T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REYHAN YAPRAĞI ANTOSİYANİNLERİNİN EMÜLJEL HİBRİT SİSTEM İLE ENKAPSÜLASYONU VE ANTOSİYANİNLERİN BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Başak Ebru ÖZCAN

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Aralık, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REYHAN YAPRAĞI ANTOSİYANİNLERİNİN EMÜLJEL HİBRİT SİSTEM İLE ENKAPSÜLASYONU VE ANTOSİYANİNLERİN BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Başak Ebru ÖZCAN tarafından hazırlanan tez çalışması 26/12/2023 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 _____

Dr. Öğr. Üyesi Esra DOĞU BAYKUT, Üye
İstanbul Medeniyet Üniversitesi _____

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

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

Danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Reyhan Yaprağı Antosiyaninlerinin Emüljel Hibrit Sistem ile Enkapsülasyonu ve Antosiyaninlerin Biyoerişilebilirliğinin Değerlendirilmesi" 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.

Başak Ebru ÖZCAN

İmza

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 1002-Hızlı Destek Programı kapsamında 122O661 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

OĞLUM'a

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi, tecrübe ve destekleriyle bana yol gösteren, ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yapıcı eleştirileri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Esra DOĞU BAYKUT'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Öznur SAROĞLU ve Canan Yağmur KARAKAŞ'a teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her daim yanımda olan ve beni bu günlere getiren aileme, sabır ve iyi niyetiyle her zaman desteğini arkamda hissettiğim sevgili eşime ve varlığıyla hayatıma anlam katan mutluluk sebebim canım oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başak Ebru ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR **v**
SİMGE LİSTESİ **viii**
KISALTMA LİSTESİ **x**
ŞEKİL LİSTESİ **xi**
TABLO LİSTESİ **xiii**
ÖZET **xiv**
ABSTRACT **xvi**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti 1
1.1.1 Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisi 1
1.1.2 Antosiyaninler 4
1.1.3 Enkapsülasyon Teknolojisi 9
1.1.4 Biyopolimer 18
1.1.5 Literatürdeki Benzer Çalışmalar ve Farklılıklar 29
1.1.6 Biyoaktif Bileşen Biyoerişilebilirliği ve Biyoyararlanımı 33
1.2 Tezin Amacı 36
1.3 Hipotez 37
2 MATERYAL VE METOT **38**
2.1 Materyal ve Kimyasallar 38
2.2 Antosiyanin Ekstraktı Eldesi 38
2.2.1 Reyhan Yaprağının Hazırlanması 38
2.2.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon 39
2.3 Antosiyanin Ekstraktı Karakterizasyonu 40
2.3.1 Toplam Antosiyanin Miktarı 40
2.3.2 Toplam Fenolik Madde Miktarı 41
2.3.3 Toplam Flavonoid Miktarı 41
2.3.4 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 42
2.3.5 Antosiyanin Profilinin HPLC ile belirlenmesi 43
2.4 Emüljel ve Hidrojel Kapsül Üretimi 44
2.4.1 Çift Emülsiyonların ($W_1/O/W_2$) ve Biyopolimer Çözeltilerinin Hazırlanması 44
2.4.2 Elektrosprey Yöntemi 45
2.5 Kapsül Karakterizasyonu 47

2.5.1 Optik Mikroskop ile Boyut ve Küresellik Faktörünün belirlenmesi 47
2.5.2 Yüzey Morfolojisinin SEM ile Belirlenmesi 48
2.5.3 Jel Kuvveti 49
2.5.4 Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi 49
2.5.5 FTIR Analizi 50
2.5.6 Termal Davranış 51
2.5.7 Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Koşullarında Antosiyanin Salınımı 51
2.6 İstatistiksel Analizler 52
3 BULGULAR VE TARTIŞMA **53**
3.1 Reyhan Yaprak Ekstraktı (RYE) Karakterizasyonu 53
3.2 HPLC ile Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi 54
3.3 Emüljel ve Hidrojel Kapsül Karakterizasyonu 56
3.3.1 Kapsüllerin Boyut ve Şekli 56
3.3.2 Yüzey Morfoloji Özellikleri (SEM) 63
3.3.3 Jel Kuvveti 68
3.3.4 Antosiyaninlerin Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi . 69
3.3.5 FTIR Analizi 72
3.3.6 Termal Davranış 77
3.3.7 Antosiyaninlerin Kapsüllerden *in Vitro* Salınımı 89
4 SONUÇ VE ÖNERİLER **97**
KAYNAKÇA **100**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **122**

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
a	Ağırlık
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
Fe	Demir
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Demir III Klorür Hekzahidrat
ɣ	Gamma
g	Gram
h	Hacim
HCl	Hidroklorik Asit
ι	İota
κ	Kappa
Ca	Kalsiyum
kV	Kilovolt
λ	Lambda
L	Litre
µ	Mikro
µA	Mikroamper
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mA	Miliamper
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimol
Ɛ	Molar Soğurma Katsayısını
M	Molarite
nm	Nanometre
N	Newton
N	Normalite
ω	Omega

K	Potasyum
R^2	Regresyon Katsayısı
sa	Saat
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
Na	Sodyum
W	Su
O	Yağ
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Varyans Analizi
CE	Kateşin Eşdeğeri
CGE	Siyanidin-3-glukozit Eşdeğeri
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazy
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DTG	Türev Termogravimetrik
FRAP	Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Güç
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GC/MS	Gaz Kromatografisi/kütle Spektrometresi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
PGE	Peonidin 3-*O*-glukosit Eşdeğeri
PGPR	Polyglycerol Polyricinoleate
RT	Alıkonma Zamanı
SEM	Taralamalı Elektron Mikroskobu
SF	Küresellik Faktörü
TE	Troloks Eşdeğeri
TFA	Trifluoroasetik Asit
TGA	Termogravimetrik Analiz
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Reyhan bitkisinin çeşitli resimleri……1

Şekil 1.2 Antosiyaninin flavilyum katyon formundaki temel yapısı……..5

Şekil 1.3 Antosiyaninlerin farklı pH değerlerinde yapısal dönüşümleri……....7

Şekil 1.4 Gıda endüstrisinde enkapsülasyonun önemli uygulamaları……9

Şekil 1.5 Matriks ve kapsül sistemler……...10

Şekil 1.6 Farklı kolloidal dağıtım sistemleri……11

Şekil 1.7 Homojenizasyon ile birincil emülsiyonların hazırlanması……12

Şekil 1.8 Emülsiyonların fiziksel kararsızlıkları……..13

Şekil 1.9 Elektrosprey ile kapsül üretimi……16

Şekil 1.10 Emüljel (emülsiyon yüklü hidrojel) kapsül üretimi……18

Şekil 1.11 Aljinatın (a) kimyasal yapısı ve (b) blok dağılımı……20

Şekil 1.12 İki değerlikli katyonlar için bağlanma bölgelerini gösteren aljinatın moleküler yapısı ...……..21

Şekil 1.13 Ca-aljinat jellerinin mekanizması: (a) egg-box, yumurta kutusu modeli; (b) yumurta kutusu yapısı ve yumurta kutusu dimerleri; (c) yumurta kutusu multimerleri…… 22

Şekil 1.14 κ- ve ι-karragenanın yapısı……...25

Şekil 1.15 κ-karragenanın K^+ iyonu varlığında jelleşme mekanizması …...……26

Şekil 1.16 SA/κ-CG çift ağ yapısının şematik gösterimi……..28

Şekil 1.17 Gastrointestinal sistemin farklı bölgelerinde antosiyanin bozunması ve emiliminin şematik gösterimi ……35

Şekil 2.1 Reyhan yapraklarının analize hazır hale getirilmesi ……...…..39

Şekil 2.2 Reyhan yaprak ekstraktı (RYE) eldesi ……...……..40

Şekil 2.3 Toplam fenolik (TFM), toplam flavonoid (TFVM) miktarları ve antioksidan aktivite değerlerinin belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrileri ……43

Şekil 2.4 Çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$) eldesi ……45

Şekil 2.5 Faz ayrımı gerçekleşmeyen çift emülsiyonlar ……...45

Şekil 2.6 Elektrosprey ile kapsül üretimi ve liyofilizatörde kurutulması ……47

Şekil 2.7 Optik mikroskop ile kapsüllerin incelenmesi ……48

Şekil 2.8 SEM analizi …….....49

Şekil 2.9 Tekstür cihazı ile jel kuvveti analizi ...……...……...49

Şekil 2.10 Enkapsülasyon etkinliği analizi ……..50

Şekil 2.11 Gastrointestinal sindirim koşullarında elde edilen ve antosiyanin içeren süpernatantlar …….52

Şekil 3.1 Reyhan yaprağı ekstraktında bulunan antosiyanin moleküllerinin HPLC kromatogramı …….....55

Şekil 3.2 (a) Birincil (W_1/O) emülsiyon ile (b) dış su fazında (W_2) yalnızca SA, (c) SA:κ-CG (1:0,075, a:a) ve (d) SA:κ-CG (1:0.15, a:a) içeren çift emülsiyonların ($W_1/O/W_2$) optik mikroskop görüntüleri ……57

Şekil 3.3 Yaş emüljel ve hidrojel kapsüller …….58

Şekil 3.4 Boş ve RYE yüklü emüljel kapsüllerin optik mikroskop görüntüleri ...62

Şekil 3.5 Boş ve RYE yüklü hidrojel kapsüllerin optik mikroskop görüntüleri ..63

Şekil 3.6 Emüljel kapsüllerin yüzey (a, b ve c) ve kesitinin (d, e ve f) SEM görüntüleri ……66

Şekil 3.7 Hidrojel kapsüllerin yüzey (a, b ve c) ve kesitinin (d, e ve f) SEM görüntüleri ……67

Şekil 3.8 SA, κ-CG, ayçiçek yağı ve E; E-K; EC2; EC2-K emüljel kapsüller ile HC2 ve HC2-K hidrojel kapsüllerin 600-4000 cm^{-1} aralığındaki FTIR Spektrumları …….75

Şekil 3.9 SA, κ-CG, ayçiçek yağı ve E; E-K; EC2; EC2-K emüljel kapsüller ile HC2 ve HC2-K hidrojel kapsüllerin 800-1500 cm-1 aralığındanormalize edilmiş FTIR spektrumları ……76

Şekil 3.10 (a) SA, κ-CG, RYE, ayçiçek yağı, RYE yüklü EC2-K emüljel ve HC2-K hidrojel kapsüllerin ve (b) RYE içermeyen E, H; E-K, H-K; EC2, HC2 ve EC2-K, HC2-K emüljel ve hidrojel kapsüllerin TGA termogramları …….....81

Şekil 3.11 (a) SA, κ-CG ve ayçiçek yağı, (b) serbest RYE, RYE yüklü EC2-K emüljel ve HC2-K hidrojel kapsüller ile RYE içermeyen (c) emüljel ve (d) hidrojel kapsüllerin DTG termogramları ……..85

Şekil 3.12 (a) SA, κ-CG ve ayçiçek yağının, (b) RYE içermeyen E, E-K, EC2 ve EC2-K emüljel kapsüllerin ve (c) serbest RYE, RYE içermeyen ve RYE yüklü HC2-K hidrojel kapsüllerin DSC termogramları …….....88

Şekil 3.13 Serbest RYE'den, RYE yüklü (a) emüljel ve (b) hidrojel kapsüllerden simüle edilmiş in vitro gastrointestinal sindirim sırasında antosiyaninlerin (%) kümülatif salınımı ……....90

Şekil 3.14 (a) Emüljel kapsülün (EC1-K) 150 dk (i) ve 300 dk (ii), (b) hidrojel kapsülün (HC1-K) ve (c) serbest RYE'nin 150 dk sonraki simüle edilmiş gastrointestinal sindirimdeki fotoğrafları …….....95

Şekil 3.15 Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim aşamaları sırasında EC1-K emüljel ve HC1-K hidrojel kapsüllerin yüzeyine ait SEM görüntüleri ...……....96

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Reyhan yaprağında bulunan fenolik bileşikler ve uçucu yağındaki aroma bileşenleri 4

Tablo 1.2 Doğada yaygın olarak bulunan antosiyaninler..... 5

Tablo 1.3 Antosiyaninlerin aljinat kapsüllerde enkapsüle edildiği çalışmalar 23

Tablo 1.4 Antosiyanin enkapsülasyonu içeren benzer çalışmalar 29

Tablo 2.1 Kapsüllerin formülasyonu ve isimlendirilmesi..... 46

Tablo 3.1 Reyhan yaprak ekstraktının TA, TFM ve TFVM içeriği ile ABTS ve FRAP antioksidan kapasitesi değerleri 53

Tablo 3.2 Reyhan yaprak ekstraktının antosiyanin profili 56

Tablo 3.3 Kapsüllerin boyutu ve küresellik faktörü (SF) 59

Tablo 3.4 Kapsüllerin jel kuvveti..... 69

Tablo 3.5 Antosiyaninlerin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi 72

ÖZET

Reyhan Yaprağı Antosiyaninlerinin Emüljel Hibrit Sistem ile Enkapsülasyonu ve Antosiyaninlerin Biyoerişilebilirliğinin Değerlendirilmesi

Başak Ebru ÖZCAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Günümüzde, sağlık açısından olumlu etkilere sahip biyoaktif bileşenleri içeren tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgi sürekli artmaktadır. Reyhan (*Ocimum basilicum* L.), bitkiye kırmızı-mor rengini veren antosiyanin içeriğiyle dikkat çekmektedir. Antosiyaninler pH, sıcaklık, ışık gibi birçok dış faktöre karşı stabilitesini koruyamadıklarından gıda ürünlerinde kullanımları ve sindirim sonrası biyoerişilebilirlikleri sınırlıdır. Antosiyaninlerin stabilitesini ve biyoyararlanımını arttırmak amacıyla enkapsülasyon teknolojisi çalışmaları önem kazanmıştır.

