara hidrolize etmekte etkili bulunmuştur, bu da dahili hidrofobik amino asitlerin artan maruziyetine yol açmıştır ancak tripsin, peptitleri daha serbest amino asitlere hidrolize ederek peptitlerin antioksidan aktivitesini etkileyen yüzey hidrofobikliğinde düşüşe neden olmuştur şeklinde yorumlanmıştır. Chen ve Li (2012), farklı molekül ağırlığına sahip antioksidan peptit fraksiyonlarının iki aşamalı gastrointestinal sistem modeline maruz bırakmıştır. 3000 Da üzerinde moleküler ağırlığa sahip fraksiyonların altındakilere kıyasla daha kolay degrade olduğu belirlenmiştir. Ayrıca peptitlerin, mide sindiriminden çok bağırsak sindirimiyle hidrolize olma eğiliminde olduğu bildirilmiştir. 1000 Da'nın altındaki peptitlerin ABTS, hidroksi radikali süpürme aktiviteleri ve ORAC değerlerinde diğer fraksiyonlara göre GI sistem modeli uygulamasından sonra daha az düşüş gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, 1000 Da'nin altındaki kazeinden türetilmiş antioksidan peptitlerin oral yoldan uygulamalara daha uygun olduğu yorumu yapılmıştır. Yap ve Gan (2020), α-amilaz, α-glukosidaz ve DPP-IV inhibitörü olan peptitleri *in silico* yöntemler kullanarak gastrointestinal sistem enzimlerine karşı stabilitelerini belirlemiştir. Çoğu peptid, gastrointestinal bozulmaya duyarlı bulunmuş ve tüketicilere alerjiye neden olabileceği bildirilmiştir. Bağırsak lümeni ve mikrovillilerin fırça kenar peptidazlarının biyoaktif peptitleri daha küçük moleküllere ve serbest aminoasitlere sindirebilme olasılığına ek olarak mukus tabakasıda emilime engel olabilmektedir (Amigo ve Hernández-Ledesma, 2020). Biyoaktif peptitler mukus tabakasına giremeyebilir veya mukus tabakası içinde sıkışıp kalabilir ve epitel hücrelerine ulaşmadan önce sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilebilirler (Lundquist ve Artursson, 2016).

b) Mevcut bilgiler hala çok az olmakla birlikte gıda matriks-peptit etkileşimlerinin peptitlerin biyoyararlınımını azalttığı bildirilmiştir (Udenigwe ve Fogliano, 2017; Kamdem ve Tsopmo, 2019). Ayrıca, oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan serbest radikaller ile peptitlerin

nükleofilik kısımları arasında etkileşimler nedeniyle, yeni peptit türevleri oluşabildiği ve bunların biyoyararlınımı değiştirebildiği de aktarılmıştır (Udenigwe ve Fogliano, 2017; Kamdem ve Tsopmo, 2019).

c) Bazı peptitler, değişen koşullar altında (pH, sıcaklık, oksijen), depolama ve gıda prosesleri sırasında parçalanmaya uğrayabilmektedir (Zhao vd., 2013; Sarabandi, 2020).
d) Peptitlerin sahip olduğu yüksek derecede acılık, duyusal kabul edilebilirlikte azalmaya ve oral formülasyon da hidrolizat kullanımının sınırlanmasına yol açmaktadır (Udenigwe, 2014).
e) Peptitlerin oral yolla alımı takiben kanda hızlı bir şekilde eliminasyona uğradığı bilinmektedir (Arhewoh vd.,2005).

Tüm bu faktörler, potansiyel sağlık yararlarını büyük ölçüde sınırlayacak ve peptitleri tüketilinceye kadar aktif formlarda tutmak hatta bunları doğrudan fizyolojik hedeflere ulaştırmak için koruyucu mekanizma arayışını gerekli kılacaktır. Enkapsülasyon yöntemi kullanılarak geliştirilebilecek etkili bir taşıma sistemi ile biyoaktif peptitler olumsuz koşullardan korunurken aynı zamanda aktivitelerini gösterecekleri hedef bölgede kontrollü ve uzatılmış salımları sağlanabilir.

2.1.3 Lipozomlar

Lipozomlar, kolesterol ve doğal toksik olmayan fosfolipitlerden oluşturulabilen küçük küresel şekilli yapay veziküllerdir. Fosfolipitlerin, sulu çözeltilerde hidrasyona uğradıklarında ani bir şekilde kapalı yapılar oluşturdukları gösterilmiştir. Bu tür bir veya daha fazla fosfolipid çift katmanlı zar içeren veziküller, enkapsüle edilecek maddenin doğasına bağlı olarak suda veya lipid fazda çözünen ilaçları taşıyabilmektedir (Akbarzadeh vd., 2013). Lipozomların boyutları 50 nm-2.5 μm arasında değişebilmektedir. Tüm lipozom hazırlama yöntemleri üç ila dört temel adım içermektedir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir;

a) Organik solventin buharlaşmasıyla lipidleri kurutma
b) Sulu ortamda lipid dispersiyonu
c) Lipozom saflaştırması
d) Son ürünün analizi (Ahmed vd., 2019).

Lipozomların hazırlanması, mekanik, çözücü dispersiyon yöntemleri ve hazırlanan vezikülün kaynaşması veya boyut dönüşümüne dayalı yöntemler gibi üç farklı teknik kullanılarak gerçekleştirilebilir (Samad vd., 2007). Lipozom formülasyonu için en yaygın ve basit uygulanabilir yöntemlerden biri mekanik yöntemler içerisine dahil olan ince film hidrasyon yöntemidir (Banghan vd., 1965). Bu teknikte, lipit genellikle kloroform veya kloroform, metanol, etanol karışımları gibi bir organic çözücüde çözülerek lipozomlar hazırlanır ve ardından çözücü vakum altında uzaklaştırılarak ince film tabakası elde edilir. Organik çözücüler tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, lipid kalıntısı bir su bazlı tampon kullanılarak hidrate edilir; lipidler kendiliğinden şişer ve hidratasyona uğrayarak lipozomları oluşturur. Bu yöntem, bir mikrometreden daha büyük çapta çok katmanlı veziküllerin heterojen boyutlu agregasyonunu içeren lipozomlar üretebilmektedir. Partiküllerin, ekstrüzyon veya sonikasyon gibi farklı teknikler kullanılarak boyutları küçültülebilmektedir (Ghanbarzadeh vd., 2013; Bhatia vd., 2004).

Lipozomlar, boyutları, hidrofobik ve hidrofilik karakterleri, biyouyumlulukları nedeniyle, hem biyoaktif peptitler hemde fenolik bileşiklerin enkapsülasyonunda öne çıkmaktadır. Li vd. (2015) yaptığı çalışmada daha önce yine aynı ekip tarafından antioksidan özelliği (Girgih vd., 2013) belirlenen somon balığı protein hidrolizatlarını, süt yağı globül zarı (MFGM) fosfolipidlerinden elde edilen lipozomu kitosanla kaplayarak enkapsüle etmiştir. Çalışmada ısıtma yöntemi kullanılarak ham lipozomlar elde edilmiştir. MFGH ve somon hidrolizatları belirli oranlarda karıştırılıp hidrate edimiş, gliserol varlığında 60-80 °C'ye ısıtılmıştır. Ardından yüksek basınçlı homojenizatörde homojenize edilmiştir. Daha sonra farklı miktarlarda kitosanla bire bir oranda karıştırılmıştır. Enkapsülantların karakterizasyonu belirlenmiş, fiziksel dayanıklılık özellikleri ve gastrointestinal sistem enzimlerine dayanıklılıkları incelenmiştir. %10 MFGH ve %0,4 kitosanla kaplı sistemin enkapsülasyon verimliliği en yüksek (%75) bulunmuştur. Salınım oranları incelendiğinde kitosan kaplı lipozomların simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvısı ile muamelesi sonrası kitosanla kaplanmamış lipozomlara kıyasla daha stabil oldukları belirlenmiştir. Kitosan kaplamanın dondurma çözündürme gibi uygulamalardan sonrada kaplama olmayan lipozomlara göre daha az somon hidrolizatının enkapsülasyon sisteminden ayrılmasını sağladığı belirtilmiştir. Partikul çapları ölçümleri göz önüne alıarak 4 haftalık depolama sonrasında 20

°C'de %0,6 oranında kitosanla kaplanmış enkapsülantların agregasyona daha meyilli olduğu belirlenmiştir.

Gonk vd. (2016), özellikle simüle edilmiş bir gastrointestinal sistemde (GIT) farklı koşullar altında yer fıstığı peptid fraksiyonu (PPF) ile yüklenmiş nanolipozomların stabilitesini ve biyoyararlanımını araştırmıştır. Nanolipozomu hazırlamak için ince tabaka dispersiyon metodu (etanol) ile yüksek basınçlı mikro-akışkanlaştırma (HPM) kullanılmıştır. Ayrıca, *in vitro* GIT sindirimi sırasında nanolipozomların biyoyararlanımını değerlendirmek için gösterge olarak ACE inhibitör aktivitesi kullanılmıştır. En iyi enkapsülasyon verimliliği ve dolum kapasitesi 120 MPa basınç altında sırasıyla 65% ve %4,31 olarak belirlenmiştir. Farklı pH koşulları altında en yüksek sızıntı, ham lipozom ve nanolipozom için sırasıyla% 21.96 ± 0.95 ve %12.53 ±0.53 ile pH 2.0'da gözlenmiştir. Diğer pH değerleri için ham lipozom ile nanolipozom arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir. Serbest hidrolizat, ham lipozom ve nanolipozomun in vitro salınım verileri incelendiğinde 4 saat sonunda sırasıyla % 49.44 ± 3.07, % 3.57 ± 0.23 ve % 1.27 ± 0.06 olduğu belirlenmiştir. Gastrointestinal sistem enzimleri ile muamale sonucu ACE inhibisyon aktiviteleri incelendiğinde serbest hidrolizat, nanolipozom ve ham lipozom için değerlerin arttığı belirlenmiştir. TEM görüntülerinde ham lipozom parçalanma gösterirken nanolipozomun yapısal bütünlüğünü koruduğu gözlemlenmiştir. Nanolipozomun, pepsin, pankreatin ve düşük pH ortamının saldırısından kaçınarak hidrolizatı başarıyla koruduğu sonucuna varılmıştır.

Mosquera vd. (2014) endüstriyel soya yan ürününden elde edilen kısmen saflaştırılmış fosfatidilkolinden yapılan nanolipozomlarda, esperase ile enzimatik hidrolize tabi tutulan çipura pullarından elde edilen bir kolajen peptidik fraksiyonunu kapsüllemiştir. Peptit fraksiyonunun moleküler ağırlık dağılımı ve aminoasit kompozisyonu incelenmiştir. ACE inhibisyonu ve ABST radikalı süpürme özelliğine bakılmıştır. Lipozom film hidrasyonu yöntemiyle elde edilmiş ve sonikasyon uygulanmıştır. Enkapsülasyon verimliliği %74.6 ± 0.9 olarak belirlenmiştir. Kapsüllenmiş peptid fraksiyonunun antioksidan aktivitesi ve ACE inhibe edici aktivitesinin, 4 ° C'de 8 gün sonunda sabit kaldığı bildirilmiştir. Fakat serbest peptit fraksiyonunun ABTS radikal süpürme kabiliyeti yaklaşık % 42.2 oranında önemli ölçüde azalırken, ACE inhibe edici aktivite yaklaşık % 13.6 artmıştır (p <0.05).

Mosquera vd. (2016), yaptıkları çalışmada büyük karidesten Esteraz kullanılarak elde edilen düşük molekül ağırlığına sahip ACE inhibisyon aktivitesi bulunan hidrolizatı (<1 kDa) fosfodikolin nanovesikülleri ile enkapsüle etmek ve peptit dolu kapsülantlar içeren balık jelatini jelinin karakterizasyonunu araştırmayı amaçlamıştır. Lipozomlar film hidrasyonu yöntemi ve sonikasyon uygulanarak elde edilmiştir. Enkapsülasyon verimliliği içerikteki peptit oranına göre %44-52.5 arasında değişmiştir. Lipozomların stabilitesi farklı pH değerlerinde test edilmiştir. 1.5 ve 2 $g.L^{-1}$ değerinde peptit fraksiyonu içeren hidrolizatlar 1 hafta 4 °C'de depolandıktan sonra zeta pontasiyellerinde artış görülmüştür. Zeta değerlerindeki bu artışın lipozomların stabil yapıda kaldığını kanıtladığı belirtilmiştir. Aynı zamanda pH 1 ve 8 arasında 24 saat boyunca 4 °C'de lipozomlar depolanmıştır. pH 1'de ölçülen zeta potansiyeli çok düşüktür ve sistemin stabil olmadığı sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde pH 2 ve 8 değerlerinde sistem stabil değildir fakat pH 3-7 arası elde edilen nanovesiküllerin stabil olduğu sonucuna varılmıştır. Peptit fraksiyonunun ACE inhibisyon aktivitesi 0.096 ± 0.005 g L^{-1} olarak belirlenmiştir.

Sarabandi vd. (2019a), keten tohumu küspesinden farklı proteazlar(alkalaz, pankreatin, tripsin) kullanarak hidrolizat elde etmiştir. Hidrolizatları nanolipozomlara doldurarak fizikokimyasal özelliklerini incelemiştir. Hidrolizatla dolu nanolipozomları maltodekstrinle karıştırıp püskürtmeli kurutma yöntemiyle kurutmuştur. Nanolipozomların zeta potansiyeli boş lipozoma göre artmıştır (-9'dan -10/-15 mV). Enkapsülasyon verimliliği %85 ile %90 arasında değişmiştir. Buzdolabı ve oda sıcaklığında 8 hafta depolama sonucu nanolipozomların enkapsülasyon verimliliklerinin sırasıyla %56-63 ve % 42-49'unun korunduğunu bildirilmiştir. Dondurma-çözdürme işlemi, nanolipozomlardan daha yüksek yüklü peptit salınımı ile sonuçlanmıştır, böylece eritme sonrasında enkapsülasyon verimliliğinin yaklaşık % 40-45'i korunabilmiştir. DPPH ve ABTS radikal süpürme değerleri kör örneklere (boş lipozom) göre artış göstermiştir. Püskürtmeli kurutma sonucu düşük nem düzeyine sahip iyi bir akış özelliği ve yüksek çözünürlük gösteren tozlar elde edilmiştir. Fakat ortalama boyut 120 kat artmış ve enkapsüle komponentlerin %56'si proses boyunca kaybedilmiştir. Fakat DPPH ve ABTS değerleri 93–97% ve 91–95% olarak korunmuştur.

Sarabandi vd. (2019b), yaptığı çalışmada nanolipozomları kazein hidrolizatlarıyla doldurmuştur. Enkapsülantların fiziksel özellikleri, stabilitesi ve salınımı farklı

depolama koşulları altında incelenmiştir. Hidrolizatlar hazırlanırken pankreatin ve alkalaz enzimleri farklı sürelerde (30,90,150) uygulanmıştır. Hidroliz dereceleri 5 ila %17 arasında tespit edilmişir. Enkapsülasyon verimliliği %92-77 arasında değişmiştir. Dondurma ve çözündürme işlemi sonrası hidrolizatların enkapsülasyon verimliliği %77-92'den %24-54'e düşmüştür. 21 gün sonra 4 °C'de ve oda sıcaklığında depolama sonucu salınım oranı %43–60 ve %52–74'e yükselmiştir. 4 °C'de depolamanın partükül boyutunda 7-9 kat büyümeye sebep olurken 24 °C'de depolama 40 kat büyümeyle sonuçlanmıştır. Antioksidan özellikleri incelendiğinde DPPH radikal süpürme aktivtesinin %34.5'ten %52.53'e yükseldiği görülmüştür.

Mohan vd. (2016), peynir altı suyu peptid fraksiyonlarının moleküler ağırlığının lipozomların kapsülleme verimliliği ve fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini incelemiştir. Farklı moleküler ağırlıklara sahip peptit fraksiyonları için peptit-çözücü etkileşimleri, yüzey hidrofobikliği ve serbest amino asit içeriğindeki (peptit sayısı) değişikliklerin, bunların lipozomlara dahil edilmesini ve konumlanmasını etkileyeceği varsayılmaktadır. Enkapsülasyon verimliliği moleküler ağırlık farketmeksizin %90 civarlarında belirlenmiştir. Yüzey elektrik yükünün büyüklüğü ve ortalama partikül çapı, peptid moleküler ağırlığının azalmasıyla artmıştır.

Mohan vd (2018), yaptığı çalışmada peynir altı suyu peptidlerinin net yükünün, kapsülleme verimliliği ve zeta potansiyeli, parçacık boyutu ve lipozomların farklı bölgeleri ile etkileşim dahil olmak üzere ortaya çıkan lipozomların özellikleri üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Peynir altı suyu proteini hidrolizatının yüke dayalı fraksiyonlanmasının, ortalama moleküler boyutta bir farka neden olmadığı belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimliliği sonuçlarında da önemli farklılıklar görülmemiştir.

Corrêa vd. (2019), aynı araştırma ekibi tarafından (Corrêa vd., 2014) ACE inhibisyonu ve antioksidan aktivitesi belirlenen ve içerdiği biyoaktif peptitleri tanımlanan koyun peynir altı suyu tozu hidrolizatını lipozom içerisine enkapsüle etmiştir. Enkapsülasyon sisteminin fizikokimyasal özellikleri ve 30 gün boyunca biyoaktif özelliklerindeki değişiklik incelenmiştir. ABTS radikal süpürme aktivitesi %48.6 ve %38.6 olan en yüksek iki fraksiyon <10kDa moleküler ağırlığa sahip olucak şekilde ultrafiltrasyondan geçirilmiştir. Elde edilen filtrat enkapsüle edilmiştir. PDI değeri ve zeta potansiyeli önerilen değerlerin altında olsada bir ay

boyunca değerler stabil kalmıştır. PDI değeri 0,440 civarlarında, zeta potansiyeli -13 ile -17 mV arasında değişmiştir. Enkapsülasyon verimliliği %48 olarak belirlenmiştir. Serbest radikallerin ABTS radikal süpürme aktivitesi ve ACE inhibisyon aktivitesi enkapsüle edildikten sonra sırasıyla %74ten %43'e ve %79'tan %52'ye düşmüştür. 30 günlük depolama sonunda serbest hidrolizat ABTS radikal süpürme aktivitesini %17 oranında kaybederken enkapsüle peptitler %7 oranında kaybetmiştir.

Liu vd. (2015), tarafından gerçekleştirilen çalışmanın amacı negatif yüklü bovin serum albuminle (BSA) doldurulmuş anyonik lipozomların *in vitro* sindirime karşı stabilitesini araştırmaktır. Stabiliteleri, zeta potansiyeli değerleri ve TEM görüntü sonuçları ile takip edilmiştir. Z-ortalama çapı ve PDI değeri 1187 ± 128 nm ve 0.27 ± 0.09 olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyeli −39.0 ± 0.8 mV'dur. Enkapsülasyon verimliliği %33,9 olarak bildirilmiştir. Simüle edilmiş mide sıvısı (pH 1.5) (SGF) ile muamele sonrası enkapsülantların çapları kısa süre içerisinde yaklaşık %50 oranında azalmış ve daha sonra 120 dakika boyunca sabit kalmıştır. Simule edilmiş intestinal sıvı (SIF) ile muamale sonrası ilk 15 dakika hızlı bir artış daha sonra azalış görülmüştür. Zeta potansiyeli değerleri SIF ile muamele esnasında değişiklik göstermemiştir. TEM sonuçları, asidik koşulların şekil değişikliğine neden olmasına rağmen, iki tabakalı zarın büyük bir kısmının SGF'de yapısal bütünlüğünü koruduğunu doğrulamıştır. Ek olarak, SIF'de sindirilen lipozomların TEM görüntülerinde görülen membran bozulması, boyut ve zeta-potansiyeli değişim sonuçlarını desteklemiştir. Protein salınım kinetiği sonuçlarına göre enkapsüle edilmemiş BSA, SGF ile muamele sonucu tamamen hidrolize olmaktadır. Fakat lipozom içerisine enkapsüle edildiği sistemde %30'unun korunduğu belirlenmiştir. SIF ile muamele sonucu serbest BSA ve enkapsüle BSA'nın önemli derecede hidrolize uğramadığı belirlenmiştir. Lipozomların lipolizi serbest yağ asitlerinin (SYA) salınımı incelenerek farklı oranda safra tuzu ile muamele ederek ölçülmüştür. Safta tuzu oranı arttıkça SYA salınımı artmıştır.

da Rosa Zavareze (2014), yaptığı çalışmada balık kasları ve atık ürünlerinden elde edilen protein hidrolizatlarını lipozom içerisine enkapsüle etmiştir. Lipozomların linoleik asit peroksidasyonu inhibisyonu belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimliliği balık kası ve atık ürünleri için sırasyıla %80 ve %79 olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyelleri ise aynı şekilde -5,5 ve -2,2 mV olarak bildirilmiştir. Lipid

peroksidasyonu inhibisyon değerleri serbest hidrolizatlar ve enkapsüle sistemler için %21'den %31'e kadar değişiklik göstermiştir. Elde edilen bu değerler alfa-tokoferolun (25.7%) lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerine çok yakın bulunmuştur.

Ramezanzade vd. (2017), yaptığı çalışmada gökkuşağı alabalığının derisinden jelatin elde etmiştir. Jelatinin alkalazla muamelesi sonucu elde edilen antioksidan peptit fraksiyonunu nanolipozomun içerisine enkapsüle edip kitosanla kaplamıştır. Enkapsülasyon verimlilikleri %75 ile %46 arasında değişirken, zeta potansiyelleri 32.2 ile 45.5 mV arasında farklılık göstermiştir. İn vitro salınım sonuçlarına göre kitosan oranı arttıkça salınım hızı azalmıştır. Kapsüllenmemiş hidrolizat 8 saat içinde tamamen salınırken kapsüllenmiş sistemden peptit salınımı 24 saat sonunda en yüksek kitosan oranında %15.7 olarak belirlenmiştir. DPPH radikali süpürme aktivitesi değeleri artan peptit miktarı ile birlikte 15.72–67.77% arasında değişmiştir ve serbest peptit fraksiyonu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. ABTS radikali süpürme aktivitesi değerleri ise 16.4–74.7% arasında değişmiştir. Enkapsüle sistemlerle serbest hidrolizatların değerleri aynı bulunmuştur.

Hosseini vd. (2017), balık derisi jelatininden elde edilen peptit fraksiyonlarını nanolipozomların içerisine enkapsüle etmiştir. Enkapsülasyon verimliliği değerlerinin peptit miktarı arttıkça (0-10 mg/ml) %84'ten %28'e düştüğü belirlenmiştir. Zeta potansiyelleri 0,11 ile 8,65 mV arasında değişkenlik göstermiştir. In vitro salınım sonuçlarına göre serbest peptit fraksiyonu 8 saat içinde hızla salınırken enkapsüle sistemlerde 24 saatte sadece %29.93-40.53 arasında salınım belirlenmiştir. DPPH radikali süpürme aktivitesi değeleri (24.3%) kapsüle sistemler için düşük bir oranda az bulunmuştur. ABTS radikali süpürme aktivitesi (%37.9) değerleri ise enkapsüle sistemlerle serbest hidrolizatlar ile aynı bulunmuştur.

Yang vd. (2012), yaptıkları çalışmada aynı ekip Wang vd. (2010) tarafından ACE inhibisyon aktivitesi belirlenen fakat tadı ve higroskopisi direk kullanım açısından yeterli olmayan peynir altı suyu hidrolizatlarını (WHP) enkapsüle etmiştir. Acı tadı hafifletmek ve peynir altı suyu proteini hidrolizatının stabilitesini arttırmak için duvar malzemesi olarak maltodekstrin veya maltodekstrin /-siklodekstrin karışımı kullanarak püskürtmeli kurutma yoluyla peynir altı suyu proteini hidrolizatını

kapsüllemiştir. Kapsüllenmemiş WPH ile karşılaştırıldığında, kapsüllenmiş WPH, önemli ölçüde daha düşük higroskopiklik ve daha yüksek cam geçiş sıcaklığı sergilemiştir. Hem maltodekstrin ile kapsüllenmiş WPH'nin hem de maltodekstrin / p-siklodekstrin ile kapsüllenmiş WPH'nin acılığı, orijinal kapsüllenmemiş WPH'ninkinden önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur.

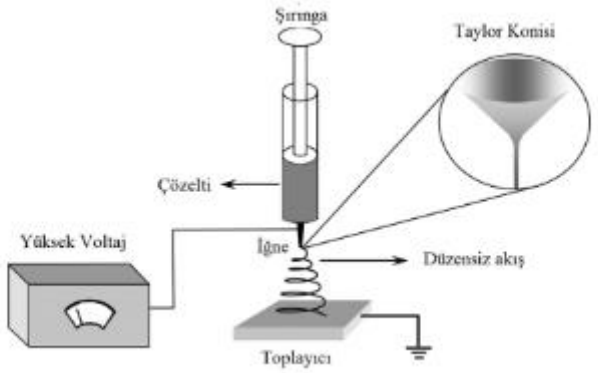
Chi vd. (2019), etanol enjeksiyon yöntemini ultrasonikasyon ile birleştirerek antosiyaninleri nanolipozomların içerisine hapsetmiştir. Elde edilen nanolipozomların farklı sıcaklıklarda, değişen pH seviyelerinde, beyaz floresan ışık altında ve süte eklendiğinde antosiyaninlerin stabilitesini koruduğunu bildirmiştir. Enkapsüle antosiyaninlerin daha yavaş salınım ve *in vitro* sindirim sırasında daha iyi stabilite gösterdiğini aktarmıştır.

Saroglu ve Karadag (2024), propolis ekstraktını soya lesitini ile oluşturulmuş lipozom veziküllerine yüklemiştir. İki gıda katkı maddesi, emülgatör olarak kullanılan polioksietilen sorbitan monooleat (Tween 80) ve amonyum fosfatid (AMP), lipozom formülasyonlarında PE'nin yükleme kapasitesini artırmak için kullanılmıştır. Örnekler in vitro sindirime tabi tutulduktan sonra, serbest PE için fenolik bileşiklerin geri kazanımı %0.03 ile %5.63 arasında değişirken, Tween 80 ile entegre lipozomal propolis için %4.85 ile %169.46 arasında, AMP ile entegre lipozomal propolis için ise %6.50 ile %495 arasında değiştiğini bildirmiştir. Lipozomla enkapsülasyonun propolis ekstraktının fenolik bileşiklerini sindirim sıvılarına karşı koruduğunu aktarmıştır.

Fakat geleneksel lipozomlar enkapsüle bileşiklerin sızmasıyla sonuçlanan kümelenmeye, bozunmaya ve hidroliz ve oksidasyon reaksiyonlarına eğilimli termodinamik açıdan kararsız sistemlerdir (Karadag vd., 2013). Lipozomların sahip olduğu çift katmanlı fosfolipid membranının mide asidi, fosfolipazlar, pankreas lipazı, kolesterol esteraz gibi sindirim enzimlerine ve safra tuzlarına karşı duyarlılığı, geliştirilmeleri için farklı birçok yaklaşımın ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Jash vd. 2021). Lipozomların ve biyopolimerlerin entegrasyonu ile elde edilen hibrit sistemler, lipozomların *in vitro* ve *in vivo* performanslarını iyileştirmek için umut verici bir stratejiyi temsil etmektedir. Hibrit sistemlere örnek olarak, biyopolimer kaplı lipozomlar, biyopolimer içeren lipozomlar, lipozomal hidrojel, lipozomal film ve lipozomal nanolifler verilebilir (Tan vd., 2021).

2.1.4 Elektroeğirme Yöntemi

Elektroeğirme, çeşitli biyomalzemelerden nanolif üretimi için kullanılan basit ve çok yönlü bir tekniktir. Biyopolimerik liflerin çapları birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişebilmektedir, birim kütle başına yüksek yüzey alanı ve gözeneklilik özelliklerine sahiptirler (Mendes vd., 2017). Son zamanlarda, elektroeğirme yöntemi, farmasötikler de dahil olmak üzere biyoaktif bileşenleri kapsüllemek için uygulanabilir bir yol olarak önerilmiştir. Geleneksel kapsülleme tekniklerine kıyasla, elektroeğirme sürecinin temel avantajı, işleme depolama sırasında biyolojik aktif maddelerin yapısını korumak ve yüksek kapsülleme verimliliği sağlamak için önemli olan ısının olmamasıdır. Elektrospun liflere kapsüllenmiş biyoaktif bileşikler, artırılmış stabilite ve işlevsellik taşırlar (Wen vd., 2017). Elektrospun nanolifler filtrasyon, yara örtüleri, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, askeri koruyucu giysiler gibi birçok alanda başarıyla uygulanmıştır (Noruzi vd., 2016). Son zamanlarda da gıda bilimi alanındanki potansiyel uygulama alanlarına nispeten yeni olmakla birlikte odaklanılmıştır (Wen vd., 2017; Noruzi vd., 2016).



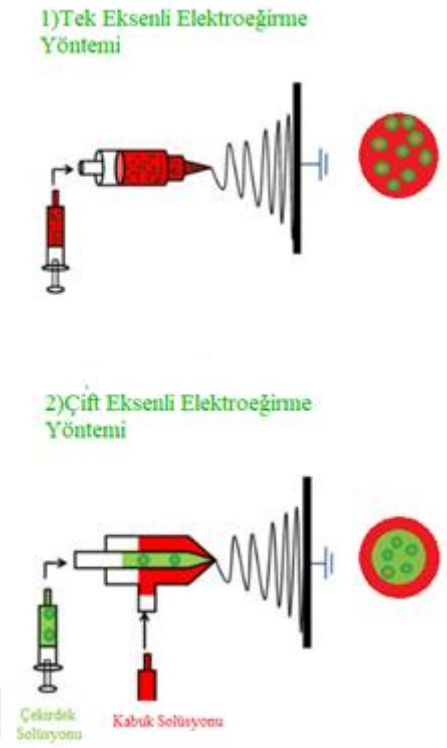
Şekil 2.1 Elektrospinning düzeneği (Evcin vd., 2019).

Elektrospinning, bir sıvı damlasının elektriklendirilerek bir jet oluşturduğu, ardından lif(ler) oluşturmak için gerilme ve uzama ile devam eden elektrohidrodinamik bir süreci içermektedir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, elektrospinning için temel kurulum oldukça basittir, bu da onu neredeyse her laboratuvara erişilebilir kılmaktadır (Xue vd., 2017). Ana bileşenler arasında yüksek voltajlı bir güç kaynağı, bir enjektör pompası, bir spinneret (genellikle, ucu kör bir hipodermik iğne) ve iletken bir toplayıcı bulunmaktadır. Güç kaynağı ya doğru akım ya da alternatif akım olabilir. Elektrospinning sırasında, sıvı, yüzey

gerilimi sonucu bir sarkıt damlacığı oluşturmak için iğneden dışarı sıkılır. Elektrikleştirme sırasında, aynı işareti taşıyan yüzey yükleri arasındaki elektrostatik itme, damlayı bir Taylor konisi şeklinde deforme eder ve buradan yüklü bir jet fırlatılır. Jet başlangıçta düz bir çizgide uzanır ve ardından bükülme kararsızlıkları nedeniyle şiddetli çırpma hareketlerine maruz kalır. Jet daha ince çaplara gerildikçe hızla katılaşır ve bu da topraklanmış toplayıcı üzerinde katı liflerin birikmesine yol açar (Xue vd., 2019). Genel olarak, elektrospinning süreci dört ardışık adıma takip eder:

a) Sıvı damlacığının yüklenmesi ve Taylor konisi veya koni şeklinde jetin oluşumu;
b) Yüklü jetin düz bir hat boyunca uzatılması;
c) Elektrik alanı varlığında jetin incelmesi ve elektriksel bükülme kararsızlığının (aynı zamanda çırpma kararsızlığı olarak da bilinir) büyümesi;
d) Jetin katı lif(ler) olarak toplanması ve bir topraklanmış toplayıcıda katılaşması (Sun vd., 2014)

Konvansiyonel düzende genellikle basit bir boş iğne kullanılmaktadır. İki boş iğneden oluşan bir koaksiyel iğne, çift eksenli elektrospinning için koaksiyel olarak elektriklendirilmiş bir jet oluşturmak üzere geliştirilmiştir (Şekil 2.2). Çift eksenli elektroeğirme çekirdek-kabuk elektro eğirme olarak da bilinmekte olup ikinci nesil nanolif üretme şeklidir. Kabuk çözeltisi, en yaygın olarak döndürülebilir polimerik malzemeden oluşan dış iğneden enjekte edilirken, iç iğneden enjekte edilen çekirdek çözelti, basit sıvılar dahil olmak üzere diğer polimerlerden veya kapsüllenmiş kütlelerden oluşabilmektedir (Yarin, 2011; Moghe ve Gupta, 2008). Feng vd. (2019) ve Li vd. (2018), somon kalsitonini öncelikle lipozom içerisine hapsedip pektinle kaplayıp PVA ve sodyum alginat polimer liflerine tek ve çift eksenli elektroeğirme yöntemlerini kullanarak enkapsüle etmiştir. Pektin kaplamanın ve çift eksenli elektroeğirme yönteminin stabilite ve nanoliflerin salım özelliklerine olumlu katkısı olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 2.2 Tek Eksenli ve Çift Eksenli Elektroeğirme Yöntemleri

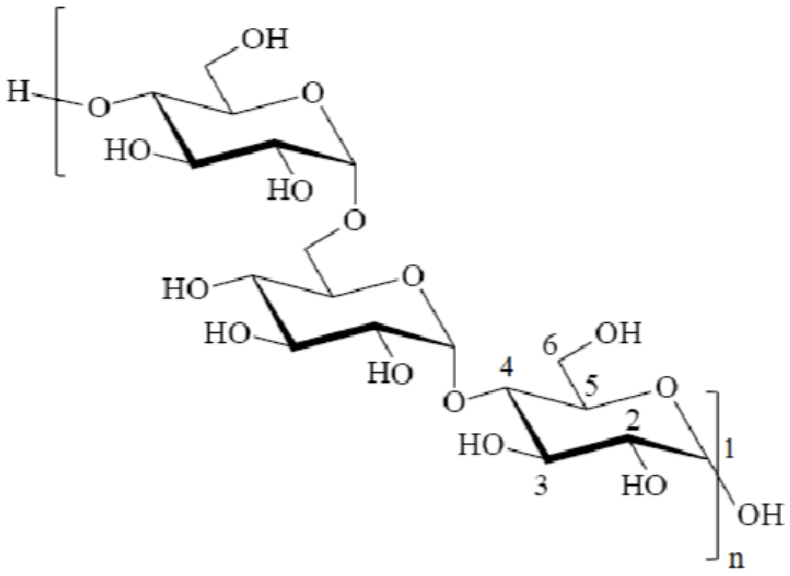
Elektrospinning süreci, elektroeğirililebilirlik, lif morfolojisi ve boyut açısından, çözeltinin özellikleri (örneğin, polimer türü, solvent, katkı maddeleri ve konsantrasyon vb.), elektrospinning parametreleri (örneğin, uygulanan voltaj, iplikleme mesafesi, besleme hızı ve iğne çapı) ve çevresel parametreler (örneğin, sıcaklık, nem ve hava akışı) tarafından etkilenebilmektedir (Ghorani ve Tucker, 2015, Mendes vd., 2017). Kapsülleme matrisleri açısından, gıda sınıfı biyopolimerler (proteinler ve polisakaritler) toksik olmayan, biyouyumlu, biyobozunur ve sürdürülebilir oldukları için son yıllarda öne çıkmaktadır.

Pullulan (PUL), nişasta, glikoz ve bazı tarımsal-endüstriyel atıklardan *Aureobasidium pullulans* tarafından büyük ölçekli olarak üretilen lineer bir polisakarittir (Tabasum vd., 2018). Maltotrioz birimleri, α-(1,4) bağıyla bağlı glikozlardan oluşur ve α-(1,6) glikozidik bağlarıyla birbirlerine bağlıdır (Leathers, 2003) (Şekil 2.3). Bu bağların kendine has dizilimi, pullulanın yüksek su çözünürlüğü, oksijen bariyeri, toksik olmama, kanserojen olmama, mutajen olmama ve biyobozunabilirlik gibi çeşitli özelliklerinden sorumludur (Prajapati, Jani, & Khanda, 2013). Pullulan pahalı bir ürün olmasına rağmen, yüksek adhesyon ve film oluşturma özellikleri nedeniyle, düşük kalorili yiyeceklerde, kıvam

arttırıcılarda ve kapsülleyici ajanlarda kullanılmaktadır (Aceituno-Medina vd., 2013). Aynı zamanda, viskoziteyi artırarak, iletkenliği ve yüzey gerilimini azaltarak elektroeğirme çözeltilerinin elektroeğirebilirliğini geliştirmek için sıklıkla tercih edildiği bildirilmiştir (Qin vd., 2019).

Karboksimetilselüloz (CMC), pektin (PEK), kitosan, aljinat gibi doğal polimerler ise mukoadhesif özellikleri sebebiyle taşıma sistemlerinde epitelyal membranlardan geçirgenliği arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Chatterjee vd., 2017). CMC, suda çözünür, anyonik mukoadhezyon özelliğine sahip bir selüloz türevidir. Pektin ise ticari olarak narenciye kabukları, şeker pancarı küspesi, elma posası gibi tarımsal yan ürünlerden ekstraksiyon yoluyla üretilmekte olup, jelleştirici veya koyulaştırıcı ajan olarak yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Fishman vd.,2000; Muhidinov vd., 2010). Pektin birçok H-bağlama grubu, örneğin karboksil grupları (Thirawong vd., 2007) içerdiği için mukoadhezyon özellikleri sağlayabilmektedir. Aynı zamanda proteazlar ile amilaza karşı direnci sayesinde, örneğin üzüm antosiyaninleri (Karadag vd., 2024) gibi kapsüllenmiş malzemeleri sindirim süreci boyunca koruyabildiği bildirilmiştir.

Pektin sulu çözeltilerinden tek başına nanolif elde edilemediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Liu vd., 2016). CMC ise suda çözünür ve pullulan ile uyumludur. CMC'nin COO^{-1} grupları ile pullulanın -OH grupları arasında hidrojen bağlarının oluşumunun, ortaya çıkacak filmin malzeme özelliklerini iyileştirebileceği böylelikle elektroeğirme işlemine uygunluğunun da arttırabileceği bildirilmiştir (Shao vd., 2018). Blanco-Padilla vd. (2015) amarant ve pullulan karışımı kullanarak *in vitro* sindirime dayanıklı nanolifler üretmeyi başarmıştır. Shao vd. (2018) ise pullulan ve CMC kullanarak çay polifenollerini nanoliflerin içerisine enkapsüle etmiş ve elde edilen liflerin morfolojik karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Li vd., (2023), PUL/PEK nanoliflerinin simüle edilmiş gastrointestinal sıvıdaki parçalanabilirliğini araştırmış, liflerin mide sıvısı altında yapısını koruduğunu, bağırsak sıvısında erimeye ve parçalanmaya başladığını ve hedeflenmiş ilaçlar veya biyoaktif taşıma alanlarının geliştirilmesi için belirli bir potansiyele sahip olduğunu aktarmışlardır.



Şekil 2.3 Pullulanın yapısı (Leathers, 2003).

Nanoliflerin tüm yapısal avantajları sayesinde, elektrospun liflere kapsüllenmiş biyoaktif bileşikler, artırılmış stabilite ve biyoyararlanım sergiler ve hedefe yönelik dağıtım sağlayabilirler (Pérez-Masiá vd., 2014). Fakat, nanolif taşıma sistemlerinin sahip olduğu en önemli sorun ise biyoaktif bileşenin hızlı atımlı salımını kontrol etmektir (Li vd., 2014a; Feng vd., 2019). Doğrudan elektroeğirme yöntemi ile üretilen nanoliflerin polimer matrisinde dağılmış biyoaktif bileşenler genellikle Fickian veya Fickian olmayan difüzyon yoluyla hızlı atımlı salım davranışı sergilemektedir (Tungprapa vd., 2007; Yu vd., 2012). Bununla birlikte bu işlemdeki yaygın bir diğer problem organik çözelti ortamındaki konformasyonel değişiklikler nedeniyle dahil edilen biyomoleküllerin aktivitesinin kaybıdır (Mickova vd., 2012). Doğrudan elektroeğirme yöntemiyle elde edilen nanolifleri geliştirmek adına hibrit nanolifler gibi birçok yaklaşım ortaya çıkmıştır. Lipozomların içerisine gömüldüğü nanolif sistemleriyle ilgili sınırlı sayıda bulunan çalışma Tablo 2.1'de listelenmiştir.

Hasanbegloo vd., (2023), paklitaksel yüklü lipozomları çift eksenli kitosan çekirdek, poli(ε kaprolakton) (PCL)/ kitosan kabuk nanoliflerin içerisine gömmüştür. Paklitaksel yüklü lipozom entegre edilmiş çekirdek-kabuk nanoliflerin üç aşamalı kontrollü ilaç salınım davranışı gösterdiği ve yüksek in vivo tümör etkinliği bulunduğunu, bu formülasyonların kanser tedavisi için kullanım potansiyeli olduğunu aktarmıştır. Karakas vd., (2023), lipozoma enkapsüle edilmiş

propolis ektraktını çekirdek jelatin/zein ve kabuki jelatin/zein çift eksenli nanolifler üretmiş, liposomal liflerin termal ve tekstürel özelliklerinin iyileştiğini, daha yüksek mukoadhesyon özelliği gösterdiğini ve *Staphylococcus aureus*'a karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Lipozomal propolis ekstraktının liflere entegre edilmesinin, insan deri fibroblast (HFF-1) hücrelerinin canlılığını arttırdığını bildirmiştir. Cui vd. (2018), lipozomal çay ağacı yağı içeren kitosan/PEO tek eksenli nanoliflerin *Salmonella*'ya karşı yüksek antibakteriyel aktivite sergilediğini, aynı zamanda elde edilen aktif gıda ambalajının tavuk etinin duyusal özellikleri üzerinde bir etki yapmadığını aktarmıştır. Alehosseini vd. (2019), liposomal kurkumin yüklü jelatin bazlı nanoliflerin daha düşük oranda hızlı atımlı salım gösterdiğini aktarmıştır. Elde edilen gıda ambalajının hidrofobik gıda benzerlerinde gelişmiş koruma etkisi ve daha sınırlı ve yavaş salım gösterdiğini bildrilmşitir. Feng vd., (2019), pektin kaplı liposomal somon kalsitonini, çekirdek PVA, kabuk sodyum aljinate/PEO içeren çift eksenli ve sodium aljinat/PVA karışımından elde edilen tek eksenli nanolifleirn içerisine hapsetmiştir. Kabuk çekirdek tipi matlardan somon kalsitonini sürekli ve kolon hedefli bir şekilde serbest kaldığını, kabuk çekirdek tip matların tek eksenli nanoliflere göre daha düşük bir hızlı atımlı salım gösterdiği bildirilmiştir.

Fakat çalışmaların hemen hemen hepsinde hibrit nanolifleri oluşturmak için poli(vinil alkol) PVA, PEO gibi sentetik polimerler kullanılmıştır (Mickova vd., 2012; Li vd., 2014b; Li vd., 2018; Feng vd., 2019; Pires vd., 2019; de Freitas Zômpero vd., 2015). Az sayıda çalışmada food-grade biyopolimerler kullanılarak nanolifler elde edildiği görülmüştür (Karakas vd., 2023; Alehosseini vd., 2019).

Tablo 2.1 Tek eksenli ve çift eksenli elektroeğirme yöntemiyle elde edilen hibrit nanoliflerle ilgili çalışmalar

KAYNAKÇA	**ÇALIŞMA ALANI**	**YÜKLENEN BİYOAKTİF BİLEŞEN**	**KULLANILAN POLİMERLER**
Mickova vd. (2012)	İlaç Taşıma Sistemi Doku Mühendisliği	Yabanturpu peroksidazı (HRP)	Karışım; PVA (polivinil alkol) /HRP, Karışım; PVA/lipozoma hapsedilmiş HRP Çekirdek; PVA-HRP Kabuk; PVA Çekirdek; PVA/lipozoma hapsedilmiş HRP Kabuk; PVA
Li vd. (2014a)	İlaç Taşıma Sistemi Yara Örtü Materyali	Naproksen (NAP)	Karışım; NAP/CA (selüloz asetat) Çekirdek; NAP yüklü lipozomlar/HA-Na (sodyum hiyalüronat) Kabuk; CA Çekirdek; NAP/CA Kabuk; CA
Li vd. (2014b)	Yara Örtü Materyali	-	Çekirdek; Boş Lipozom-HA-Na Kabuk; PVP (polyvinylpyrrolidone)
Li vd. (2018)	Ağız yoluyla ilaç taşıma sistemi	Somon kalsitonin (SCT)	Karışım; Pektin kaplı SCT yüklü lipozomlar/sodyum alginat ve polivinalkol (PVA) Karışım; SCT yüklü lipozomlar/ sodyumalginat ve polivinalkol (PVA)

Tablo 2.1 Tek eksenli ve çift eksenli elektroeğirme yöntemiyle elde edilen hibrit nanoliflerle ilgili çalışmalar (devamı)

Pires vd. (2019)	Doku Mühendisliği	Epigallokatesingallat (EGCG)	Karışım; PCL(polikaprolakton)/ EGCG hapsedilmiş lipozom/jelatin
Alehosseini vd. (2019)	Aktif Gıda Ambalajı	Kurkumin	Karışım; Lipozoma hapsedilmiş kurkumin/Jelatin Karışım; Kurkumin/Jelatin
de Freitas Zômpero vd. (2015)	Gıda Uygulaması	β-Karoten	Karışım; PVOH (polivinilalkol)/ β-Karoten yüklü lipozom/PEO(polietilenoksit)
Cui vd. (2018)	Aktif Gıda Ambalajı	Çay ağacı yağı	Karışım; Kitosan/PEO/Lipozoma hapsedilmiş çay ağacı yağı
Hasanbegloo vd. (2023)	Ağız yoluyla ilaç taşıma sistemi	Paklitaksel	Çekirdek; Kitosan/Lipozomal Paklitaksel Kabuk; poli(ε kaprolakton) (PCL)/ kitosan
Feng vd. (2019)	Ağız yoluyla ilaç taşıma sistemi	Somon kalsitonin (SCT)	Çekirdek; PVA/Pektin kaplı SCT yüklü lipozom Kabuk; SA(Sodyumalginat) /PEO Karışım; SA/PVA/Pektin kaplı SCT yüklü lipozom
Karakas vd. (2023)	Yara Örtü Materyali	Propolis Ekstraktı (PE)	Çekirdek; Zein/jelatin/Lipozomal PE Kabuk; Zein/Jelatin

3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tezin ilk kısmı olan karadut ekstraktı yüklü lipozomal nanolif üretimini hedefleyen çalışmada kullanılmak üzere, lesitin **(**Lipoid S 75), Lipoid'den (Ludwigshafen, Almanya) satın alınmıştır. Pullulan ve turunçgil pektini (E 440, HM RS) sırasıyla Prinova Nagase Group (İngiltere) ve Cargill (İngiltere)'den hediye edilmiştir. Sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), potasyum persülfat, ABTS [2, 2′-Azino-bis(3- etilbenzotioazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu], α-amilaz (A1031), pankreatin (P7545, 8xUSP), pepsin (P7012), sodyum klorür (NaCl), Triton™ X-100 (T8787), safra tuzu (B3883), kalsiyum klorür, potasyum klorür, monopotasyum fosfat, magnezyum klorür hekzahidrat, amonyum karbonat ve müsin (M2378), Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır. Glacial asetik asit (%100 anhidrat) ve etanol (%99,5, ekstra saf) sırasıyla Isolab (Türkiye) ve Tekkim'den (Türkiye) temin edilmiştir. Santrifüj tüpleri (AmiconUltra, UFC905024) Millipore'dan (İngiltere) satın alınmıştır. Ultra saf su Milli-Q sistemi (Billerica, MA, ABD) ile hazırlanmıştır. Taze karadut örnekleri İstanbul, Türkiye'deki yerel bir tedarikçiden temin edilmiştir. UPLC-ESI-MS/MS tespiti ve miktar tayini için kullanılan standartlar; siyanidin, siyanidin 3-5 diglukozit, siyanidin 3-rutinosit, siyanidin 3-glukozit, pelargonidin, pelargonidin 3-glukozit, kaempferol 3-glukozit, kuersetin 3-glukozit, rutin, luteolin 7-glukozit, klorojenik asit, kriptoklorojenik asit, protokateşuik asit ve vanilik asit Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır. *in vitro* biyoerişilebilirlik analizinde kullanılan, CaCo-2 insan adenokarsinom hücre hattı (HTB-37TM) American Type Culture Collection'dan (ATCC®) temin edilmiştir. Minimum esansiyel ortam (Minimum Essential Medium, MEM, SLM-550-500) Serox GmbH'den (Izmır, Türkiye); esansiyel olmayan amino asit solüsyonu

(SH3023801), sodyum piruvat solüsyonu (SH30239.01), Earle's Balanced Salt Solution (Medium 199/EBSS, SH30253.01) ve fetal bovine serum (FBS, SH30071. 03) Cytiva/HycloneTM (GE Life Sciences, ABD), penisilin-streptomisin (P4333), L-glutamin (G7513) çözeltileri ve 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT, M2003) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), 6-kuyulu insert membranlar (657640) Greiner Bio-One International GmbH (Avusturya) şirketinden temin edilmiştir.

Tezin ikinci kısmı olan glutenin hidrolizatı yüklü lipozomal nanoliflerin üretimini hedefleyen çalışmada kullanılmak üzere, etanol, sodyum azit, sodyum

Tablo 3.1 Fitosterol içeriği

Kompozisyon	İçerik (%)
Fitosterol	90
ß-sitosterol	<80
Campestrol	<40
Stigmasterol	<30
Brassicasterol	<3
Campestanol	<5
Sitostanol	<15
Diğer steroller	<3
Sükroz Ester (E-473)	<10
Maltodekstrin	<10

hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin) (T1253), demir (III) klorür hekzahidrat (FeCl3-6H2O) (236489), potasyum perfulfat, ABTS [2, 2′-Azino-bis(3-etilbenzotioazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu)], α-amilaz (A1031), sodium klorür (NaCl), triton™ X-100 (T8787), kalsiyum klorür, potasyum klorür, monopotasyum fosfat, magnezyum klorür hekzahidrat, amonyum karbonat, müsin (M2378), pankreatin (P7545,8xUSP), pepsin (P7012) ve Tris/HCl Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) temin edilmiştir. Membran filtre [14629-47-D, PES, 5.000 moleküler ağırlık kesme (MWCO)], AmiconUltra filtreleri (UFC905024) ve BCA (bisinkoninik asit) Protein Test Kiti ve safra tuzu sırasıyla Sartorius (Göttingen, Almanya), Millipore (İngiltere), Thermofisher (Massachusetts, ABD) ve Biolife (Milano, İtalya) firmalarından temin edilmiştir. Fitosterol [Vitasterol S-80 WDP (%90), bileşimi Tablo 3.1'de gösterildiği gibidir], lesitin (Lipoid S75, Ludwigshafen, Almanya), pullulan (Prinoava Nagase Group), CMC (METHOCEL E4M Gıda Sınıfı Modifiye Selüloz) ve flavourzyme (500-1000 LAPU/g, Novozyme, Danimarka) ilgili firmalardan hediye edilmiştir. Buğday unu (Efsane) yerel bir süpermarketten satın alınmıştır.

3.2 Karadut Ekstraktının Enkapsülasyonu

3.2.1 Karadut Ekstraktının Eldesi ve Karakterizasyonu

Taze karadutlar sıvı nitrojen kullanılarak hızla dondurulmuş ve bir blender ile doğranmış, %80 etanol (%0.1 HCl) (1:15, a/h) ile karıştırılmış, T-25 Ultra-Turrax (Ika Labortechnik, Stauden, Almanya) ile 10000 rpm'de 5 dakika boyunca homojenize edilmiş ve 30 dakika ultrasonikasyon banyosunda (Daihan Scientific, WUC-A03H, Kore) tutulmuştur. Sıcaklık soğuk su sirkülasyonu ile 25°C'de sabit tutulmuştur. Süpernatant santrifüjleme (2480 x g, 10 dk, 4 ºC) ile ayrılmış ve kalıntılar aynı koşullar altında iki kez tekrar ekstrakte edilmiştir. Çözücü, vakum altında (40 °C, 70 mmHg) döner buharlaştırıcı (Buchi-R-210, Essen, Almanya) ile uzaklaştırılmış (Kamiloğlu vd., 2013), kalan ekstrakt suda tekrar çözülmüş ve dondurularak kurutulmuştur (Christ, Epsilon 2-10D, Almanya). Kurutulmuş KE bir sonraki kullanıma kadar -20 °C'de saklanmıştır. Nihai ekstraksiyon verimi %9.40±0.61 (a/a) olarak belirlenmiştir.

3.2.1.1 Karadut Ekstraktının Toplam Fenolik ve Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi

Karadut ekstraktının toplam fenolik içeriği (TF) Folin-Ciocalteu yöntemine göre ölçülmüştür (Kamiloğlu vd., 2013). Toplam fenolik maddelerin belirlenmesi için, 0.25 mL seyreltilmiş örnek ve 1.25 mL seyreltilmiş (1:10) Folin-Ciocalteau reaktifi vortex cihazıyla karıştırılıp, 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, 1 mL sodyum karbonat çözeltisi (%7.5, a/h) eklenip karıştırılmıştır. Örnekler 30 dakika boyunca karanlıkta bırakılmış ve absorbans 720 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar mg gallik asit (GAE)/100 g olarak ifade edilmiştir.

Karadut ekstraktının toplam antosiyanin miktarı (TA) pH diferansiyel yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Gültekin-Özgüven vd., 2016). Örnekler potasyum klorür tamponu pH 1.0 (25 mM) ve sodyum asetat tamponu pH 4.5 (0.4 M) ile seyreltilmiştir. Absorbans 520 ve 700 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve mg siyanidin-3-glukozit (S3G)/g olarak ifade edilmiştir.

Antosiyanin miktarı (mg/L) = (A.MW.DF.1000)/(ε.1)

A; ABS (ApH1.0 - ApH4.5), MW; moleküler ağırlık (449.2 g/mol C3G), DF; seyreltme faktörü, ε; molar absorpsiyon katsayısı (26900 L/mol.cm)

3.2.1.2 Karadut Ekstraktının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Karadut ekstraktının antioksidan aktivitesi, ABTS ve DPPH radikalı süpürme aktiviteleri belirlenerek değerlendirilmiştir. ABTS radikali süpürme aktivitesi, Kamiloglu vd. (2013) tarafından tarif edilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 2.45 mM potasyum persülfat ve 7 mM ABTS içeren ABTS stok çözeltisi hazırlanmış ve karanlık bir yerde oda sıcaklığında 12 saat bekletilmiştir. Bu şekilde $ABTS^{+}$ radikallerinin oluşması sağlanmıştır. $ABTS^{+}$ radikal çözeltisi 734 nm'de 0.700 ± 0.02 absorbans değeri elde etmek için distile su ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş ABTS radikal çözeltisi 2 mL'lik bir mikro küvete yerleştirilmiş ve çeşitli KE konsantrasyonlarında (5-0.625 mg/mL) 100 µL örnekle karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltiler 30 °C'de karanlık bir yerde 6 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans spektrofotometre ile 734 nm'de ölçülmüş ve sonuçlar mg Trolox eşdeğeri (TE) /g KE olarak ifade edilmiştir. Kalibrasyon grafiği 0.02-0.20 mg Trolox /mL aralığında çizilmiştir.

DPPH radikal süpürme aktivitesi, Karadağ vd. (2020) tarafından kullanılan metoda göre belirlenmiştir. Kısaca, 100 µL örnek çözeltisi 490 µL 0.1 mM DPPH çözeltisi ile karıştırılıp, 27 °C'de 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Absorbans spektrofotometre ile 515 nm'de ölçülmüş ve sonuçlar mg TE/g KE olarak verilmiştir. Kalibrasyon grafiği 0.02-0.6 mg Trolox /mL aralığında çizilmiştir.

3.2.1.3 UPLC-ESI-MS/MS ile KE fenoliklerinin tanımlanması ve miktar tayini

KE'de bulunan fenolik bileşiklerin tanımlanması, Çatalkaya vd. (2022) yöntemine göre elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı ile donatılmış bir Waters Xevo TQD üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (Waters Co., Milford, MA, ABD) ile birleştirilmiş bir Waters Acquity UPLC H sınıfı sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma işlemi, Waters Acquity HSS T3 C18 kolonu (2,1 × 100 mm, 1,8 µm) kullanılarak yapılmıştır. 0.22 µm membran filtrelerden süzülen 5 µL numune, 0.6 mL/dak akış hızında formik asit/MQ su (1:1000, h/h; eluent A) ve formik asit/asetonitril (1:1000, h/h; eluent B) kullanılarak sisteme enjekte edilmiştir. Doğrusal gradyan şu şekilde uygulanmıştır: başlangıç, %95 A; 0-6.48 dk, %65 A, doğrusal; 6.48-6.77 dk, %25 A, doğrusal; 6.77-7.06 dk, %65 A, doğrusal; 7.06-7.20 dk, %95 A, doğrusal; 7.20-8.50 dk, %95 A, doğrusal. Kolon ve otomatik örnekleyici sıcaklığı sırasıyla 45°C ve 10°C'de tutulmuştur. Kütle spektrometresi aşağıdaki çalışma koşullarıyla hem pozitif hem de negatif ESI modlarında çalıştırılmıştır: kapiler voltaj, 3,5 kV; iyon kaynağı sıcaklığı, 150 °C; desolvasyon sıcaklığı, 600 °C; desolvasyon gazı akış hızı, 1000 L/sa; ve koni gazı akış hızı, 50 L/sa. Örneklerin spektrumları tam tarama modunda (m/z 100-1000) ve daha sonra artan hassasiyet için çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda kaydedilmiştir. MRM modunda kullanılan koni ve çarpışma voltajları her standart için optimize edilmiştir. Veri toplama için MassLynx 4.1 yazılımı (Waters Co.) kullanılmıştır. KE'nin fenolik bileşikleri moleküler ağırlıklarına (kütle spektrumları) ve MS/MS parçalanmalarına dayanarak tanımlanmıştır. Konsantrasyonları 0.5 ila 20 ppm arasında değişen bir dizi standart çözelti hazırlanmıştır. Fenolik bileşiklerin miktar tayini, fenolik bileşik standartlarının kalibrasyon eğrisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Tespit edilen fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri

Bileşen Adı	Standart Eğri	R^2
Antosiyaninler		
Siyanidin	y= 3530.07 x - 2 288.77	0.999229
Siyanidin 3-5 diglukozit	y= 18197x - 161.278	0.997421
Siyanidin 3-rutinosid	y= 33588x - 5368.67	0.99934
Siyanidin 3-glukozit	y= 12153.1x - 1987.72	0.998110
Pelargonidin	y= 10484.7x + 24.2165	0.997108
Pelargonidin 3-glukozit	y= 4174.6 x - 572.248	0.998901
Flavonoidler		
Kaempferol 3-glukozit	y= 104470 x + 166.512	0.998564
Quercetin 3-glucoside	y= 8214.42x - 286.916	0.998630
Rutin	y= 8515.98x - 419.711	0.998175
Luteolin 7-glukozit	y= 3632.42x + 442.564	0.997115

Tablo 3.2 Tespit edilen fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri (devamı)

Fenolik asitler		
Klorojenik asit	y= 8501.26 x - 644.724	0.999865
Kriptoklorojenik asit	y= 1704.32x + 194.219	0.997803
Protokateşuik asit	y= 7941.13x + 140.377	0.996609
Vanilik asit	y= 693.316 x - 108.404	0.996062

3.2.2 Lipozom Üretimi ve Karakterizasyonu

Lipozomlar, ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Saroglu ve Karadag, 2024) (Şekil 3.1). Soya lesitini (%2, a/h) 15 mL etanolde ve KE ise 3 mL asetat tamponunda (0.25 mol/L, pH 3.5) çözülmüştür. Lesitin ve KE çözeltileri karıştırılıp, 12000 rpm'de (IKA T-18, Staufen, Almanya) 2 dak boyunca homojenize edilmiştir. Daha sonra, etanol vakum altında (40 °C, 70 mmHg) döner buharlaştırıcı (Buchi-R-210, Almanya) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen film 15 mL asetat tamponu içinde süspanse edilip, 12000 rpm'de 5 dk boyunca tekrar homojenize edilmiştir. Daha sonra bir ultrasonic cihaz (UP400S, Hielscher, Almanya) ile 0.5 döngü, %60 genlikte farklı sürelerde (3, 5, 7 ve 10 dak) sonike edilmiştir. Sıcaklık sonikasyon boyunca soğuk su sirkülasyonu ile 25 °C'de tutulmuştur. Boş lipozomlar üretilirken, KE yerine asetat tamponu kullanılmıştır. Lipozomal dispersiyonlardaki nihai lesitin konsantrasyonu %2 (a/h) olarak sabitlenmiş, KE yüklemesi %0.2 ila %1 (a/h) arasında değiştirilmiştir. Z-ortalama partikül çapı, zeta (ζ) potansiyeli ve polidispersite indeksi (PDI) dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi (Nano ZS, Malvern, Worcestershire, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Çoklu saçılma etkilerini önlemek için lipozomlar 1000 kat seyreltilmiş ve 25°C'de taze olarak hazırlanan lipozomlar üzerinde dokuz ölçüm yapılmıştır.

3.2.2.1 KE Yüklü Lipozomların Enkapsülasyon Verimliliği (%EE)

Enkapsülasyon verimliliğini (%EE) belirlemek için, serbest KE, Amicon® ultra-santifüj filtresi (50 kDa) kullanılıp 4 °C'de 4000 × g'de 40 dakika santrifüj edilerek lipozomlardan ayrılmıştır (Karakas vd., 2023; Saroglu ve Karadag, 2024). KE, asetat tamponunda (0.25 mol/L, pH 3.5), 0.125 ile 2 mg/mL arasında çözündürülüp, absorbans 510 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi (y = 0.3779x + 0.0051, R^2>0.99, x ve y, sırasıyla KE konsantrasyonu ve absorbans) KE miktarını belirlemek için kullanılmıştır (Gibis vd., 2014). 1 mL lipozom, filtrenin üst kısmına eklenmiş ve serbest KE, permeat (alt kısım) olarak filtrelenmiştir. KE yüklü lipozomlar ise retentat fazında (üst kısım) kalmıştır. Alt faz (serbest KE) uygun şekilde seyreltilerek, EE% hesaplamak için 510 nm'de absorbans ölçülürken, retentat fazı lipozomları parçalamak için %0.15 (a/h) Triton X-100 (1:3, h/h) ile karıştırılmış, lesitini çöktürmek için 4°C'de 4000 × g'de 30 dak santrifüj edilip, seyreltilmiş süpernatantın absorbansı ölçülmüştür. Boş lipozom (KE içermeyen) spektofotometrik ölçümler için kör olarak benzer şekilde işlenmiştir. Sonuçlar, permeat içindeki serbest KE miktarına göre hesaplanmış, fakat değerler aynı zamanda retentat ile de doğrulanmıştır.

$$EE\% = \frac{Başlangıçta\ yüklenen\ KE\ miktarı - \ Serbest\ KE\ miktarı}{Başlangıçta\ yüklenen\ KE\ miktarı}\ x\ 100$$

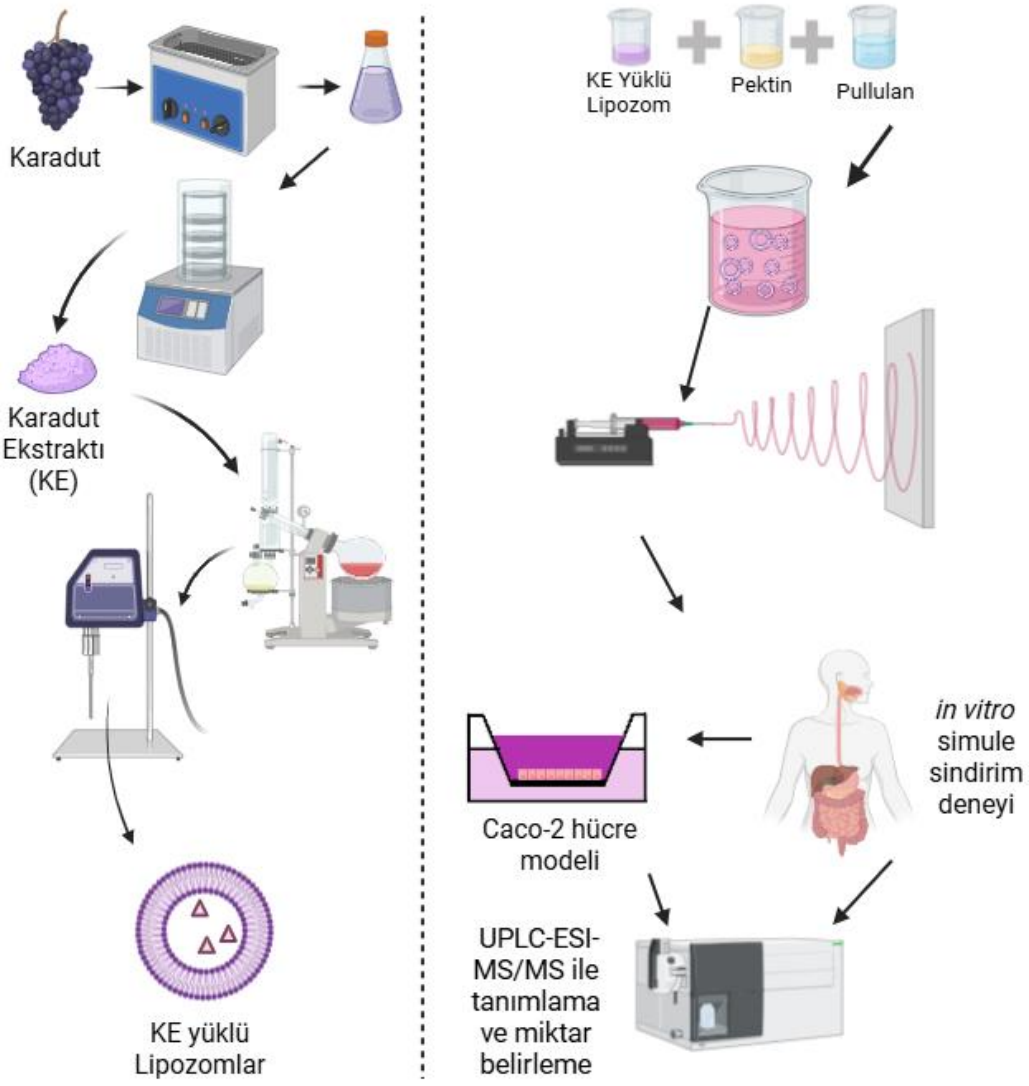
3.2.2.2 Lipozomların Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntülemesi

Lipozomların TEM analizi, negatif boyama tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, bir miktar lipozomal çözelti karbon kaplı bakır gridlere (200 mesh) konularak, oda sıcaklığında tamamen sabitlenmesi için bekletilmiştir. Daha sonra gridler, %2'lik (a/h) uranyum asetat çözeltisi ile negatif boyanıp, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Lipozom yapısının görüntüsü, dijital kamerayla donatılmış 100 kV hızlandırma voltajında TEM (Hitachi HT7800, Tokyo, Japonya) ile çekilmiştir (Karakas vd., 2023).