Çalışmada, reyhan yaprak ekstraktı (RYE), dış su fazında (W_2) aljinat/kappa-karragenan (SA/κ-CG) bulunan bir çift emülsiyonun iç su fazına (W_1) yüklenmiş ve farklı çapraz bağlayıcılar (Ca^{+2}/K^{+}) kullanılarak elektrospreyleme yöntemi ile çift emülsiyon yüklü hidrojel kapsüller (emüljel) üretilmiştir. Eş zamanlı olarak, emülsiyon içermeyen hidrojel kapsüller de üretilmiştir. Emüljel ve hidrojel kapsüller, optik mikroskop, jel kuvveti, SEM (Taramalı elektron mikroskobu),

FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi) ve TGA (Termogravimetrik analiz), DTG (Türev termogravimetrik), DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetri) analizleriyle karakterize edilmiştir. Reyhan antosiyaninlerinin enkapsülasyon etkinliği ve simüle edilmiş *in vitro* sindirim koşullarında kapsüllerden salınımı değerlendirilmiştir.

Emüljel kapsüllerde κ-CG, daha büyük kapsül boyutuna, küresellikten uzaklaşmaya, yüzey morfolojisinde pürüzlüğe ve kırışıklığa neden olmuştur. Antosiyaninlerin emüljel kapsüllerdeki enkapsülasyon etkinliği %70,73-87,89 aralığında iken emülsiyon içermeyen hidrojel kapsüllerde %13,50-20,67 aralığında değişmiştir. FTIR analizi, SA/κ-CG polimerlerinin Ca^{+2}/K^{+} iyonlarıyla çapraz bağlanmasını göstermiştir. TGA, DTG ve DSC termogramları, emüljel kapsüllerin hidrojellere göre daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir.

Simüle edilmiş sindirim koşullarında, emüljel kapsüller, serbest RYE ve hidrojel kapsüllere göre antosiyaninlerin *in vitro* biyoerişilebilirliğini arttırmıştır. Serbest RYE-antosiyaninlerinin %86'sı mide fazında çözünür halde bulunurken, hidrojel kapsüllerden antosiyaninlerin %46'sı salınmış ve emüljel kapsüllerde ise herhangi bir salınım gözlenmemiştir. Bağırsak aşamasında, sindirimin 150. dakikasında RYE ve hidrojel kapsülleri içeren sindirim sıvılarında antosiyanin tespit edilemezken emüljel kapsülleri içeren bağırsak sıvısında 300. dakikaya kadar antosiyanin salınımı gözlenmiştir.

Sonuçlar, antosiyanin enkapsülasyonunda emülsiyon ve iyonik jelasyon yöntemlerinin kullanıldığı hibrit bir sistemin (emüljel kapsüller), sadece iyonik jelasyondan oluşan hidrojel sisteme göre daha başarılı olduğunu göstermiştir. Emüljel kapsüllerinin çeşitli fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde kullanılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antosiyaninler, *in vitro* sindirim, emüljel, hidrojel, biyoerişilebilirlik

ABSTRACT

Encapsulation of Purple Basil Leaf Anthocyanins with Emulgel Hybrid Encapsulation System and Evaluation of Bioaccessibility of Anthocyanins

Başak Ebru ÖZCAN

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr Ayşe KARADAĞ

Currently, there is a growing research focus on medicinal and aromatic plants containing bioactive components with positive effects on health. As a medicinal and aromatic plant, purple basil (*Ocimum basilicum* L.) attracts attention with its anthocyanin content, which provides its red-purple coloration. However, their application in food products and their bioaccessibility are limited due to their inability to withstand various external factors such as pH, temperature, and light. Research on encapsulation technology has become significant in recent years to enhance the stability and bioavailability of anthocyanins.

In this study, purple basil leaf extract (PBLE) was loaded into the inner water phase (W_1) of a double emulsion containing alginate/kappa-carrageenan (SA/κ-CG) in the outer water phase (W_2). This emulsion was then converted into double emulsion-loaded hydrogel capsules (emulgel capsules) using different cross-linkers (Ca^{2+}/K^{+}) by the electrospraying method. Simultaneously, hydrogel capsules without emulsion have been produced. Optical microscopy, gel strength, SEM (Scanning Electron Microscopy), FTIR (Fourier Transform Infrared), TGA (Thermogravimetric), DTG (Derived Thermogravimetric), and DSC (Differential

Scanning Calorimetry) analyses were carried out to characterize the emulgel and hydrogel capsules. In addition, the encapsulation efficiency of purple basil leaf anthocyanins and their release from capsules under simulated *in vitro* digestion conditions were evaluated.

The presence of κ-CG in emulgel capsules has resulted in larger capsule sizes, non-spherical shapes, roughness, and wrinkles on the surface morphology. The encapsulation efficiency of anthocyanins in emulgel capsules ranged between 70,73 and 87,89%, while it was determined between 13,50 and 20,67% in hydrogel capsules without emulsion. In FTIR analyses, the cross-linking of SA/κ-CG polymers with Ca^{2+}/K^{+} ions has been proven. TGA, DTG, and DSC thermograms indicated that emulgel capsules exhibited higher thermal stability than hydrogel capsules.

Under simulated digestion conditions, emulgel capsules have been found to increase the *in vitro* bioaccessibility of anthocyanins compared to both free PBLE and hydrogel capsules. In the stomach phase, 86% of the free PBLE-anthocyanins were dissolved, and 46% of the anthocyanins that were encapsulated in the hydrogel capsules were released, while there was no release of the anthocyanins that were encapsulated in the emulgel capsules. At the intestinal stage, anthocyanins could not be detected in the digestive fluids containing free PBLE or hydrogel capsules after 150 minutes of digestion, while the release of anthocyanins from all emulgel capsules continued until 300 minutes.

The results revealed that for anthocyanins, a hybrid encapsulation system (emulgel capsules) that combines emulsion and ionic gelation methods is a more successful method than a system solely based on ionic gelation. The anthocyanin-loaded emulgel capsules have enormous potential in the production of various functional foods.

Keywords: Anthocyanins, *in vitro* digestion, emulgel, hydrogel, bioaccessibility

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisi

Sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen ve biyoaktif özelliklere sahip ikincil bileşikleri içeren tıbbi ve aromatik bitkilerin önemi her geçen gün artmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, gıdalara tat, lezzet, renk, aroma ve koruyucu olarak eklenmelerinin yanı sıra boyar madde, kozmetik ve geleneksel tedavi amacıyla da kullanılmaktadır.

Ülkemiz dahil birçok bölgede yetiştiriciliği yapılan anavatanı Asya, Afrika ve Güney Amerika olan Lamiaceae familyasının üyesi *Ocimum basilicum* L., tıbbi ve aromatik bitkilerden birisidir. *Ocimum basilicum* tür içerisinde geniş yapısal ve kimyasal çeşitliliğe sahiptir. Bu sebeple birçok alt türlere ayrılarak incelenmektedir [1]. Bitkinin mor yapraklı türleri ülkemizde reyhan (Şekil 1.1), yabancı literatürde ise 'purple basil' olarak adlandırılmaktadır. Ülkemizde fesleğen olarak adlandırılan yeşil yapraklı olan türler ise yabancı literatürde 'green basil' veya 'sweet basil' olarak bilinmektedir.



Şekil 1.1 Reyhan bitkisinin çeşitli resimleri

Sentetik ilaçların yan etkileri, bitkiler gibi doğal ürünlerin tedavi edici özellikleri konusunda farkındalığı artırmıştır. Yapılan çalışmalar tarafından reyhanın kanser, alerji, iltihaplanma ve bakteri, mantar ve virüse karşı enfeksiyonlarla ilgili hastalıkların tedavisinde potansiyel klinik uygulamalara sahip olabileceğini öne sürülmüştür [2, 3]. Reyhanın, plazma kolesterolünü düşürmek ve damar sertliği ile ilişkili hastalık riskini azaltmak için kullanıldığı da belirtilmiştir [4]. Gökçe vd. [5]

tarafından yürütülen çalışmada, metanol ile elde edilen reyhan ekstraktı kullanılarak kolesterolle beslenen sıçanlarda lipid ve kolesterol düzeylerinin düşürülmesi amaçlanmış ve ekstraktın karaciğer üzerinde koruyucu etkisinin bulunduğu vurgulanmıştır.

Reyhan, salata, makarna, çorba, sebze ve deniz ürünleri, şekerlemeler gibi birçok ürünün lezzetini arttırmak için kurutulmuş veya taze olarak yaygın bir şekilde gıdalarda kullanılmaktadır [6]. Türk mutfağında reyhan, taze yapraklarından elde edilen reyhan şerbeti olarak adlandırılan bir içecek olarak da yer almaktadır. Ayrıca, ülkemizde Malatya'nın Arapgir bölgesinde yetiştirilen mor reyhan, coğrafi işaretli olup diğer reyhan türlerine göre daha yoğun bir aromaya sahip bir reyhan çeşididir [7].

Tüketicilerin doğal ürünlere olan farkındalığı ve talebi doğrultusunda, gıda endüstrisinde gıda depolama süresini uzatmak amacıyla bitki özütlerinin kullanımı gün geçtikçe artış göstermektedir. Bitkilerin sap, yaprak ve tohum gibi çeşitli bölgesinde bulunan biyoaktif bileşenler, onların antimikrobiyal olarak kullanımına katkı sağlamıştır. Özellikle tıbbi ve aromatik bitkiler gıdalara ilave edildiğinde gösterdikleri antimikrobiyal etki ile ürünlerin depolanma süresini arttırabilmektedir. Reyhan yapraklarındaki fenolik bileşikler bitkiye antimikrobiyal özellik kazandırmaktadır [8]. Jelatin ve reyhan yaprak ekstraktı kullanılarak pH duyarlı film elde edilen çalışmada, ekstraktın eklenmesiyle jelatin filmlerin antibakteriyel aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar, reyhan yaprak ekstraktı içeren jelatin bazlı filmin tavuk filetolarının tazelik göstergesinde kullanılabileceğini de vurgulamıştır [9]. Gurkan vd. [10] tarafından yapılan çalışmada, süte farklı oranlarda toz ve sulu formda reyhan ekstraktı katılarak dört çeşit yoğurt elde edilmiştir. Yoğurt örneklerinin fizikokimyasal ve reolojik özellikleri, antioksidan kapasite içeriği 21 gün depolama boyunca takip edilen çalışmada, toz formdaki ekstraktın kullanımının antioksidan aktiviteye olumlu katkı sağladığı ve yoğurt jelinin reolojik davranışını değiştirdiği görülmüştür. Başka bir çalışmada, reyhan ekstraktı yoğurt üretiminde toz ve sulu ekstrakt formunda kullanılmış ve elde edilen örneklerin 4 °C'de 3 haftalık depolaması sırasında uçucu bileşen ve duyusal özellikleri değerlendirilmiştir. Reyhan ekstraktı kullanımının yoğurdun uçucu bileşimini arttırdığı ve reyhan aromalı yoğurdun

alternatif bir aromalı yoğurt türü olarak tüketicilere sunulabileceği sonucuna varılmıştır [11].

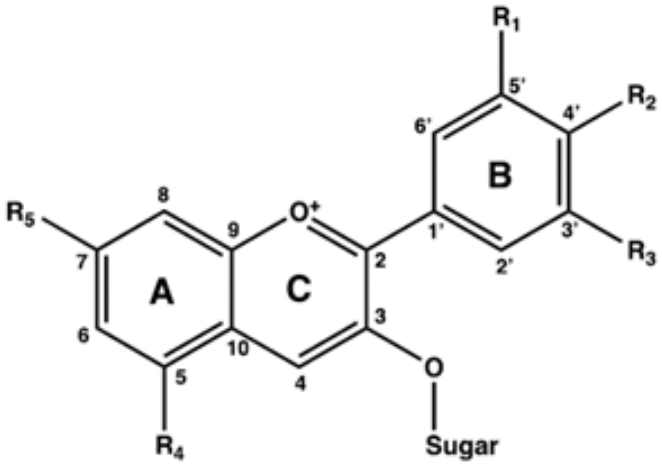
Reyhanın, çeşitli polifenoller, aromatik bileşikler ve uçucu yağlar bakımından zengin olması önemini arttırmaktadır. Antifungal, insektisit ve antioksidan gibi etkilerinden dolayı reyhan uçucu yağı, parfümeri, kozmetik, ilaç ve hijyen uygulamaları dahil olmak üzere çeşitli gıda, içecek ve gıda dışı sektörlerde önemli bir endüstriyel bileşendir [12]. Tursun, [13] tarafından gerçekleştirilen çalışmada, reyhan uçucu yağının aromatik bileşenlerinin monoterpenler ve seskiterpenlerden oluştuğu belirlenmiştir. Reyhan uçucu yağının ana bileşeninin metilsinnamat ve monoterpen olan linalool olduğu rapor edilmiştir. Reyhan güçlü bir fenolik bileşik kaynağıdır. Rosmarinik, kikorik, kafeik ve kaftarik asitler gibi fenolik asitler reyhanda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır [1] ve bitkinin bilinen antioksidan özelliklerine büyük oranda katkı sağlamaktadırlar [14]. Javanmardi vd. [15] 23 reyhan çeşidi ile yaptıkları çalışmada, rosmarinik asidin hem çiçek hem de yaprak dokularında bulunan baskın fenolik asit olduğu rapor edilmiştir. Reyhan yaprak ekstraksiyonu için su, etanol ve aseton çözgenlerinin kullanıldığı çalışmada, toplam fenolik madde içeriğini gallik asit eşdeğerinde 66-116 mg/g ekstrakt ve toplam flavonoid madde içeriğini kateşin eşdeğerinde 24.2-42,5 mg/g ekstrakt olarak tespit edilmiş olup DPPH analizi ile de 17,34-62,10 µg/mL aralığında antioksidan kapasite tespit edilmiştir [16]. Reyhan yüksek antioksidan özellik gösteren yüksek miktarda içerdiği antosiyaninler açısından da dikkat çekmektedir. Reyhan yaprağında HPLC ve GC-MS kullanılarak tespit edilen bazı fenolik bileşikler [17] ve uçucu yağ aroma bileşenleri [5] Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1 Reyhan yaprağında bulunan fenolik bileşikler ve uçucu yağındaki aroma bileşenleri

Fenolik Bileşikler	**Konsantrasyon (mg/L)**	**Uçucu Yağ Aroma Bileşenleri**	**%**
Hesperidin	2,13	*α*-Pinene	0,61
Kaempferol-3-Glucoside	14,23	*β*-Myrcene	0,46
Quercetin-3-Glucoside	7,58	1,8-Cineole	13,11
Caftaric acid	42,72	ɣ-Terpinene	0,23
t-Caffeic acid	546,35	Linalool oxide	0,34
Chlorogenic acid	1,82	1-Octen-3-ol	0,21
4-Hydroxybenzoic acid	3,06	Linalool oxide cis	0,41
2,5-Dihyrdoxybenzoic acid	2,35	Linalool	24,69
Syringic acid	2,39	4-Terpineol	1,08
Luteolin	1,20	1-Terpineol	0,02
Myricetin	1,49	*α*-Humulene	1,72
Rutin	4,33	ɣ-Cadinene	1,11
p-Coumaric acid	2,18	Nerol	0,18
Ferulic acid	1,78	Geraniol	0,37
Sinapic acid	1,52	Methyleugenol	0,31

1.1.2 Antosiyaninler

Antosiyaninler, C_6-C_3-C_6 karbon zinciri olarak temsil edilen temel flavonoid yapıyı içerirler ve şeker parçalarının varlığı nedeniyle polifenollerin suda çözünebilen ana grubu olarak kabul edilen doğal pigmentlerdir [18]. Kimyasal olarak antosiyaninler, flavilyum (2-fenilbenzopirilyum) katyonundan türetilen antosiyanidinlerin glikozit kısımlarıdır (Şekil 1.2) [19, 20]. Glikozitler genellikle C halkasının 3. pozisyonuna (3-monoglikozitler) veya A halkasının 5. pozisyonuna (3, 5-diglikozitler) bağlanırlar [21]. Antosiyaninler yapısında bulunan şeker sayısına göre monoglikozitler, diglikozitler ve triglikozitler olarak sınıflandırılırlar [22].



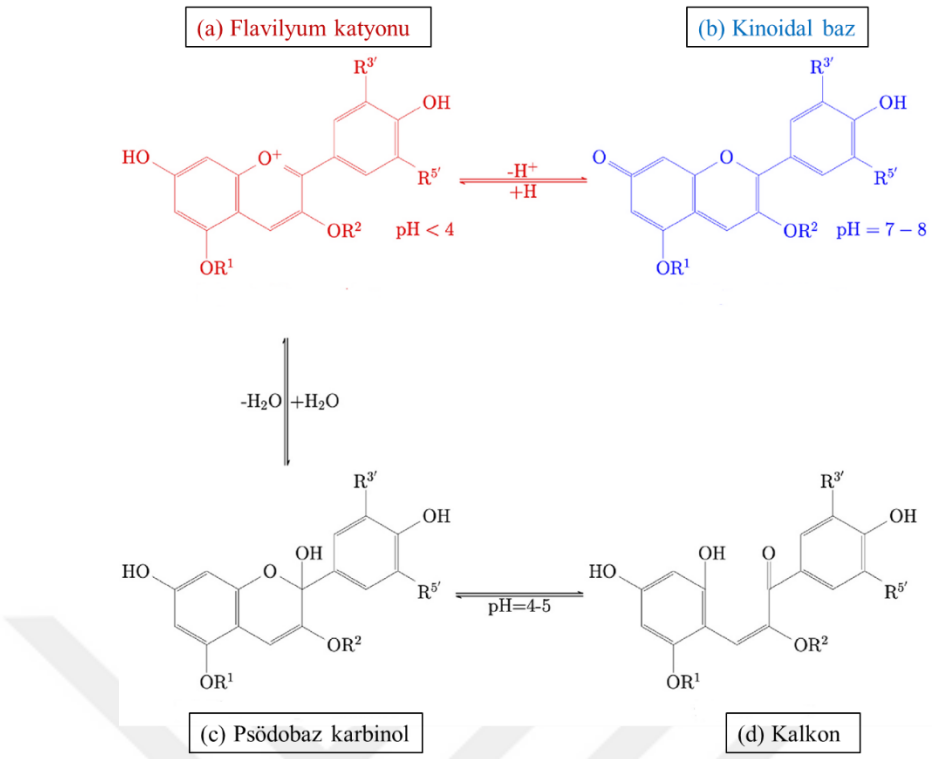
Şekil 1.2 Antosiyaninin flavilyum katyon formundaki temel yapısı [23].

Doğada tanımlanan birçok antosiyanidin vardır ancak bunlardan altısı doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Doğada yayın olarak bulunan pelargonidin, siyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin ve malvidin antosiyaninlerinin yapısı ve sorumlu oldukları renkler Tablo 1.2'de verilmiştir [21, 24]. Antosiyaninler, yapraklı gıdalarda ve bitkilerin köklerinde, yumrularında ve saplarında bulunurlar. Bitkinin çeşitli bölgelerinin kırmızı, mavi ve mor renklerinden sorumludurlar [25–27]. Antosiyaninlerin spesifik rengi ve yoğunluğu, pH, yapısal özellikler (metil ve hidroksil gruplarının miktarı ve konumu, ayrıca aromatik halkalarına bağlı farklı şekerler ve/veya asitler), metal iyonlarıyla kompleks oluşumu gibi çeşitli faktörlere son derece bağlıdır [28].

Tablo 1.2 Doğada yaygın olarak bulunan antosiyaninler

Antosiyanidin	**R_1**	**R_2**	**R_3**	**Renk**
Siyanidin	OH	OH	H	Turuncu-kırmızı
Delfinidin	OH	OH	OH	Kırmızı
Malvidin	OCH_3	OH	OCH_3	Mavi-kırmızı
Pelargonidin	H	OH	H	Turuncu
Peonidin	OCH_3	OH	H	Turuncu-kırmızı
Petunidin	OCH_3	OH	OH	Kırmızı

Glikosilasyon ve asilasyon, genellikle bu bileşiklerin yapısal stabilitesini artırmaktadır. Örneğin di-, tri- veya poliasillenmiş antosiyaninler, monoasillenmiş ve basit formlara kıyasla gelişmiş stabiliteye sahiptir [29]. Ayrıca moleküldeki hidroksilasyon ve metoksilasyonun derecesi bu pigmentlerin stabilitesini ve rengini etkilemektedir. Bu şekilde mevcut ana metoksil grupları stabilite ve kırmızılıkta artışa neden olurken, mevcut hidroksil grupları ise kararsız moleküllere ve daha mavimsi bir tona neden olmaktadır [19]. Aynı zamanda pH değeri de antosiyanin stabilitesini ve rengini büyük ölçüde doğrudan etkilemektedir (Şekil 1.3). Asidik koşullar altında (pH 1-3), antosiyaninler esas olarak kırmızı flavilyum katyonu halinde bulunurlar (Şekil 1.3a). pH arttıkça, bir proton kaybolur ve bu da mavi veya mor olan kinoidal bazın (Şekil 1.3b) oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Oldukça asidik çözeltilerde (pH<0.5), flavilyum katyonu tek yapılıdır. Yüksek pH değerlerinde [30], 2. pozisyonda proton kaybı ve su ilavesi meydana gelir ve bu da psödobaz karbinol ile kalkon arasında bir denge oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 1.3c-d). Hemiketal hem de kalkon renksiz ve oldukça kararsız formlardır. 7'nin üzerindeki pH değerlerinde, oksidasyonla hızla bozunan mor kinoidal formlar ortaya çıkar [31]. 4 ile 5.5 arasındaki pH değerleri hafif bir renklenme göstermektedir çünkü renkli formlar düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ve denge durumu renksiz formlara doğru kaymaktadır. Bu nedenle, kalkon formu bozulmaya en duyarlı olan ve iyonik flavilyum formu ise en stabil olan antosiyanin formu olarak bilinmektedir [31, 32].



Şekil 1.3 Antosiyaninlerin farklı pH değerlerinde yapısal dönüşümleri [31]

Antosiyaninler insan beslenmesine bitkisel gıdalar ile girerler. Antosiyaninler açısından zengin gıdaların veya takviyelerin tüketimine atfedilen başlıca faydalardan biri bunların antioksidan etkileridir [33]. Antioksidanlar, serbest radikallerin nötralizasyonuyla sonuçlanan çeşitli mekanizmalarla radikal reaktif türlerden kaynaklanan oksidatif hasara karşı koruma sağlarlar. Antosiyaninin pozitif yükü ve aromatik hidroksil grupları sayesinde bu bileşikler serbest radikallere kolayca proton bağışlayabilir. Bu durum, hücreleri yaşlanmaya ve çeşitli hastalıklara yol açan oksidatif hasardan korumaktadır [34].

Dünya genelinde antosiyanin tüketimi büyük ölçüde değişiklik göstermekte ve bu durum, her ülke ve bölgenin beslenme alışkanlığına, biyoyararlanımına, gıda bulunabilirliğine ve coğrafi, sosyal ve kültürel özelliklerine bağlıdır. Antosiyaninlerin güvenliği geniş çapta kabul görmekte ve yüksek dozda (320 mg/gün) bile alımından kaynaklanan toksik etkilere ilişkin herhangi bir rapor bulunmamaktadır [33]. Dolayısıyla bu bileşikler, diyetin bir parçası olarak, çeşitli hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için tıbbi olarak kullanıldığında güvenli kabul edilebilmekte ve insan sağlığına olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. [35]. Hücre çoğalmasını azaltarak kanser gelişimini engellemede güçlü bir kaynak olarak kabul edilirler [36]. Araştırmalara göre, antosiyaninlerin iltihap giderici [37],

tümör gelişimini engelleyici [38], nöral [39] ve kardiyovasküler [40] hastalık risklerinin azaltılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir.

Antosiyaninlerin ekstraksiyonu, bileşiğin kararsız doğasından dolayı sentezlenmesinden daha uygun olabilmektedir [41]. Yüksek ısı, glikosile edilmiş ve açillenmiş antosiyaninleri kolayca bozabilir ve yapısındaki şekeri hidrolize ederek bir antosiyanidin yapısı oluşturabilmektedir [42]. Antosiyaninler, yüksek olmayan sıcaklık koşullarında asitlendirilmiş polar organik solventlerle ekstrakte edilebilirler. Solventin asitleştirilmesinin, hücresel membranları denatüre ederek antosiyaninlerin ekstraksiyon veriminin artmasına yol açtığı daha önce bildirilmişti [24, 43, 44].

Literatürde farklı reyhan ekstraktlarında antosiyanin miktarının 16,63-18,78 mg/100 g taze örnek [45] ve 2,07-9,72 mg/g kuru madde [46] aralığında değiştiği belirtilmiştir. Diğer antosiyanin kaynaklarına kıyasla, reyhan bitkisinin çok fazla asitlenmiş ve glikozide antosiyanin içerdiği ve gıda endüstrisi için kararlı kırmızı pigment kaynağı olabileceği ifade edilmiştir. Bileşiminde tespit edilen antosiyaninlerin en önemlileri olarak siyanidin 3-O-glukozit, siyanidin 3,5-diglukozit ve peonidin 3,5-diglukozit rapor edilmiştir [45]. Reyhanın fenolik bileşikler açısından zengin olduğu ve buna bağlı olarak yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilen çalışmada, DPPH ve ABTS antioksidan aktivitelerinin sırasıyla 490,17 ve 57,63 mg TE/g kuru madde ve toplam fenolik madde içeriğin ise 55,64 mg GAE/g kuru madde olduğu rapor edilmiştir ([17]. Başka bir çalışmada, reyhan ekstraktının ABTS ve DPPH bazlı antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik içeriği sırasıyla %67,83, %86,98 ve 57,94 mg GAE olarak tespit edilmiştir [5].