3.2.3 Elektrospinleme ile Tek Eksenli Lipozomal Nanoliflerin Üretilmesi

Tek eksenli nanolif üretimi için, PUL (22%, a/h) ve PEK (3%, a/h) stok çözeltileri ayrı ayrı bir gece boyunca asetat tamponunda (0.25 mol/L, pH 3.5) çözündürülmüştür. Daha sonra, iki polimerik çözelti 80:20 (h/h) oranında

karıştırılmıştır. Lipozom yüklü nanolifleri üretmek için, boş ve KE yüklü lipozomlar PUL/PEK karışımına (15:85, h/h) eklenmiştir. Serbest KE yüklü nanolifleri üretmek için, belirlenen miktardaki KE (lipozomal lifte yüklü miktara karşılık gelen) asetat tamponunda çözülerek PUL/PEK çözeltisi ile karıştırılmıştır. Elektrospinning işlemi, elektrospinning cihazında (HO-NFES-0434, Holmarc Opto Mechatronics, Hindistan) gerçekleştirilmiştir. İşlem parametreleri 15.5 kV voltaj, 0.6 mL/saat akış hızı, iğne ile lif toplayıcı arasında 9 cm mesafe ve 5 mA akım olarak belirlenmiştir. Tüm deneyler, odanın sıcaklığında (25 °C) ve kabin içerisinde %50 bağıl nemde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 KE enkapsülasyonu ve analizleri

3.2.4 SEM ve Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM) ile Nanoliflerin Morfolojik Analizi

SEM analizi için tüm örnekler, 40 mA akım yoğunluğunda vakum altında altın platin ile ince bir şekilde kaplanmıştır (Agar Manual Sputter Coater B7340, Agar Scientific, Stansted, İngiltere) ve liflerin morfolojisi, 6.5 mm mesafede ve 10 kV hızlandırma voltajında düşük vakum altında SEM (FEI Quanta 450 FEG, Graz, Avusturya) ile analiz edilmiştir. Ortalama lif çapı (SEM görüntülerinde en az 100 lif) Image J yazılımı (National Institutes of Health) kullanılarak analiz edilmiştir. CLSM analizi için, Zeiss Zen Yazılımı (2012 SP1 siyah edisyon) ile kontrol edilen bir konfokal lazer mikroskobunda (Zeiss LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) lif görüntülemesi yapılmıştır. Lipozomlar, yağda çözünebilen bir boya olan Nil kırmızısıyla, karbonhidrat-polimerler ise Fast yeşil ile boyanmışıtır. Nil kırmızısı ve Fast yeşil boyaları belirli bir miktar etanolde çözülerek, nanoliflerin üretiminden önce lipozom ve polimerlerin karışımına eklenmiştir (Karakas vd., 2023).

3.2.5 Nanoliflerin FT-IR ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik (DSC) Analizi

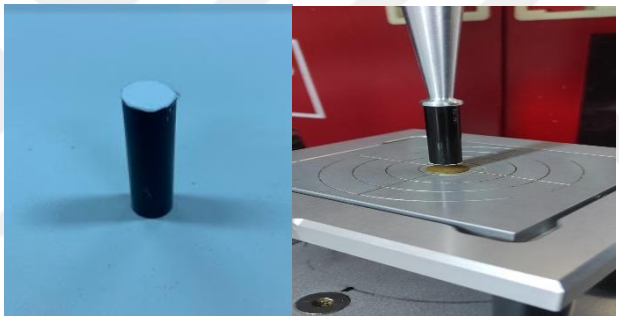
Liflerin kızılötesi spektrumları bir FT-IR spektrofotometresi (ATR-FT-IR; Bruker Tensor 27, Karlsruhe, Almanya) ile elde edilmiştir. Spektrumlar, 4000–500 cm^{-1} dalga boyu aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte absorpsiyon modunda kaydedilmiştir. Nanoliflerin termal özellikleri ise, DSC (SDT Q600, TA, New Castle, DE) ile analiz edilmiştr. Her bir örnek (5-8 mg), alüminyum kaplara hassas bir şekilde tartılıp hermetik olarak kapıtılmış, 20-300°C arasında 20°C/dak hızında 20 mL/dak nitrojen gazı akışı altında analiz edilmiştir.

3.2.6 Nanoliflerin Mekanik Özellikleri

Liflerin mekanik mukavemetleri bir Tekstür cihazı (Stable Micro System, TA-XT2 Plus, UK) ve 5 kg'lik yük hücresi kullanılarak ölçülmüştür. Lifler 1 mm kalınlığında şeritler halinde (60 mm × 10 mm) kesilip, oda sıcaklığında test edilmiştir. Ortalama değer, her bir örnek üzerinde yapılan en az altı ölçümden hesaplanmıştır (Karakas vd., 2023).

3.2.7 Nanoliflerin *in vitro* ve *ex vivo* Mukoadhesif Özellikleri

Liflerin *in vitro* mukoadhezyonu, 5 kg'lık yük hücresine sahip bir Tekstür cihazıyla (Stable Micro System, TA-XT2 Plus, UK), müsin (Tip 2, M2378, Sigma-Aldrich) diskleri substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir (Prezotti vd., 2020). Müsin diskleri, 30 saniye boyunca 10 tonluk hidrolik basınç uygulanarak hazırlanmıştır. Lifler P/10 probuna (10 mm) yapıştırılırken, müsin diskleri metalik tutucuya çift taraflı yapışkan bantla sabitlenmiştir (Şekil 3.2). Müsin diskleri analizden hemen önce 60 saniye boyunca 0.1 M PBS (pH = 7.4) ile nemlendirilmiş, fazla çözelti emici bir kağıtla uzaklaştırılmıştır. Nanoliflerin tutturulduığu prob, diskin yüzeyine 0.5 mm/s hızla ulaşana kadar metal tutucuya doğru alçaltılmış, 5 g kuvvet uygulayarak 100 s boyunca müsin disk ile temas ettirilmiştir. Daha sonra, probun hızı 0.5 mm/s sabit hızda artırılarak nanolifin müsin diskinden tamamen ayrılması sağlanmıştır.



Şekil 3.2 Nanoliflerin *in vitro* mukoadhezyon ölçümleri (sağ şekil- müsin diske yaklaştırılan nanolif, sol şekil- proba yapıştırılan nanolif)

Nanoliflerin *ex vivo* mukoadhezyon analizi ise, Singh vd. (2021) ve Thirawong vd. (2007) tarafından beliritlen yöntemlerde modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. *Ex vivo* dokusu olarak, kuzu mukozal membranı, yerel bir mezbahada (İstanbul, Türkiye) kesimden hemen sonra hayvanlardan temin edilmiş olup, geviş getirenlerde midenin dördüncü bölümü olan ve gerçek mide olarak işlev gören abomasum bölgesinden elde edilmiştir (Sejrsen vd., 2006). Dokular, sindirilmemiş yiyecekleri çıkarmak için fosfat tamponu (pH=7.4) ile yıkanmış, yaklaşık 2.5 x 2.5 cm boyutlarında parçalar halinde kesilmiştir. TA-XT/Plus tekstür cihazı ve mukoadhezyon test düzeneği, nanoliflerin mukoadhezyon işini ölçmek için kullanılmıştır (Şekil 3.3). Analizden hemen önce, dokular 37 °C'de 15 dakika süreyle enzim içermeyen simüle bağırsak sıvısında (pH = 7) bekletilmiştir.

Mukozal membranlar, mukoadhezyon test düzeneğinin doku tutucusuna sabitlenmiş, cihazın sıcaklığı su sirkülasyonu ile 37°C'de sabit tutulmuştur. Nanolifler çift taraflı bant ile P/10 probuna (10 mm) yapıştırılmış, membranın yüzeyine değene kadar sabit bir hızda 0.5 mm/s hızla aşağıya indirilmiştir. Lif ve membrane 5 g'lik bir temas kuvvetiyle 120 saniye boyunca temas ettirilmiş ardından lifin tamamen ayrılmasını sağlamak için prob 0.5 mm/s sabit hızda kaldırılmştır. *In vitro* ve *ex-vivo* mukoadhezyon çalışması (g.mm) (kuvvet-yer değiştirme eğrisi altındaki alan), yerleşik yazılım (Exponent 32, Stable Micro Systems, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3 Nanoliflerin *ex vivo* mukoadhezyon ölçümleri (sol şekil- mukoadhesyon test düzeneğine sabitlenmiş mukozal membrane, sağ şekil- mukozal membrane yaklaştırılan nanolif)

3.2.8 Tek Eksenli KE Yüklü Lipozomal Nanolifler için Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık Analizleri

3.2.8.1 *in vitro* Simule Sindirim Koşullarında KE ve KE Yüklü Nanoliflerin Biyoerişilebilirliğinin Belirlenmesi

In vitro simüle sindirim deneyi, Minekus vd. (2014) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Simüle tükürük sıvısı (SSF), simüle mide sıvısı (SGF) ve simüle bağırsak sıvısı (SIF) hazırlanmıştır (Tablo 3.3). 0.25 g lif (KE ve liposomal KE yüklü lifler) ve 1 mg KE, 1 mL suda çözündürülmüştür, bir test tüpünde SSF ile karıştırılmış (1:1, h/h), α-amilaz (75 U/mL) ve $CaCl_2$ (0.75 mM) eklenip, karışım 37°C'de 2 dakika boyunca bir karıştırıcılı su banyosunda tutulmuştur (pH 7). Ağız ortamı karışımı daha sonra SGF (1:1, h/h), CaCl2 (0.075 mM) ve pepsin (2000 U/mL) ile seyreltilerek 37 °C'de, 100 rpm'de (pH 3) 2 saat inkübe edilmiştir. Mide ortamı karışımı, SIF (1:1, h/h), $CaCl_2$ (0.075 mM), pankreatin (100 U/mL) ve taze

safra (10 mM) ile seyreltilmiş, 37 °C, 100 rpm'de (pH 7) 2 saat inkübe edilmiştir. Hem mide hem de bağırsak sindiriminden sonra toplanan örnek tüpleri 4 °C'de 1075 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiş, 0.22 μm filtreden geçirilen süpernatantlar hızlıca sıvı nitrojenle dondurulup, dondurularak kurutulmuştur. Numunesiz ancak tüm sindirim sıvılarını içeren boş test tüpleri de analize tabi tutulmuştur. Liyofilize edilmiş mide ve bağırsak fazlarının süpernatantları, %0.1 HCl (h/h) ile asitlendirilmiş %80'lik sulu metanolde çözündürülüp, UPLC-ESI-MS/MS ile miktar tespiti yapılmıştır. Biyoerişilebilirlik (BE%), mide ve bağırsak fazından geri kazanılan bileşiğin konsantrasyonunun, sindirilmemiş örnekten geri kazanılan bileşiğin başlangıç konsantrasyonuna oranı olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.3 In vitro gastrointestinal sindirim deneyi için kullanlan sindirim sıvıları

Tuz	Konsantrasyon (mol/L)	Simüle tükürük sıvısı (SSF, mL)	Simüle mide sıvısı (SGF, mL)	Simüle bağırsak sıvısı (SIF, mL)
KCl	0.5	15.1	6.9	6.8
KH_2PO_4	0.5	3.7	0.9	0.8
$NaHCO_3$	1	6.8	12.5	42.5
NaCl	2	-	11.8	9.6
$MgCl_2(H_2O)_6$	0.15	0.5	0.4	1.1
$(NH4)_2CO_3$	0.15	0.06	0.5	-
HCl	6	0.09	1.3	0.7

*Tüm sindirim sıvıları distile su ile 400 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.8.2 *in vitro* Biyoyararlınımın Belirlenmesi için Sitotoksisitenin Ölçülmesi

CaCo-2 hücreleri, 75 cm^2'lik hücre büyütme kaplarında (T-75), %15 FBS, %1 esansiyel olmayan amino asitler, %1 sodyum piruvat ve %1 penisilin-streptomisin çözeltileri içeren hücre besiyerinde büyütülmüştür. Tüm bakım çalışmaları, farklılaşma ve deneysel dönemler 37 °C ve %5 CO_2 içeren bir inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler boyunca hücre pasajları 30-40 arasında tutulmıştır. Hücresel biyoyararlanınım çalışmalarında örnekleri test etmeden önce, CaCo-2 hücrelerine uygulanabilecek maksimum konsantrasyonları belirlemek için bir sitotoksisite testi yapılmıştır. Hücreler, 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 4000 hücre yoğunluğunda ve 100 µL hacminde ekilerek, kuyucuk yüzeyini kaplamak için genel amaçlı ortamda inkübe edilmiştir. Hücre besiyerleri her gün değiştirilerek 21 günlük konfluans süresi boyunca sürdürülmüş ve sitotoksisite testi yapılmıştır. Dondurularak kurutulmuş bağırsak sindirimine maruz bırakılmış örneklerin, stok çözeltilerini (EKS400; ekstrakt, SL400; serbest KE içeren nanolif, LP400; lipozomal KE içeren nanolif) hazırlamak için aynı hacimde hücre ortamında çözülmüş ve 1.3 ve 2 kat (EKS/SL/LP300 ve EKS/SL/LP200) seyreltilmiştir. Diferansiyel CaCo-2 hücreleri daha sonra bu çözeltilere 3 saat boyunca maruz bırakılmış ve inkübasyon süresinin sonunda (4 saat), medya içeren örnek 100 µL taze EBSS ve 10 µL 5 mg/mL MTT reaktanı ile değiştirilmiştir. Formazan kristal oluşumunun görsel onayının ardından, hücre kültürü medyası kristallere dokunmadan çıkarılmış, 100 µL dimetil sülfoksit içinde eritilmiştir. Absorbanslar 570 nm'de kaydedilmiş ve sonuçlar, %100 canlılık varsayılarak tedavi edilmemiş kontrol kuyucuklarına normalize edilmişitir (Morgan, 1998). Ayrıca, olası toksik etkiler ve ayrılmalar sürekli olarak bir mikroskop altında izlenmiştir.

3.2.8.3 Caco-2 Hücreleri ile Biyoyararlınımın Belirlenmesi

Örneklerin *in vitro* biyoyararlanımının değerlendirilmesi için iki bölmeli hücre membran sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.1). Sistemin üst kısmı olan apikal kısım bağırsak boşluğunu, alt kısmı olan bazolateral kısım ise emilim gerçekleştikten sonra bileşenlerin nakledildiği kan dolaşımını temsil etmektedir. Hücreler, 6-well insert membranlarda 4.17 x 10^5 hücre/kuvvet yoğunluğunda ekilmiş, 21 gün boyunca büyütülüp, farklılaştırılmıştır. Analizden önce, hücrelerin membranlardaki bütünlükleri, transepiteliyal elektrik direnci (TEER) (World Precision Instruments, FL, ABD) değerleri ölçülerek saptanmıştır. TEER değerleri 250 $\Omega \cdot cm^2$'nin

üzerindeyse, bu minimum kabul edilen değer olduğundan (Alvarez-Hernandez vd., 1991) biyoyararlanım denemesinde kullanılmıştır. Hücre bütünlüğü onaylandıktan sonra, örnekler EBSS ortamında iki bölmeli hücre kültürü sisteminin apikal tarafına verilmiştir. Ayrıca, her bir membranın TEER değerleri de tedavi süresinin sonunda kontrol edilmiştir. Fenoliklerin hücresel salınımı (efflux), UPLC-ESI-MS/MS ile apikal ve bazolateral tarafta tespit edilen miktarına göre hesaplanmış olup, belirlenen bileşiklerin biyoyararlanımı olarak verilmiştir.

3.3 Glutenin Hidrolizatının Enkapsülasyonu

3.3.1 Glutenin hidrolizatının (GH) Eldesi ve Karakterizasyonu

Gluten, AACC Yöntemi No. (38-10) (AACC International, 2010) belirtildiği gibi buğday unundan elde edilmiştir. Hamur, 1 kg un kullanılarak hazırlanmış, ardından nişasta ve suda çözünebilen proteinleri uzaklaştırmak için su ile yıkanmıştır. Daha sonra, etanol ile çözünebilen gliadin ve glutenin %70 etanol (h/h) ile 24 saat boyunca kapsamlı bir şekilde yıkanmış, 4 °C'de 9000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tortular glutenin fraksiyonu olarak toplanıp (Bozkurt vd., 2021), etanolü uzaklaştırmak için 3 gün boyunca 45 °C'de bir etüvde tutulmuştur. Kurutulmuş buğday glutenin fraksiyonu -20 °C'de saklanmıştır.

Buğday glutenini Flavourzyme ile hidrolize edilmiştir. Öncelikle, %5 (a/h) glutenin dispersiyonu, %0.02 (a/h) sodyum azid içeren 10 mM fosfat tamponunda (pH 7) hazırlanmıştır. Enzim ile substrat oranı %1 (a/h) olarak sabitlenmiştir. Hidroliz, pH 7'de 50 °C'de 4 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Enzim, 90 °C'de 10 dakika ısıtılarak hızla inaktive edilmiştir. Süpernatant, 4 °C'de 15 dakika boyunca 9000 rpm'de santrifüj ile geri kazanılmıştır (Bozkurt vd., 2021). Son olarak, süpernatant, membran filtrasyon ünitesi kullanılarak 5 kDa MWCO membranından filtrelenmiştir. Glutenin hidrolizatı (GH) <5 kDa içeren permeat dondurularak kurutulup, 4 °C'de bir desikatörde saklanmıştır.

3.3.1.1 Glutenin Hidrolizatınn Hidroliz Derecesinin (HD) Belirlenmesi

Elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesi (HD) pH-stat yöntemi ile belirlenmiştir (Adler-Nissen, 1986). pH-Stat yöntemi, reaksiyon sırasında açığa çıkan veya tüketilen hidrojen iyonlarına bağlı olarak değişen pH değerini sabit tutmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle hidroliz reaksiyonu sırasında açığa çıkan

protonların otomatik titrasyonu sırasında ortama eklenen baz miktarı ölçülerek hidroliz derecesi belirlenir. Hidroliz derecesi, parçalanmış peptit bağlarının (h) birim ağırlık başına toplam bağ sayısına (htot) oranı olarak tanımlanır. Hidroliz derecesini hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanılmıştır;

%HD = B x Nb/(Mp x a x htot) x 100 B= Harcanan baz miktarı (mL), Nb=Bazın normalitesi (N), a= α- NH2 gruplarının ortalama ayrışma derecesi, Mp= Protein miktarı (g), htot= Toplam peptit bağları (meqv/g protein)

3.3.1.2 Glutenin Hidrolizatının Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

FRAP analizi, Benzie ve Strain (1996) tarafından gerçekleştirilen metoda bazı modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. FRAP reaktifi, 25 mL 300 mM asetat tamponu (pH 3.6), 40 mM HCl içinde 2.5 mL 10 mM TPTZ çözeltisi ve 2.5 mL 20 mM $FeCl_3$-$6H_2O$ çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. 25 mg ve 50 mg hidrolizat, 10'ar mL fosfat buffer (pH 7.0) içinde ayrı ayrı çözülmüştür. Elde edilen çözeltilerden 1 ml alınarak karışıma 2 mL taze FRAP reaktifi eklenmiştir. Daha sonra çözelti 37 °C'de 15 dak su banyosunda inkübe edilmiştir. Her örneğin absorbansı 593 nm'de belirlenmiştir. Sonuçlar, askorbik asit eşdeğeri (AAE) µM/mL olarak ifade edilmiştir

Hidrolizatların serbest radikal temizleme kapasitesi, Vásquez-Villanueva vd. (2016) tarafından gerçekleştirilen stabil 2,2′- azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit radikali ($ABTS^+$) kullanılarak belirlenmiştir. 2.45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM ABTS solüsyonu hazırlandıktan sonra, bu solüsyon 12-16 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. ABTS radikal çözeltisi 734 nm'de 0.700 ± 0.02 absorbans değeri elde edebilmek için distile su ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş ABTS radikal çözeltisi 2 mL'lik bir mikro küvete alınıp çeşitli konsantrasyonlarda (500-1500 µg/ml) 100 µL hidrolizat numunesi ilave edildikten sonra karanlık bir etüvde 30 °C'de 6 dak. inkübe edilmiştir. Her numunenin absorbansı 734 nm'de ölçülmüş olup, $ABTS^+$ radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki denklem kullanılarak yüzde inhibisyon olarak hesaplanmıştır;

$$\%Inhibisyon = \frac{(Ac - As)}{Ac}\ x\ 100$$

Ac; Kontrolün absorbansı; As; Hidrolizatın absorbansı

3.3.2 Lipozom Üretimi ve Karakterizasyonu

Lipozomlar, ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Sarabandi vd., 2019). İlk olarak, soya lesitini (L) (%2, a/h) ve farklı oranlarda karıştırılmış fitosterol (F) (L:F, 1:0.10, 1:0.25, 1:0.50, 1:0.75, a/a) 10 mL etanolde çözündürülmüştür. Etanol daha sonra vakum altında (40 °C, 70 mmHg) bir döner buharlaştırıcı (Buchi-R-210, Almanya) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Kurumuş filmler, iz miktarda kalan etanolun tamamen uzaklaştırılması için, oda sıcaklığında 12 saat boyunca bir desikatörde saklanmıştır. Farklı GH konsantrasyonları (5, 7.5 ve 10 mg/mL) fosfat tamponunda (10 mM, pH 7) hazırlanarak lesitin filmlerini çözdürmek için kullanılmıştır. Karışım, 60 °C'de 30 dakika boyunca bir su banyosunda ısıtılıp, 10 adımlı bir sonikasyon işlemine maruz bırakılmıştır (1 dakika açık- 1 dakika kapalı, UP400S, Hielscher, Teltow, Almanya, %60 genlik, 0.5 döngü, 25 °C).

Z-ortalama parçacık çapı, zeta potansiyeli (ζ) değeri ve lipozomların polidispersite indeksi (PDI), dinamik ışık saçılması (DLS) analizi (Nano ZS, Malvern, Worcestershire, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Yeni hazırlanmış örnekler, çoklu saçılma etkilerini önlemek için 1000 kat seyreltilmiş ve her örnek için 25°C'de en az dokuz ölçüm yapılmıştır.

3.3.3 GH Yüklü Lipozomların Enkapsülasyon Verimliliği (%EE)

Enkapsülasyon verimliliği (EE), Sepúlveda vd. (2021) tarafından uygulanan yönteme göre belirlenmiştir. Kapsüllenmemiş GH, 50 kDa santrifüj filtre cihazı (Amicon® Ultra-15) kullanılarak filtrasyon ve 4 °C'de 20 dakika boyunca 5000 x g'de santrifüjleme yoluyla lipozomlardan ayrılmıştır. Membrandan geçen kapsüllenmemiş GH ve başlangıçta eklenen GH protein içeriği, BCA Protein Test Kiti (Thermofisher) kullanılarak ölçülmüştür (Li vd., 2015). Bunun için 25 µL örnek, 200 µL reaktifle karıştırılmış, 37 °C'de 30 dakika boyunca bekletilmiş, 10 dak. boyunca oda sıcaklığına geri soğutulup, 562 nm'de bir mikroplaka okuyucu yardımıyla sonuçlar belirlenmiştir. Boş lipozomlara aynı işlem uygulanarak mikroplaka okuyucu ölçümleri için kör olarak kullanılmıştır. Protein miktarı, liyofilize hidrolizattan hazırlanan standart bir eğri kullanılarak kalibre edilmiştir. GH (0.1 ila 3 mg/mL) fosfat tamponda (10 mM, pH 7) çözülerek kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılmıştır. ($y = 0.2544x + 0.1994$; $R^2 = 0.999$, x ve y sırasıyla

GH konsantrasyonu ve absorbansı ifade etmektedir). Enkapsülasyon verimliliği aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır;

$$\%EE = \frac{Başlangıçta\ yüklenen\ GH\ protein\ miktarı - Serbest\ GH\ protein\ miktarı}{Başlangıçta\ yüklenen\ GH\ protein\ miktarı}\ x\ 100$$

3.3.4 Lipozomların TEM ile Görüntülenmesi

Lipozomların yapısı, negatif boyama (2% uranyum asetat) tekniği ile transmisyon elektron mikroskobu (TEM) (Hitachi HT7800, Tokyo, Japonya) kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.3.5 Elektrospinleme ile Tek ve Çift Eksenli Lipozomal Nanoliflerin Üretilmesi

PUL (%25, a/h) ve CMC (%3, a/h) stok çözeltileri fosfat tamponunda (10 mM, pH 7) bir gece boyunca çözündürülerek hazırlanmıştır. Daha sonra stok çözeltiler, 80:20 oranında (PUL:CMC, h/h) karıştırılmıştır. Tek eksenli nanoliflerde, PUL/CMC karışımına 10:90 (h/h) oranında lipozom solüsyonları (boş veya GH yüklü) eklenmiştir. Boş tek eksenli ve sadece GH yüklü lifler için, polimer karışımı aynı oranda GH çözeltisi veya fosfat tamponu ile karıştırılmıştır. Tek eksenli lif üretimi için elektrospinleme (HO-NFES-0434, Hindistan) parametreleri 15.8 kV voltaj, 5 mA akım, 25 °C, %50 RH'de 0.35 mL/saat besleme çözeltisi akış hızı ve iğne ile lif toplayıcı arasındaki mesafe 10 cm olarak belirlenmiştir.

Çift eksenli liflerde, çekirdek çözeltisi için PUL (%25, a/h) ve lipozom (boş veya GH yüklü) 85:15 (h/h) oranında karıştırılmıştır. Kabuk çözeltisi ise, 80:20 (h/h) oranından karıştırılmış, PUL (%25, a/h) ve CMC (%3, a/h) polimer çözeltilerinden oluşmuştur. Lipozomsuz çekirdek çözeltisi olarak, yalnızca PUL (%25, a/h) ve GH veya fosfat tampon (85:15, h/h) kullanılmıştır. Çift eksenli nanolif üretimi için işlem parametreleri 18.8 kV voltaj, 5 mA akım, dış enjektörden 0.30 mL/saat akış hızı, iç enjektörden 0.05 mL/saat akış hızı ve iğne ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe 12 cm olarak belirlenmiştir. Liflerin kısaltmaları Tablo 3.4'te aktarılmıştır.

Tablo 3.4 Liflerin kısaltmaları

Elektroeğirme Yöntemi	Yüklenen Bileşen	Kısaltma
Tek Eksenli	GH yüklü Lipozom	T-GHL
	Boş Lipozom	T-BL
	Sadece GH	T-GH
	pH 7 Fosfat Tamponu	T-B
Çift Eksenli	GH yüklü Lipozom	Ç-GHL
	Boş Lipozom	Ç-BL
	Sadece GH	Ç-GH
	pH 7 Fosfat Tamponu	Ç-B

3.3.6 GH Yüklü Liflerin Yükleme Kapasitesi (%YK)

100 mg lipozomal GH ve boş lipozomlar yüklenmiş lifler, bir gece boyunca 1 mL fosfat tamponunda (10 mM, pH 7) çözündürülmüştür. Çözelti daha sonra lipozom yapısını bozmak için %0.5 sulu Triton X-100 (a/h) ile 1:1 (h/h) oranında karıştırılmıştır (Park vd., 2011). Öncelikle yaklaşık 25 °C'de 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuş, ardından oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiş ve 4 °C'de 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, 0.45 µm enjektör filtresinden süzülmüştür. Süpernatandaki GH miktarı, daha önce açıklandığı gibi (3.3.3) BCA Protein Assay Kiti ile belirlenmiştir. EE (%) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\%YK = \frac{Liflerde\ ölçülen\ GH\ miktarı}{Liflerde\ bulunan\ teorik\ GH\ miktarı} x\ 100$$

3.3.7 SEM ve Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM) ile Nanoliflerin Morfolojik Analizi

Elde edilen nanoliflerin, SEM ve CLSM ile morfolojik özellikleri belirlenmiştir (Li vd., 2014b). Elektroeğirme işlemi sırasında lipozomların stabil kaldığını lazer taramalı konfokal mikroskopi (CLSM) kullanılarak görüntülemek amacıyla lipozomlar nile kırmızısı, biyopolimerler ise fast yeşiliyle boyanmıştır. Konfokal mikroskop kullanılarak görüntüleme işlemleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi bünyesinde hizmet veren ARUM'da Zeiss Zen Software (2012 SP1 black edition) tarafından kontrol edilen bir Zeiss LSM 780 konfokal (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.8 Nanoliflerin DSC ve Termogravimetrik Analizleri

Nanoliflerin termal özellikleri, diferansiyel taramalı kalorimetrik analizler (DSC) ve termal gravimetrik analizler (TGA) kullanılarak belirlenmiştr. Nitrojen gazı akışı altında DSC (SDT Q600, TA Instruments, New Castle, ABD) kullanılarak yaklaşık olarak 5-8 mg nanolif ve bileşenleri, 25 °C'ye getirildikten sonra 20 °C/dk'lık bir tarama hızında 300 °C'ye ısıtılmıştır. TGA analizleri ise, Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez laboratuvarında nitrojen atmosferi (50 mL/dak) altında bir termogravimetrik analiz cihazı tarafından gerçekleştirilmiştir olup, yaklaşık 5-10 mg numune, 10 °C/dakikalık bir ısıtma hızıyla 30 °C'den 300 °C'ye ısıtılmıştır (Shao vd., 2018; Yang vd., 2020).

3.3.9 Nanoliflerin FT-IR Analizleri

Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi, nanoliflerin içerisinde materyallerin kimyasal etkileşimlerinin ve kimyasal kararlılıklarının varlığını belirlemek için kullanılmıştır. FTIR analizi, üretilen bütün liflerde ve sistem içerisinde bulunan bütün bileşenlere 400–4000 cm^{-1} arasında 4 cm^{-1} çözünürlükle FTIR cihazı gerçekleştirilmiştir.

3.3.10 Nanoliflerin *in vitro* ve *ex vivo* Mukoadhesif Özellikleri

Nanoliflerin *in vitro* müsin enzimi kullanılarak mukoadhezyon özellikleri belirlenmiştir (Xu vd., 2014 ve Prezotti vd., 2020). Yöntem 5 kg'lik yük hücresi bulunan TA-XT/Plus (Stable Mycro-Systems) cihazı ile müsin diskleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Müsin diskleri, hidrolik basınç makinesiyle 10 tonluk 30 saniye boyunca bir sıkıştırma uygulanarak domuz midesinden elde edilmiş Tip2 formunda

toz müsinden (M2378, Sigma-Aldrich) oluşturulmuştur. Analizi gerçekleştirilecek nanolifler 3 saatlik atım sonucunda elde edilmiş olup, 10 mm'lik P/10 probuna yapıştırılmıştır. Tekstür analizi cihazının alt tablasına ise çift taraflı bir bant yardımıyla müsin diskler sabitlenmiştir (Şekil 3.2). Müsin diskler analizden hemen önce 60 saniye boyunca 10 mM pH 7 fosfat tamponuyla nemlendirilmiş olup, fazla tampon bir absorbant kağıt yardımıyla alınıp analiz başlatılmıştır. Prob 0.5 mm/s hızla metalik tutucuya doğru indirilip, 100 s süreyle 5 g kuvvet uygulanarak müsin diskiyle temas ettirilmiştir. Süre sonunda 0.5 mm/s hızla prob yukarıya kaldırılmıştır. Mukoadhesyon işi, kuvvet mesafe grafiğinden cihaz yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

ex vivo mukoadhezyon testi ise Kalintas Caglar vd. (2024) tarfından belirlenen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılacak mukozal membranlar koyunların abomasum bölgesinden alındıktan sonra -18°C'ye alınmış ve analizden bir gün önce 4°C buzdolabı sıcaklığında bekletilmiştir. Nanoliflerin mukoadhezyon işinin ölçümü için 5 kg'lik yük hücresi bulunan TA-XT/Plus (Stable Mycro-Systems) analiz cihazı ile Mucoadhesion Test Rig probu kullanılmıştır. Analizden hemen önce 4 °C buzdolabında bekletilen dokular 15 dak. boyunca 37 °C'lik simüle mide sıvısında bekletilmiştir. Analizi gerçekleştirilecek olan lif in vitro müsin yöntemine benzer olarak 3 saatlik atım sonucu elde edilmiş ve çift taraflı bir bant yardımıyla 10 mm'lik P/10 probuna yapıştırılmıştır. Mukozal membran, doku tutucu aparat yardımıyla sabitlenip, platforma yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Daha sonra bu platform, su sirkülasyonu ile 37 °C'de sabit tutulan bağırsak simüle sıvısı içeren bir su banyosunun içerisine yerleştirilmiştir. Analiz yapılacak örnek proba takıldıktan sonra örneği taşıyan probun 0.5 mm/s sabit hızla aşağıya inerek mukozal membrana temas etmesi sağlanmıştır. Temas süresince (120s) 5 g'lik bir kuvvet uygulanmış ve sonrasında prob sabit hızla yukarı çekilmiş ve analiz tamamlanmıştır. Kuvvet-mesafe grafiği cihaz yazılımı sayesinde çizdirilerek mukoadhezyon işi g.mm cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.11 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin *in vitro* simule sindirim koşullarında Stabilitelerinin Belirlenmesi

In vitro simüle sindirim deneyi, Minekus vd. (2014) tarafından belirtilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Simüle tükürük sıvısı (SSF), simüle mide sıvısı (SGF) ve simüle bağırsak sıvısı (SIF) hazırlanmıştır (Tablo 3.3). 0.75 g lif (GH ve lipozomal

GH yüklü lifler) ve serbest GH (3.4 mg) 1 mL suda çözülmüş, bir test tüpünde SSF ile karıştırılmıştır (1:1, h/h), daha sonra α-amilaz (75 U/mL) ve $CaCl_2$ (0.75 mM) eklenmiş, karışım 37°C'de 2 dakika boyunca karıştırıcılı bir su banyosunda tutulmuştur (pH 7). Elde edilen ağız sıvısı daha sonra SGF (1:1, h/h), CaCl2 (0.3 mM) ve pepsin (2000 U/mL) ile seyreltilmiş, 37°C'de, 100 rpm'de (pH 3) 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Mide karışımı, SIF (1:1, h/h), CaCl2 (0.075 mM), pankreatin (100 U/mL) ve taze safra (10 mM) ile seyreltilmiş ve 37°C, 100 rpm'de (pH 7) 2 saat daha inkübe edilmiştir. Boş lifler (boş lipozom yüklü lifler ve boş lifler) sindirim analizine tabi tutulmuş ve aynı şekilde muamele edilip ölçümler için boş olarak kullanılmıştır. Numuneler, sindirimi durdurmak için 10 dakika boyunca 85 °C'de tutulmuştur (Mohammadi vd., 2023). Numuneler santrifüj edilip (9000 rpm, 10 dakika), süpernatantlar dondurularak kurutulmuş, -18 °C'de saklanmıştır. Liyofilize edilmiş örnekler fosfat tamponunda (10 mM, pH 7) çözündürülmüş, sindirilmiş örneklerin antioksidan aktivitesi belirlenmiştir (3.3.1.2). Ayrıca, boyalı lipozomlarla yüklü tek eksenli lifler mide ve bağırsak sindirimine tabi tutulup, lipozomların yapısı konfokal lazer mikroskobu ile gözlemlenmiştir (3.3.7).