Antosiyaninlerin sağlık üzerinde olumlu etkileri olmasına rağmen biyolojik aktiviteleri, sıcaklık, pH veya radyasyon gibi etkenler nedeniyle tehlikeye girebilmekte, enzimlerin, proteinlerin veya metal iyonlarının varlığı, oksijen, nem, ışık veya mikroorganizmalarla temas bozulmaya ve pigmentasyon gücünde azalmaya neden olabilmektedir [47, 48]. Antosiyaninlerin düşük stabilitesi onların kullanımını da sınırlamakta ve bu durum stabilite çalışmalarına olan ihtiyacı arttırmıştır. Bu amaçla enkapsülasyon teknolojisi üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu anlamda Herrera-Balandrano vd. [21], pigmentin kararsızlığını azaltmak için nanokapsülleme, mikrokapsülleme ve protein kompleksleri gibi farklı

dağıtım sistemlerinin kullanıldığını belirtmiştir. Martins vd. [49] ve Ribeiro ve Veloso [50], enkapsülasyon teknolojisinin bu biyoaktif kimyasal bileşiklerin kaplanması ve korunmasına uygun bir alternatif olduğunu vurgulamıştır.

1.1.3 Enkapsülasyon Teknolojisi

Enkapsülasyon, biyoaktif maddelerin dış etkenlerden korunması amacıyla bir sistem içerisinde korumaya alınmasını ve kapsüle edilen bu maddelerin istenen koşullarda salınmasına izin veren teknolojidir [51]. Enkapsüle sistemlerde, antosiyaninler gibi biyoaktif bileşikler çekirdek malzemesi, çevreleyen malzeme ise duvar malzemesi olarak adlandırılır. Duvar malzemesi sıcaklık, ışık, nem ve oksijen gibi çevresel faktörlerin kapsüllenmiş aktif bileşiklerin stabilitesi üzerindeki etkisini azaltarak koruma sağlamaktadır [52].

Gıda amaçlı kullanılacak enkapsüle sistemler için kapsülleyici duvar malzemeleri gıdada kullanılabilir ve kullanım kolaylığına, düşük higroskopisiteye ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahip olmalıdır. Bir diğer önemli ön koşul ise iç ve dış faz arasında bir bariyer oluşturarak kapsüllenmiş malzemeyi çevre koşullarından koruması ve böylece işleme ve depolama sırasında stabilitesini arttırmasıdır [53] (Şekil 1.4).

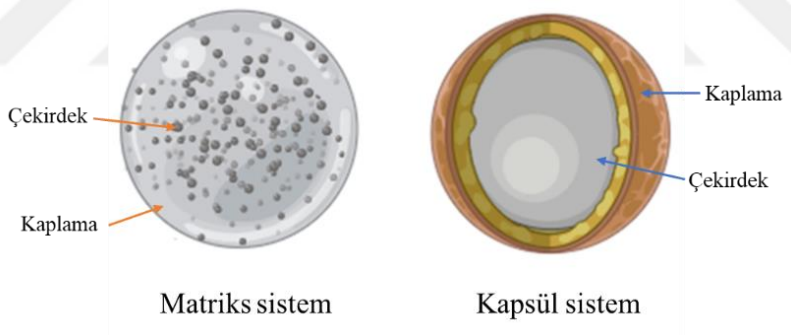


Şekil 1.4 Gıda endüstrisinde enkapsülasyonun önemli uygulamaları

Enkapsülasyon, moleküler stabiliteyi, biyoyararlanımı ve bağırsakta kontrollü salınımı geliştirmek için kapsamlı bir şekilde araştırılmakta ve kullanılmaktadır.

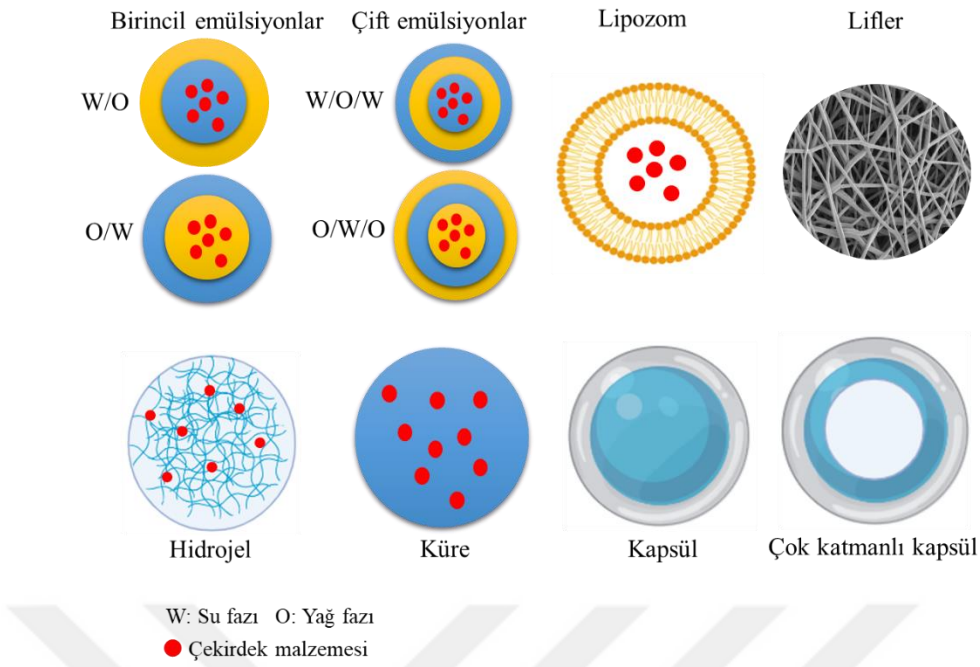
Enkapsülasyon için çeşitli duvar malzemeleri bulunmaktadır [54]. Polisakkaritler, proteinler ve lipitler gibi doğal nanoyapılı polimerler, düşük toksisite, kimyasal özellikler ve mekanik direnç nedeniyle düşük stabilite gösteren antosiyaninler dahil biyoaktif bileşenlerin kapsüllemesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [55]. Enkapsülasyon, bu fonksiyonel biyoaktif bileşenlerin gıdalara, diyet takviyelerine ve ilaçlara eklenmesi için etkili bir strateji oluşturmaktadır [56]. Enkapsülasyon ile çekirdek malzemesi olan biyoaktif bileşikler oksidasyona karşı daha dayanıklı hale getirilebilir. Örneğin, balık yağının gıda ürünlerine enkapsüle şekilde eklenmesi ile çeşitli proses ve çevre koşulları kaynaklı oksidatif reaksiyonlar engellenerek istenmeyen aroma ve lezzet bileşiklerinin ve toksisiteye sahip oksidasyon bileşiklerinin son üründe oluşması engellenebilmektedir [57]. Ayrıca, enkapsülasyonla biyoaktif bileşenlerin mide ve bağırsak ortamındaki pH koşullarına, enzim ve safra tuzları varlığına karşı stabilitesi ve dolayısıyla biyoerişilebilirliği arttırılabilmektedir [58].

Kapsüllenmiş partiküller, çekirdek malzemenin dağılımına bağlı olarak Şekil 1.5'te görüldüğü gibi matriks ve kapsül sistem olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.



Şekil 1.5 Matriks ve kapsül sistemler

Matriks sistemleri, aktif bileşenin veya çekirdeğin fiziksel ve düzgün bir şekilde dağıldığı sistemlerdir. Buna karşılık, kapsül sistemler, çekirdek materyalinin bir kapsül (polimer) membranla çevrelenen bir boşlukla sınırlandırıldığı sistemlerdir [59, 60]. Kapsül ve matriks sistemler (kolloidal dağıtım sistemleri), bileşimlerine, şekillerine, kaplama malzemelerine ve üretim tekniklerine bağlı olarak farklı şekillerde adlandırılmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Farklı kolloidal dağıtım sistemleri

Enkapsülasyon tekniğinin seçimi, çekirdek materyallerin fizikokimyasal özelliklerine ve bunların amaçlanan uygulamasına bağlıdır. Emülsifikasyon, koaservasyon ve süperkritik akışkan teknikleri ile hem hidrofilik hem de lipofilik bileşiklerin kapsüllenmesi gerçekleştirilebilir [61]. Ancak, inklüzyon kompleksleştirme, emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma ve nano çöktürme teknikleri ile lipofilik bileşikler enkapsüle edilebilmektedir [59].

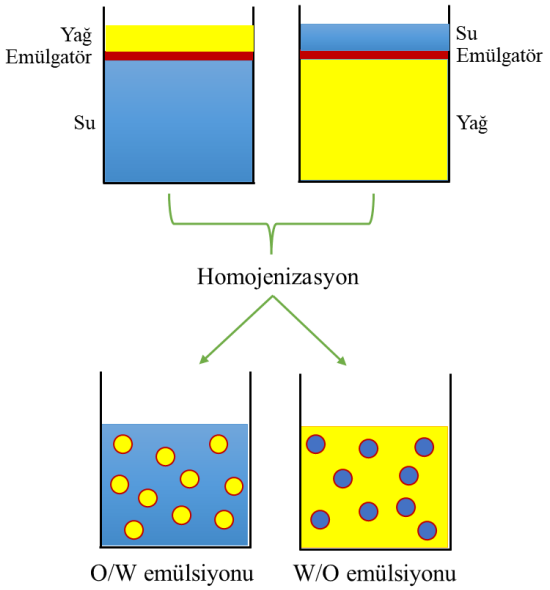
Literatürde antosiyaninlerin, kompleks koaservasyon [62–64], lipozom [65], sprey kurutma [66, 67], dondurarak kurutma [68, 69] ve iyonik jelasyon-ekstrüzyon [70–72] gibi farklı enkapsülasyon yöntemleriyle stabilitesinin arttırıldığı birçok çalışma mevcuttur.

1.1.3.1 Emülsiyon Yöntemi

Bir emülsiyon, genellikle yağ ve su olmak üzere birbiriyle karışmayan iki sıvıdan oluşmakta ve sıvılardan biri, diğerinde küçük küresel damlacıklar halinde dağılmaktadır [73]. Emülsiyonlar, özellikle gıda endüstrisinde olmak üzere birçok özel uygulamada temel kapsülleme sistemleri olarak kullanılmaktadır. Emülsiyonların formülasyonu, yapı-işlevsellik ilişkisi ve dağıtım davranışları da mevcut araştırmaların odak noktasını oluşturmaktadır. Bileşenlerin konsantrasyonu ve oluşum adımlarının sayısı gibi emülsiyon hazırlama koşullarına bağlı olarak birincil yağ içinde su (W/O), su içinde yağ (O/W), nanoemülsiyonlar, çok katmanlı

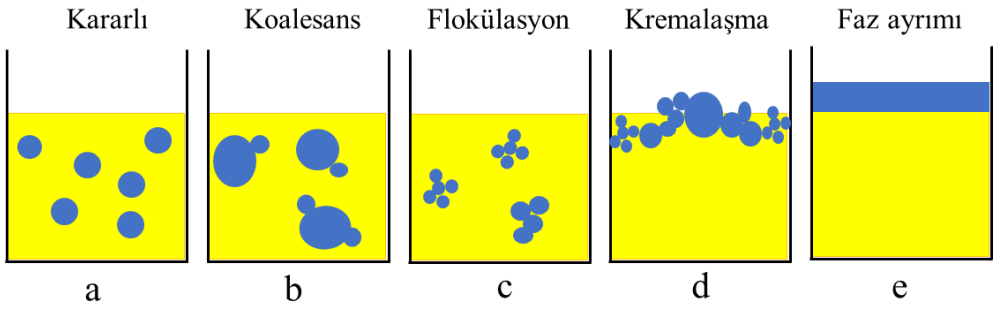
emülsiyonlar ve çift emülsiyonlar (W/O/W ve O/W/O) elde edilebilmektedir. Emülsiyonlar, alkolsüz içecekler, kremalar, salata sosları, mayonez, soslar, çorbalar, tereyağı ve margarin gibi gıda ürünlerini elde etmek için yağ bileşenlerinin yerine veya taşıyıcı sistemler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [74].

Su içinde yağ (O/W) emülsiyonları, sulu bir sürekli fazda dağılmış yağ damlacıklarından oluşmakta ve yağ damlacıkları, emülgatör moleküllerinden oluşan ince bir ara yüzey tabakasıyla çevrelenmektedir (Şekil 1.7). Emülsiyonlardaki yağ damlacıklarının konsantrasyonu ve parçacık boyut dağılımı, yağ fazı oranı ve hazırlama teknolojileri ile kontrol edilebilmektedir. Yağ damlacıkları tipik olarak 0,1-100 mm aralığında çapa sahipken, yüzey aktif maddeler olarak fosfolipitler, proteinler veya polisakkaritler kullanılmaktadır [73]. Damlacıklardaki elektrik yükü, pozitif, yüksüz veya negatif olabilen, uygun şekilde yüklenmiş bir emülgatör seçilerek kontrol edilebilmektedir. O/W emülsiyonları, çeşitli biyoaktif besinler için dağıtım sistemi olarak yaygın şekilde kullanılmasına ve büyük potansiyeller göstermesine rağmen, hala bazı dezavantajlar söz konusudur. Örneğin, O/W emülsiyonları genellikle ısıtma, soğutma, aşırı pH ve tuz konsantrasyonları gibi çevresel strese karşı hassastır ve bu durum fiziksel ve kimyasal kararsızlıklara yol açabilmektedir.