3.3.12 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin *in vitro* simule sindirim koşullarında Salım Özelliklerinin Belirlenmesi

Lipozomal GH yüklü tek eksenli, çift eksenli ve GH yüklü tek eksenli liflerin salım özellikleri, sindirim simülasyonu sırasında 30 dakikalık aralıklarla sindirilmiş örneklerden 100 µL toplanıp, sindirim ortamına eşit hacimde taze sindirim sıvısı eklenerek değerlendirilmiştir. Sindirilmiş örnekler, 4 °C'de 10 dakika boyunca 9000 rpm'de santrifüj edilmiş, bir buz banyosunda hızla soğutulmuştur. Süpernatantın GH miktarı BCA protein tayin kiti kullanılarak belirlenmiştir. Daha düşük miktarlardaki GH'yi belirlemek için, kullanım kılavuzunda önerildiği gibi, örnek (25 µL) ve reaktanın (200 µL) karışımı 30 dakika boyunca 45°C'de tutuldu. Kalibrasyon grafiği 0.05-2 mg GH/mL aralığında ($y = 0.0003x - 0.0262$; $R^2 = 0.993$, x ve y sırasıyla GH konsantrasyonu ve absorbans) belirleme için kullanılmıştır. GH'nin kümülatif salınım hızı (%) zamana karşılık aşağıdaki gibi çizilmiştir:

$$Kümülatif\ salım\ (\%) = \frac{Mt}{Mo} * 100$$

M0 ve Mt, sırasıyla GH'nin başlangıç miktarı ve sindirilmiş örnekten salınan GH'nin kümülatif miktarıdır.

3.4 İstatistiksel Analizler

Tüm sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Her bir sistemde yapılacak ilgili deneyler en az 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Örneklerin analiz sonuçları üzerinde anlamlı düzeyde etkili olup olmadığı ikiden fazla gruplar için one-way ANOVA ile, ortalamalar arasındaki farklar ise Tukey testi (SPSS 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD), iki grup olduğunda ise Student's T-test kullanılarak karşılaştırılmıştır. Olasılık $p<0.05$ değerler anlamlı kabul edilmiştir.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Karadut Ekstraktının Enkapsülasyonu

4.1.1 KE'nin Toplam Fenolik, Toplam Antosiyanin ve Antioksidan Aktivitesinin Analizleri

Toplam fenolik (TF), toplam antosiyanin içeriği (TA) ve KE'nin antioksidan kapasiteleri Tablo 4.1'de verilmiştir. KE'nin TF'si 2178.09±93.46 mg GAE/100 g olarak bulunmuş olup, bu değer Memete ve ark. (2023), Huo ve ark. (2023) ve Kamiloglu ve ark. (2013) tarafından yapılan önceki çalışmalarda belirlenen sırasıyla 1460.37, 561.62 ve 1451.40 mg GAE/100 g değerlerinden daha yüksektir. Önceki çalışmalarda karadut ekstraktlarının TA değerlerinin, 1.14 ile 12.21 mg S3G/g arasında değiştiği bildirilmiştir (Huo vd., 2023; Kamiloglu vd., 2013; Kostić vd., 2013). Ekstraktımızın TA'si 2.29±0.03 mg S3G/g olarak saptanmış olup, önceki çalışmalarda bildirilen değerlerle uyumludur. KE'nin DPPH ve ABTS radikal temizleme aktiviteleri ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi ise sırasıyla 54.92±0.99 ve 78.19±3.03 mg TE/g olarak bulunmuştur. Önceki çalışmalarda sonuçlarımızla uyumlu olarak, karadut ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin 3.62 TE mg/g ile 74.75 TE mg/g arasında değiştiği bildirilmiştir (Kamiloglu vd., 2013; Sánchez-Salcedo vd., 2015).

Tablo 4.1 KE fenolik bileşiklerinin toplam fenolik (TF), toplam antosiyanin (TA), ve antioksidan kapasiteleri (DPPH ve ABTS)

	TF mg GAE /100 g	TA mg S3G /g	DPPH mg TE /g	ABTS mg TE /g
	2178.09±93.46	**2.29±0.03**	**54.92±0.99**	**78.19±3.03**
Bileşen Adı	**Alıkonma zamanı (dk)**	**Ana iyon (m/z)**	**MS^2 ana fragmenti (m/z)**	**Miktar (mg/ g)**
Antosiyaninler				
Siyanidin 3-glukozit	2.73	449.4	287	22.19±0.39
Siyanidin	2.55	287.2	137.1/121.1/109.1	17.58±0.25
Siyanidin 3-rutinosid	2.85	595.25	287.2	13.66±0.34
Siyanidin 3-5 diglukozit	2.88	611.3	449.4/287.2	1.45±0.02
Pelargonidin	3.03	271.2	121.2 /93.2	0.46±0.04
Pelargonidin 3-glukozit	3.06	434.4	271.2	0.77±0.02
			Toplam	**56.11**
Flavonoidler				
Luteolin 7-glukozit	2.74	447.1	285.2	4.86±0.08
Rutin	4.47	609.3	300.1	1.31±0.01
Kuersetin 3-glukozit	4.53	463.2	300.1	0.35±0.02
Kaempferol 3-glukozit	2.49	449.3	287	0.13±0.00
			Toplam	**6.65**
Fenolik asitler				
Klorojenik asit	2.83	353.1	191/179.1	0.85±0.00
Kriptoklorojenik asit	2.92	353	191.1/179.1/173.1	0.64±0.03
Protokateşuik asit	1.92	153.05	109	0.04±0.00
			Toplam	**1.53**

TF: Toplam fenolik içeriği; TA: Toplam Antosiyanin içeriği; GAE: Gallik asit eşdeğeri; S3G: Siyanidin 3-glukozit eş değeri; TE: Trolox eşdeğeri.

4.1.2 KE'nin Fenolik Bileşiklerinin UPLC-ESI-MS/MS ile Tanımlanması ve Miktarlarının Belirlenmesi

Karadut ekstraktında on üç farklı fenolik bileşik tespit edilip, miktarları belirlenmiştir (Tablo 4.1). Antosiyaninler, doğrudan renkle ilişkili oldukları ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları için karadut meyvesinin en önemli bileşenlerinden biridir. Çalışmamızda KE'de altı antonsiyanin tanımlanmış ve miktarları ölçülmüştür. En yüksek miktarlarda siyanidin 3-glukozit, siyanidin 3-

rutinozit ve siyanidin tespit edilmiş olup, sırasıyla miktarları 22.19±0.39, 13.66±0.34 ve 17.58±0.25 mg/g olarak belirlenmiştir. Diğer antosiyaninlerin, (siyanidin 3-5 diglukozit, pelargonidin ve pelargonidin 3-glukozit) miktarlarının 0.46±0.04 ile 1.45±0.02 mg/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Benzer olarak, siyanidin türevlerinin baskın antosiyaninler olduğu, pelargonidin türevlerinin ise sınırlı miktarlarda bulunduğu karadut ekstrakt içerikleri bildirilmiştir (Huo vd., 2023; Sánchez-Salcedo vd., 2015; Wang vd., 2022). Çalışmamızda elde edilen karadut ekstraktında bulunan siyanidin 3-glukozit ve siyanidin 3-rutinozit miktarları, Huo vd. (2023) tarafından bildirilenlerden daha düşükken, Kamiloglu vd. (2013) ile Pawlowska vd. (2008) tarafından bildirilen seviyelerden daha yüksek saptanmıştır.

Ekstraktımızda, kantitatif olarak ölçülen toplam fenolik bileşiklerin %87.3'ünü antosiyaninler (56,11 mg/g), %10.3'ünü flavonoidler, %2.4'ünü ise fenolik asitler oluşturmaktadır. Sánchez-Salcedo vd. (2015), İspanya'da yetiştirilen dört farklı karadut cinsinin yalnızca birinde antosiyaninlerin baskın fenolik bileşen olduğunu, diğerlerinde ise benzoik asit türevlerinin içeriğinin öne çıktığını bildirmiştir. Sinnamik asit türevleri, Wang vd. (2022) tarafından 13 farklı Çin dut çeşidinin baskın fenolik bileşeni olarak bildirilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak, Türkiye'de yetiştirilen bir karadut çeşidinin başlıca fenolik bileşenleri, Kamiloglu vd. (2013) tarafından antosiyaninler > flavonoller > fenolik asitler şeklinde rapor edilmiştir.

Ekstraktımızda dört adet flavonoid (rutin ve luteolin, kuersetin ve kampferolün glikozillenmiş formları) tanımlanmış olup miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ana flavonoidler luteolin 7-glukozit ve rutin olarak belirlenmiş olup, sırasıyla miktarları 4.86±0.08 ve 1.31±0.01 mg/g olarak tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda da rutin baskın flavonoid olarak tanımlamıştır (Huo vd., 2023; Kamiloglu vd., 2013; Wang vd., 2022). Kuersetin 3-glukozit ve kaempferol 3-glukozit (Li vd., 2016; Sánchez-Salcedo vd., 2015) ile luteolinin de dutlarda bulunduğu bildirilmiştir (Jin vd., 2015).

KE'de üç adet fenolik asit tespit edilmiş, miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Fenolik asitlerin %85'inden fazlasını klorojenik asit ve kriptoklorojenik asidin oluşturduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar Wang vd. (2022) tarafındanda bildirilmiştir. Fakat, Huo vd. (2023), Çin karadutlarında ana fenolik asitlerin kinik asit, protokateşuik asit ve klorojenik asit olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda saptanan 0.85 mg/g

klorojenik asit miktarına benzer olarak, Sánchez-Salcedo vd. (2015), farklı dut çeşitlerinde klorojenik asit miktarının 0.58 ile 0.81 mg/g arasında değiştiğini gözlemlemiştir. *M. nigra* meyvesinin fenolik bileşimi ve içeriği, ekstraksiyon yöntemi, çeşit, meyvenin olgunluğu ve meyve gelişimi sırasında çevresel koşullar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Kostić vd., 2013).

4.1.3 KE Yüklü ve Boş Lipozomların Karakterizasyonu

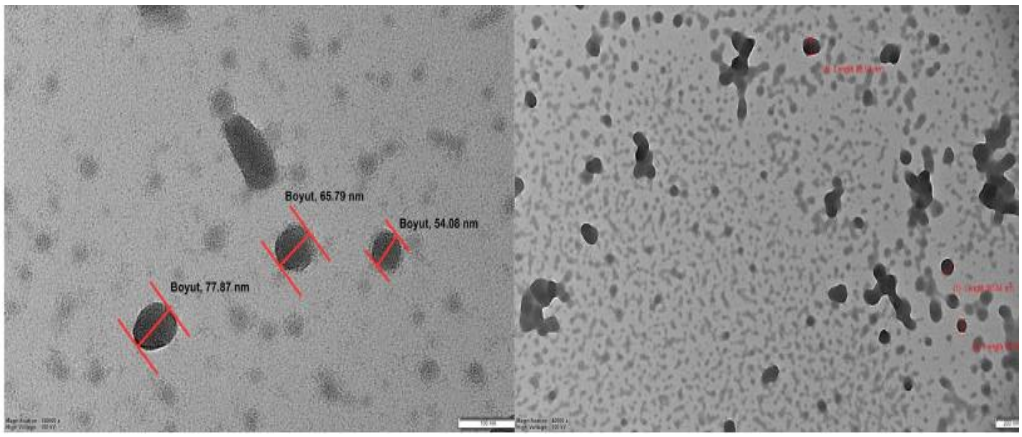
Ultrasonikasyon süresinin lipozomların boyutunu ve %EE değerini etkileyen önemli bir parametre olduğu bilinmektedir; bu nedenle, farklı ultrasonikasyon sürelerinin parçacık boyutu, PDI ve %EE üzerindeki etkisi sabit yükleme konsantrasyonunda (%0.6, a/h) incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir. Ayrıca, belirli bir ultrasonikasyon süresinde (7 dakika) lipozomlara beş farklı KE konsantrasyonu (%0.2 – 1.0, a/h) yüklenmiş olup, sonuçlar Tablo 4.3'te aktarılmıştır. Boş lipozomların parçacık boyutları, ultrasonikasyon süresi 7 dakikaya kadar çıkarıldığında 127.33 nm'den 77.52 nm'ye düşerken, KE yüklü lipozomların boyutu 132.53 nm'den 92.16 nm'ye kadar azalmıştır. Ultrasonikasyon süresi 10 dakikaya çıkarıldığında ise KE yüklü lipozomların boyutu 104.67 nm'ye yükselmiştir (Tablo 4.3). Ultrasonik kavitasyon, şok dalgaları, mikrojetler ve mikro-akışlar oluşturarak agregatları mekanik stres yoluyla etkilemekte (Koshani & Jafari, 2019) ve agregatları daha küçük parçacıklara bölmektedir. Fakat, belirli bir noktadan sonra, aşırı ultrasonikasyonun ısıtma etkisi çarpışma olasılığında ve parçacıklar arası çekimde bir artışa neden olabilmekte, bu da lipozomların yeniden aglomerasyonuna yol açabilmektedir (Gokce vd., 2014). Boş lipozomlara kıyasla, KE yüklemesi belirli bir konsantrasyona kadar (%0.6, a/h) parçacık boyutunu (Tablo 4.3) önemli ölçüde değiştirmemiştir (p>0.05), bunun üzerindeki konsantrasyonlarda ise, parçacık boyutunda bir azalma gözlemlenmiştir. Aktif bileşenin içeriğinin arttırılmasıyla lesitinle arasındaki etkilişimde artmakta dolayısıyla membran yapıda bir sıkışmaya sebep olmaktadır (Hasan vd., 2014). TEM görüntülerinde KE yüklü lipozomal veziküller yaklaşık 75 nm boyutunda küresel şekiller olarak gözlemlenmiş olup (Şekil 4.1), sonuçlar DLS analizi ile elde edilen değerlerle tutarlılık göstermiştir. Çok sayıda OH grubu içeren antosiyanin ve fenolik bileşiklerle fosfolipidlerin açil zincirleri arasındaki etkileşimin, çift katmanlı lipozom yapılarında konformasyonel ve membran akışkanlığında değişikliklere, dolayısıyla vezikül boyutunda farklılıklara sebep olabileceği

bildirilmiştir. Ayrıca, bu hidroksil grupları belirli koşullar altında negatif yüklü O gruplarına ayrışabilir ve bu O grupları, fosfolipitlerin pozitif yüklü kolin baş grupları ile hidrojen bağları veya daha stabil iyonik bağlar oluşturabilmektedir (Maherani vd., 2013; Rafiee vd., 2017).

Tablo 4.2 Farklı ultrasonikasyon süresine maruz bırakılmış boş ve KE yüklü lipozomların zeta potansiyeli, boyut, PDI ve enkapsülasyon verimliliği (%)

Ultrasonikasyon süresi (dk)	Örnek	Zeta potansiyeli (mV)	Boyut (nm)	PDI	%EE
3	**Boş**	-19.53±0.64^{c}	127.33±1.89^{b}	0.363±0.006^{cd}	-
	KE	-27.97±0.31^{a}	132.53±2.68^{b}	0.363±0.005^{cd}	67.73±0.68^{c}
5	**Boş**	-24.67±0.87^{b}	118.80±3.01^{c}	0.355±0.011^{d}	-
	KE	-23.10±0.36^{b}	141.67±4.91^{a}	0.380±0.004^{cd}	77.72±0.41^{b}
7	**Boş**	-23.87±1.00^{b}	94.02±1.63^{e}	0.382±0.007^{bc}	-
	KE	-19.27±0.15^{c}	92.16±1.24^{e}	0.361±0.000^{cd}	85.29±0.80^{a}
10	**Boş**	-18.77±0.21^{c}	77.52±0.33 ^{f}	0.435±0.015^{a}	-
	KE	-17.97±0.42^{c}	104.67±1.97 ^{d}	0.407±0.009^{b}	57.61±0.13^{d}

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her sütundaki farklı harfler, ortalamalar arasında anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$). KE yüklemesi KE-lipozomlarında %0.6 (a/h) olarak sabit tutulmuştur. KE: Karadut ekstraktı.



Şekil 4.1 KE yüklü lipozomların TEM görüntüleri (Sol ve sağ görüntülerdeki ölçek çubuğu sırasıyla 100 ve 200 nmdir).

Fosfolipid türlerinin anyonik doğası nedeniyle, ultrasonikasyonla üretilen soya lesitini lipozomlarının -17.97 ile -27.97 mV arasında değişen negatif yüzey yüklerine sahip olduğu belirlenmiştir. KE yüklü örneklerde sonikasyon uygulama süresi uzadıkça zeta potansiyeli azalmıştır (Tablo 4.2). Tüm yüklü lipozomların zeta potansiyeli (18.33-22.47 mV) sabit ultrasonikasyon süresinde (Tablo 4.3) boş lipozomlarınkinden (-23.87 mV) daha düşük bulunmuş olup, KE yükleme oranı arttıkça bu değerin muhtemelen fenolik asitlerin negatif yüklü karboksil grubundan dolayı (Gibis vd., 2013) arttığı tespit edilmiştir. Lipozomların polidispersite indeksi (PDI) değerleri 0.355 ile 0.435 arasında değişerek geniş bir boyut dağılımını göstermiştir (Tablo 4.2) (Hasan vd., 2014). Sonikasyon uygulamasıyla lipozom vezüküllerinin oluşumu sırasında, disk şeklindeki çift katmanlı fosfolipid parçaları, suda çözünebilen maddeleri hapseden termodinamik olarak daha küçük kararlı lipozomları oluşturabilir, alternatif olarak küçük kararsız lipozomlar biraz daha büyük kararlı lipozomlar olarak birleşebilir (Woodbury vd., 2006). Örneklerimizde ultrasonikasyonun uzun sürelerde uygulanması, yüksek kesme kuvvetlerinin çok katmanlı veziküllerin yapısını bozması nedeniyle (Koshani & Jafari, 2019) lipozomların %EE değerlerini %85,29'dan %57.61'e kadar azaltmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.3 Farklı oranlarda KE yüklü lipoozomların zeta potansiyeli, boyut, PDI ve enkapsülasyon verimliliği (%)

KE %, a/h	Zeta potansiyeli (mV)	Boyut (nm)	PDI	%EE
Boş	-23.87±1.00^{a}	94.02±1.63^{a}	0.382±0.007^{ab}	-
0.2	-19.97±0.40^{c}	94.75±1.54^{a}	0.384±0.010^{ab}	95.05±0.09^{a}
0.4	-18.33±0.35^{d}	96.22±0.46^{a}	0.392±0.001^{a}	92.83±0.03^{a}
0.6	-19.27±0.15^{cd}	92.16±1.24^{b}	0.361±0.000^{c}	85.29±0.80^{c}
0.8	-21.65±0.31^{b}	76.41±1.23^{c}	0.362±0.007^{c}	79.40±0.99^{c}
1	-22.47±0.21^{b}	71.59±0.74^{d}	0.371±0.004^{bc}	74.10±0.84^{d}

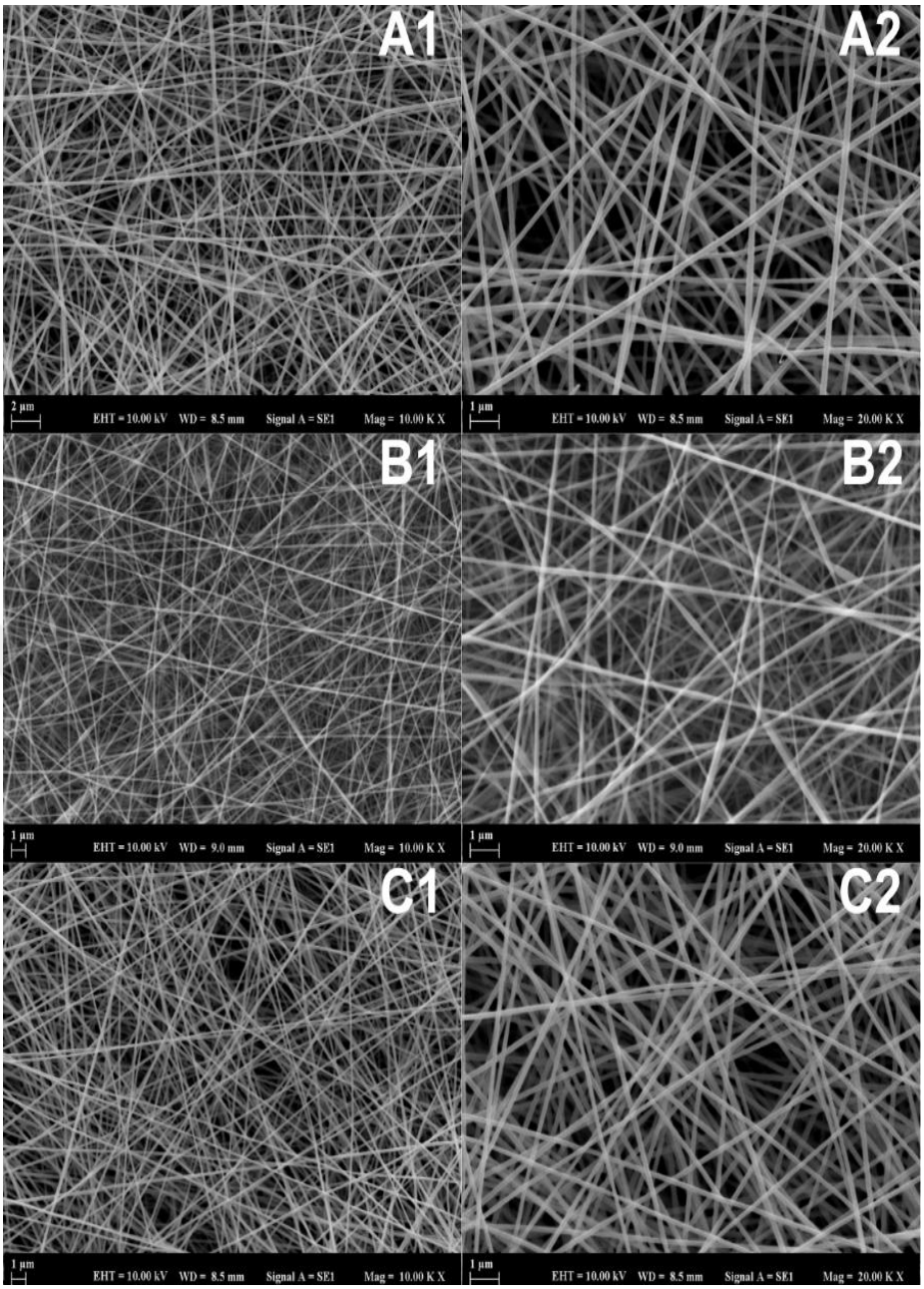
Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her sütun içindeki farklı harfler, ortalamalar arasında anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$). KE: Karadut ekstraktı.

Çalışmamızda, KE yüklü lipozomların %EE değerleri %74.10 ile %95.05 arasında değişmiştir (Tablo 4.3). Benzer çalışmalarda, Memete vd. (2023), karadut ekstraktını soya lesitini lipozomu içerisine hapsetmiş %EE değerini %88.25 olarak bildirmiştir, fenolik bileşik içeriği yüksek hibisküs ekstraktı için %EE değeri Gibis vd. (2014) tarafından %61–72 olarak saptanmıştır. Mürver ekstraktı için ise Bryla vd. (2015) tarafından %25 oranında enkapsülasyon verimliliği bildirilmiştir. Çalışmamızda yüklenen KE miktarının artırılması, %EE'de bir azalmaya yol açmıştır (Guldiken vd., 2017; Gültekin-Özgüven vd., 2016). Bu durum, lipozomların muhtemel yapısal değişikliği ve artan geçirgenliğyle açıklanabilmektedir. En yüksek %EE değerini vermemesine rağmen, %0.8 KE (a/h) içeren lipozom, sonraki adımlarda yüklü KE'nin seyreltileceği için lipozom yüklü nanolif üretimlerinde kullanılmıştır.

4.1.4 Boş, KE ve Lipozomal KE yüklü nanoliflerin karakterizasyonu

4.1.4.1 Nanoliflerin SEM ve CLSM ile morfolojik analizleri

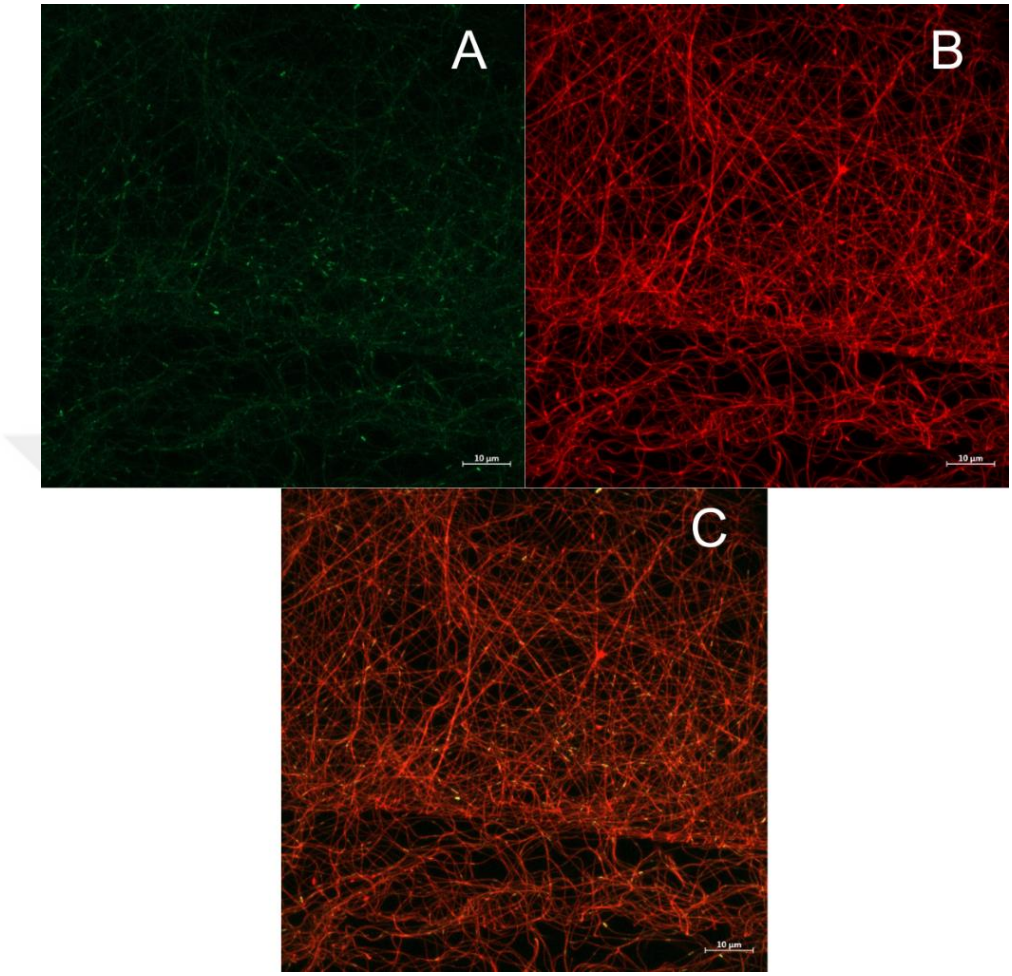
PUL/PEK ile üretilen boş nanoliflerin (A1-A2), serbest KE ile yüklü nanoliflerin (B1-B2) ve lipozomal KE ile yüklü nanoliflerin (C1-C2) morfolojisi SEM ile gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). PUL/PEK ve lipozomal KE yüklü nanofibril ağların morfolojisinin uniform ve kusursuz olduğu gözlemlenirken, yalnızca KE yüklü örnekler PUL/PEK nanofibril ağlar boyunca rastgele boncuk benzeri yapıların oluşumuna sebep olmuştur. Boş liflerin boyutu 183.71 nm olarak tespit edilmiştir. Serbest KE ve lipozomal KE yüklenmesi ile nanoliflerin boyutları sırasıyla 135.83 ve 163.09 nm'ye düşmüştür. Besleme çözeltisindeki polimer oranı ve konsantrasyonuna bağlı olarak, PUL/PEK nanoliflerinin boyutunun Liu vd., (2016) ve Li vd. (2023) tarafından 140.19 ile 369.45 nm arasında değiştiği bildirilmiştir. Karakas vd. (2023), jelatin-zein nanofiberlerine propolis yüklü lipozomlar eklediklerinde, lif boyutunda 312.00 nm'den 243.70 nm'ye kadar bir azalma olduğunu bildirmiştir. Polimer çözeltilerine lipozom ve KE eklenmesi, besleme çözeltilerinin özelliklerini değiştirebilmekte ve lif boyutlarında farklılığa sebep olabilmektedir. Örneğin besleme çözeltilerinin daha yüksek iletkenliğe sahip olması, yüzey yüklerinin daha ileri itilmesine izin vererek elektroeğirme jetinin yüksek gerilime maruz kalmasına dolayısıyla daha ince liflerin oluşumuna neden olabilmektedir (Xue vd., 2019). Jiang vd. (2024), pullulan bazlı nanolifleri bayberry posası antosiyanin ekstraktı ile yüklediklerinde, antosiyanin eklenmesi sonucunda polimer jetinin daha büyük uzama kuvveti oluşturup, yüklü olmayan liflere kıyasla daha ince nanolifler elde ettiklerini bildirmiştir.



Şekil 4.2 Nanoliflerin SEM görüntüleri (A1-A2: KE ve lipozom içermeyen PUL/PEK nanolifleri; B1-B2: serbest KE ile yüklü PUL/PEK nanolifleri; C1-C2: lipozomal KE ile yüklü PUL/PEK nanolifleri).

Lesitin ve polimerler (pullulan ve pektin), lipozom hazırlığı ve elektroeğirme işleminden önce iki farklı floresan boya (sırasıyla Nile kırmızı ve fast yeşili) ile boyanmış, CLSM ile çekilen lipozomal liflerin görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir. PUL/PEK polimerleri kırmızı uzun ipliklere benzerken, yeşil lipozomlar iplik üzerinde sıralanmış küçük dairesel veziküller veya lif boyunca uniform olarak dağılmış kum taneleri olarak tanımlanabilir. Elektrospinning işleminin hafif işleme

koşulları ve besleme çözümlerinin ayarlanabilir formülasyonu, lipozomal yapıların liflere stabil olarak yüklenmesini sağlamıştır (Karakas vd., 2023; Kalintas vd., 2024).



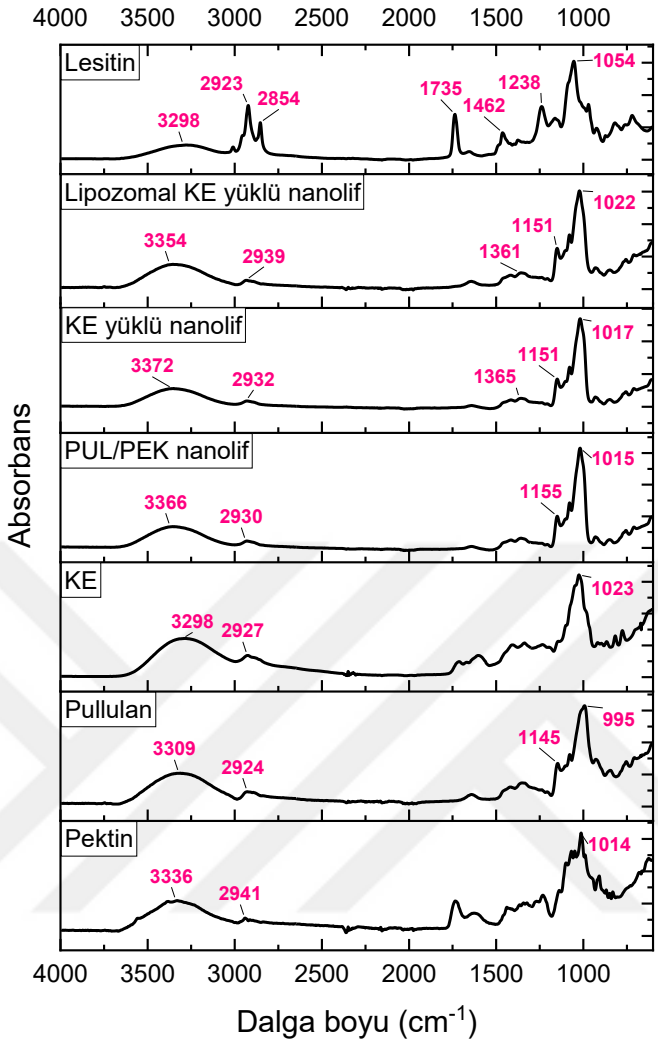
Şekil 4.3 KE-yüklü nanolilflerin CLSM görüntüleri (A: Nil kırmızısı ile boyanmış lipozomlar, B: Fast yeşil ile boyanmış polimerler, C: üst üste bindirilmiş görüntü. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla lipozomları ve polimerleri temsil etmektedir).

4.1.4.2 Nanoliflerin FT-IR spektrumları ve DSC analizi

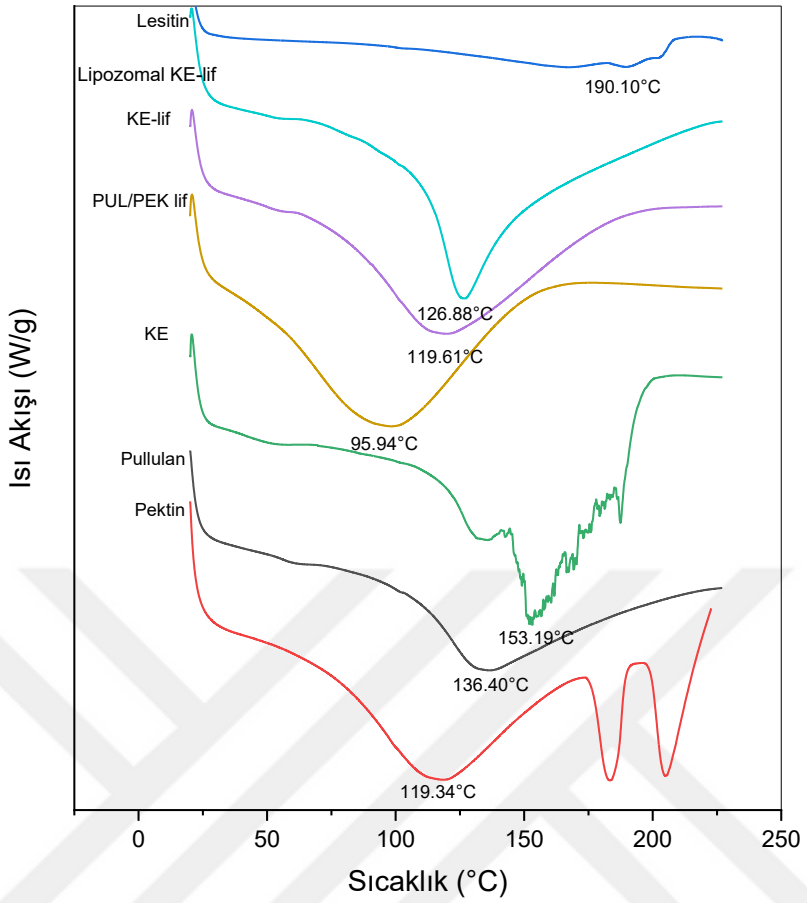
Lipozomal KE yüklü nanoliflerin ve ilgili bileşenlerin FT-IR spektrumları Şekil 4.4'te verilmiştir. KE yüklü nanolif ve lipozomal KE yüklü nanoliflerin spektrumları PUL/PEK nanolifinkine benzer olsa da, çeşitli pik pozisyonlarında az miktarda değişiklik görülmektedir. Bu durum, polimerlerin O-H ve N-H grupları ile KE'nin O-H grupları arasında olası moleküller arası hidrojen bağlarının varlığını göstermektedir.

Karakteristik O–H gerilme titreşim bandı, boş PUL/PEK nanolifinde 3366 cm^{-1}'de (Li vd., 2023), KE ve lipozomal KE yüklü liflerde sırasıyla 3372 ve 3354 cm^{-1}'de kendini göstermiştir. Boş lifteki 2930 cm^{-1}'deki C–H gerilme titreşimleri, sırasıyla KE ve lipozomal KE yüklü liflerde 2932 ve 2939 cm^{-1}'de gözlemlenmiştir. KE'nin 1023 cm^{-1} ve 1240 cm^{-1}'deki absorpsiyon bantları sırasıyla C-O ve =C-O-C gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Trak & Arslan, 2021). Lesitinde ester karbonil (C=O) gerilme titreşimi sebebiyle oluşan 1735 cm^{-1}'deki absorpsiyon bandının (Lu vd., 2014), KE yüklü nanoliflerde görülmediği tespit edilmiştir. Pullulanın spektrumunda görülen 754 cm^{-1} ve 924 cm^{-1}'de gerilme titreşimleri, karakteristik α-(1−4) ve α-(1−6)-D-glikosidik bağlarının varlığını göstermekte olup, tüm liflerde tespit edilmiştir.

Nanoliflerin ve ilgili bileşenlerin DSC termogramları Şekil 4.5'te verilmiştir. KE tek başına 134.50 °C ve 153,19 °C'de iki endotermik zirve göstermiştir. Pektin ve pullulanın, sırasıyla 119.34 °C ve 136.40 °C'de suyun eliminasyonundan kaynaklanan endotermik zirvelere sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Nanolifler sadece PUL ve PEK karışımı ile üretildiğinde, bu zirve 95.94 °C'ye kayarken, sırasıyla KE ve lipozomal KE yüklü nanoliflerde 119.61 ve 126.88 °C'ye gibi daha yüksek bir sıcaklığa kaymıştır. Literatürdeki birçok çalışmada, endotermik zirvelerdeki kaymanın veya kaybolmanın, kapsüllenmiş bileşik ile polimer matris arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığı iddaa edilmiştir (Li vd., 2020; Shao vd., 2018).



Şekil 4.4 Lesitin, lipozomal KE yüklü nanolif, serbest KE yüklü nanolif, pullulan (PUL)/pektin (PEK) nanolif, karadut ekstraktı (KE), pullulan ve pektinin FT-IR spektrumları.

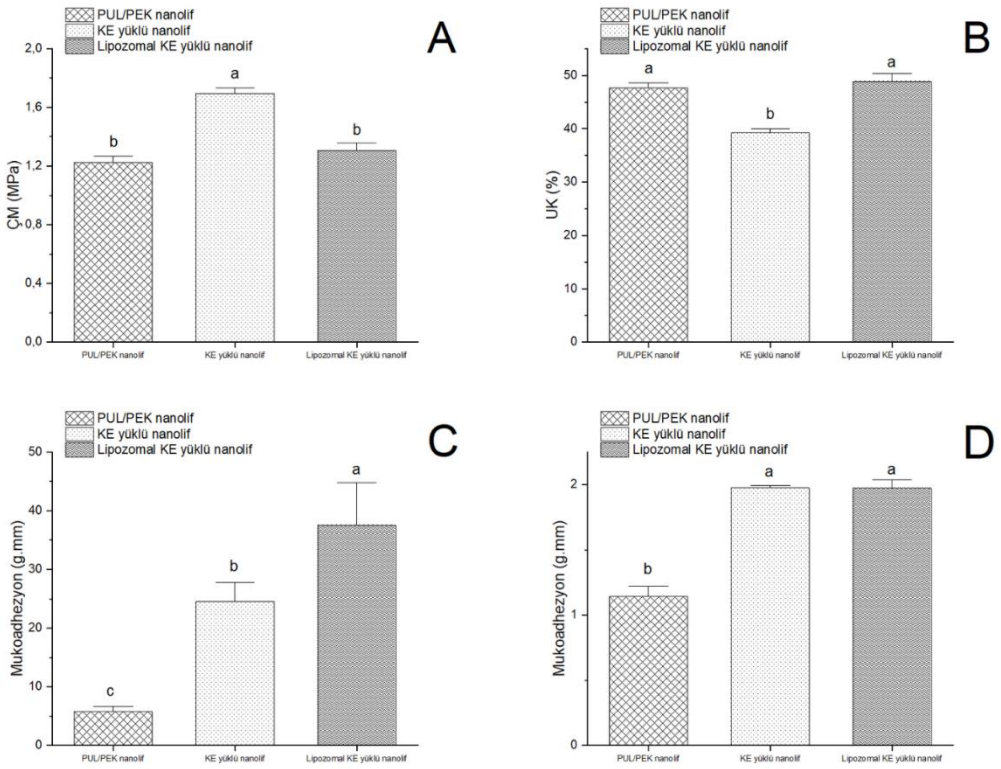


Şekil 4.5 Lesitin, lipozomal KE yüklü nanolif, serbest KE yüklü nanolif, pullulan (PUL)/pektin (PEK) nanolif, karadut ekstresi (KE), pullulan ve pektinin diferansiyel taramalı kalorimetre termogramları.

4.1.4.3 Nanoliflerin Mekanik Özellikleri

Liflerin mekanik özelliklerini belirlemek için, PUL/PEK lifinin, KE yüklü ve lipozomal KE yüklü nanoliflerin çekme mukavemeti (ÇM-Tensile Strength) ve uzama kırılması (UK- Elongation at Break) parametreleri ölçülmüştür. Serbest KE'nin PUL/PEK nanolifine yüklenmesi ÇM değerini arttırırken UK'yi düşürmüştür. Fakat, lipozomal KE yüklenmesi mekanik özellikleri anlamlı olarak değiştirmemiştir (p>0.05) (Şekil 4.6A-B). Benzer olarak, Priyadarshi vd., (2022), tarafından üzüm çekirdeği ekstraktı PUL/PEK yenilebilir filmlere yüklenmiş, filmlerin ÇM değerinin artarken UK değerinin azaldığını bildirmiştir. Bu değişikliklerin, ekstrakt ile polimer matrisi arasında hidrojen bağları aracılığıyla yoğun bir yapının oluşması sonucu moleküller arası etkileşimlerin artmasından

kaynaklanabileceğini aktarmıştır. Buna karşılık, önceki çalışmalarda, life hidrofobik biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesi durumunda ÇM değerlerinde azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir (Ge vd., 2019; Karakas vd., 2023). KE, çeşitli polifenoller ve yüksek seviyede antosiyanin içermektedir. Antosiyaninler de aromatik halkalar (kısmen hidrofobik) içersede daha çok hidroksil grupları içeren hidrofilik moleküller olarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenle, KE eklenmesinin, nanolifleri oluşturan polimerlerin moleküller arası kuvvetini güçlendirip, nanolif ağlarının yoğunlaşmasını arttırmış olabileceği, dolayısıyla liflerin ÇM değerlerinde bir artışa sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat, bu değişiklikler genellikle nanoliflerin esnekliğini ve elastikiyetini zayıflatabilmektedir. Güçlü moleküler arası etkileşimler daha küçük deformasyonlara izin verebileceğinden dolayı çalışmamızda UK değerlerinde azalmalar görülmüştür. Fakat, KE'nin nanoliflere yüklenmeden önce kapsüllenmiş olması, KE ve polimerler arası etkileşimleri önlediğinden lipozomal KE yüklü liflerle boş PUL/PEK liflerinin benzer ÇM ve UK değerleri gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 Nanoliflerin çekme mukavemeti, (ÇM) (A), uzama kırılması, (UK) (B) değerleri, in vitro (C) ve ex vivo (D) mukoadhezyon özellikleri.

4.1.4.4 Nanoliflerin Mukoadhesyon Özellikleri

Liflerin mukoadhesyon özellikleri, bir müsin diski ve kuzu mukozal membranı kullanılarak bir tekstür analiz cihazıyla hem *in vitro* hemde *ex vivo* mukoadhezyon testleri ile değerlendirilmiştir. Her ikisinde de hem serbest KE hemde lipozomal KE yüklenmesi, yüklü olmayan boş nanoliflerin mukoadhesyon işini arttırmıştır (Şekil 4.6C-D). Polimerik bir matrisin hidrofilikliği ve şişme kapasitesinin mukoadhezyon özelliğini etkilediği bilinmektedir. Yüklü lifler, müsin glikoproteinleri ile yapışmayı arttırdığı bildirilen hidroksil, karboksil veya amin grupları gibi ek fonksiyonel gruplara sahip olabilirler. Benzer olarak, Montero vd. (2019), lipozom içeren filmlerin mukoadhezyon özelliğinin arttığını bildirmiştir. Lipozomların plastikleştirici etkisi sebebiyle biyopolimer matrisinin çözünürlüğünü dolayısıyla mukoadhesyon özelliğini arttırdığı iddaa edilmiştir. Ek olarak, plastikleştiricilerin eklenmesi, PUL/PEK filmlerinin esnekliğini ve zincir hareketliliğini hidrojen bağları etkileşimleri yoluyla artırabilir. Polimerlerin zincir hareketliliği/esnekliğinin, mukus jel ağı ile karşılıklı difüzyon için kritik olduğu

bildirilmiştir (Andrews vd., 2009). Lipozomal KE yüklü nanoliflerin *in vitro* mukoadhezyon deneyi sonucunda sadece KE yüklü olanlara kıyasla daha yüksek mukoadhezyon sağlasa da, *ex vivo* mukoadhezyon deneyi sonuçlarına göre yüklü lifler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05) (Şekil 5D). Moreno vd. (2018), Periodik Asit-Schiff (PAS) deneyi ve domuz ince bağırsak dokusu kullanarak kitosan mikropartiküllerinin (CS) mukoadhezyonunu karşılaştırdıklarında, sadece bağırsak dokusu ile test edildiğinde örnekler arasında anlamlı bir fark tespit edememiştir. Hayvan dokusunun değişkenliği ve karmaşıklığının test sonuçlarını etkileyebileceğini aktarmıştır.

4.1.4.5 Serbest KE ve KE Yüklü Liflerden Fenoliklerin *in vitro* Biyoerişilebilirliğinin Belirlenmesi

Mide ve bağırsak sindirimi aşamaları sonrasında serbest KE ve KE yüklü nanoliflerden elde edilen fenoliklerin *in vitro* biyoerişilebilirliği (BE%) Tablo 4.4'te verilmiştir. Mide sindiriminden sonra, serbest KE'den antosiyaninlerin geri kazanımı %66.88 ile %103.89 arasında değişmiş olup, en yüksek geri kazanım oranı siyanidin 3-rutinositte görülmüştür (Tablo 4.4). Jiao vd. (2018), yaban mersini ekstraktını mide sindirimine maruz bıraktıktan sonra siyanidin 3-rutinositin geri kazanımının sonuçlarımıza benzer olarak arttığını bildirmiştir. Kim vd. (2020) ile Liang vd. (2012) tarafından farklı karadut türleri için mide sindirimi sonrasında toplam antosiyanin geri kazanımları %73 ve %98.37 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda mide sindirimi sonrası örneklerden elde edilen antosiyaninlerin %BE değerleri, serbest KE > KE yüklü nanolif > lipozomal KE yüklü nanolif olarak sıralanmaktadır. Bu sonuç tasarlanan enkapsülasyon sistemlerinin mide sindirimi boyunca daha düşük bir salınım yaptığını göstermektedir. Antosiyaninler, esas olarak flavylium katyonları olarak bulundukları asidik çözeltilerde (pH 1–3) çoğunlukla stabildirler. pH > 6'da, antosiyaninler stabilitelerini kaybederler, kalkon formunu alır ve ardından kimyasal bozulmaya uğrayarak fenolik asitlere parçalanmaktadırlar (Fang, 2014). Mide sindirimine kıyasla bağırsak sindirimi sonrası, çalışmamızdaki serbest KE'den elde edilen antosiyaninlerin %BE değerlerinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Özellikle siyanidin türevlerinin %BE değerlerinin %8.86 ile %14.58 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Hassimotto vd. (2008) *in vivo* olarak farelerde siyanidin 3-glukozit ve siyanidin 3-rutinozitin emilimini ve metabolizmasını araştırdıklarında, bu

antosiyaninlerin sindirim sıvılarındaki oranının zamanla azaldığını ve siyanidin glikozitlerinin düşük miktarlarda aglikon formlarına dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Bağırsak sindirimi sonrası, siyanidin di-glukozitin (%11.49) stabilitesinin, siyanidin 3-glukozitin (%8.86) stabilitesinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar, Alighourchi vd. (2008) ve Sengul vd. (2014) tarafından da bildirilmiştir. Diglikozitlerin 3-glikozitlere göre daha fazla stabilite göstermesinin sebebi, C5'teki glikozil grubunun C6 ve C8 pozisyonlarının nükleofilik karakterini azaltmasına bağlanmaktadır. Kim vd. (2020), şeker gruplarınında *in vitro* sindirim sistemindeki antosiyaninlerin stabilitesini etkilediğini bildirmiştir. Çalışmamızda benzer olarak, siyanidinin rutinozit grubunun (%14.58) glikozit grubuna (%8.86) kıyasla daha stabil olduğu görülmüştür. Pelargonidin 3-glukozit, bağırsak sindiriminden sonra KE'den elde edilen en stabil antosiyanin olarak tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda, B-halkasında daha az hidroksil grubu bulunan antosiyanininlerin stabilitesini daha yüksek olduğu, B-halkasında bir substitüsyon (hidroksil grubu) bulunması sebebiyle pelargonidin glikozitlerinin yaygın antosiyaninler arasında en yüksek stabiliteye sahip olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2014).

Serbest KE ile karşılaştırıldığında, lipozomal KE yüklü nanoliflerdeki antosiyaninlerin biyoerişilebilirliğinin yaklaşık olarak iki kat artttığı görülmüştür. Serbest KE yüklü liflerde ise bağırsak sindirimi sonrasında siyanidin ve siyanidin 3-glukozit dışında istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere rastlanamamıştır ($p>$ 0.05). Serbest Jussura posası ve Jussura posası yüklü PEO nanoliflerin sindirim sonrasındaki antosiyanin geri kazanımları Giaconia vd (2022) tarafından incelenmiştir. Nanoliflerin içerisine hapsedilmiş antosiyaninlerin sindirim sonunda %17'sinin, serbest ekstraktan ise %14'ünün geri kazanıldığını bildirmiştir. Isik vd. (2018), ise kiraz ekstraktını jelatin veya jelatin-laktalbumin nanoliflerinin içerisine hapsetmiş, örneklerin biyoyararlınımında iyileşme tespit etmiştir. Li vd. (2023), PUL/PEK elektrospun nanoliflerini üretip, sindirim özelliklerini simüle edilmiş bir gastroinstestinal modelde değerlendirmiştir. Lifleri mide sıvısında 30 dakika boyunca beklettiklerinde yapısını koruyabildğini, mide asidinin nanolifleri tamamen parçalamak için yeterli olmadığını bildirmiştir. Fakat, bağırsak sıvısında 30 dakika sonunda liflerde parçalanmalar, şişmeler gözlemlemiştir. Bağırsak sıvısında 60 dakika sonunda lif yapının çözündüğünü bildirmiştir. KE'nin

PUL/PEK nanoliflerine lipozomlara yüklenerek enkapsüle edilmesi, antosiyaninlere ek koruma sağlamaktadır. Antosiyaninlerin hidrofilik doğası nedeniyle lipozomların çekirdeklerine hapsolması muhtemeldir. Lipozomal KE yüklü nanoliflerde KE önce lipozom zarından ardından PUL/PEK nanolifin polimer ağından difuze olmaktadır. Serbest KE yüklü nanolifte ise KE nanoliflerin sindirim oratamında şişmesi ve çözünmesi sonucu doğrudan bağırsak koşullarına maruz kalmaktadır. Çalışmamızda polimer matrisinden salınan lipozomlar, lipozomlarda hapsolmuş aktif bileşenin sindirim sıvılarına maruz kalmasını geciktirmiştir. Fenolik bileşiklerin sindirim sistemi koşullarından lipozomal enkapsülasyonla korunabildiği daha önce bildirilmiştir (Saroglu & Karadag, 2024). Bağırsak sindirimi sırasında, safra tuzları fosfolipid çift katmanına nüfuz ederek lipozom veziküllerinin şişmesine ve membranın akışkanlığının artmasına neden olur, bu da kapsüllenmiş maddelerin kontrollü salınımına yol açmatakdır (Chen vd., 2021).

Fenolik asitlerden, sadece protokateşuik asit ve vanilik asit sindirilmiş KE'den geri kazanılmıştır. Serbest ve kapsüllenmiş KE'nin bağırsak sindirimi sonrası protokateşuik asit seviyesi başlangıç miktarının yaklaşık %107-169'u olarak belirlenmiştir. Lipozomal KE yüklü nanoliflerin protokateşuik asit geri kazanımı, tüm örnekler arasında en düşük bulunmuştur. Bu durum, enkapsülasyon sisteminin antosiyaninleri daha fazla koruyabildiğine atfedilmiştir. Antosiyaninler, bağırsak sindirimi sırasında şekerlerin ayrılmasıyla antosiyanidine metabolize olmakta, daha sonra protokateşüik asit ve ferulik asit gibi daha küçük bileşiklere parçalanabilmektedir. Bağırsak ortamı, moleküler yapının değişmesine ve B halkasının kırılmasına neden olarak fenolik asit bileşenlerinin oluşumunu sağlamaktadır (Fang, 2014). Seeram vd. (2001), protokateşuik asidin, siyanidin 3-glukozitinin B/C halkasının parçalanmasıyla oluşan siyanidinden kendiliğinden bozulma yoluyla oluşabileceğini bildirmiştir. Protokateşuik asit, ayrıca siyanidin 3-glukozit ile beslenen sıçanların serumunda (Tsuda vd., 1999) ve siyah ahududu tüketiminin ardından insanların plazmasında (Chen vd., 2012) tespit edilmiştir. Çalışmamızda başlangıçta tespit edilemeyen, vanilik asitin serbest KE'de bağırsak sindirimi sonunda oluştuğu tespit edilmiştir. De Ferrars vd. (2014), siyanidin 3-glukozitin öncelikle protokateşuik aside parçalanıp daha sonra vanilik asit, hipurik asit, ferulik asit ve 4-hidroksibenzaldehit dahil olmak üzere birçok metabolite geniş ölçüde metabolize edildiğini bildirmiştir. Klorojenik asit ve kriptoklorojenik asidin

ise sindirimden sonra serbest KE'de tamamen parçalandığı görülürken, lipozomal KE yüklü nanoliflerdeki %BE değerleri sırasıyla %27.51 ve %19.16 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Sadece klorojenik asit (%11.06) sindirimden sonra serbest KE yüklü nanoliflerde tespit edilmiştir. Siracusa vd. (2011), bağırsak sindiriminden sonra klorojenik asidin %95.7 oranında kaybını bildirmiştir, bu durum klorojenik asidin sulu çözeltilerdeki kararsızlıkları ile ilişkilendirilmiştir (Kamiloglu & Capanoglu, 2013).

Serbest KE'den bağırsak sindirimi sonunda kaempferol 3-glukozit ve kuersetin 3-glukozit geri kazanımı gözlemlenmemiştir; bu flavonoidlerin miktarının sindirimle yüksek oranda azalması, Siracusa vd. (2011) tarafından da bildirilmiştir. Başka bir çalışmada bu stabilite kayıpları, kaempferol 3-glukozit ve kuersetin 3-glukozitin pankreatin ve diğer sindirim bileşenlerindeki sindirim enzimleri veya diğer proteinlerle olan affinitelerine bağlanmıştır (Gonzales vd., 2015). Ancak, lipozomal KE yüklü nanolifler için bağırsak sindirimi sonunda, kuersetin 3-glukozitin geri kazanımı %26.75 olarak tespit edilmiş olup, kaempferol 3-glukozid için %4.61 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.4). Bağırsak sindiriminden sonra, serbest KE (%2.23) ve KE yüklü nanoliflerde (%1.10) luteolin 7-glukozitin %BE değeri, lipozomal KE yüklü liftekine (%17.83) kıyasla önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Çalışmamızda, flavonoidler arasında en yüksek %BE değerine rutinin (%21.38 - 35.95) sahip olduğu görülmüştür. Gayoso vd. (2016) ile Siracusa vd. (2011) saf bileşiklerin sindirimi üzerinde çalışarak farklı sonuçlar bildirmişlerdir. Örneğin, rutin geri kazanımı toplam kayıptan başlangıç konsantrasyonunun %37'sine kadar değişiklik göstermiştir. Bu nedenle, sindirim metodolojisininde de biyoerişilebilirliğin değerlendirilmesinde önemli bir faktör olabileceği sonucuna varılmıştır (Minekus vd., 2014).

Tablo 4.4 KE, serbest KE ve lipozomal KE ile yüklü nanoliflerin in vitro biyoerişilebilirliği

	Biyoerişilebilirlik (%)					
	KE		KE yüklü nanolif		Lipozomal KE yüklü nanolif	
	Mide	Bağırsak	Mide	Bağırsak	Mide	Bağırsak
Antosiyaninler						
Siyanidin 3-glukozit	98.60±1.33^{a}	8.86±0.21^{z}	50.85±0.01^{b}	13.60±0.20^{y}	28.30±2.69^{c}	17.12±0.90^{x}
Siyanidin	81.51±2.08^{a}	10.95±0.07^{z}	40.32±2.84^{b}	12.67±0.79^{y}	24.54±2.19^{c}	23.64±0.19^{x}
Siyanidin 3-rutinosid	103.89±4.57^{a}	14.58±0.60^{y}	45.56±3.57^{b}	14.63±0.39^{y}	31.66±1.05^{b}	23.08±1.33^{x}
Siyanidin 3-5 diglukozit	90.80±1.63^{a}	11.49±1.63^{y}	71.73±2.06^{b}	11.59±1.65^{y}	45.34±0.93^{c}	22.19±0.87^{x}
Pelargonidin	81.50±1.30^{a}	31.14±2.59^{x}	42.48±4.54^{b}	21.65±4.15^{x}	26.31±3.91^{c}	25.29±4.52^{x}
Pelargonidin 3-glukozit	66.88±0.31^{a}	32.47±3.06^{y}	38.76±0.89^{c}	26.52±0.52^{y}	52.69±0.93^{b}	50.36±1.37^{x}
Flavonoidler						
Luteolin 7-glukozit	43.74±1.21^{b}	2.23±0.24^{y}	67.09±5.13^{a}	1.10±0.22^{y}	48.91±4.89^{b}	17.83±0.38^{x}
Rutin	32.97±1.26^{b}	21.38±2.52^{y}	50.18±2.06^{a}	33.96±4.89^{xy}	18.55±0.46^{c}	35.95±1.30^{x}
Kuersetin 3-glukozit	40.15±0.00^{b}	-	84.57±0.75^{a}	14.60±1.92^{y}	47.13±0.90^{b}	26.75±1.35^{x}
Kaempferol 3- glukozit	55.56±7.14^{a}	-	77.27±6.43^{a}	-	62.54±1.45^{a}	4.61±0.72
Fenolik asitler						
Klorojenik asit	29.39±2.77^{a}	-	22.30±1.40^{a}	11.06±2.24^{y}	11.61±1.09^{b}	27.51±3.13^{x}
Kriptoklorojenik asit	-	-	89.06±1.29^{a}	-	45.47±5.17^{b}	19.16±2.96
Protokateşuik asit	54.17±5.89^{b}	169.79±4.42^{x}	87.26±8.67^{a}	153.65±8.46^{x}	71.28±3.03^{ab}	107.06±10.75^{y}
Vanilik asit	-	100.00±2.45^{x}	-	89.26±3.12^{y}	-	86.30±1.02^{y}

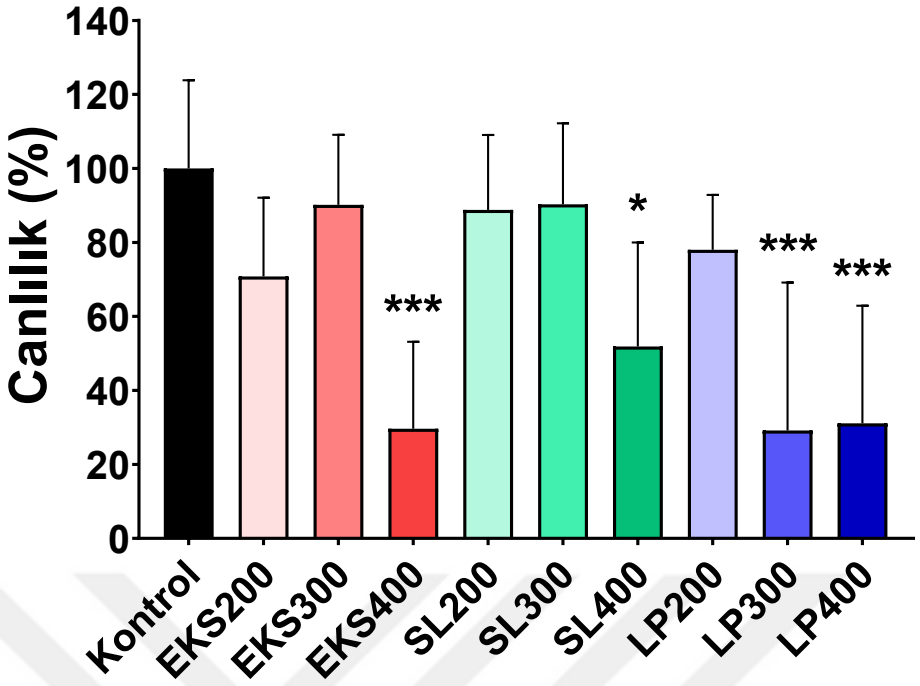
4.1.4.6 Fenolik bileşiklerin *in vitro* biyoyararlanımı

Caco-2 hücre çalışmasında, insan bağırsak sistemi taklit edilmiştir. *İn vitro* biyoyararlanabilirlik, antosiyaninlerin hücrelerin bağırsak boşluğunu temsil eden apikal kısımdaki miktarının, emilim gerçekleştikten sonra bileşenlerin nakledildiği kan dolaşımını temsil eden bazolateral kısımdaki miktarına oranı belirlenerek değerlendirilmiştir. Tüm örneklerin stok çözeltisi (EKS400; SL400; LP400) ve lipozomal KE yüklü nanolifin SS1 seyreltisi (LP300), CaCo-2 hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermiştir (p<0.05). Bu nedenle, biyoyararlanım testini gerçekleştirmek için SS2 (EKS200, SL200, LP200) seyreltik çözeltileri kullanılmıştır (Şekil 4.7). Tespit edilen antosiyaninlerin *in vitro* biyoyararlanım sonuçları Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Sadece siyanidin 3-5 diglikozit, KE ve serbest KE yüklü nanoliflerin bazolateral taraflarında tespit edilebilmiştir. Lipozomal KE yüklü nanoliflerin bazolateral tarafında ise, siyanidin 3-5 diglukozitin yanı sıra pelargonidin 3-glukozit, siyanidin 3-rutinosit ve siyanidin 3-glukozitte tespit edilmiştir. Lipozomal KE yüklü nanoliflerin antosiyaninlerin hücresel salınımını arttırdığı tespit edilmiştir. Serbest KE biyoyararlanımı sonuçlarımızla uyumlu olarak, Steinert vd. (2008) Caco-2 hücre monolayerleri kullanarak frenk üzümü antosiyaninlerinin potansiyel emilimini araştırmış ve bazolateral çözeltide herhangi bir antosiyanin (delfinidin ve siyanidin glikozitleri) bulamamışlardır. Antosiyaninlerin emilimi ve biyoyararlanabilirliğinin hücresel metabolizma ve bazolateral zar boyunca translokasyon tarafından etkilenebileceğini aktarmışlardır. Benzer sonuçlar üzüm antosiyaninleri için Kuntz vd. (2015) tarafından bildirilmiştir. Fakat, Herrera-Balandrano vd. (2023), yaban mersini antosiyaninleri için %16'dan fazla biyoyararlanım değerleri elde etmiştir.

Antosiyaninler için biyoyararlılık değerleri çalışmamızda elde edilen serbest KE sonuçlarıyla uyumlu olarak genellikle oldukça düşük (1-5%) bildirilmiştir (Kamiloglu vd., 2015). Serbest KE'de sadece siyanidin 3-5 diglikozitin bazolateral tarafa taşındığı tespit edilmiş ve bu değer %5'ten küçük bulunmuştur (Tablo 4.5). Ancak, farklı kapsülleme çalışmalarında daha yüksek emilim seviyeleri bildirilmiştir. Örneğin, Jeon vd. (2016) nanokapsüllerin resveratrol emilimini %3.5'ten %7'ye önemli ölçüde arttırdığını bildirmiştir. Çalışmamızda, lipozomal KE yüklü nanolifler, antosiyaninlerin *in vitro* biyoyararlanımını %3.92 ile %10.50 arasında artırmış olup, önerdiğimiz kapsülleme yönteminin bağırsak fitobesin

emilimi için etkili bir yaklaşım olduğunu göstermektedir. Önceki çalışmalar, lipozomal formülasyonların antosiyaninlerin (Sun vd., 2021) ve resveratrolün (Xu vd., 2023) emilimini artırabileceğini ortaya koymuştur.

Lipozomal nanolifimizde siyanidin 3-rutinositin (%6.94) emilimi, siyanidin 3-glukozitin (%3.92) emiliminden daha yüksek bulunmuştur. Liu vd. (2014), Caco-2 hücrelerinde yaban mersini antosiyaninlerinin emilimini değerlendirdiklerinde, şeker gruplarının antosiyaninlerin emilimini etkilediğini bildirmiştir. Nielsen vd., (2003) ise, tavşanlar üzerinde bir çalışma yaparak antosiyanin rutinosidlerinin antosiyanin glukozidlerinden daha kolay emildiğini tespit etmiştir. Ayrıca, Yi vd.,. (2006), daha fazla serbest hidroksil grubunun ve daha az OCH_3 grubunun antosiyaninlerin biyoyararlanımını azaltabileceğini iddia etmiştir. Çalışmamızda pelargonidin 3-glukozit (%6.00) ve siyanidin 3-glukozit (%3.92) arasındaki hücresel salınım farklılıkları, B halkalarındaki hidroksil grubu miktarlarının farklılığına atfedilmiştir (Fang, 2014). Fenolik bileşiklerin hücresel emilim çalışmalarında şeker gruplarının varlığıda literatürde farklı sonuçlara sahiptir. Herrera-Balandrano vd., (2023), daha hidrofobik antosiyaninlerin daha hidrofilik antosiyaninlerden daha iyi emilim verimliliğine sahip olduğunu bildirmiştir. Aksine, Zhang vd., (2020) flavonoidler için özellikle diglükosit formlarının aglikon formlarına kıyasla daha iyi emilebileceğini belirtmiştir.



Şekil 4.7 In vitro sindirilmiş örneklerin Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksisitesi (Sonuçlar, kontrol grubunun %100 canlılık oranına sahip olduğu varsayılarak elde edilen verilerin normalize edilmesiyle elde edilmiş olup, ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir, *p<0.05, ***p<0.001).

Tablo 4.5 Serbest KE, serbest KE ve liposomal KE yüklü nanoliflerin in vitro biyoyararlanımı

	Serbest KE µg/mL			**Serbest KE yüklü nanolif µg/mL**			**Lipozomal KE yüklü nanolif µg/mL**		
	Apikal	**Bazolateral**	**Hücresel salınım (%)**	**Apikal**	**Bazolateral**	**Hücresel salınım (%)**	**Apikal**	**Bazolateral**	**Hücresel salınım (%)**
Siyanidin 3-glukozit	8.23±0.14	-	-	8.69±0.09	-	-	5.85±0.83	0.23±0.01	3.92±0.33
Siyanidin 3-rutinozit	6.07±0.18	-	-	3.53±0.44	-	-	3.18±0.13	0.22±0.01	6.94±0.49
Siyanidin 3-5 diglukozit	0.47±0.05	0.02±0.01	4.16±1.01[b]	0.63±0.09	0.04±0.01	5.23±0.53[b]	0.31±0.05	0.02±0.04	10.50±1.02[a]
Pelargonidin 3-glukozit	0.94±0.06	-	-	3.19±0.04	-	-	3.11±0.06	0.19±0.00	6.00±0.11

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her sütundaki farklı harfler, ortalamalar arasında anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$). Hücresel salınım (%) = (bazolateral çözeltideki KE fenolik bileşen miktarı/apikal çözeltideki KE fenolik bileşen miktarı) x 100. KE: Karadut ekstraktı.