Şekil 1.7 Homojenizasyon ile birincil emülsiyonların hazırlanması

Çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$) sisteminde, öncelikle küçük su damlacıkları bir yağ fazında dağılır ve birincil (W_1/O) emülsiyon oluşur, birincil emülsiyon dış su fazında (W_2) dağılarak çift emülsiyonlar ($W_1/O/W_2$) meydana gelir [75]. Genellikle iki aşamalı emülsifikasyonda, çift emülsiyonların hazırlanması için bir lipofilik emülgatör (iç su damlacıklarını stabilize etmek için) ve bir hidrofilik emülgatör (yağ damlacıklarını birleşmeden korumak için) kullanılmaktadır. Çift emülsiyonlardaki tek emülsiyon aynı yağ fazı ile bağlanmakta ve aktif maddelerin, emülgatörlerin ve su moleküllerinin fazlar arasında nüfuz etmesine ve arayüzlerde etkileşime girmesine izin vermektedir [76]. Çift emülsiyonlar termodinamik olarak kararsız sistemlerdir, bu nedenle fiziksel ve kimyasal faktörlerle kararsızlaşmaya eğilimlidirler. Çift emülsiyonların stabilitesi, birincil (W/O) emülsiyonunda kullanılan emülgatörün yüzdesinden etkilenebilmektedir [77]. Ancak bazı yeni yöntemler, geleneksel yöntemlere kıyasla çift emülsiyonların stabilitesini iyileştirmiştir [78, 79]. Emülsiyonların yaygın fiziksel kararsızlıkları için kremalaşma, flokülasyon, koalesans, faz ayrımı ve ostwald olgunlaşması (Şekil 1.8) söz konusu iken kimyasal kararsızlıklar için oksidasyon ve hidroliz meydana gelebilmektedir [80].



Şekil 1.8 Emülsiyonların fiziksel kararsızlıkları

Başka bir emülsiyon sistemi olarak Pickering emülsiyonlar, su içinde yağ (O/W), yağ içinde su (W/O) veya çift emülsiyonları elde etmek için kullanılan yüzey aktif maddeler yerine katı parçacıklar tarafından stabilize edilen bir emülsiyon çeşididir [81]. Bu parçacığın arayüzey aktivitesi, yeterli boyutun yanı sıra orta düzeyde yüzey ıslanabilirliğini de gerektirmektedir. Stabilize eden katı parçacıklar doğası gereği organik veya inorganik olabilmektedir [82]. Katı parçacıklar, emülsiyonu stabilize etmek için stabil bir ara yüzey tabakası oluşturmak üzere yağ-su arayüzü

üzerine adsorbe edilir. Katı parçacıklar, yağ-su ara yüzeyi ile üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturur ve damlacıklar, katı parçacıklar arasında mevcut olan elektrostatik itme kuvveti ile birbirlerinden uzaklaştırılır [83].

Julio vd. [74], ω-3 taşıyıcı sistemi üretmek için ayçiçeği lesitini ve kitosan içeren chia yağı çift emülsiyonları geliştirdi. Elde edilen emülsiyonların lipid oksidasyonuna karşı koruyucu bir sistem olduğu ve gıda endüstrisindeki potansiyel uygulamalarla ω-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin dağıtım sistemi için uygun bir seçenek oluşturduğu ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada, guar gamın ve çift emülsiyonun antosiyaninlerin termal stabilitesini arttırma potansiyeli araştırılmıştır. Çift emülsiyonun yağ fazı olarak üzüm çekirdeği yağı kullanılan çalışmada, antosiyaninler çift emülsiyonun iç su fazına guar gam ile eklenmiş ve ışık varlığında 40 °C'de 10 gün boyunca depolanmıştır. Çift emülsiyon sisteminin, antosiyanin bileşiklerini bozunmaya karşı korumanın yanı sıra, belirlenen koşullar altında yüksek kapsülleme verimliliği (%90,6) ve yüksek kinetik stabilite sergilediği vurgulanmıştır [84]. Bamba vd. [85] tarafından yapılan çalışmada, polifenol açısından zengin bir yaban mersini posası ekstraktından fenoliklerin ve antosiyaninlerin birlikte kapsüllenmesine uygun bir ($W_1/O/W_2$) çift emülsiyon sistemi geliştirilmiştir. Çift emülsiyonun homojenizasyon süresinin 15 dk'dan 20 dk'ya çıkarılması damlacık çapında ve zeta potansiyelinde artışa neden olurken antosiyaninlerin kapsülleme verimi azalmıştır. Ayrıca, yağ damlacıklarının nispeten küçük olduğunda (ortalama çap < 400 nm), yaban mersini polifenolleri ve antosiyaninlerinde %80 koenkapsülasyon oranı tespit edildiği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada, antosiyaninler, mısır yağı ve PGPR ile saponin emülgatörleri kullanılarak elde edilen çift emülsiyonun ($W_1/O/W_2$) iç su fazında (W_1) enkapsüle edilmiştir. Enkapsülasyonun, iç sulu fazın dış fazdan farklı bir pH'a sahip olması nedeniyle, pH'ın neden olduğu renk değişikliklerini önemli ölçüde yavaşlattığı rapor edilmiştir. Sulu fazlar arasındaki antosiyanin transferinin pH, sıcaklık ve başlangıç konumuna bağlı olduğu ifade edilmiş olup çift emülsiyonların doğal pigmentlerin kapsüllenmesi ve korunması için yararlı olduğu gösterilmiştir [86]. Bir çalışmada, astaksantin, zein ve adzuki fasulyesi tohumu kabuğu polifenol nanopartikülleri ile stabilize edilen Pickering emülsiyonlar ile enkapsüle edilmiştir. Sonuçlara göre, astaksantin *in vitro* biyoerişilebilirliği zein ile stabilize olan

Pickering emülsiyonlarda %58,56 iken polifenol nanopartiküller ile stabilize olanda ise %55,66 olarak tespit edilmiştir [83].

1.1.3.2 İyonik Jelasyon Tekniği

Hidrokolloid jel parçacıkları veya hidrojel kapsülleri, biyoaktif bileşiklerin kapsüllenmesi ve gıda tekstür özelliğinin iyileştirilmesi amacıyla, probiyotik, tıbbi ve kozmetik ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. İyonik polimerizasyon veya polielektrolit iyonik bağlanma ile oluşturulmaktadırlar. İyonik jelasyon veya iyonotropik jelasyon olarak adlandırılan bu enkapsülasyon yöntemi, yüklü polimerlerin karşıt yüklü iyonlar varlığında çapraz bağlanmalar yaparak kapsül oluşturmasına dayanmaktadır. Genellikle, bir polimerik hidrokolloid çözeltisi, sürekli karıştırma altında iyonik bir çözeltiye damlatılmakta veya atomize edilmektedir. Kapsüllenecek aktif bileşik, polimerik çözelti içinde çözdürülmekte ve iyonik çözeltiye ulaşan damlalar, polimer matrisinde dağılmış olan aktif bileşiği içeren küresel jel yapıları oluşturmaktadır [87]. İyonik jelleşme, damlatma-ekstrüzyon ve koekstrüzyon, atomize etme ve son zamanlarda elektrospreyleme yöntemiyle gerçekleştirilebilmektedir [88]. Bu yöntem, yüksek sıcaklığa, organik çözücülere, yüksek basınç gibi proses koşullarına ihtiyaç duymaması ve hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin enkapsülasyonunda kullanılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Bu yöntemde, yüzey jelleşmesi genellikle çekirdek (iç kısım) jelleşmesinden önce meydana gelir ve iç kısmın yumuşak olmasına neden olur. Bu şekilde, heterojen bir jelasyonun meydana gelmesi, jelasyonun difüzyon mekanizması ile oluşmasından kaynaklanmaktadır [89]. Bu dezavantaj ile, hidrofilik bileşiklerin kapsüllenmesine yönelik literatürde bildirilen, düşük kapsülleme verimliliği, istenmeyen salınım özellikleri ve kapsüllenmiş bileşiğin zaman içinde difüzyonu gibi olumsuzluklar ortaya çıkmaktadır [87]. Bu olumsuzlukları engellemek için, iyonik jel ağına enkapsüle edilen biyoaktif maddelerle etkileşime girmesi için farklı polimerlerin dahil edilmesi [90] ve jel matrisine yağ gibi bir bariyerin eklenmesi [91] şeklinde bazı stratejiler önerilmiştir.

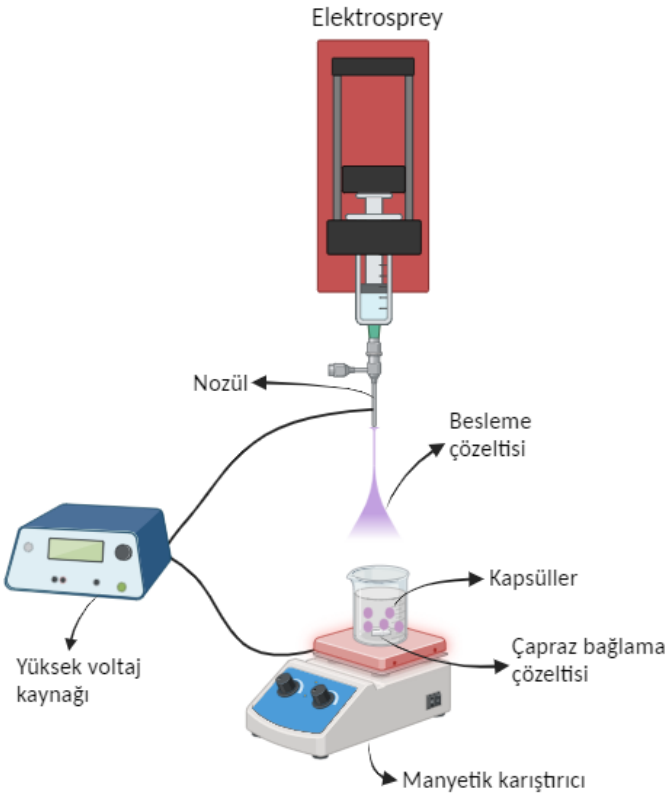
Cordoba vd. [92] tarafından yürütülen çalışmada, yerba mate (mete çayı, *Ilex paraguariensis*) polifenollerini kalsiyum aljinat hidrojel kapsüllerine nişasta ilave ederek enkapsüle edilmiş ve kapsülleme verimliliğinde %55'ten (nişastasız kontrol numunesi) %65'e kadar bir artış olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar, nişasta granüllerinin kalsiyum aljinat matrisi içindeki boşlukları doldurduğunu, iyonik

jelleşme sırasında polifenollerin çapraz bağlanma çözeltisine difüzyonunu engellediğini ifade etmişlerdir. Aynı grubun sonraki çalışmasında, kontrol numunelerinin (ikinci polimer içermeyen), nişasta dolgulu taneciğe göre daha yüksek bir toplam gözenek hacmi sunduğu belirtilmiştir. Ayrıca nişasta, kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında simüle edilmiş sindirim sıvılarındaki toplam polifenol salınımını geciktirdiği gözlenmiştir [93].

Çevresel faktörlere karşı oldukça hassas olan antosiyaninlerin enkapsülasyonunda iyonik jelasyon yönteminin kullanıldığı birçok çalışmada olumlu sonuçlar kaydedilmiştir [72, 94–96].

Elektrosprey Yöntemi

Bu çalışmada, iyonik jelasyon elde etmek için kullanılan elektrospreyleme tekniğinde (Şekil 1.9), besleme çözeltisinin viskozitesi, nozül-kolektör aralığı, akış hızı, voltaj ve iğne tipi ayarlanarak homojen ve daha küçük parçacık boyutları elde edilebilmektedir [97].