4.2 Glutenin Hidrolizatının Enkapsülasyonu

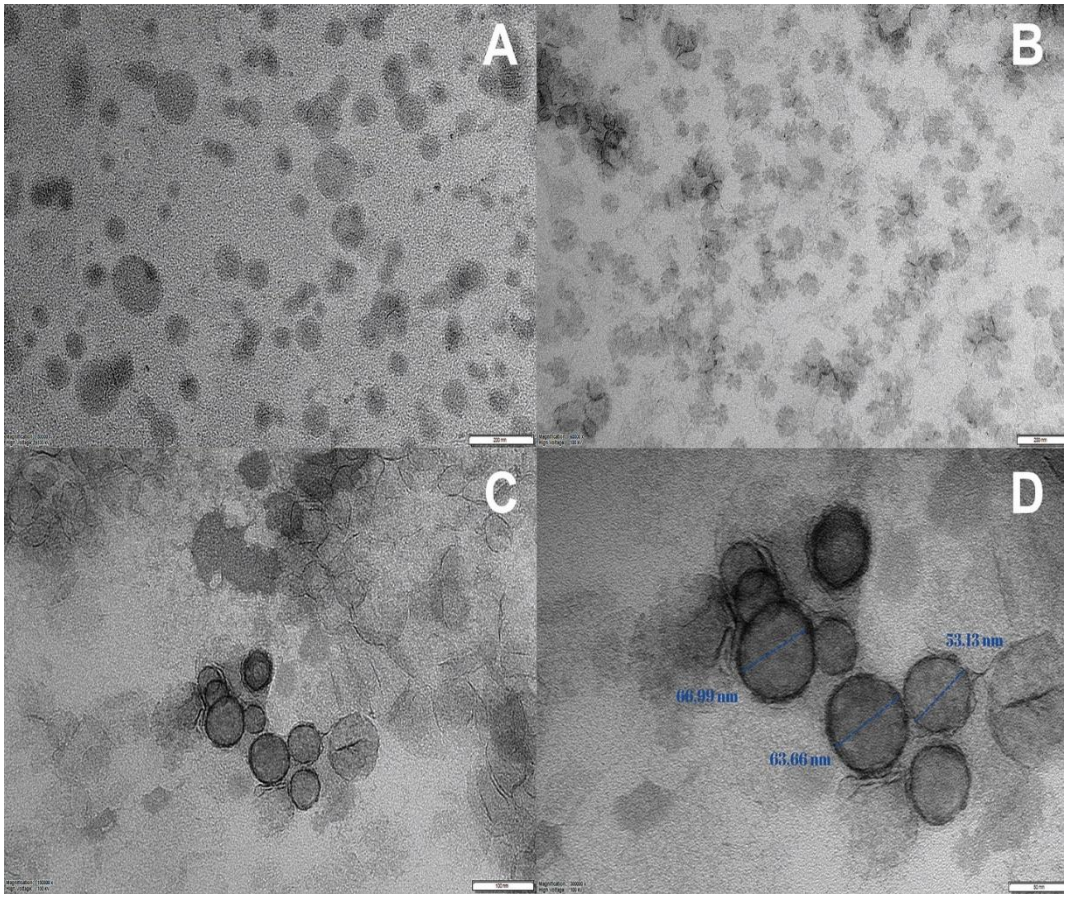
4.2.1 GH'in Hidroliz Derecesi ve Antioksidan Aktivitesinin Analizleri

Flavourzyme, *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen bir endoproteaz ve ekzopeptidaz karışımıdır ve proteinleri hidrolize ederek antioksidatif veya radikal temizleyici peptitler oluşturması açısından önerilmiştir (Xue vd., 2009; Raghavan vd., 2008). Çalışmamızda GH'nin HD'si %5.45±0.48 olarak belirlenmiş olup, bu değer Bozkurt vd., (2021) tarafından bildirilen GH'nin HD değeri (%5) ve Flavourzyme kullanılarak üretilen kanola proteini hidrolizatının (%6.33) HD değeri ile yakın bulunmuştur (Cumby vd. 2008). FRAP ve $ABTS^{+}$ analiz sonuçları sırasıyla 0.436 ± 0.02 µg AAE/mg GH ve 1096.13 ± 13.17 µg GH/mL IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir. Protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin, peptit boyutu, amino asit dizilimi, enzim türü, enzim-substrat oranı, sıcaklık ve pH gibi bir çok farklı hidroliz koşuluna bağlı olduğu bilinmektedir (Czelej vd., 2022).

4.2.2 GH Yüklü ve Boş Lipozomların Karakterizasyonu

Farklı lesitin:fitosterol oranlarının lipozomların zeta potansiyeli, boyut, PDI ve %EE değerlerine etkisi Tablo 4.6'da verilmiştir. Boş lipozomların boyutu (GH olmadan) yaklaşık 60 nm tespit edilmiştir. Boş lipozomların boyutunun belirli bir lesitin:sterol oranına kadar fitosterol miktarına önemli ölçüde bağlı olmadığı görülmüştür (p>0.05). Daha yüksek fitosterol seviyelerinde (1:0.75, a/a), lipozomların boyutları, membranların steroller tarafından boyutsal olarak doldurulması nedeniyle yaklaşık 73 nm'ye yükselmiştir (Song vd., 2022). Vesikül boyutu, GH ile yüklendiğinde lesitin:sterol oranına bağlı olarak hafif bir azalma ardından artış göstermiştir. Örneğin, GH'nin saf lesitin lipozomlarına (fitosterol olmadan) yüklenmesi vezikül boyutunu büyütmüştür (p>0.05). 1:0.1 (a/a) oranında fitosterol katılması ile boyut yaklaşık 55 nm'ye ($p<0.05$) düşmüştür daha sonra 1:0.5 (a/a) oranında boyut hafifçe artarak yaklaşık 67 nm olmuştur. Wong (2009), sterolün lipozomlara daha düşük konsantrasyonlarda eklenmesinin çift katman

akışkanlığını artırabileceğini ve daha küçük lipozomların oluşumunu kolaylaştırabileceğini bildirmiştir. Jovanović vd., (2018) ile Zhao vd., (2015) ise, daha yüksek sterol seviyelerinin membran akışkanlığını azaltabileceğini, lipidler arası boşluk oluşumunu teşvik edebileceğini, membran genişlemesini sağlayabileceğini ve boyutta artışa neden olabileceğini belirtmişlerdir. Boş ve GH yüklü lipozomların TEM görüntüleri, DLS analiziyle uyumlu olarak, 53 ila 66 nm arasında değişen lipozomlarda yaygın olarak gözlemlenen özelliklerle uyumlu olarak, küresel bir morfoloji ve monolayer yapı göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Boş (A) ve GH yüklü lipozomların (B, C, D) TEM görüntüleri (Ölçek çubuğu A ve B için 200 nm, C için 100 nm ve D için 50 nm'dir).

Yaklaşık +/-30 mV'ye yaklaşan bir zeta potansiyeli değeri, nanopartiküllerin çözeltideki kolloidal stabilitesinin arttığını göstermektedir. Fitosterollerin eklenmesi, GH yüklü lipozomların zeta potansiyel değerini arttırmış, ancak boş lipozomları önemli ölçüde etkilememiştir (Tablo 4.6). Daha yüksek konsantrasyonlarda sterollerin eklenmesi, lipozom yüzeylerindeki peptitler ve fosfolipitler arasındaki etkileşimi değiştirmiş olabilir (Hosseini vd., 2017;

Mazloomi vd., 2020). Düşük bir polidispersite indeksi (PDI), uniform bir parçacık boyutu dağılımını göstermektedir (da Rosa Zavareze vd, 2014). GH yüklü fitosterolsüz lipozom hariç tüm lipozomların PDI değeri 0.3'ün altında bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 Farklı lesitin:fitosterol (L:F) oranlarında lipozom örneklerinin parçacık boyutu, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI) değerleri ve kapsülleme verimliliği (EE%)

L:F (a/a)	Örnek	Boyut (nm)	Zeta potansiyeli (mV)	PDI	%EE
1:0	Boş	58.91±0.88 ^{c}	-32.80±0.66 ^{bc}	0.274±0.011 ^{b}	-
	GH	62.87±0.59 ^{bc}	-32.63±1.33 ^{bc}	0.319±0.006 ^{a}	17.46±1.37 ^{c}
1:0.10	Boş	59.78±2.55 ^{c}	-28.63±0.55 ^{d}	0.249±0.015 ^{bcd}	-
	GH	54.51±1.04 ^{d}	-30.70±0.79 ^{cd}	0.209±0.002 ^{d}	18.51±0.93 ^{c}
1:0.25	Boş	61.68±0.69 ^{c}	-33.43±0.25 ^{b}	0.241±0.010 ^{bcd}	-
	GH	61.85±0.82 ^{c}	-32.47±0.95 ^{bc}	0.233±0.009 ^{bcd}	25.48±1.77 ^{b}
1:0.50	Boş	61.10±0.23 ^{c}	-32.97±1.26 ^{bc}	0.243±0.002 ^{bcd}	-
	GH	66.86±0.86 ^{b}	-39.40±1.01 ^{a}	0.272±0.013 ^{b}	66.09±1.21 ^{a}
1:0.75	Boş	72.68±0.98 ^{a}	-32.73±0.55 ^{bc}	0.255±0.009 ^{bc}	-
	GH	74.42±2.81 ^{a}	-37.03±0.42 ^{a}	0.228±0.036 ^{cd}	20.17±1.04 ^{c}

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her sütundaki farklı harfler, ortalamalar arasında anlamlı farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$). GH lipozomlara yüklenme oranı 5 mg/mL olarak sabit tutulmuştur. GH: Glutenin hidrolizatı

Herhangi bir taşıma sistemi geliştirildiğinde öncelikli olarak yüksek bir kapsülleme verimliliği (%EE) değeri hedeflenmektedir. Önceki çalışmalarda, protein hidrolizatı yüklü lipozomların %EE değerlerinin %28 ile %92 arasında değiştiği bildirilmiştir (Mohan vd., 2018; Hosseini vd., 2017). Protein hidrolizatlarındaki

peptit çeşitliliği, lipozom yapılarıyla olan affinitelerini anlamayı zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda, GH'nin (5 mg/mL) saf lipozomlara (fitosterol olmadan) yüklendiğinde EE% değeri %17.46±1.37 olarak tespit edilmiştir, bu değer fitosterolün belirli bir seviyeye kadar (lesitin konsantrasyonunun %50'si, a/a) eklenmesiyle %66.09±1.21'e yükseltilmiş olup, daha yüksek ekleme seviyelerinde azalmıştır (Tablo 4.6). Fosfolipid çift katmanına yerleşen sterol molekülü, C17'deki karbonhidrat kuyruğunun hidrofobik yağ asidi zincirleriyle etkileşime girmesine olanak tanır. Sterolün C3'teki hidroksil grubu, fosfolipitlerin hidrofilik baş gruplarıyla eşzamanlı olarak etkileşir (Silva vd., 2011). Bu etkileşimler, çift katmanda boşlukları doldurur, yapıyı güçlendirir ve kapsüllenmiş bileşiğin geçişini azaltarak sızıntıyı azaltır (Chen vd. 2010). Önceki çalışmalar da fitosterollerin lipozomlara dahil edilmesiyle kuersetin ve askorbik asit yüklü lipozomların %EE'sinin arttığı bildirilmiştir (Toopkanloo vd., 2020; Alexander vd., 2012). Belirli bir fitosterol konsantrasyonunun ötesinde (%1:05, w/w) %EE'deki azalma, veziküllerde aşırı sert zar yapısının oluşması, bu durumun homojen olarak stabil veziküllerin oluşumunu engellemesi ve sızıntıya yol açmasıyla ilişkilendirilmiştir (Tai vd., 2019).

Aynı lipozom formülasyonunu (lesitin: fitosterol, 1:0.5, a/a) farklı GH konsantrasyonları (0-10 mg/mL) ile yüklemek, lipozom parçacık boyutunun yaklaşık 60'dan 90 nm'ye kadar artmasına neden olmuştur (Tablo 4.7), benzer sonuçlar, 1-10 mg/mL balık jelatini hidrolizatını lipozomlara kapsüle eden Hosseini vd. (2017) tarafından bildirilmiştir. GH yüklü lipozomların zeta potansiyel değerleri ise (-35.93 ila -39.73 mV) (Tablo 4.7), boş lipozomlarınkinden (-32.97 mV) daha yüksek bulunmuştur. Bu durum peptitlerin lipozom yüzeyine entegrasyonuyla açıklanabilir (Sarabandi vd.., 2019). En yüksek konsantrasyon (10 mg/mL) hariç, GH yüklemesi PDI değerlerinde istatistisel olarak anlamlı bir farklılığa sebep olmamıştır (p>0.05). Yüksek derecede yüklü peptitlerin varlığı, kolloidal sistemin heterojenliğini sebep olmuş olabilir. GH'nin lipozomlardaki %EE değeri, yükleme konsantrasyonu 5 mg/mL'den 10 mg/mL'ye çıkarıldığında, %66.09'dan %32.02'ye kadar önemli ölçüde azalmıştır (Tablo 4.7). Daha önce bildirildiği gibi, belirli bir peptit konsantrasyonunun ötesinde, lipozomlar doygunluğa ulaşacak ve daha yüksek yükleri taşıyamayacaktır (Hosseini vd., 2017; Mosquera vd., 2014).

Tablo 4.7 GH ile yüklü lipozomların parçacık boyutu, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI) ve kapsülleme verimliliği (EE%).

GH (mg/mL)	Boyut (nm)	Zeta potansiyeli (mV)	PDI	%EE
0	61.10±0.23 ^{d}	-32.97±1.26 ^{c}	0.243±0.002 ^{bc}	-
5	66.86±0.86 ^{c}	-39.40±1.01 ^{a}	0.272±0.013 ^{b}	66.09±1.21 ^{a}
7.5	75.69±0.34 ^{b}	-37.47±0.50 ^{ab}	0.214±0.003 ^{c}	57.52±2.27 ^{b}
10	87.71±0.58 ^{a}	-35.93±0.87 ^{b}	0.329±0.028 ^{a}	32.02±2.62 ^{c}

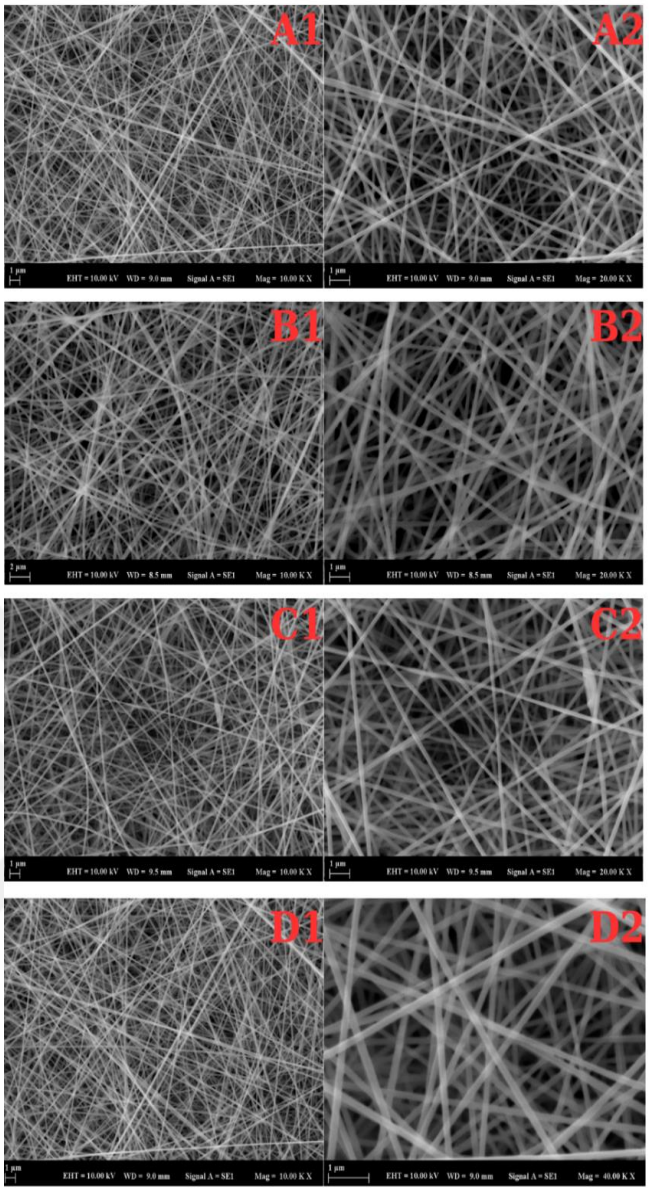
Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her sütundaki farklı harfler, ortalamalar arasında önemli farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$). GH: Glutenin hidrolizatı. Lesitin: Fitosterol oranı 1:0.5 (a/a) olarak sabit tutulmuştur.

4.2.3 Boş, GH ve Lipozomal GH Yüklü Tek ve Çift Eksenli Nanoliflerin Karakterizasyonu

4.2.3.1 Nanoliflerin SEM ve CLSM ile morfolojik analizleri

Lipozom veya GH içermeyen, boş tek eksenli (Şekil 4.9A) ve çift eksenli liflerin (Şekil 4.10B) boyutları, sırasıyla yaklaşık 188 ve 195 nm olarak belirlenmiştir. Serbest GH'nin tek eksenli liflere eklenmesi boyutu 216 nm'ye (Şekil 4.9C) kadar artırırken, çift eksenli liflerde yaklaşık 181 nm civarı tespit edilmiştir (Şekil 4.10B). GH (7.5 mg/mL) yüklü lipozomlar (1:0.5, lesitin:fitosterol, a/a) ve bunların boş karşıtları, lipozom yüklü liflerin üretimi için kullanılmıştır. Boş lipozomlar (Şekil 4.9D) ve GH yüklü lipozomlar (Şekil 4.9C) tek eksenli liflere eklendiğinde, boyutları sırasıyla 254 ve 241 nm'ye yükselmiştir. Çift eksenli liflerde ise GH yüklü lipozomların varlığı, boyutun 195 nm'den 219 nm'ye (Şekil 4.10C) yükselmesine neden olmuştur. Tüm yüklü lif formülasyonlarında, çift eksenli elektrospinning sonucu daha düşük boyutlara sahip lifler elde edilmişir. Li vd. (2023), çift eksenli

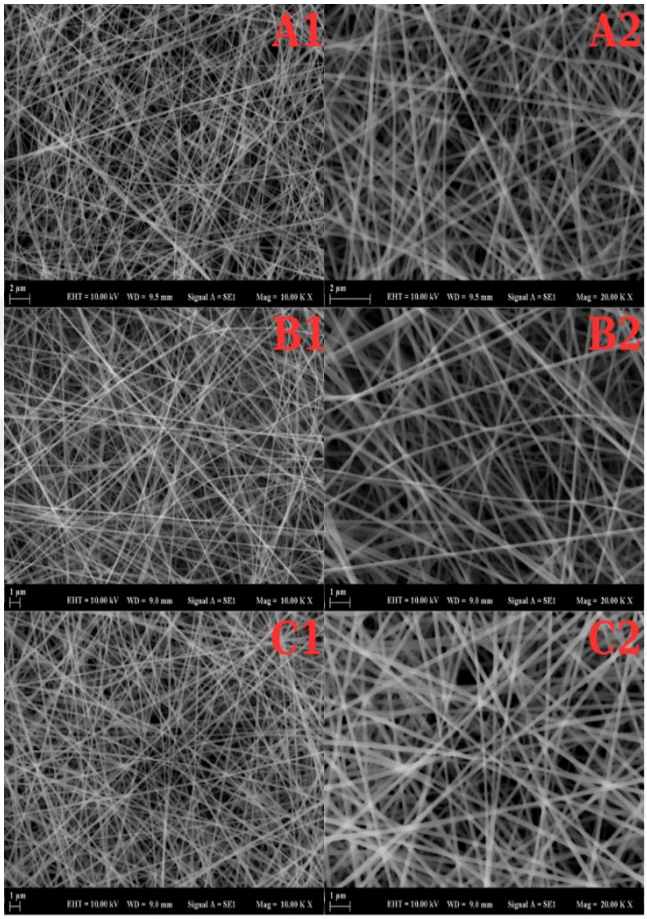
lif boyutlarındaki bu farkı, çekirdek sıvısının hızlı buharlaşmasını önleyen ve daha stabil jetlerin oluşmasına ve daha uzun uzanmasına neden olan kabuk sıvısının varlığına atfetmişlerdir. Lipozom ve polimerlerin daha önce boyandığı lipozomal GH yüklü liflerin CLSM görüntüleri Şekil 4.11'de verilmiştir. PUL/CMC polimer lifinin kırmızı iplikleri içinde bulunan lipozomlar (yeşil-sarı) küçük, dairesel veziküller olarak tanımlanabilir ve homojen bir şekilde dağılmıştır. Tek eksenli ve çift eksenli liflerin üst üste bindirilmiş CLSM görüntüleri, lipozomların gömülü olduğu lif yapılarını ispatlamaktadır (Şekil 4.11C-F). Tek eksenli liflere (Şekil 4.11A ve B) kıyasla, yeşil rengin daha az yoğunluğu (Şekil 4.11E) ve kırmızı rengin daha yüksek yoğunluğu (Şekil 4.11D), lipozomların çekirdek tarafından kabuk polimerleriyle korunmasına atfedilebilir. Bir konfokal mikroskopta, örneğin derinliği arttıkça, floresan boyanın yaydığı sinyal genellikle zayıflar ve renk yoğunluğu azalır. Üst katmanlardan geçen lazer ışığı emilir veya dağılır. Benzer şekilde, daha derin katmanlardan yayılan fluoresan sinyal, üst katmanlardan geçerken yoğunluğunda bir azalma yaşar (Pawley, 2006).



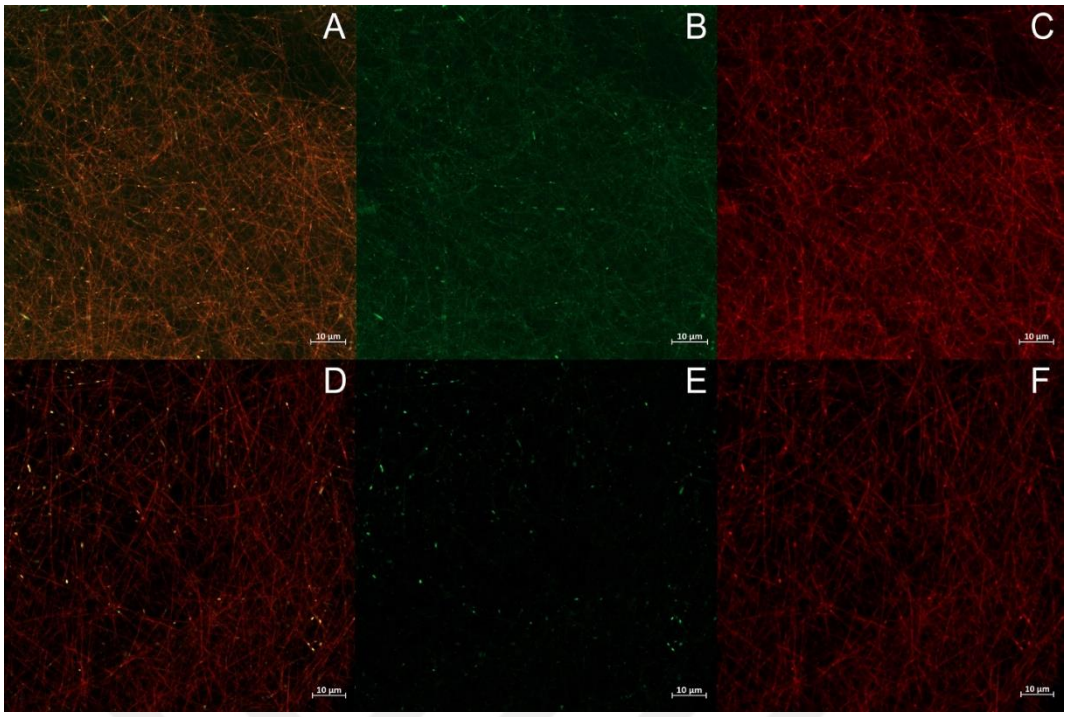
Şekil 4.9 Tek eksenli liflerin SEM görüntüleri (A1-A2: GH ve lipozom içermeyen boş lifler; B1-B2: Lipozomal GH ile yüklü lifler; C1-C2: Sadece GH ile yüklü lifler; D1-D2: Boş lipozomlarla yüklü lifler).

Tüm liflerin, GH yüklü tek eksenli lifler hariç, PUL/CMC lif ağları boyunca uniform ve kusursuz bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. GH yüklü tek eksenli liflerde ise boncuk benzeri yapılar görülmüştür (Şekil 4.9C). Elektroeğirme çözeltisinin viskozite ve iletkenliği arasındaki denge, elektrospinning sürecini bozabilir ve boncuklu lif morfolojisine neden olabilir (Feng vd., 2019). Yüklü peptitlerin (GH), PUL/CMC besleme çözeltisine eklenmesi, viskozite ve iletkenlikte değişikliklere yol açabilir. Yüksek iletkenlik nedeniyle, çözeltideki

yüklü moleküllerin varlığının pullulan nanoliflerinde boncuk oluşumunu etkilediği bildirilmiştir (Li vd., 2017). Ancak, bu etkileşimler, GH'nin polimer çözeltilerine eklenmeden önce lipozomlara kapsüllenmesi sırasında engellenmiş olabilir. Lesitin varlığı, plastikleştirici etkisi nedeniyle polimer çözeltisinin elektrospinlenebilirliğini arttırmış olabilir ve bu da daha uniform liflerin oluşumuna yol açmıştır. Bununla birlikte, GH yüklü çift eksenli liflerde GH'nin liflerin çekirdeğinde kapsüllenmesinden dolayı, bu boncuk benzeri yapılar gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.10 Çift eksenli nanoliflerin SEM görüntüleri (A1-A2: GH ve liposom içermeyen PUL/CMC nanolifleri, B1-B2: Sadece GH ile yüklenmiş PUL/CMC nanolifleri; C1-C2: Liposomal GH ile yüklenmiş PUL/CMC nanolifleri).

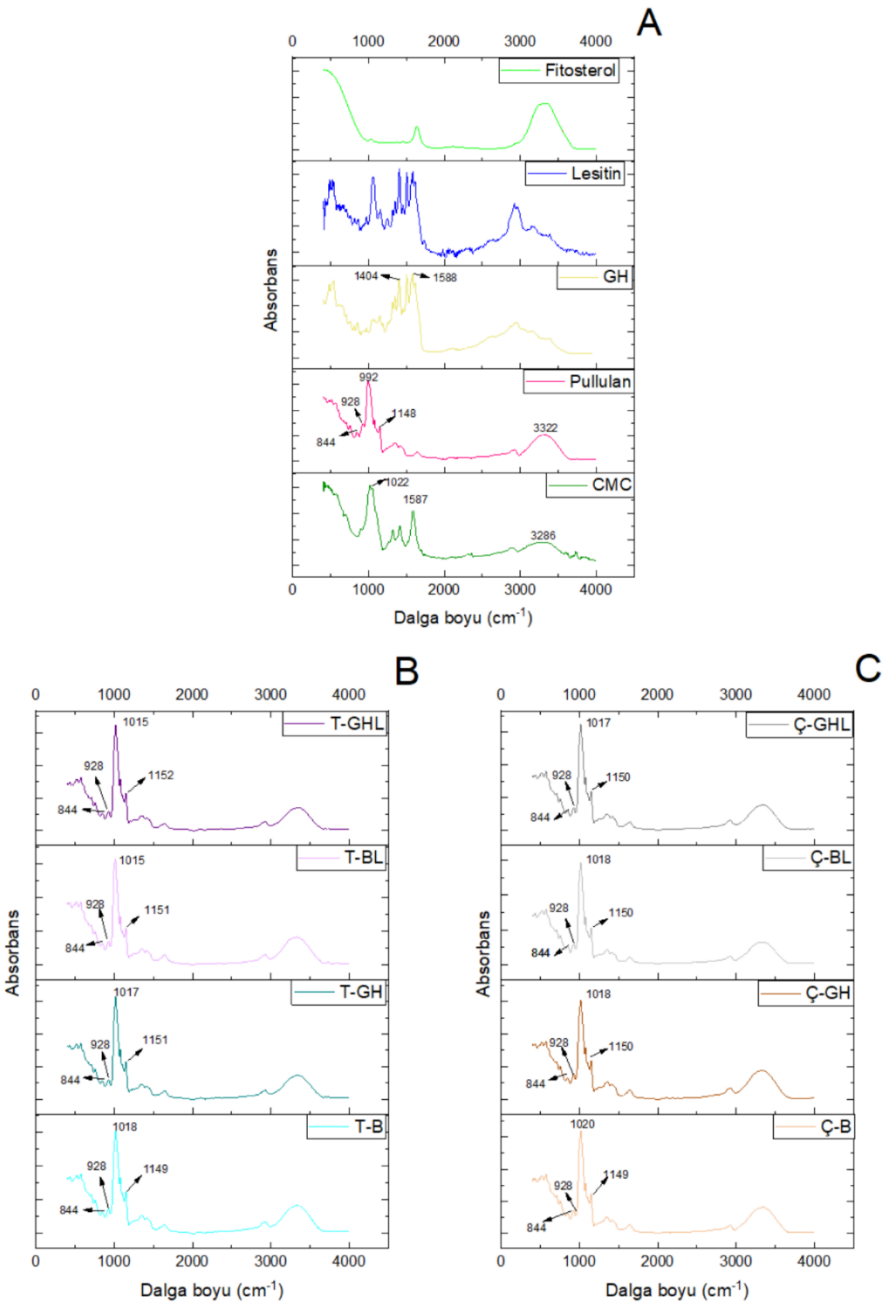


Şekil 4.11 Tek eksenli (A-C) ve koaksiyel (D-F) liposomal GH yüklü nanoliflerin konfokal lazer tarama mikroskobu görüntüleri (A, D: Nil kırmızısıyla ile boyanmış lipozomlar, B, E: Fast yeşili ile boyanmış polimerler, C, F: üst üste bindirilmiş görüntü. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla lipozomları ve polimerleri temsil etmektedir).

4.2.3.2 Nanoliflerin FT-IR spektrumları

Liflerin FT-IR spektrumu Şekil 4.12'te sunulmuştur. PUL ve CMC, 3000 - 3700 cm^{-1} (O-H gerilme titreşimi) (Xie vd., 2019), 800 - 950 cm^{-1} (α-glukopiranozid birimleri ve PUL'un α-(1,6) glikozidik bağları) (Prasad vd., 2012), 950 - 1250 cm^{-1} (C-C, C-O, C-H gerilme titreşimleri) (Lopez-Rubio vd., 2008), 1413-1600 cm^{-1} (CMC'nin COO simetrik titreşimleri) (Shao vd., 2018) aralığında karakteristik absorbans bantları sergilemiştir. GH'nin 1404 ve 1588 cm^{-1} absorpsiyon bantları arasındaki pikler, Amide II'de CN uzama ve NH bükülme titreşimlerinin varlığını göstermektedir (Aboul-Enein vd., 2014). Bu karakteristik piklerin yoğunluğu, GH yüklü liflerin absorbsiyon bantlarında önemli ölçüde azalmış veya yok olmuştur, bu da etkili bir enkapsülasyonun gerçekleştirildiğini göstermektedir (Tolun vd., 2025). CMC ve PUL karıştırılarak elde edilen T-B ve Ç-B liflerinin spektrumları, karbonhidratlara özgü birçok absorpsiyon tepe noktasında kayma göstermiştir. Örneğin, pullulanın 925 cm^{-1} ve CMC'nin 1022 cm^{-1}'deki absorpsiyon piklerinin sırasıyla T-B ve Ç-B için 1018 cm^{-1} ve 1020 cm^{-1}'e kaydığı tespit edilmiştir. Benzer

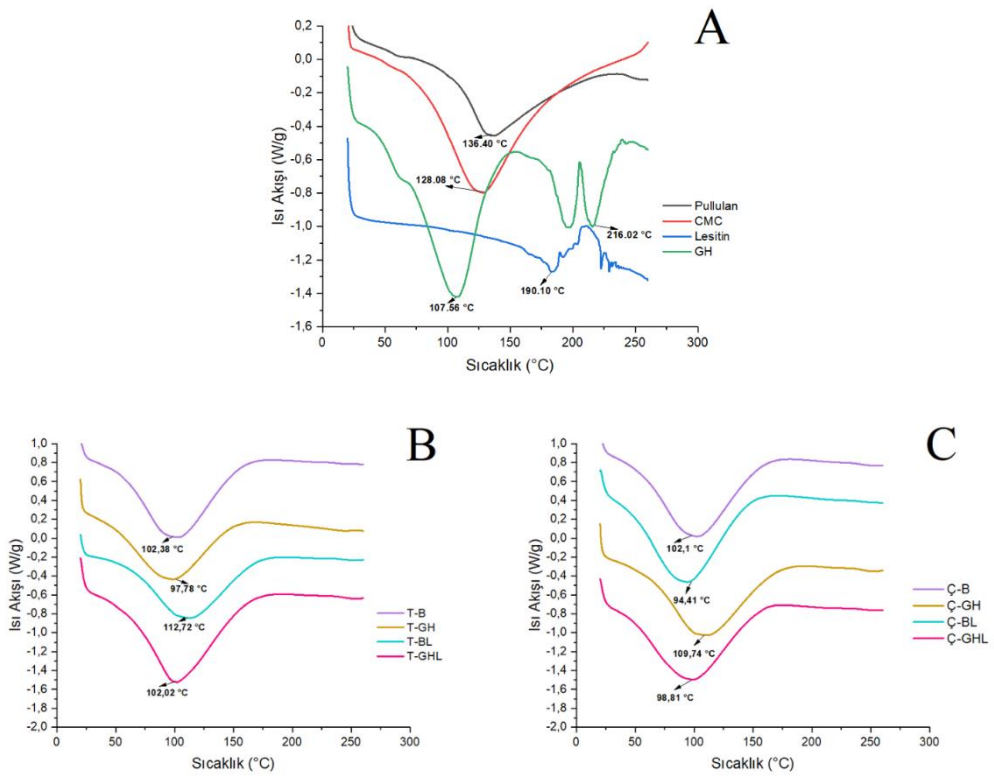
değişiklikler pullulanın 1148 cm^{-1}'deki absorpsiyon bandı içinde gözlemlenmiştir. Yüklü tüm liflerin spektrumları incelendiğinde aynı absorpsiyon piklerinde daha düşük kaymalar gözlemlenmiştir (Şekil 4.12B-C). Tüm bu değişiklikler, ilgili malzemeler arasındaki kimyasal ve fiziksel etkileşimlerdeki değişikliklere atfedilmektedir (Maciel vd., 2015).



Şekil 4.12 Pullulan, CMC, lesitin, fitosterol, GH (A); tek eksenli (B) ve çift eksenli liflerin (C) FT-IR spektrumları.

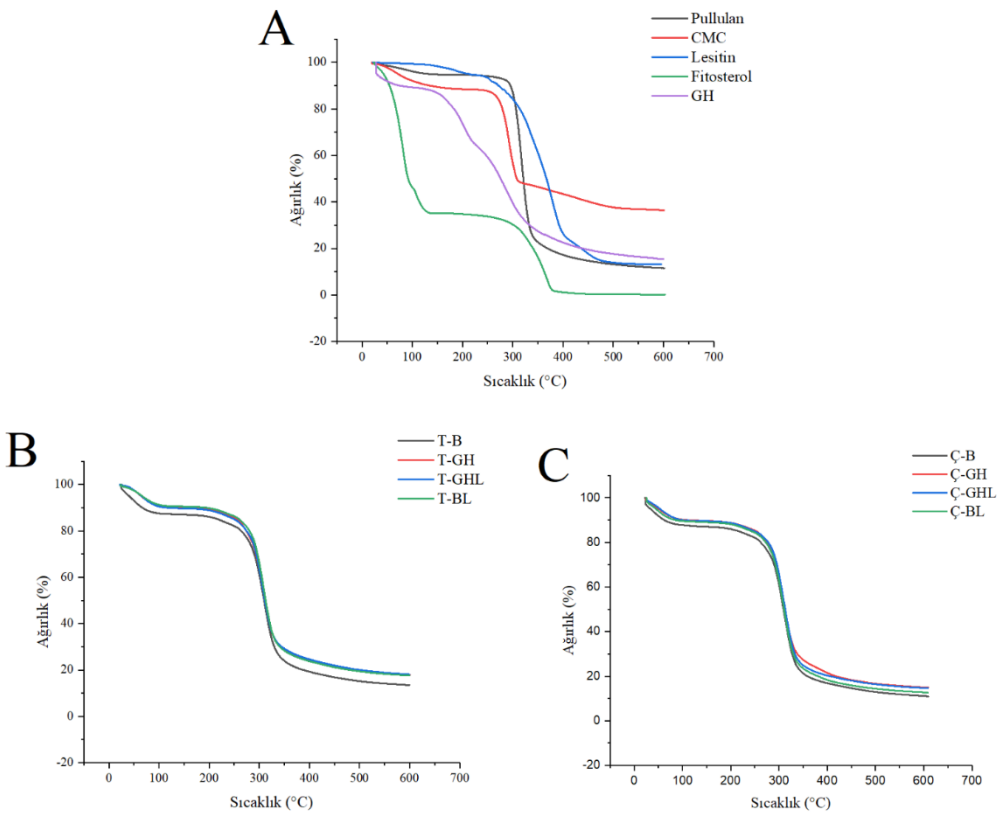
4.2.3.3 Nanoliflerin Termal Analizleri

Tüm liflerin ve bunların bileşenleri olan pullulan, CMC, lesitin ve GH'in DSC termogramları Şekil 4.13'te verilmiştir. PUL ve CMC'nin termogramları sırasıyla 136.40 ve 128.08 °C'de endotermik pikler göstermiştir. Bu pikler, bu biyopolimerlerin karışımından üretilen tek eksenli T-B ve çift eksenli Ç-B liflerinde yaklaşık 102 °C'ye kaymıştır (Şekil 4.13). Bu hareketler, CMC'nin COO^{-1} grupları ile PUL'un -OH grupları arasında hidrojen bağları gibi komplekslerinin oluşumunu göstermektedir (Tolun vd., 2025). Tek eksenli boş lifler, boş lipozomlar (T-BL) ve lipozomal-GH (T-GHL) ile yüklendiğinde, endotermik zirveler sırasıyla 112.72 ve 102.02 °C'de gözlemlenmiştir. Çift eksenli liflerde ise boş ve GH dolu lipozom yüklü liflerde 94.41 ve 98.81 °C'de tespit edilmişlerdir. Zirvelerdeki bu değişimler, suyun dehidrasyonu ve polisakaritler ile lipozomlar arasındaki moleküller arası komplekslerin ve hidrojen bağlarının oluşumu ile ilgili olabilmektedir (Shen vd., 2021).



Şekil 4.13 Pullulan, CMC, lesitin, GH (A), tek eksenli (B) ve çift eksenli liflerin (C) diferansiyel taramalı kalorimetre termogramları.

Liflerin ve bileşenlerin TGA termogramlarında ise iki ana ağırlık kaybı gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). İlk ağırlık kaybı, ~140 °C'ye kadar olan sıcaklık aralığında gerçekleşmekte ve bu, örneklerin su dehidratasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Saf pullulanın 50-140°C civarındaki ağırlık kaybı %3.69 iken, PUL/CMC tek eksenli (T-B) ve çift eksenli liflerin (Ç-B) ağırlık kayıpları sırasıyla yaklaşık %5.85 ve %4.70 olarak tespit edilmiştir. CMC'nin COO^{-1} grupları ile pullulanın -OH grupları arasında hidrojen bağlarının oluşması (Shao vd., 2018) pullulanın su tutma kapasitesinde bir azalmaya neden olmuş olabilir. Ek olarak, tek eksenli lifteki daha büyük ağırlık kaybı, çift eksenli nanoliflerle karşılaştırıldığında daha fazla bağın oluştuğunu göstermektedir. İkinci ağırlık kaybı, ~300 °C'de meydana gelen, örnek yapısının bozulmasıyla ilişkilidir. Tüm nanoliflerde gözlemlenen ana ağırlık kaybı, PUL'un bozulmasına atfedilebilir (Blanco-Padilla vd., 2015). Boş tek eksenli nanoliflerde (T-B), ana ağırlık kaybında maksimum ayrışma oranının gerçekleştiği sıcaklık 311.6 °C olarak belirlenmiş ve bu değerler T-B, GH (308.3 °C), boş lipozom (308.7 °C) ve lipozomal GH (307.1 °C) ile yüklendiğinde yaklaşık 3 °C azalmıştır. Boş çift eksenli nanoliflerde ise (Ç-B), maksimum bozulma oranı 311.3 °C'de gerçekleşmiş olup, yüklü çift eksenli nanoliflerde (sırasıyla Ç-GH, Ç-BL ve Ç-GHL için 310.4, 311.8 ve 311.1 °C) farklılık göstermemiştir. Lipozom, GH veya lipozomal GH yüklemesi, PUL/CMC nanoliflerinin termal stabilitesi üzerinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. Yaklaşık 600 °C'deki kalıntı yüzdeleri incelendiğinde, T-GHL ve Ç-GHL için sırasıyla %18.11 ve %14.76 ağırlık kayıpları belirlenmiştir. Bu değerler boş tek eksenli (T-B) (13.51%), çift eksenli (Ç-B) (11.14%), ve boş lipozomlar ile yüklü tek eksenli (T-BL) (17.65%), çift eksenli (Ç-BL) (12.80%) liflerin kalıntı yüzdelerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Lipozom veya lipozomal GH eklenmesinin nanoliflerin termal stabilitesini arttırmış olabileceği sonucuna varılmıştır (Liang ve Gao, 2023).



Şekil 4.14 Pullulan, CMC, lesitin, fitosterol, GH (A); tek eksenli (B) ve çift eksenli liflerin (C) TGA eğrileri.

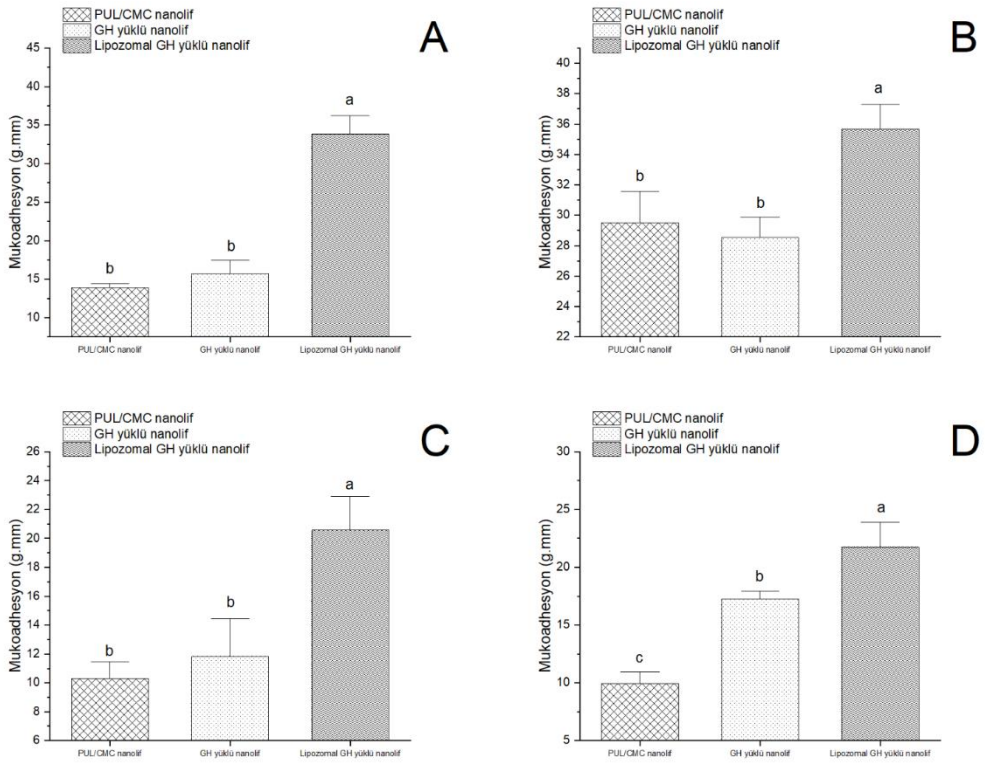
4.2.3.4 Liflerin Yükleme Kapasitesi

Nanoliflerin yükleme kapasitesi (YK), liflerdeki toplam peptit içeriğinin başlangıçtaki eklenen GH miktarına oranıyla belirlenmiştir. 1 g tek eksenli serbest GH yüklü (T-GH), lipozomal (T-GHL) ve çift eksenli lipozomal (Ç-GHL) nanoliflerde teorik hidrolizat miktarları sırasıyla 5.27 mg, 4.56 mg ve 3.39 mg olarak hesaplanmıştır. Teorik veriler, GH veya lipozomal GH içeren 1 ml polimer çözeltisinden elde edilen nanolif miktarının (mg) belirlenmesiyle elde edilmiştir. Ancak, ölçümler sonucunda sırasıyla 4.49, 3.55 ve 2.07 mg GH belirlenmiştir. Böylece, T-GH, T-GHL ve Ç-GHL için YK değerleri sırasıyla %85.22±3.15, %77.72±3.88 ve %61.04±0.82 olarak saptanmıştır. Elektrospinning ile liflerin üretimi sırasında, polimer çözeltisinin püskürtülmesi ve damlacık oluşumu gibi sistemik kayıplar meydana gelmektedir, bu çalışmada elde edilen nanoliflerin YK değerleri oldukça yüksek ve literatürle uyumlu bulunmuştur. Benzer şekilde, Kirbas ve Altay (2025), pullulan/Alginat/$CaCl_2$ liflerine tek eksenli elektrospinning ile kapsüle edilen peptit karışımının %EE değerinin %77.97 olduğunu bildirmiştir.

Ayrıca, Soto vd., (2016), nisini (10 mg/mL-20 mg/mL) nanoliflere kapsüllemek için tek eksenli elektrospinning kullanmış, liflerin EE değerlerinin %80.82 ile %95.41 arasında değiştiğini bildirmiştir. Rajanna vd., (2022) ise, pullulanın değişken konsantrasyonlarına sahip besleme çözeltilerinden üretilen nanoliflerin içine kazein kaynaklı peptitleri kapsüllemek için tek eksenli elektrospinning kullanmıştır. Liflerin EE değerlerinin %72.95 ile %86.04 arasında değiştiğini bildirmiştir.

4.2.3.5 Nanoliflerin Mukoadhesyon Özellikleri

In vitro ve *ex vivo* mukoadhezyon testlerinden elde edilen sonuçlar, liflere lipozomal GH yüklemenin, boş ve serbest GH yüklü liflere kıyasla mukoadhezyon özelliklerini artırdığını göstermiştir (Şekil 4.15). Araştırma ekibimiz tarafından gerçekleştirilen önceki çalışmalarımızda, jelatin-zein ve pullulan-pektin nanoliflerine lipozomal propolis ve lipozomal dut ekstresi yüklenmesinin de mukoadhezyonu artırdığı görülmüştür (Karakas vd., 2023; Kalintas Caglar vd., 2024). Benzer şekilde, Montero vd., (2019), lipozomal karides peptit fraksiyonunun sodyum kazeinat filmlerine yüklenmesiyle mukoadhezyonun arttığını bildirmiştir. Bu durumu, lipozomların plastikleştirici etkisi sebebiyle, polimerlerin esnekliğini ve zincir hareketliliğini arttırıp, polimerin mukus matrisindeki difüzyonunun artışına bağlamıştır. Lipozomal-GH'nin çift eksenli liflere eklenmesiyle gözlemlenen mukoadhesyon işindeki artışın, tek eksenli nanoliflerden daha düşük olduğu görülmüştür. Çift eksenli nanoliflerin lipozomları çekirdek bölgesinde hapsetmesi nedeniyle plastikleştirici etkisi tek eksenli nanolif kadar gözlemlenememiş olabilir (Şekil 4.15B).
In vitro mukoadhezyon testleri sonuçlarına göre, lipozom yüklü örnekler hariç, çift eksenli liflerin mukoadhezyon özelliklerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Çift eksenli nanoliflerin, kabuk-çekirdek yapısı nedeniyle lif yüzeylerinde CMC'nin daha homojen bir şekilde dağılmasını sağlayabilir ve bu da müsin içindeki oligosakkarit zincirleri ile CMC'nin zayıf anyonik karboksilik grupları arasında hidrojen bağı oluşumunu artırabilir. *In vitro* ve *ex-vivo* testleri arasındaki farklılıkların ise, lifler ile müsin arasındaki etkileşimlerin koyun mukozal zarına kıyasla farklı olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Brako vd., 2018).



Şekil 4.15 In vitro tek eksenli (A), çift eksenli (B), ve ex vivo tek eksenli (C), çift eksenli (D) nanoliflerin mukoadhezyonu.

4.2.4 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin in vitro simule sindirim koşullarında Stabilitelerinin Belirlenmesi

İn vitro sindirime tabi tutulan örneklerde GH'nin antioksidan aktivitesindeki değişim, $ABTS^{+}$ radikal temizleme kapasitesi ve FRAP analizinin sonuçlarıyla değerlendirilmiştir (Tablo 4.8). Sindirimden sonra, serbest GH, başlangıçtaki $ABTS^{+}$ radikal temizleme aktivitesinin %35.27'sini koruyabilmiştir. Antioksidan peptitler genellikle kısa peptitlerdir (2 - 10 kalıntı), amino asit dizisi aktivitelerinin kritik bir faktörü olarak işlev görmektedir (örneğin, histidin, triptofan, prolinin konumlandırılması) (Xiong, 2010). Sindirim sırasında, bu amino asitler farklı kombinasyonlarda parçalanır, bu da potansiyel olarak antioksidan kapasitesini azaltabilir (Gallego vd., 2020; Zhu vd., 2014). Serbest GH ile karşılaştırıldığında, kapsüllenmiş örnekler daha büyük bir stabilite göstererek, başlangıçtaki radikal temizleme aktivitelerinin sırasıyla %65.40 (T-GH), %87.18 (T-GHL) ve %87.48 (Ç-GHL) kadarını korumuştur. Blanco-Padilla vd. (2015), kurkumin yüklü amarant protein izolatı ve pullulan liflerinin ABTS kapasitesini değerlendirmiştir. Serbest kurkuminin bağırsakta %72'lik bir azalma gösterdiğini, oysa nanoliflerin yalnızca %28'lik bir kayıp yaşadığını bildirmiştir. Çalışmamızdaki FRAP testi sonuçlarına

göre, serbest GH'nin sindirimden sonra başlangıçtaki aktivitesinin %50'sinden fazlasını kaybettiği, nanolif örneklerinin ise maksimum %25 kayıp gösterdiği saptanmıştır (T-GH). Bu çalışmada önerilen tüm kapsülleme sistemleri, sindirim sırasında GH'nin antioksidan aktivitesini başarıyla korumuştur. Lipozomal liflerin ise en yüksek koruma düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.8 Nanoliflerin *in vitro* sindirim öncesi ve sonrası antioksidan aktiviteleri

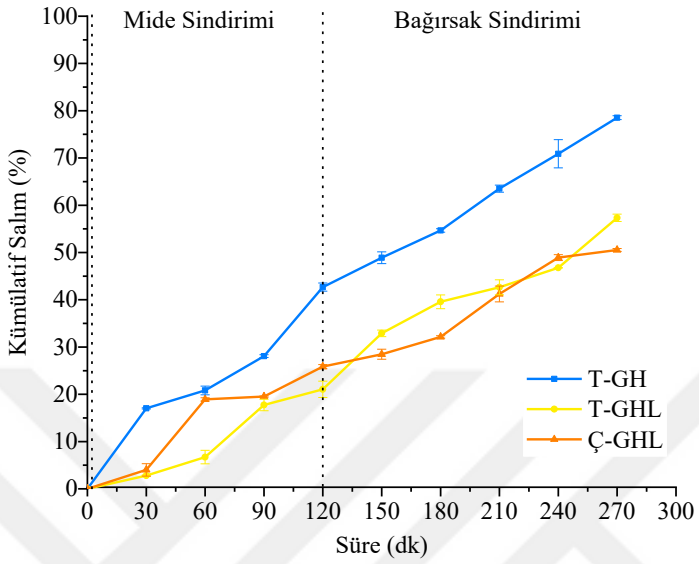
Örnek	**Sindirim Öncesi**		**Sindirim Sonrası**	
	ABTS (%)	**FRAP µg AAE/mL**	**ABTS (%)**	**FRAP µg AAE/mL**
GH	110.37±2.64 [a]	1.42±0.04 [a]	38.93±3.97 [b]	0.72±0.01 [c]
T-GH	109.58±3.26 [a]	1.45±0.03 [a]	71.65±1.28 [a]	1.10±0.02 [a]
T-GHL	86.89±6.13 [b]	0.96±0.03 [b]	75.73±3.24 [a]	0.83±0.02 [b]
Ç-GHL	30.99±0.27 [c]	0.69±0.05 [c]	27.18±1.96 [b]	0.56±0.04 [d]

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her sütundaki farklı harfler, ortalamalar arasında önemli farklılıkları temsil etmektedir ($p < 0.05$). GH: Glutenin hidrolizatı.

4.2.5 Tek Eksenli ve Çift Eksenli GH Yüklü Nanoliflerin *in vitro* simule sindirim koşullarında Salım Özelliklerinin Belirlenmesi

Tek eksenli serbest GH yüklü (T-GH), lipozomal GH yüklü (T-GHL) ve çift eksenli lipozomal GH yüklü (Ç-GHL) nanoliflerin GH salınımı Şekil 4.16'da verilmiştir. Tek eksenli serbest GH yüklü lif, mide sindirimi sırasında ilk 30 dakikada %17.03'lük hızlı bir başlangıç salınımı ortaya koymuştur. Bu durum, pullulanın yüksek su çözünürlüğüyle ilişkilendirilmiştir (Aceituno-Medina vd., 2013). Blanco-Padilla vd. (2015), amaranth protein izolatı ve pullulan karışımlarından oluşan tek eksenli liflerden kurkuminin (%14.5-28.6) ilk 10 dakikada hızlı bir şekilde serbest bırakıldığını bildirmiştir. Lipozomal nanoliflerden GH'nin salınımı (sırasıyla T-GHL için %21.05 ve Ç-GHL için %25.85), gastrik sindirim aşamasının sonunda T-GH'in (42.69%) yaklaşık yarısı kadar saptanmıştır. T-GHL liflerinin

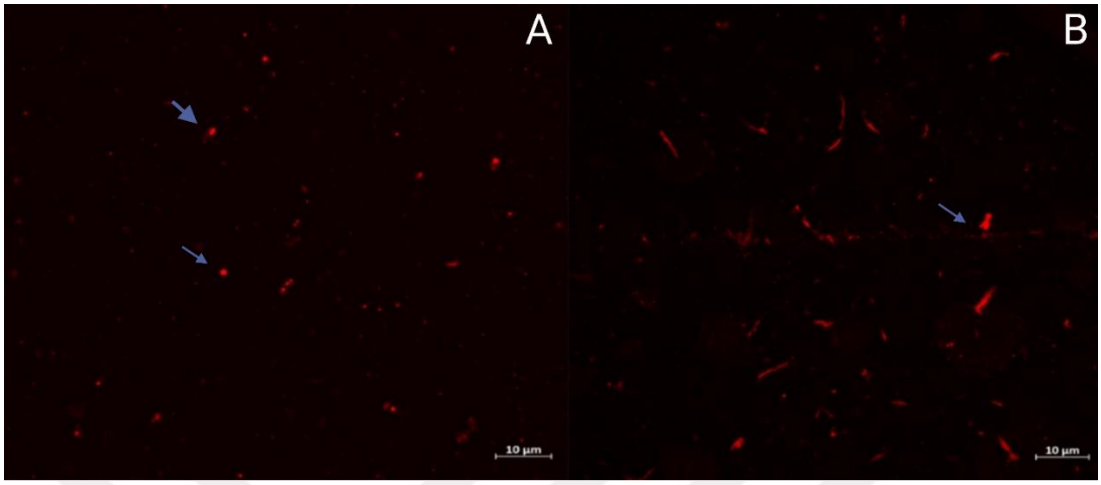
mide sindirimi konfokal mikroskop görüntüleri (Şekil 4.17), GH'in lipozomal liflerden gecikmeli salınımının kanıtı olarak lipozomların yapılarını koruduğunu göstermiştir.



Şekil 4.16 *İn vitro* sindirim testine tabi tutulan liflerden GH'nin kümülatif salınımı

Sindirim sürecinin bağırsak aşamasında, GH, T-GH lifinden başlangıçtaki içeriğinin %78.53'ü kadar salınmıştır. Aceituno-Medina vd. (2015), pullulan-amaranth protein tek eksenli liflerinden bağırsak sindirimi sırasında başlangıçtaki kuersetin ve ferulik asidin sırasıyla %82 ve %99'unun serbest bırakıldığını bildirmiştir. Öte yandan, lipozom yüklü liflerden daha düşük bir GH yüzdesi (T-GHL için %57.34 ve Ç-GHL için %50.54) salınmış olup, en düşük salınımı çift eksenli lipozomal nanolif (Ç-GHL) sergilemiştir. Mide koşullarına kıyasla, lipozomlar, safra tuzlarının fosfolipid zarına nüfuz etmesi ve fosfolipidler üzerindeki enzimatik hidroliz nedeniyle bağırsak koşullarında iyi organize olmuş yapısını koruyamamaktadır. Bu durum, T-GHL liflerinin bağırsak sindirimi konfokal mikroskop görüntülerinde gözlemlenen uzamış dikdörtgen yapılarının nedeni olabilir (Şekil 4.17). Lipozomal GH yüklü liflerde, aktif bileşen başlangıçta lipozom zarından ve ardından PUL/CMC lif matriksinden difüze olmaktadır (Li vd., 2014, Kalintas Caglar vd., 2024). Benzer olarak, Feng vd. (2019), PVA ve PEO-sodyum aljinat içeren tek ve çift eksenli liflere lipozom yüklemesinin, somon peptidinin mide ve bağırsak sıvısına ani salınımını azalttığını ve enkapsüle

sistemlerin biyolojik aktif peptitlerin veya proteinlerin sürdürülebilir salınımı için daha iyi bir tasarım sunduğunu, dolayısıyla oral biyoyararlanımı artırdığını bildirmiştir.



Şekil 4.17 Lipozomal GH yüklü liflerin mide sindiriminden sonra (A) ve bağırsak sindiriminden sonra (B) konfokal lazer taramalı mikroskobi görüntüleri.

5
SONUÇ

5.1 Karadut Ekstraktının Enkapsülasyonu

KE yüklü soya-fosfatidilkolin lipozomları, ince film hidrasyonu ve ultrasonikasyon yöntemiyle üretilmiştir. 7 dakikadan fazla ultrasonikasyon uygulamasının lipozomların yapısında olumsuz bir etkisi olduğu görülmüştür. KE yükleme miktarının artırılması (0.2–1, a/h) kapsülleme verimliliğini (%95.05-74.10) azaltmıştır. CLSM ve SEM görüntülerine göre, lipozomların, PUL/PEK nanoliflerine gömüldüğünde yapısal bütünlüğünü korunmuş olduğu ve homojen bir şekilde dağıldığı tespit edilmiştir. Boş PUL/PEK nanolifinin ortalama lif çapı (183.71 nm), liflere serbest KE (135.83 nm) ve lipozomal KE (163.09 nm) yüklenmesiyle azalmıştır. DSC ve FT-IR analizleri, lipozomal KE'nin liflere başarılı bir şekilde entegre edildiğini göstermiştir. Serbest KE ve lipozomal KE yüklemesi, PUL/PEK nanoliflerinin mukoadhezyon özelliğini arttırmıştır. Serbest KE ile karşılaştırıldığında, lipozomal KE yüklü lifler, simüle edilmiş bağırsak sindiriminden sonra tüm fenoliklerin, özellikle antosiyaninlerin *in vitro* biyoerişilebilirliğini neredeyse iki katına çıkarmıştır, fakat serbest KE yüklü lifler sadece bazı fenoliklerin biyoerişilebilirliğini düşük düzeyde arttırmıştır. Caco-2 hücreleri tarafından dört farklı antosiyaninin hücresel salınımı, KE lipozomal lifte sindirildiğinde önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (%3.9- 10.50), serbest KE ve serbest KE ile yüklü nanoliflerde ise yalnızca siyanidin 3-5 diglikozit *in vitro* biyoyararlanılabilirlik göstermiştir. Lipozomal nanoliflerin, özellikle antosiyaninler olmak üzere fenolik bileşenlerin ağız yoluyla taşınımı için büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2 Glutenin Hidrolizatının Enkapsülasyonu

GH yüklü soya-fosfatidilkolin lipozomları, ince film hidrasyonu ve ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak farklı oranlarda fitosterol eklenerek üretilmiştir. Fitosterolün belirli bir oranda eklenmesi (lesitin:fitoesterol, 1:0.5, a/a) lipozomların kapsülleme verimliliğini %17.46±1.37'den %66.09±1.21'e çıkarmıştır. GH yüklemesi arttıkça (5 mg/mL-10 mg/mL), kapsülleme verimliliğinin azaldığı görülmüştür (%66.09-32.02). Lipozomlar, CLSM ve SEM görüntülerine göre, nanoliflerin içerisinde bütünlüklerini koruyarak homojen bir dağılım göstermiştir. Boş tek eksenli nanolifin (188 nm) ve çift eksenli nanolifin (195 nm) ortalama lif çapları, tek eksenli (241 nm) ve çift eksenli liflere (219 nm) lipozomal GH yüklenmesiyle artmıştır. Çift eksenli elektroeğirme yöntemi, tüm yüklü lif formülasyonlarında lif boyutlarını azaltmıştır. DSC, TGA ve FT-IR değerlendirmeleri, lipozomal GH'nin liflere etkili bir şekilde entegre olduğunu göstermiştir. Lipozomal GH'nin eklenmesi, tüm nanoliflerin mukoadhezyon özelliklerini iyileştirmiştir. *In vitro* sindirim sonuçları, bu çalışmada kullanılan kapsülleme yöntemlerinin sindirim sırasında GH'nin antioksidan aktivitesini etkili bir şekilde koruduğunu, lipozomal liflerin ise artırılmış koruma sağladığını göstermiştir. Lipozomal nanolifler, mide ve bağırsak sindirimi sırasında daha düşük düzeyde salım yapmış, en düşük miktar lipozomal çift eksenli nanoliflerde (%50.54) gözlemlenirken, bu değeri lipozomal tek eksenli (%57.34) ve serbest GH yüklü tek eksenli nanoliflerin (%78.53) salım oranları takip etmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, lipozomları nanoliflere yerleştirmenin, hassas gıda kaynaklı biyoaktif bileşenler için yenilebilir film takviyeleri geliştirmek amacıyla yeni bir dağıtım yöntemi sağlayabileceğini göstermiştir.

İleriki çalışmalarda, tasarlanan lipozomal nanoliflerin karmaşık biyolojik sistemlerdeki biyoyararlanımını ve biyouyumluluğunu daha iyi değerlendirebilmek amacıyla, *in vivo* hayvan ve insan çalışmalarına yer verilebilir. Ek olarak, nanoliflerin eldesinde kullanılan pullulanın lif kalitesine yüksek oranda katkısı olmasına rağmen, suda hızlıca çözünebilen bir polisakkarit olması taşıma sistemlerinde tek başına kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda pullulanın bu negatif özelliği nanoliflerin, PEK, CMC ve lipozom içermesi sebebiyle giderilmiş olup, kullanım potansiyeli arttırılmış olsada, pullulanın çapraz bağ ajanlarıyla fiziksel özelliklerinin geliştirilip nanolif üretme kapasitesinin karakterize edilmesi tasarlanabilecek yeni taşıma sistemleri için önem arz edebilir.

KAYNAKÇA

AACC International. (2010). *AACC International approved methods of analysis (11th ed.)*. AACC Method 26-70.01.

Aboul-Enein, A. M., Shanab, S. M., Shalaby, E. A., Zahran, M. M., Lightfoot, D. A., & El-Shemy, H. A. (2014). Cytotoxic and antioxidant properties of active principals isolated from water hyacinth against four cancer cells lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 14*(1), 1–11.

Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2013). Development and characterization of food-grade electrospun fibers from amaranth protein and pullulan blends. *Food Research International, 54*(1), 667–674.

Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *Journal of Functional Foods, 12*, 332–341.

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins.* Elsevier Applied Science Publishers.

Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q., & Jinghua, C. (2019). Liposome: Composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting, 27*(7), 742–761.

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters, 8*, 102.

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.

Alexander, M., Lopez, A. A., Fang, Y., & Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT - Food Science and Technology*, *47*(2), 427–436.

Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology, 227*(3), 881–887.

Alvarez-Hernandez, X., Nichols, G. M., & Glass, J. (1991). Caco-2 cell line: A system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1070*(1), 205–208.

Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides. *Molecules, 25*(19), 4479.

Andrews, G. P., Laverty, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 71*(3), 505–518.

Ao, J., & Li, B. (2013). Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion in vitro: Charge properties of peptides affect digestive stability. *Food Research International, 52*(1), 334–341.

Arhewoh, I. M., Ahonkhai, E. I., & Okhamafe, A. O. (2005). Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides. *African Journal of Biotechnology, 4*(13), 1591–1597.

Bae, S. H., & Suh, H. J. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT - Food Science and Technology, 40*(6), 955–962.

Bangham, A., Standish, M. M., & Watkins, J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology, 13*(1), 238–252.

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.

Bhatia, A., Kumar, R., & Katare, O. P. (2004). Tamoxifen in topical liposomes: Development, characterization and in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7*(2), 252–259.

Blanco-Padilla, A., López-Rubio, A., Loarca-Piña, G., Gómez-Mascaraque, L. G., & Mendoza, S. (2015). Characterization, release and antioxidant activity of curcumin-loaded amaranth-pullulan electrospun fibers. *LWT - Food Science and Technology, 63*(2), 1137–1144.

Bora, A. F. M., Ma, S., Li, X., & Liu, L. (2018). Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances. *Food Research International, 105*, 241–249.

Bozkurt, F., Bekiroglu, H., Dogan, K., Karasu, S., & Sagdic, O. (2021). Technological and bioactive properties of wheat glutenin hydrolysates prepared with various commercial proteases. *LWT, 147*, 111787.

Brako, F., Thorogate, R., Mahalingam, S., & Nivison-Smith, L. (2019). Physicochemical and antioxidant properties of peptides derived from marine sources. *Marine Drugs, 17*(2), 95.

Bryła, A., Lewandowicz, G., & Juzwa, W. (2015). Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering, 167*, 189–195.

Bucić-Kojić, A., Fernandes, F., Silva, T., Planinić, M., Tišma, M., Šelo, G., Šibalić, D., & Andrade, P. B. (2020). Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. *Food & Function, 11*(1), 680–688.

Catalkaya, G., Guldiken, B., & Capanoglu, E. (2022). Encapsulation of anthocyanin-rich extract from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace by spray drying using different coating materials. *Food & Function, 13*(22), 11579–11591.

Chakka, A. K., Elias, M., Jini, R., Sakhare, P. Z., & Bhaskar, N. (2015). In-vitro antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology, 52*(12), 8059–8067.

Chang, C. H., Chung, C. H., Tu, Y. S., Tsai, C. C., Hsu, C. C., Peng, H. C., & Huang, T. F. (2017). Trowaglerix venom polypeptides as a novel antithrombotic agent by targeting immunoglobulin-like domains of glycoprotein VI in platelet. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 37*(7), 1307–1314.

Chatterjee, B., Amalina, N., Sengupta, P., & Mandal, U. K. (2017). Mucoadhesive polymers and their mode of action: A recent update. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7*(5), 195–203.

Chen, C., Han, D., Cai, C., & Tang, X. (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release, 142*(3), 299–311.

Chen, L., Zhao, H., Zi, Y., & Zhang, Y. (2021). Fabrication, characterization, and in vitro digestion of bamboo leaf extract loaded liposomes. *Food Structure, 30*, 100238.

Chen, M., & Li, B. (2012). The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 16*, 341–348.