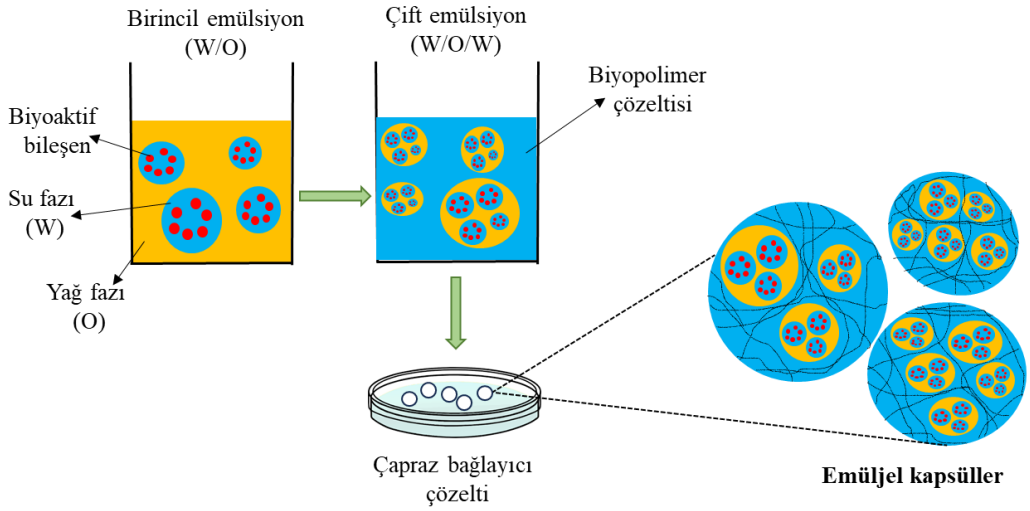
Şekil 1.9 Elektrosprey ile kapsül üretimi

Bugarski vd. [98] ilk olarak elektrosprey tekniğini kullanarak mikrokapsül eldesini bildirmiş ve boyut kontrollü mikrokapsüllerin etkili bir şekilde elde edildiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, elektrosprey tekniği kullanılarak aljinat-kitosan mikrokapsülleri (~100 μm) başarılı bir şekilde üretilmiştir. Mikrokapsüllerin çapları, besleme hızı, çalışma voltajı, iğneden toplayıcıya olan mesafe, iğne çapı ve polielektrolit konsantrasyonları gibi çalışma koşulları değiştirilerek 80-230 μm aralığında kontrol edilmiştir. Çalışmada, ayrıca protein ve dekstranın elde edilen polielektrolit mikrokapsüller içerisine yüksek kapsülleme verimliliğiyle (%99'dan fazla) kapsülasyonu sağlanmıştır [99]. Karakas vd. [100] tarafından gerçekleştirilen çalışmada, polifenolik bir bileşik olan ellajik asit, elektrosprey kullanılarak kitosan kaplı aljinat-pektin hidrojel kapsüller içinde başarılı bir şekilde kapsüllenmiştir. Ellajik asitin enkapsülasyon etkinliği (%EE), kaplanmamış kapsüller için %49,53-69,85 arasında değişirken aljinat hidrojel kapsülün kaplanması ile %86,50'ye kadar artış gösterdiği ve düşük molekül ağırlıklı kitosan ile kaplamanın daha yüksek %EE sağladığı belirtilmiştir.

1.1.3.3 Hibrit Enkapsülasyon Sistemi

Su içinde yağ emülsiyonu (O/W) olarak hazırlanan tekli bir emülsiyonda sürekli su fazına bir jelleştirici ajanın eklenmesi, klasik bir emülsiyonu bir emüljel (emülsiyon içeren hidrojel) sistemine dönüştürebilmektedir [101].

Aktif bileşenlerin enkapsülasyonunda tekli/çift emülsiyon sistemlerinin veya iyonik jelasyon ile elde edilen hidrojellerin ayrı ayrı kullanılmasıyla ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak biyoaktif maddelerin enkapsülasyonunda, bu iki sistemin bir arada kullanıldığı ve emüljel kapsül (boncuk şeklindeki emülsiyon içeren hidrojel kapsül) (Şekil 1.10) olarak adlandırılan hibrit enkapsülasyon sistemleri ile ilgili çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Emüljel hibrit enkapsülasyon sistemi, tek başına emülsiyon veya tek başına hidrojele göre daha yüksek stabilite, kontrollü salınım, yüksek yükleme kapasitesi gibi avantajlar sunmaktadır [102]. Enkapsüle edilecek biyoaktif bileşen antosiyaninler gibi suda çözünür özellikte ise, öncelikle stabil bir çift emülsiyonun ($W_1/O/W_2$) hazırlanması ve son su fazına (W_2) iyonik çözelti ile çapraz bağlanma oluşturabilecek bir biyopolimerin ilave edilmesi gerekmektedir.



Şekil 1.10 Emüljel (emülsiyon yüklü hidrojel) kapsül üretimi

Çeşitli biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonunda emüljel sistemin (emülsiyon yüklü hidrojel sistemi) kullanıldığı çalışmalar son zamanlarda artış göstermiştir [72, 103–106]. Yapılan bir çalışmada, β-karoten enkapsülasyonu için tatlı rezene yağı ile formüle edilmiş emüljel taşıyıcı bir sistem geliştirilmiştir. Damlacık boyutunun nanometre ölçeğine kadar önemli ölçüde küçüldüğü ve emüljellerin aktif bileşenleri korumada etkili bir yöntem olduğu ifade edilmiştir [107]. Başka bir çalışmada, tatlı rezene yağı ve gliserol ile hazırlanan emülsiyon rhamsan gamı ile jelleştirilerek emüljeller elde edilmiştir. Rhamsan gamın iyi bir emülsiyon stabilizatörü olduğu ve emüljel stabilitesini arttırdığı vurgulanmıştır [108]. Karakas vd. [109] probiyotik bakteri olan *Lactobacillus plantarum* ELB90 enkapsüle etmek için elektrosprey yöntemi ile çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$) yüklü aljinat hidrojel kapsüller (emüljel kapsül) elde etmişlerdir. Emüljel kapsüllerin optik mikroskop, SEM ve FTIR analizleri ile karakterize edildiği çalışmada, sindirimin bağırsak aşamasından sonra, enkapsüle edilmeyen bakterilerin %38'i hayatta kalırken kitosan kaplı aljinat emüljel kapsüllerde bu oran %84'e yükselmiştir. Aljinat kapsüllerin jel matrisine çift emülsiyonun katılması sonucunda probiyotik bakteriler için gelişmiş koruma elde edilmesi fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde faydalı olabileceği vurgulanmıştır.

1.1.4 Biyopolimer

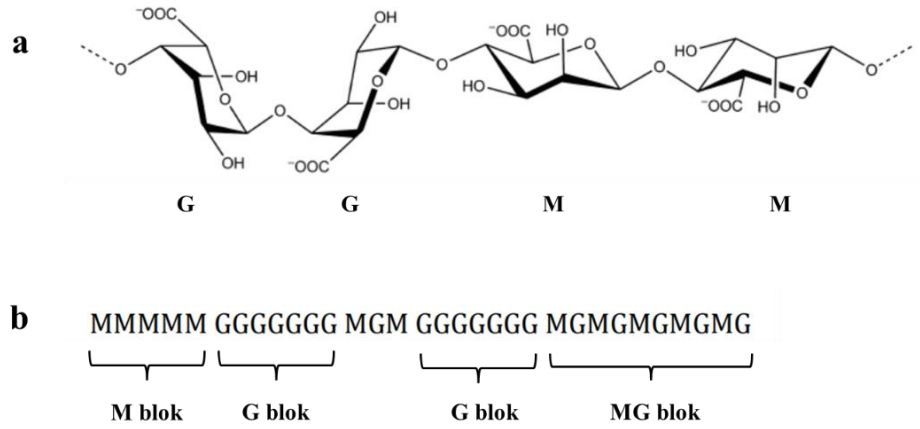
Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin önemi her geçen gün artmaktadır. Biyopolimerlerin çok yönlülüğü, herhangi bir toksik kalıntı bırakmadan parçalanabilir ve ucuz olmaları, doğada bol miktarda bulunmaları araştırmaların

artmasına ve yeni endüstriyel uygulamaların geliştirilmesine olanak sağlamıştır [110].

Polimerler, bir veya daha fazla monomer biriminden oluşan uzun, kovalent olarak dallanmış yapılardır. Her monomerin iyon yükü ve polarite gibi benzersiz bir özelliği vardır. Bu polimerler gıda endüstrisinde kullanıldığında bu özellikler önemlidir. Son araştırma eğilimleri, doğal alternatiflerin geliştirilmesinde bir artış olduğunu göstermektedir. Gıda endüstrisinde öncelikle doğal veya doğadan türetilen polimerler kullanılmaktadır. Bu polimerler yenilebilir film, kaplama, ambalaj veya koruyucu, muhafaza edici bariyerler, emülsifiye edici ve jelleşme ajanı olarak kullanılabilmektedir [111, 112]. Enkapsülasyon teknolojisinde kaplama malzemesi olarak sıklıkla kullanılan biyopolimerlerin seçimi elde edilecek kapsülün boyutu ve şekli, stabilite ve geçirgenlik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Doğal polimerler arasında bitki karbonhidratlarından kitosan, nişasta, karragenan, agar, aljinat ve bitkisel ve hayvansal protein kökenli peynir altı suyu proteini, soya proteini, gluten, kollajen, zein, kazein, jelatin gibi polimerler yer almaktadır [113].

1.1.4.1 Aljinat

Aljinat, β-1,4-glikosidik bağlarla rastgele bir şekilde bağlanan α-L-Gluronik asit (G blok) ve β-D-Mannuronik asitten (M blok) oluşan bir polianyonik polisakkarittir [114, 115] (Şekil 1.11) Bağlı G bloklarının uzunluğu doğrudan mekanik özelliklerle, M bloklarının içeriği ise immünojeniteyle ilişkilidir. Doğada, aljinat genellikle farklı kahverengi alg (*Phaeophyceae*) türlerinin hücre duvarında ve hücreler arası müsilajında ve ayrıca psödomonas (*Pseudomonas aeruginosa vb.)* ve azot sabitleyici bakteriler (*Azotobacter vinelandii* vb.) gibi bazı bakterilerde genellikle sodyum tuzları formunda bulunur; bu nedenle aljinatın yapısı ve kaynağı farklı olabilmektedir. Aljinat aynı zamanda olumlu biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, çözünürlük, stabilite ve hipoglisemi, antioksidasyon ve bağışıklık aktivitesinin arttırılması gibi spesifik fizyolojik işlevlere de sahiptir. Daha da önemlisi, aljinatın ana zinciri, değiştirilmesi kolay olan hidroksil (OH) ve karboksil (COOH) grupları gibi çok sayıda hidrofilik grup içerir, bu özellikler nedeniyle aljinat, birçok alanda büyük ilgi görmektedir [116, 117].

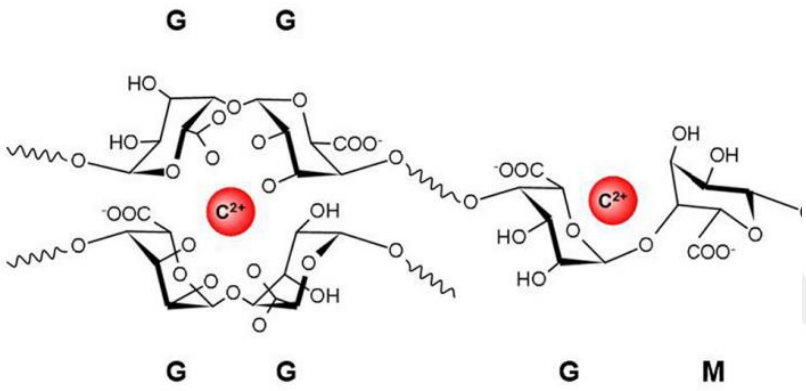


Şekil 1.11 Aljinatın **(a)** kimyasal yapısı ve **(b)** blok dağılımı [118]
(G blok: Gluronik asit blok; M blok: Mannuronik asit blok; MG blok: Gluronik asit ve Mannuronik asit blok karışımı)

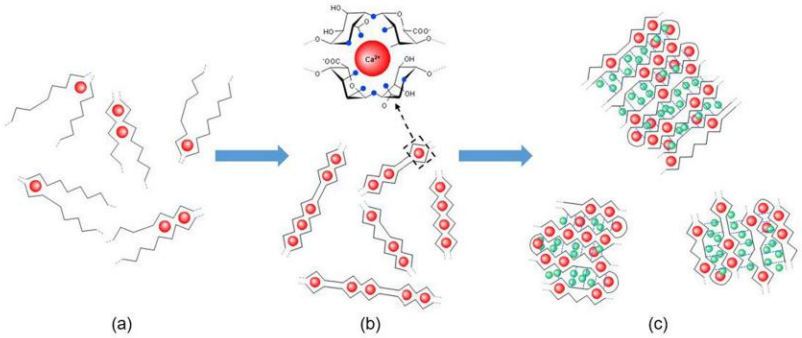
Aljinatların kalsiyum, sodyum, amonyum ve potasyum tuzları, FDA (U.S. Food and Drug Administration, ABD Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe, Genellikle güvenilir olarak kabul edilen) olarak onaylanmıştır. Mükemmel stabilize etme ve kıvamlaştırma özelliklerinden dolayı aljinat, çok çeşitli içecek, jöle, dondurma ve tatlı ürünlerinde stabilizatör ve/veya koyulaştırıcı olarak görev almaktadır [115]. Ayrıca, aljinat gıdaya dahil edilmesi ile potansiyel olarak glisemik tepki ve kardiyovasküler hastalıkla ilişkili riskleri azalttığından yararlı sağlık etkileri de bulunmaktadır [119]. Aljinat, kronik hastalıklara neden olan metallerin toksik etkilerini azaltabilen doğal bir ağır metal emicidir [120]. Fakat, yüksek viskozite ve jelleşme özellikleri nedeniyle gıda ürünlerine dahil edildiğinde aşırı tekstürizasyona yol açabilmekte ve böylece, yararlı sağlık etkilerini sağlamak için yüksek miktarda kullanım gerektirdiğinde aljinatın potansiyel uygulamalarını kısıtlayabilmektedir.