Chen, W., Wang, D., Wang, L., Bei, D., Wang, J., See, W. A., Mallery, S. R., Stoner, G. D., & Liu, Z. (2012). Pharmacokinetics of protocatechuic acid in mouse and its quantification in human plasma using LC-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, 908*, 39–44.

Chi, J., Ge, J., Yue, X., Liang, J., Sun, Y., Gao, X., & Yue, P. (2019). Preparation of nanoliposomal carriers to improve the stability of anthocyanins. *LWT, 109*, 101–107.

Corrêa, A. P. F., Bertolini, D., Lopes, N. A., Veras, F. F., Gregory, G., & Brandelli, A. (2019). Characterization of nanoliposomes containing bioactive peptides obtained from sheep whey hydrolysates. *LWT, 101*, 107–112.

Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, S. M. M., Segalin, J., & Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides, 61*, 48–55.

Cui, H., Bai, M., Li, C., Liu, R., & Lin, L. (2018). Fabrication of chitosan nanofibers containing tea tree oil liposomes against *Salmonella* spp. in chicken. *LWT, 96*, 671–678.

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.

Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry, 109*(1), 144–148.

Czelej, M., Garbacz, K., Czernecki, T., Wawrzykowski, J., & Waśko, A. (2022). Protein hydrolysates derived from animals and plants—A review of production methods and antioxidant activity. *Foods, 11*(13), 1953.

da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., El Halal, S. L. M., da Rocha, M., Colussi, R., de Assis, L. M., de Oliveira, R. P., & Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT - Food Science and Technology, 59*(2), 841–848.

De Ferrars, R. M., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N. P., Kroon, P. A., Cassidy, A., & Kay, C. D. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology, 171*(13), 3268–3282.

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.

Elmacı, Y., & Altuğ, T. (2002). Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 82*(6), 632–635.

Ercisli, S., & Orhan, E. (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry, 103*(4), 1380–1384.

Evcin, A., Ersoy, B., & Bezir, N. Ç. (2019). Elektroeğirme yöntemiyle Ag katkılı karbon nanoliflerin sentezi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8*, 88–97.

Fang, J. (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Reviews, 46*(4), 508–520.

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—A review. *Trends in Food Science & Technology, 21*(10), 510–523.

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.

Fernández-Musoles, R., Salom, J. B., Castelló-Ruiz, M., del Mar Contreras, M., Recio, I., & Manzanares, P. (2013). Bioavailability of antihypertensive lactoferricin B-derived peptides: Transepithelial transport and resistance to intestinal and plasma peptidases. *International Dairy Journal, 32*(2), 169–174.

Fishman, M. L., Chau, H. K., Hoagland, P., & Ayyad, K. (2000). Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. *Carbohydrate Research, 323*(1–4), 126–138.

Gallego, M., Mauri, L., Aristoy, M. C., Toldrá, F., & Mora, L. (2020). Antioxidant peptides profile in dry-cured ham as affected by gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods, 69*, 103956.

Gayoso, L., Claerbout, A. S., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2016). Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the in vitro gastrointestinal digestion models. *Journal of Functional Foods, 26*, 428–438.

Ge, Y., Tang, J., Fu, H., Fu, Y., & Wu, Y. (2019). Characteristics, controlled-release and antimicrobial properties of tea tree oil liposomes-incorporated chitosan-based electrospun nanofiber mats. *Fibers and Polymers, 20*(4), 698–708.

Ghanbarzadeh, S., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2013). Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *BioImpacts, 3*(2), 75–81.

Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids, 51*, 227–240.

Giaconia, M. A., Ramos, S. dos P., Neves, B. V., Almeida, L., Costa-Lotufo, L., de Rosso, V. V., & Braga, A. R. C. (2022). Nanofibers of Jussara Pulp: A tool to prevent the loss of thermal stability and the antioxidant activity of anthocyanins after simulated digestion. *Processes, 10*(11), 2343.

Gibis, M., Rahn, N., & Weiss, J. (2013). Physical and oxidative stability of uncoated and chitosan-coated liposomes containing grape seed extract. *Pharmaceutics, 5*(3), 421–433.

Gibis, M., Zeeb, B., & Weiss, J. (2014). Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids, 38*, 28–39.

Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 88*(3), 381–389.

Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Hasan, F. M., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International, 52*(1), 315–322.

Gokce, Y., Cengiz, B., Yildiz, N., Calimli, A., & Aktas, Z. (2014). Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 462*, 75–81.

Gong, K. J., Shi, A. M., Liu, H. Z., Liu, L., Hu, H., Yang, Y., Wang, Q., & Li, Y. (2016). Preparation of nanoliposome loaded with peanut peptide fraction: Stability and bioavailability. *Food & Function, 7*(4), 2034–2042.

Gonzales, G. B., Smagghe, G., Grootaert, C., Zotti, M., Raes, K., & Van Camp, J. (2015). Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: A sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Reviews, 47*(2), 175–190.

Guldiken, B., Gibis, M., Boyacioglu, D., Capanoglu, E., & Weiss, J. (2017). Impact of liposomal encapsulation on degradation of anthocyanins of black carrot extract by adding ascorbic acid. *Food & Function, 8*(3), 1085–1093.

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 bioaccessibility studies. *Food Chemistry, 201*, 205–212.

Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J. F., Jabbari, E., Linder, M., & Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics, 461*(1–2), 519–528.

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.

Hassimotto, N. M. A., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2008). Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutrition Research, 28*(3), 198–207.

He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods, 5*(1), 219–227.

Herrera-Balandrano, D. D., Wang, J., Chai, Z., Zhang, X., Wang, J., Wang, N., & Huang, W. (2023). Impact of in vitro gastrointestinal digestion on rabbiteye blueberry anthocyanins and their absorption efficiency in Caco-2 cells. *Food Bioscience, 52*, 102424.

Heymich, M. L., Friedlein, U., Trollmann, M., Schwaiger, K., Böckmann, R. A., & Pischetsrieder, M. (2021). Generation of antimicrobial peptides Leg1 and Leg2 from chickpea storage protein, active against food spoilage bacteria and foodborne pathogens. *Food Chemistry, 347*, 128917.

Hosseini, S. F., Ramezanzade, L., & Nikkhah, M. (2017). Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *International Journal of Biological Macromolecules, 105*, 1455–1463.

Huo, J., Ni, Y., Li, D., Qiao, J., Huang, D., Sui, X., & Zhang, Y. (2023). Comprehensive structural analysis of polyphenols and their enzymatic inhibition activities and antioxidant capacity of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Food Chemistry, 427*, 136605.

Ibrahim, M. A., Bester, M. J., Neitz, A. W., & Gaspar, A. R. (2018). Structural properties of bioactive peptides with α-glucosidase inhibitory activity. *Chemical Biology and Drug Design, 91*(2), 370–379.

Isik, B. S., Altay, F., & Capanoglu, E. (2018). The uniaxial and coaxial encapsulations of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) concentrate by electrospinning and their in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry, 265*, 260–273.

İpek, M., Pirlak, L., & Kafkas, S. (2012). Molecular characterization of mulberry (*Morus* spp.) genotypes via RAPD and ISSR. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 92*(8), 1633–1637.

Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry, 42*(5), 840–846.

Jeon, Y. O., Lee, J. S., & Lee, H. G. (2016). Improving solubility, stability, and cellular uptake of resveratrol by nanoencapsulation with chitosan and γ-poly (glutamic acid). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 147*, 224–233.

Jiang, L., Wang, C., Zhao, F., Li, S., Sun, D., Ma, Q., Yu, Z., Zhang, B., Liu, Y., & Jiang, W. (2024). Development of electrospun nanofiber films based on pullulan/polyvinyl alcohol incorporating bayberry pomace anthocyanin extract for aquatic products freshness monitoring. *Food Bioscience, 58*, 103717.

Jiao, X., Li, B., Zhang, Q., Gao, N., Zhang, X., & Meng, X. (2018). Effect of in vitro-simulated gastrointestinal digestion on the stability and antioxidant activity of blueberry polyphenols and their cellular antioxidant activity towards HepG2 cells. *International Journal of Food Science & Technology, 53*(1), 61–71.

Jin, Q., Yang, J., Ma, L., Cai, J., & Li, J. (2015). Comparison of polyphenol profile and inhibitory activities against oxidation and α-glucosidase in mulberry (*Genus Morus*) cultivars from China. *Journal of Food Science, 80*(11), C2440–C2451.

Jøraholmen, M. W., Basnet, P., Tostrup, M. J., Moueffaq, S., & Škalko-Basnet, N. (2019). Localized therapy of vaginal infections and inflammation: Liposomes-in-hydrogel delivery system for polyphenols. *Pharmaceutics, 11*(2), 53.

Jovanović, A. A., Balanč, B. D., Ota, A., Ahlin Grabnar, P., Djordjević, V. B., Šavikin, K. P., Bugarski, B. M., & Poklar Ulrih, N. (2018). Comparative effects of cholesterol and β-sitosterol on the liposome membrane characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology, 120*(9), 1800039.

Kalintas Caglar, N., Saroglu, O., Karakas, C. Y., Tasci, C. O., Catalkaya, G., Yildirim, R. M., & Karadag, A. (2024). Liposomal black mulberry extract loaded-nanofibers: Preparation, characterisation, and bioaccessibility of phenolics by simulated in vitro digestion combined with the Caco-2 cell model. *International Journal of Food Science and Technology, 59*(12), 9298–9309.

Kamdem, J. P., & Tsopmo, A. (2019). Reactivity of peptides within the food matrix. *Journal of Food Biochemistry, 43*(1), e12489.

Kamiloglu, S., & Capanoglu, E. (2013). Investigating the in vitro bioaccessibility of polyphenols in fresh and sun-dried figs (*Ficus carica* L.). *International Journal of Food Science & Technology, 48*(12), 2621–2629.

Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C., & van Camp, J. (2015). Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells—A review. *International Journal of Molecular Sciences, 16*(9), 21555–21574.

Kamiloglu, S., Serali, O., Unal, N., & Capanoglu, E. (2013). Antioxidant activity and polyphenol composition of black mulberry (*Morus nigra* L.) products. *Journal of Berry Research, 3*(1), 41–51.

Karadag, A., Ozkan, K., & Sagdic, O. (2024). Development of microencapsulated grape juice powders using black 'Isabel' grape peel pectin and application in jelly formulation with enhanced in vitro bioaccessibility of anthocyanins. *Journal of Food Science, 89*(4), 2067–2083.

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., 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.

Kaur, J., Kumar, V., Sharma, K., Kaur, S., Gat, Y., Goyal, A., & Tanwar, B. (2020). Opioid peptides: An overview of functional significance. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 26*(1), 33–41.

Kehinde, B. A., & Sharma, P. (2020). Recently isolated antidiabetic hydrolysates and peptides from multiple food sources: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60*(2), 322–340.

Khalifa, I., Zhu, W., Li, K. K., & Li, C. M. (2018). Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: Compositions, metabolism, health benefits, and stability—A structural review. *Journal of Functional Foods, 40*, 28–43.

Kim, I., Moon, J. K., Hur, S. J., & Lee, J. (2020). Structural changes in mulberry (*Morus Microphylla*. Buckl) and chokeberry (*Aronia melanocarpa*) anthocyanins during simulated in vitro human digestion. *Food Chemistry, 318*, 126449.

Kirbas, Z., & Altay, F. (2025). Uniaxial electrospinning encapsulation of bioactive peptides into green nanofibers containing pullulan-alginate-CaCl2. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 31*(2), 1–11.

Koshani, R., & Jafari, S. M. (2019). Ultrasound-assisted preparation of different nanocarriers loaded with food bioactive ingredients. *Advances in Colloid and Interface Science, 270*, 123–146.

Kostić, D. A., Dimitrijević, D. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Stojanović, G. S., & Živanović, A. V. (2013). Phenolic content and antioxidant activities of fruit extracts of *Morus nigra* L (Moraceae) from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 12*(1), 105–110.

Kuntz, S., Asseburg, H., Dold, S., Römpp, A., Fröhling, B., Kunz, C., & Rudloff, S. (2015). Inhibition of low-grade inflammation by anthocyanins from grape extract in an in vitro epithelial-endothelial co-culture model. *Food & Function, 6*(4), 1136–1149.

Lavanya, M., Jeyakumar, S., Veerappa, V. G., Pushpadhas, H. A., Ramesha, K. P., Kumaresan, A., & Emerald, F. M. E. (2024). Fabrication and characterization

of progesterone loaded pullulan nanofibers for controlled release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 91*, 105193.

Leathers, T. D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology, 62*(5–6), 468–473.

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, C., Wei, Y. S., Wen, P., Feng, K., Zong, M. H., & Wu, H. (2018). Preparation and characterization of an electrospun colon-specific delivery system for salmon calcitonin. *RSC Advances, 8*(18), 9762–9769.

Li, F., Chen, G., & Fu, X. (2016). Comparison of effect of gear juicer and colloid mill on microstructure, polyphenols profile, and bioactivities of mulberry (*Morus indica* L.). *Food and Bioprocess Technology, 9*(7), 1233–1245.

Li, R., Tomasula, P., De Sousa, A. M. M., Liu, S. C., Tunick, M., Liu, K., & Liu, L. (2017). Electrospinning pullulan fibers from salt solutions. *Polymers, 9*(1), 32.

Li, S. F., Wu, J. H., Hu, T. G., & Wu, H. (2023). Encapsulation of quercetin into zein-ethyl cellulose coaxial nanofibers: Preparation, characterization and its anticancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules, 248*, 125797.

Li, X., Liu, Y., Huang, Y., Wang, F., Feng, X., Zhu, B., Ramalingam, M., & Wang, Y. (2023). Preparation and characterization of edible pullulan/pectin nanofiber substrates and their digestion in simulated gastric and intestinal fluids. *Industrial Crops and Products, 206*, 117745.

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 and Nutrition, 8*(7), 3099–3109.

Li, Y. W., & Li, B. (2013). Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology, 318*, 29–43.

Li, Z., Kang, H., Che, N., Liu, Z., Li, P., Li, W., & Huang, Y. (2014a). Controlled release of liposome-encapsulated Naproxen from core-sheath electrospun nanofibers. *Carbohydrate Polymers, 111*, 18–24.

Li, Z., Kang, H., Li, Q., Che, N., Liu, Z., Li, P., & Huang, Y. (2014b). Ultrathin core–sheath fibers for liposome stabilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 122*, 630–637.

Li, Z., Paulson, A. T., & Gill, T. A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods, 19*, 733–743.

Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G., & Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International, 46*(1), 76–82.

Liang, Q., & Gao, Q. (2023). Effect of amylose content on the preparation for carboxymethyl starch/pullulan electrospun nanofibers and their properties as encapsulants of thymol. *Food Hydrocolloids, 136*, 108250.

Liu, S.-C., Li, R., Tomasula, P. M., Sousa, A. M. M., & Liu, L. (2016). Electrospun food-grade ultrafine fibers from pectin and pullulan blends. *Food and Nutrition Sciences, 7*(7), 636–646.

Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J., & Singh, H. (2015). Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chemistry, 175*, 16–24.

Liu, Y., Zhang, D., Wu, Y., Wang, D., Wei, Y., Wu, J., & Ji, B. (2014). Stability and absorption of anthocyanins from blueberries subjected to a simulated digestion process. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 65*(4), 440–448.

Lopez-Rubio, A., Flanagan, B. M., Shrestha, A. K., Gidley, M. J., & Gilbert, E. P. (2008). Molecular rearrangement of starch during in vitro digestion: Toward a better understanding of enzyme resistant starch formation in processed starches. *Biomacromolecules, 9*(7), 1951–1958.

Lu, Q., Lu, P. M., Piao, J. H., Xu, X. L., Chen, J., Zhu, L., & Jiang, J. G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT - Food Science and Technology, 57*(2), 686–695.

Lundquist, P., & Artursson, P. (2016). Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews, 106*, 256–276.

Maciel, V. B. V., Yoshida, C. M., & Franco, T. T. (2015). Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator. *Carbohydrate Polymers, 132*, 537–545.

Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirolomoom, A., Geny, D., & Linder, M. (2013). Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie, 95*(11), 2018–2033.

Maqsoudlou, A., Assadpour, E., Mohebodini, H., & Jafari, S. M. (2020). Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers. *Advances in Colloid and Interface Science, 278*, 102122.

Mazloomi, S. N., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M., & Houshmand, G. (2020). Physicochemical properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with orange seed protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering, 280*, 109976.

Megías, C., Pedroche, J., del Mar Yust, M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., & Vioque, J. (2009). Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. *LWT - Food Science and Technology, 42*(9), 1496–1500.

Memete, A. R., Miere, F., Laslo, V., Purcarea, C., Vicas, L., Ganea, M., Antonescu, A., & Vicas, S. I. (2023). An in vitro study of the healing potential of black mulberry (*Morus nigra* L.) extract in a liposomal formulation. *Applied Sciences, 13*(2), 1041.

Mendes, A. C., Stephansen, K., & Chronakis, I. S. (2017). Electrospinning of food proteins and polysaccharides. *Food Hydrocolloids, 68*, 53–68.

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., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., MacKie, A., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function, 5*(6), 1113–1124.

Miralles, B., Amigo, L., & Recio, I. (2018). Critical review and perspectives on food-derived antihypertensive peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66*(36), 9384–9390.

Moghe, A. K., & Gupta, B. S. (2008). Co-axial electrospinning for nanofiber structures: Preparation and applications. *Polymer Reviews, 48*(2), 353–377.

Mohammadi, M., Hamishehkar, H., McClements, D. J., Shahvalizadeh, R., & Barri, A. (2023). Encapsulation of Spirulina protein hydrolysates in liposomes: Impact on antioxidant activity and gastrointestinal behavior. *Food Chemistry, 400*, 133973.

Mohan, A., McClements, D. J., & Udenigwe, C. C. (2016). Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chemistry, 213*, 143–148.

Mohan, A., Rajendran, S. R., Thibodeau, J., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2018). Liposome encapsulation of anionic and cationic whey peptides: Influence of peptide net charge on properties of the nanovesicles. *LWT, 87*, 40–46.

Montero, P., Mosquera, M., Marín-Peñalver, D., Alemán, A., Martínez-Álvarez, Ó., & Gómez-Guillén, M. C. (2019). Changes in structural integrity of sodium caseinate films by the addition of nanoliposomes encapsulating an active shrimp peptide fraction. *Journal of Food Engineering, 244*, 47–54.

Moreno, J. A. S., Mendes, A. C., Stephansen, K., Engwer, C., Goycoolea, F. M., Boisen, A., Nielsen, L. H., & 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. *Methods in Molecular Biology, 79*, 179–183.

Mosquera, M., Giménez, B., da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., & Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry, 156*, 144–150.

Mosquera, M., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2016). Incorporation of liposomes containing squid tunic ACE-inhibitory peptides into fish gelatin. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 96*(3), 769–776.

Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition, 47*(4), 171–182.

Muhidinov, Z. K., Kasimova, G. F., Bobokalonov, D. T., Khalikov, D. K., Teshaev, K. I., & Khalikova, M. D. (2010). Pectin/zein microspheres as a sustained drug delivery system. *Chemical Pharmaceutical Journal, 44*(1), 20–24.

Nielsen, I. L. F., Dragsted, L. O., Ravn-haren, G., Freese, R., & Rasmussen, S. E. (2003). Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(9), 2813–2820.

Noruzi, M. (2016). Electrospun nanofibres in agriculture and the food industry: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 96*(14), 4663–4678.

Ozrenk, K., Gazioglu, S. R. I., Erdinc, C., Guleryuz, M., & Aykanat, A. (2010). Molecular characterization of mulberry germplasm from Eastern Anatolia. *African Journal of Biotechnology, 9*(1), 1–8.

Park, S. J., Choi, S. G., Davaa, E., & Park, J. S. (2011). Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. *International Journal of Pharmaceutics, 415*(1–2), 267–272.

Pawlowska, A. M., Oleszek, W., & Braca, A. (2008). Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(9), 3377–3380.

Peanparkdee, M., & Iwamoto, S. (2020). Encapsulation for improving in vitro gastrointestinal digestion of plant polyphenols and their applications in food products. *Food Reviews International, 36*(1), 1–19.

Pérez-Masiá, R., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2014). Development and optimization of novel encapsulation structures of interest in functional foods through electrospraying. *Food and Bioprocess Technology, 7*(11), 3236–3245

Picariello, G., Iacomino, G., Mamone, G., Ferranti, P., Fierro, O., Gianfrani, C., & Addeo, F. (2013). Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from in vitro digestion of bovine milk proteins. *Food Chemistry, 139*(1–4), 203–212.

Pires, F., Santos, J. F., Bitoque, D., Silva, G. A., Marletta, A., Nunes, V. A., & Raposo, M. (2019). Polycaprolactone/gelatin nanofiber membranes containing EGCG-loaded liposomes and their potential use for skin regeneration. *ACS Applied Bio Materials, 2*(11), 4790–4800.

Prajapati, V. D., Jani, G. K., & Khanda, S. M. (2013). Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers, 95*(1), 540–549.

Prasad, P., Guru, G. S., Shivakumar, H. R., & Sheshappa Rai, K. (2012). Investigation on miscibility of sodium alginate/pullulan blends. *Journal of Polymers and the Environment, 20*(3), 887–893.

Prezotti, F. G., Siedle, I., Boni, F. I., Chorilli, M., Müller, I., & Cury, B. S. F. (2020). Mucoadhesive films based on gellan gum/pectin blends as potential platform for buccal drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology, 25*(2), 159–167.

Priyadarshi, R., Riahi, Z., & Rhim, J. W. (2022). Antioxidant pectin/pullulan edible coating incorporated with *Vitis vinifera* grape seed extract for extending the shelf life of peanuts. *Postharvest Biology and Technology, 183*, 111740.

Qin, Z. Y., Jia, X. W., Liu, Q., Kong, B. H., & Wang, H. (2019). Fast dissolving oral films for drug delivery prepared from chitosan/pullulan electrospinning nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules, 137*, 224–231.

Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high - valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry, 220*, 115–122.

Raghavan, S., Kristinsson, H. G., & Leeuwenburgh, C. (2008). Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(21), 10359–10367.

Rajanna, D., Pushpadass, H. A., Emerald, F. M. E., Padaki, N. V., & Nath, B. S. (2022). Nanoencapsulation of casein-derived peptides within electrospun nanofibres. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 102*(4), 1684–1698.

Ramezanzade, L., Hosseini, S. F., & Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry, 234*, 220–229.

Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: An update review. *Current Drug Delivery, 4*(4), 297–305.

Sánchez-Salcedo, E. M., Mena, P., García-Viguera, C., Martínez, J. J., & Hernández, F. (2015). Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. *Journal of Functional Foods, 12*, 399–408.

Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Mata-Haro, V., & González-Córdova, A. F. (2016). Food-derived immunomodulatory peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 96*(11), 3631–3641.

Sarabandi, K., Gharehbeglou, P., & Jafari, S. M. (2020). Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. *Drying Technology, 38*(5–6), 577–595.

Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mohammadi, M., Akbarbaglu, Z., Pezeshki, A., & Heshmati, M. K. (2019a). Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates: Stability and characterization. *Food Hydrocolloids, 96*, 442–450.

Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2019b). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering, 251*, 19–28.

Saroglu, O., & Karadag, A. (2024). Propolis-loaded liposomes: Characterization and evaluation of the in vitro bioaccessibility of phenolic compounds. *ADMET & DMPK, 12*(1), 209–220.

Seeram, N. P., Bourquin, L. D., & Nair, M. G. (2001). Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(10), 4924–4929.

Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., & Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 18*(9), 567–579.

Sejrsen, K., Hvelplund, T., & Nielsen, M. O. (2006). *Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen Academic Publishers.

Sengul, H., Surek, E., & Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International, 62*, 1069–1079.

Sepúlveda, C., Santos, L., Kuo, J., Sepúlveda, C., Sotomayor, C. P., & Aguilar, C. N. (2022). Microencapsulation of fish protein hydrolysates: Challenges and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 21*(6), 3703–3726.

Shao, P., Niu, B., Chen, H., & Sun, P. (2018). Fabrication and characterization of tea polyphenols loaded pullulan-CMC electrospun nanofiber for fruit preservation. *International Journal of Biological Macromolecules, 107*(Pt B), 1908–1914.

Shen, C., Cao, Y., Rao, J., Zou, Y., Zhang, H., Wu, D., & Chen, K. (2021). Application of solution blow spinning to rapidly fabricate natamycin-loaded gelatin/zein/polyurethane antimicrobial nanofibers for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life, 29*, 100721.

Shui, G., & Leong, L. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry, 97*(2), 277–284.

Silva, C., Aranda, F. J., Ortiz, A., Martínez, V., Carvajal, M., & Teruel, J. A. (2011). Molecular aspects of the interaction between plants sterols and DPPC bilayers: An experimental and theoretical approach. *Journal of Colloid and Interface Science, 358*(1), 192–201.

Singh, C. K. S., Lim, H. P., Tey, B. T., & Chan, E. S. (2021). Spray-dried alginate-coated Pickering emulsion stabilized by chitosan for improved oxidative stability and in vitro release profile. *Carbohydrate Polymers, 251*, 117110.

Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., & Ruberto, G. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(23), 12453–12459.

Song, W., Kong, X., Hua, Y., Li, X., Zhang, C., & Chen, Y. (2020). Antioxidant and antibacterial activity and in vitro digestion stability of cottonseed protein hydrolysates. *LWT, 118*, 108724.

Soto, K. M., Hernández-Iturriaga, M., Loarca-Piña, G., Luna-Bárcenas, G., Gómez-Aldapa, C. A., & Mendoza, S. (2016). Stable nisin food-grade electrospun fibers. *Journal of Food Science and Technology, 53*(9), 3787–3794.

Soto, K. M., Hernández-Iturriaga, M., Loarca-Piña, G., Luna-Bárcenas, G., & Mendoza, S. (2019). Antimicrobial effect of nisin electrospun amaranth: Pullulan nanofibers in apple juice and fresh cheese. *International Journal of Food Microbiology, 295*, 25–32.

Steinert, R. E., Ditscheid, B., Netzel, M., & Jahreis, G. (2008). Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in Ussing type chambers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(13), 4995–5001.

Sun, B., Long, Y. Z., Zhang, H. D., Li, M. M., Duvail, J. L., Jiang, X. Y., & Yin, H. L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science, 39*(5), 862–890.

Sun, Y., Chi, J., Ye, X., Wang, S., Liang, J., Yue, P., Xiao, H., & Gao, X. (2021). Nanoliposomes as delivery system for anthocyanins: Physicochemical characterization, cellular uptake, and antioxidant properties. *LWT, 139*, 110554.

Tabasum, S., Noreen, A., Maqsood, M. F., Umar, H., Akram, N., Nazli, Z. I. H., & Zia, K. M. (2018). A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers. *International Journal of Biological Macromolecules, 120*, 603–632.

Tai, K., He, X., Yuan, X., Meng, K., Gao, Y., & Yuan, F. (2017). A comparison of physicochemical and functional properties of icaritin-loaded liposomes based on different surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 518*, 218–231.

Tai, K., Rappolt, M., He, X., Wei, Y., Zhu, S., Zhang, J., & Yuan, F. (2019). Effect of β-sitosterol on the curcumin-loaded liposomes: Vesicle characteristics, physicochemical stability, in vitro release and bioavailability. *Food Chemistry, 293*, 92–102.

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.

Tolun, A., Sharifuzzaman, M., & Altintas, Z. (2025). Electrospun nanofibers of curcumin/HP-beta-CD/pullulan complex with enhanced solubility and controlled release in food and drug delivery applications. *International Journal of Biological Macromolecules, 248*, 140064.

Toopkanloo, S. P., Tan, T. B., Abas, F., Alharthi, F. A., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2020). Impact of quercetin encapsulation with added phytosterols on bilayer membrane and photothermal-alteration of novel mixed soy lecithin-based liposome. *Nanomaterials, 10*(12), 2432.

Trak, D., & Arslan, Y. (2021). Synthesis of silver nanoparticles using dried black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit extract and their antibacterial and effective dye degradation activities. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*.

Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (1999). Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Letters, 449*(2–3), 179–182.

Tungprapa, S., Jangchud, I., & Supaphol, P. (2007). Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats. *Polymer, 48*(17), 5030–5041.

Udenigwe, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology, 36*(2), 137–143.

Udenigwe, C. C., & Fogliano, V. (2017). Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin? *Journal of Functional Foods, 35*, 9–12.

Vásquez-Villanueva, R., Marina, M. L., & García, M. C. (2016). Identification by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry of peptides with antioxidant capacity in food residues. *Journal of Chromatography A, 1428*, 185–192.

Veitch, N. C., & Grayer, R. J. (2008). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports, 25*(3), 555–611.

Vergara, D., López, O., Bustamante, M., & Shene, C. (2020). An in vitro digestion study of encapsulated lactoferrin in rapeseed phospholipid–based liposomes. *Food Chemistry, 321*, 126717.

Wang, R. S., Dong, P. H., Shuai, X. X., & Chen, M. S. (2022). Evaluation of different black mulberry fruits (*Morus nigra* L.) based on phenolic compounds and antioxidant activity. *Foods, 11*(9), 1252.

Wei, Y., Zhang, J., Memon, A. H., & Liang, H. (2017). Molecular model and in vitro antioxidant activity of a water-soluble and stable phloretin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Molecular Liquids, 236*, 68–75.

Wen, P., Feng, K., Yang, H., Huang, X., Zong, M. H., Lou, W. Y., & Wu, H. (2017). Electrospun core-shell structured nanofilm as a novel colon-specific delivery system for protein. *Carbohydrate Polymers, 169*, 157–166.

Wen, P., Zong, M. H., Linhardt, R. J., Feng, K., & Wu, H. (2017). Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology, 70*, 56–68.

Wilska, J. J. (2007). Food colorants. In Z. E. Sikorski (Ed.), *Chemical and functional properties of food components* (pp. 245–274). CRC Press.

Wong, E. (2009). *Cells: Molecules and mechanisms*. Axolotl Academic Publishing.

Woodbury, D. J., Richardson, E. S., Grigg, A. W., Welling, R. D., & Knudson, B. H. (2006). Reducing liposome size with ultrasound: Bimodal size distributions. *Journal of Liposome Research, 16*(1), 57–80.

Xie, J., Xu, Y., Shishir, M. R., Zheng, X., & Chen, W. (2019). Green extraction of mulberry anthocyanin with improved stability using β-cyclodextrin. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 99*(5), 2494–2503.

Xiong, Y. L. (2010). Antioxidant peptides. In *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals* (pp. 29–42). Wiley-Blackwell.

Xu, X., Tian, M., Deng, L., Jiang, H., Han, J., Zhen, C., Huang, L., & Liu, W. (2023). Structural degradation and uptake of resveratrol-encapsulated liposomes using an in vitro digestion combined with Caco-2 cell absorption model. *Food Chemistry, 403*, 133943.

Xue, J., Wu, T., Dai, Y., & Xia, Y. (2019). Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical Reviews, 119*(8), 5298–5415.

Xue, J., Xie, J., Liu, W., & Xia, Y. (2017). Electrospun nanofibers: New concepts, materials, and applications. *Accounts of Chemical Research, 50*(8), 1976–1987.

Xue, Z., Yu, W., Liu, Z., Wu, M., Kou, X., & Wang, J. (2009). Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(12), 5287–5293.

Yang, S., Mao, X. Y., Li, F. F., Zhang, D., Leng, X. J., Ren, F. Z., & Teng, G. X. (2012). The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *European Food Research and Technology, 235*(1), 91–97.

Yap, P. G., & Gan, C. Y. (2020). In vivo challenges of anti-diabetic peptide therapeutics: Gastrointestinal stability, toxicity and allergenicity. *Trends in Food Science & Technology, 100*, 59–71.

Yarin, A. L. (2011). Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core–shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies, 22*(3), 310–317.

Yi, W., Akoh, C. C., Fischer, J., & Krewer, G. (2006). Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(15), 5651–5658.

Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P. (2016). Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56*(13), 2223–2230.

Yu, D. G., Yu, J. H., Chen, L., Williams, G. R., & Wang, X. (2012). Modified coaxial electrospinning for the preparation of high-quality ketoprofen-loaded cellulose acetate nanofibers. *Carbohydrate Polymers, 90*(2), 1016–1023.

Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry, 44*(9), e13394.

Zhang, H., Hassan, Y. I., Liu, R., Mats, L., Yang, C., Liu, C., & Tsao, R. (2020). Molecular mechanisms underlying the absorption of aglycone and glycosidic flavonoids in a Caco-2 BBe1 cell model. *ACS Omega, 5*(19), 10782–10793.

Zhang, J., Hassane Hamadou, A., Chen, C., & Xu, B. (2023). Encapsulation of phenolic compounds within food-grade carriers and delivery systems by pH-

driven method: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 63*(19), 4153–4174.

Zhao, C. J., Hu, Y., Schieber, A., & Gänzle, M. (2013). Fate of ACE-inhibitory peptides during the bread-making process: Quantification of peptides in sourdough, bread crumb, steamed bread and soda crackers. *Journal of Cereal Science, 57*(3), 514–519.

Zhao, L., Temelli, F., Curtis, J. M., & Chen, L. (2015). Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols. *Food Research International, 77*, 63–72.

Zhu, C. Z., Zhang, W. G., Kang, Z. L., Zhou, G. H., & Xu, X. L. (2014). Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham. *Meat Science, 96*(2), 783–789.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Kalintas Caglar, N., Caglar, A.F., Sağdıç, O., Karadağ, A. 'Glutenin Hidrolizatının Hibrit Sistemlerle Enkapsülasyonu', II. Internatıonal Food, Agrıculture and Veterinary Congress, October 04-06, 2024, Erzurum, Turkey, oral presentation, p.p. 26-27.

Makaleler

1. Kalintas Caglar, N., Saroglu, O., Karakas, C. Y., Tasci, C. O., Catalkaya, G., Yildirim, R. M., ... & Karadag, A. (2024). Liposomal black mulberry extract loaded-nanofibers: preparation, characterisation, and bioaccessibility of phenolics by simulated in vitro digestion combined with the Caco-2 cell model. International Journal of Food Science and Technology, 59(12), 9298-9309.

Projeler

1. Caglar, N. (Yürütücü), Karadag, A (Danışman). Glutenin Hidrolizatının Hibrit Sistemlerle Enkapsülasyonu. Tübitak 1002, 01/09/2022-01/09/2023.