Enkapsülasyon teknolojisinde yaygın olarak kullanılan aljinatın biyouyumlu ve bağırsaklarda tamamen çözünebilir olması kaplama materyali olarak kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Uygulamaların çoğu, aljinatın iki değerlikli katyonların, özellikle Ca^{+2} iyonları varlığında bağlanma (Şekil 1.12), bir araya gelme ve jelleşme kabiliyetine dayanmaktadır [121]. Jelleşme kapasitesini düzenleyen mekanizma, zincir boyunca mevcut G-bloklarının miktarıyla doğrudan ilişkilidir, çünkü hidrojel oluşumunda yalnızca α-L-gluronik asit aktif bir role sahiptir. Bu mekanizma "egg-box, yumurta kutusu" modeliyle açıklanmaktadır. Bu modelde, karşılıklı bakan iki

G bloğu, içinde Ca^{+2} iyonlarının spesifik koordinasyon etkileşimi yoluyla barındırıldığı boşluklara sahip bükülmüş yapıyı oluşturmak üzere bir araya gelir ve yumurta kutusunu andıran geometrik yapıya sahip çapraz bağlı dimerler oluşur. Yeterli Ca^{+2} varlığında dimerler yanal olarak multimerler halinde toplanırlar (Şekil 1.13) [122, 123]. Bu reaksiyon çok hızlı gerçekleşmekte ve jelin stabilitesi, çözeltiye eklenen iyonların miktarına ve stabil birleşmelerin oluşumundaki G-bloğunun uzunluğuna bağlı olmaktadır [124]. Aljinatın çok değerlikli katyonlar varlığında jelleştiği çok uzun zamandır bilinse de jelleşmenin tek değerlikli iyonlarla (Ag^{+} ve K^{+} gibi) da mümkün olduğu son zamanlardaki çalışmalar ile gösterilmiştir [125, 126].



Şekil 1.12 İki değerlikli katyonlar için bağlanma bölgelerini gösteren aljinat moleküler yapısı [122]
(Kırmızı daireler katyonları temsil etmektedir. C: katyon; G: α-L-gluronik asit; M: *β*-D-mannuronik asit)



Şekil 1.13 Ca-aljinat jellerinin mekanizması: **(a)** egg-box, yumurta kutusu modeli; **(b)** yumurta kutusu yapısı ve yumurta kutusu dimerleri; **(c)** yumurta kutusu multimerleri [122]
(Kırmızı ve yeşil daireler sırasıyla Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarını, mavi içi dolu daireler Ca^{+2} ile koordinasyonda yer alan oksijen atomlarını ve mavi noktalı çizgiler hidrojen bağını temsil etmektedir)

İyonik çapraz bağlama yoluyla aljinat jelleri elde etmek için iki farklı yöntem vardır: difüzyon yöntemi ve iç jelasyon yöntemi. Yöntemler, çapraz bağlama iyonunun ortama verilme şekli açısından farklılık göstermektedir. Difüzyon yöntemi, aljinat çözeltisine dışarıdan iki değerlikli iyonların dahil edilmesi ile karakterize edilmektedir. Bu jelleşme çok kısa sürede gerçekleşmekte olup aljinat jeli içindeki çapraz bağların homojen olmayan dağılımı ile sonuçlanmaktadır. İç jelleşme yöntemi, çapraz bağlanan iyonun aktif olmayan formunun aljinat çözeltisi ile karıştırılmasına dayanmaktadır. Bu yöntem, jellerin yavaş ve kontrollü bir şekilde oluşmasına bağlı olarak aljinat jelinin homojen bir şekilde dağılmasıyla sonuçlanmaktadır [124].

Aljinat kapsüllerinin pH karşı duyarlı olması onların önemli bir özelliğidir ve bu özellik onları oral dağıtım sisteminin tasarımı için uygun hale getirmektedir. Mide ortamında aljinat bazlı hidrojeller büzülüp enkapsüle edilmiş biyoaktif bileşiklerin salınımı engellenirken bağırsak ortamında, yapısındaki hidrofilik gruplar sayesinde aljinat kapsüller şişerek kapsüllenmiş çekirdek materyalinin kontrollü salınımı gerçekleşmektedir [127, 128]. Bu sebeple aljinat biyoaktif bileşiklerin hidrojel kapsüller içinde enkapsüle edilmesi amacıyla çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çeşitli bitki kaynaklarından elde edilen antosiyaninlerin aljinat kapsüllerde enkapsüle edildiği çalışmalar Tablo 1.3'te verilmiştir.

Tablo 1.3 Antosiyaninlerin aljinat kapsüllerde enkapsüle edildiği çalışmalar

Polimer	Antosiyanin Kaynağı	Yöntem	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Kaynaklar
-Aljinat (SA) -Pektin (P)	Üzüm kabuğu	Çift (W_1/O/W_2) emülsiyon (DE), Ultrasonik jelasyon	SA: %64 SA-DE: %89 P: %46 P-DE: %76	[105]
-Aljinat	Kırmızı soğan kabuğu	Atomizasyon	%25-60	[129]
-Aljinat	Jabuticaba kabuğu	Damlatma	%89,6	[130]
-Aljinat	Jabuticaba kabuğu	Damlatma	%98,67	[95]
-Aljinat	Patlıcan kabuğu	Damlatma	%51,08-72,79	[131]
-Aljinat (SA) -Gam arabik (GA) -Guar gam (GG) -Pektin (P) -Ksantam gam (KG)	*Syzygium cumini*	Damlatma	SA-KG: %80,83 SA-P: %87,41 SA-GA: %90,15 SA-GG: %95,76	[71]
-Aljinat -Kitosan	Yabanmersini	Birincil (W/O) emülsiyon, Damlatma	%80,69	[132]
-Aljinat (SA) -Pektin (P)	Kuş üzümü	Damlatma	SA: %69-72 SA-P: %76	[133]
-Aljinat (SA) -Maltodekstrin (MD) -Gam Arabik (GA) -Kitosan (K)	*Syzygium cumini*	Damlatma	SA: %83,25 SA-MD: %84,42 SA-GA: %91,17 SA-K: %92,4	[134]
-Aljinat	Kırmızı soğan	Damlatma	%54,80-75	[135]

Fathordoobady vd. [136] tarafından yapılan çalışmada, kırmızı ejder meyvesinin (*Hylocereus polyrhizus* L.) kabuğundan elde edilen betalain pigmenti aljinat mikrokapsüller ile enkapsüle edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliğinin %78,62 ve ortalama kapsül boyutunun 106,32 µm olduğu çalışmada, betalain yüklü aljanat kapsüllerin doğal renklendirici gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada, mor mısırdan elde edilen antosiyaninlerin enkapsülasyonu, kaplama malzemesi olarak aljinat kullanılarak ekstrüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Aljinat (%1-2) ve ekstrakt (%20-30) konsantrasyonu ile ekstrüzyon voltajının (3-5 kV) enkapsülasyon etkinliği ve ortalama kapsül boyutu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği (%91,59) ve minimum kapsül boyutu (1,29 mm) %1 aljinat, %20 ekstrakt ve 5 kV ekstrüzyon voltajı koşullarında elde edilmiştir. Stabilite çalışması sonucunda, antosiyanin

yüklü aljinat kapsüllerin 8 °C'de 4 haftalık depolama boyunca renklerini koruduğu rapor edilmiştir [137]. Kanokpanont vd. [138] tarafından yapılan çalışmada, dut ekstraktlı antosiyanin enkapsülasyonu için elde edilen aljinat/kitosan kapsüllerinin, simüle edilmiş mide sıvısında bağırsak sıvısında olduğundan daha hızlı bir oranda bozunduğu rapor edilmiştir. Kalsiyum aljinat kapsüllerin %0,05 kitosan çözeltisinde inkübe edilmesiyle elde edilen aljinat/kitosan kapsüllerin, yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren ve mide rahatsızlıklarında kullanılabilecek dut ekstraktlı antosiyaninlerin kapsüllenmesi için uygun mikro taşıyıcılar olduğu vurgulanmıştır. Natal eriği (*Carissa macrocarpa*) antosiyaninlerinin aljinat hidrojel kapsüllerde enkapsüle edildiği çalışmada, ksantan gam, pektin ve psilyum müsilajı aljinat ile kullanılmıştır. En yüksek enkapsülasyon etkinliği aljinat/psilyum müsilaj kapsüllerde (%93,67) gözlenirken sadece aljinatın kullanıldığı kapsüllerde (%86,80) verim en düşük olarak tespit edilmiştir. Simüle edilmiş *in vitro* sindirim ortamında en yüksek antosiyanin biyoerişilebilirliği aljinat/psilyum müsilaj kapsüllerinde (%85,42) elde edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, psilyum müsilajının aljinat kapsüllerin termal stabilitesini arttırdığını belirtmiştir [139]. Ayrıca, aljinat hidrojelleri diğer yapıların fiziksel stabilitesini arttırmak ve koruma sağlamak için de kullanılmaktadır. Sun ve Xia [140], ekstrüzyon-damlatma yöntemi ile aljinat hidrojel kapsüllere kuersetin-yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcıları dahil etmiştir. Nanobazlı lipid taşıyıcılar, lipofilik bileşenler için başarılı bir oral dağıtım sistemi olarak düşünülse de nispeten düşük stabiliteleri nedeniyle pratik kullanımları sınırlıdır. Bu nedenle, bunların aljinat hidrojellere dahil edilmesi, bu yapıların fiziksel stabilitesini etkili bir şekilde geliştirmektedir.

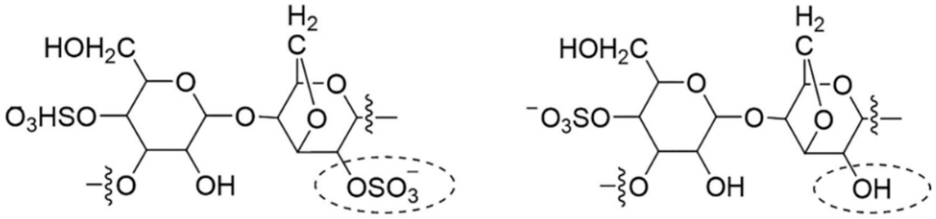
1.1.4.2 Karragenan

Karragenan, kırmızı alglerden ekstrakte edilen, %15-40 ester sülfat içeriğine sahip ve ortalama molekül ağırlığı 100 kDa'nın üzerinde olan, galaktoz ve α-1, 3 ve *β*-1, 4 glikosidik bağlarla dönüşümlü olarak bağlanan 3, 6-anhidro galaktozdan oluşan doğal bir anyonik polisakkarittir [141, 142]. Güçlü negatif yüklü karragenan, sülfat grubunun varlığı nedeniyle anyonik sülfatlanmış bir poligalaktan olup pozitif yüklü maddeler ile etkileşime girme kapasitesine sahiptir[143].

Disakkarit birimlerinin yapısal özelliklerine göre (sülfat grubunun sayısı ve konumu gibi), karragenan altı temel forma ayrılmaktadır: κ-, ι-, λ-, μ-, ν- ve θ-karragenan. Bu farklı karragenan türleri arasında κ- ve ι-karragenanın öncülleri

sırasıyla μ ve ν-karragenandır. Enzim ve alkalinin etkisi altında μ-, ν- ve λ-karragenan, α-galaktozsülfatın 3, 6-anhidroköprüsü oluşturularak κ-, ι- ve θ-karragenan dönüşebilmektedir [144].

Sırasıyla bir, iki ve üç organosülfat içeren ι-, κ- ve λ-karragenan, gıda endüstrisinde, farmasötiklerde ve biyomühendislikte yaygın olarak kullanılmaktadır [145]. Bu farklı karragenan türleri farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptir. İlk olarak, farklı karragenan türlerinin kendine özgü jelleşme yetenekleri vardır [146]. Sülfat gruplarının artmasıyla karragenanın jelleşme yeteneği azalmaktadır [147]. Böylece, κ-karragenan sert, güçlü ve kırılgan jeller oluştururken, ι-karragenan yumuşak ve zayıf jeller oluşturmaktadır [141], λ-karragenan ise yalnızca viskoz davranış sergilemektedir. Ancak son araştırmalar λ-karragenanda jelleşmenin üç değerlikli iyonlarla mümkün olduğunu ileri sürülmektedir [147]. Ayrıca jelin kuvveti karragenanın formuna, iyonların yüküne ve konsantrasyonuna bağlıdır. Katyon varlığında (örneğin K^+, Na^+, Ca^{+2}), κ- ve ι-karragenan termo-geri dönüşümlü jeller oluşturabilmektedir [148]. Jelleşen κ- ve ι-karragenanlar, düzensiz sarmallar oluşturan 3,6-anhidro-α-D-galaktopiranoz alt birimi ile aynı yapıda oluşur ve yalnızca yarı ester sülfat gruplarının yüzdesi ve ayrıca Şekil 1.14'te gösterilen galaktoz alt birimlerinin toplam sayısı açısından farklılık göstermektedir [149].

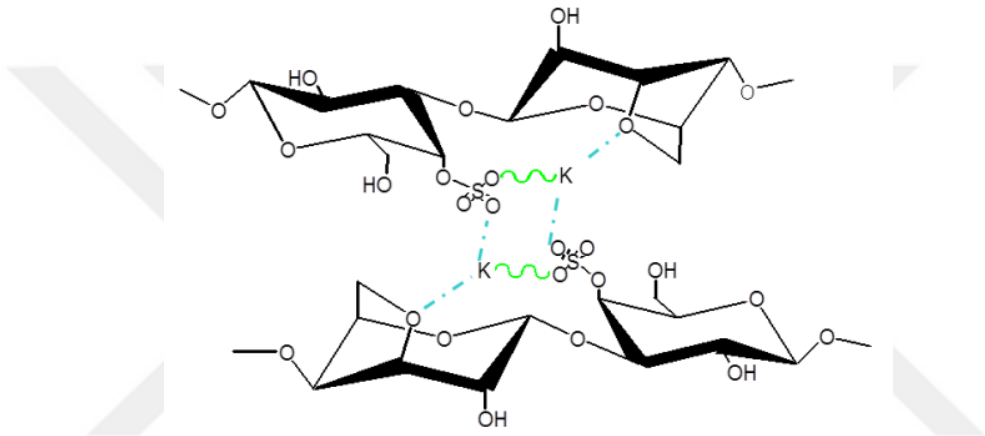


Şekil 1.14 κ- ve ι-karragenanın yapısı
(Yapısal fark daire içerisinde gösterilmiştir)

Tüm karragenan türleri suda çözünür özellikte olup çözünürlüğü formuna, sıcaklığa, pH'a, katyon tipine bağlıdır. Karragenanın hidrofilikliği sülfat ve hidroksil gruplarının varlığı ile ilgiliyken hidrofobikliği 3,6-anhidro galaktozdan kaynaklanmaktadır [148]. Üç ana karragenan türünün ester sülfat içeriği κ < ι < λ-karragenan şeklinde, 3, 6-anhidrogalaktoz içerikleri ise κ > ι > λ-karragenan

şeklinde sıralanmaktadır [147]. Bu nedenle κ-karragenanın çözünmesi ι ve λ formuna göre göre daha zor olduğu bilinmektedir.

κ-karragenan (κ-CG) jelleşmesi iki aşamada gerçekleşmektedir: İlk aşamada, 80-90 °C sıcaklıkta helis yapısı oluşmakta ve κ-CG sülfat grubu Ca^{+2}, Na^{+} ve K^{+} gibi katyonlar tarafından nötralize edilmektedir. İkinci aşamada, sıcaklığın 50 °C'ye düşürülmesiyle üç boyutlu ağ oluşmaktadır [150]. Ayrıca κ-CG, KCl varlığında NaCl, $MgCl_2$, LiCl, $SrCl_2$ ve $CaCl_2$ gibi diğer tuzlara göre daha güçlü jeller oluşturduğu rapor edilmiştir [151]. Şekil 1.15'te κ-CG'nın jelleşme mekanizması verilmiştir.



Şekil 1.15 κ-karragenanın K^{+} iyonu varlığında jelleşme mekanizması [152]
[(~): iyonik bağlanma; (— · —): elektrostatik çekim kuvveti]

κ-CG, düşük maliyet, toksik olmama, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, düşük immünojenite gibi üstün özelliklerinden dolayı gıda çalışmalarında geniş bir uygulama alanına sahiptir [153].

Karragenan diğer polimerler ile karşılaştırıldığında kapsülleme açısından birçok avantajlara sahiptir. Örneğin, karragenan pektinden daha iyi stabilite göstermektedir [154] ve κ-CG, kapsüllenmiş biyoaktif bileşenlerin daha iyi korumasını sağlayan asidik koşullar altında aljinattan daha yüksek bir elektronegatifliğe sahiptir [155]. Öte yandan, karragenan jellerinin termo-geri dönüşümlü olması birçok polimerde görülmeyen özelliktir [156].

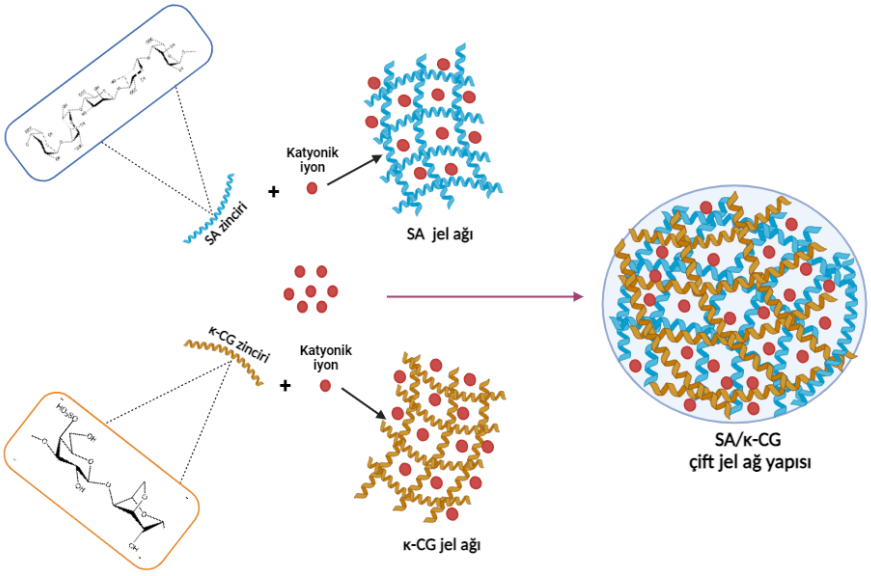
Bir çalışmada, kurkumin enkapsülasyonu için O/W emülsiyonu ile kalsiyum ve potasyum varlığında O/W emülsiyon yüklü-aljinat kapsüller ve O/W emülsiyon yüklü-karragenan kapsüller elde edilmiştir. Elde dilen sistemler ağız, mide ve ince

bağırsak aşamalarını içeren simüle edilmiş bir gastrointestinal sistemden geçirilerek kapsüllenmiş kurkuminin biyoerişilebilirliği karşılaştırılmıştır. Kapsüllenmiş kurkuminin salınması için lipit damlacıklarının lipaz tarafından sindirilmesi gerektiği ifade edilmiştir. Üç farklı sistemin lipit sindirim hızı, serbest lipit damlacıkları (O/W emülsiyonu) > karragenan kapsüller > aljinat kapsüller olacak şekilde azalma göstermiştir. Ayrıca kurkuminin biyolojik olarak erişilebilirliği benzer bir sırayı takip etmiştir: serbest lipit damlacıkları (emülsiyon) (%73) > karragenan kapsüller (%33) > aljinat kapsüller (%16) [157]. Zhang vd. [158] β-galaktosidaz enzimini K^+ iyonları varlığında κ-CG hidrojel kapsüllerde enkapsüle etmişlerdir. Araştırmacılar, sulu çözeltilerde depolama sırasında enzimin kapsüllerden salınmasını, hidrojel matrisinin nispeten büyük gözenek boyutuna sahip olmasıyla açıklamıştır. Xie vd. [159] tarafından yapılan çalışmada, yaban mersini antosiyaninlerinin stabilizasyonunu kolaylaştırmak için sülfat-antosiyanin nanokompleksi κ-CG hidrojeline dahil edilmiştir. Stabilite analizlerinin sonucunda, antosiyaninlerin stabilizesinin sıcaklık, pH ve metal iyonları gibi farklı depolama koşullarına bağlı olduğu gözlenmiş ve kullanılan nanokompleksin nispeten düşük pH'a maruz kaldığında antosiyaninlerin bozulmaya karşı etkili bir şekilde korunduğu rapor edilmiştir.

Karragenanın kullanışlılığının yanında işlenebilirlik ve reaktivite açısından bazı sınırlamalar söz konusudur. Karragenanların kitosan, pektin ve aljinat gibi diğer polimerlerle birlikte kullanılması ile işlenme yeteneği geliştirilebilmektedir [126]. Birbirinin özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla farklı polimer kullanılarak elde edilen karışım hidrojellerde, aralarında herhangi bir kovalent bağ oluşmadan bağımsız olarak çapraz bağlanan iki veya daha fazla polimer zincirleri söz konusudur. Birbirine nüfuz eden bu polimer ağları, yalnızca makromoleküler matrislerin kimyasal yapısına değil aynı zamanda pH, iyonik güç, sıcaklık, manyetik alan gibi çevre koşullarına da duyarlıdır. Karışım polimer hidrojelleri, gıda alanındaki biyoaktif bileşenlerin dağıtım sistemlerindeki uygulamaları nedeniyle günümüzde birçok araştırmacının odak noktasında yer almaktadır [126].

κ-CG biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonunda sıklıkla sodyum aljinat (SA) ile beraber kullanılan bir polimerdir. SA yüksek oranda karboksil grup [160], κ-CG yüksek oranda hidroksil grubu [161] içeriğine sahiptir. SA/κ-CG karışımında iki bileşik arasında, hidrojen bağları ve iyonik etkileşim yoluyla çapraz bağlanma ağı

oluşturan çok sayıda hidrojen bağı oluşmaktadır. Bu ağ nispeten stabil bir formdadır ve SA ile κ-CG molekülleri arası mesafenin azalmasını sağlamaktadır [162]. Böylece ağ yapısı giderek daha kompakt hale gelmekte ve κ-CG jelinin düşük mekanik kuvvetinin dezavantajının üstesinden gelinmektedir [163]. Şekil 1.16'da SA/κ-CG çift ağ yapısının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.16 SA/κ-CG çift ağ yapısının şematik gösterimi

Yu vd. [164], κ-CG ilavesinin SA'nın şişme derecesini azalttığını ve jellerin adsorpsiyon kapasitesini arttırdığını bildirmiştir. Sarıyer vd. [165] SA/κ-CG karışım polimer ağından simüle edilmiş bağırsak ortamına sığır serum albümininin salınımının azalmasının, karışım hidrojelinin yüksek oranda çapraz bağlı yapısından ve bağırsak ortamında bulunan fosfat iyonlarının şelatlayıcı etkisine karşı dirençten kaynaklandığını ileri sürmüştür. Yapılan bir çalışmada, jel matrisine κ-CG ve keçiboynuzu gamı eklenmesinin çift emülsiyon yüklü SA kapsüllerden tartrazinin kontrollü salınımına olan etkisi incelenmiştir [166]. Wu vd. [104], resveratrol yüklü Pickering emülsiyonların dahil edildiği SA/κ-CG hidrojel kapsülleri geliştirmiş ve simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında çapraz bağlama maddesindeki K^+ ve Ca^{+2} oranının stabilite, şişme ve sindirim davranışı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yang vd. [167], soya fasulyesi proteini/κ-CG kompleks hidrojellerini kullanılarak keten lignanları için taşıyıcı bir sistem geliştirmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinde, optimum κ-CG konsantrasyonundaki (%0,6) hidrojellerin yoğun ve düzgün bir yapı sergilediği

gözlenmiştir. Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim sonunda keten lignanının soya fasulyesi proteini/κ-CG kompleks jellerdeki kümülatif salınım oranı (%46), sadece soya fasulyesi proteini ile elde edilen hidrojellerinkinden (%77,43) daha düşük olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar, κ-CG, sindirim enzimlerinin hidrojellere erişimini engelleyerek proteini koruduğunu, dolayısıyla sindirim sırasında jel matriks erozyonunun ve lignan salınımının azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, κ-CG, pektin ve bunların hibrit hidrojelleri, iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak *β*-galaktosidazın kapsüllenmesi açısından değerlendirilmiştir. Üç aylık depolamanın ardından κ-CG hidrojelinin en iyi stabilite gösterdiği ve *β*-galaktosidaz salınımı pektin hidrojeline göre daha iyi sonuçlar verdiği rapor edilmiştir [154].

1.1.5 Literatürdeki Benzer Çalışmalar ve Farklılıklar

Çeşitli bitki kaynaklı antosiyaninlerin enkapsülasyonu ile ilgili literatürdeki çalışmalar incelenmiş ve bu tez çalışmasındaki farklılıklar belirtilip özet olarak aşağıda verilmiştir (Tablo 1.4).

Tablo 1.4 Antosiyanin enkapsülasyonu içeren benzer çalışmalar

Antosiyanin Kaynağı	**Besleme Çözeltisi**	**Yöntem**	**Sistem Bileşenleri**	**Kaynaklar**
Hibiscus sabdariffa L.	Çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$)	Damlatma, atomizasyon	Pektin, kolza yağı, PGPR (emülgatör)	[72]
Mor mısır, yabanmersini	Aljinat-pektin solüsyonu	Damlatma	Aljinat, pektin	[70]
Siyah ahududu	Çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$)	Kompleks koaservasyon	Jelatin, arabik gam, soya yağı, PGPR ve Tween 80 emülgatörleri	[62]
Euterpe edulis Martius	Aljinat solüsyonu	Atomizasyon	Kitosan, whey proteini, Jelatin	[168]
Yabanmersini	Tekli emülsiyon (W/O)	Termal jelasyon	Whey proteini, ayçiçek yağı, PCDL ve Span 80 emülgatörleri	[169]
Siyah pirinç	Çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$)	Kompleks koaservasyon	Maltodekstrin, pirinç kepeği yağı, jelatin-akasya gam, kitosan-karboksimetil selüloz	[64]

Guo vd. [70] tarafından yapılan çalışmada, mor mısır ve yaban mersini antosiyaninleri sodyum aljinat-pektin (SA-P) hidrojel parçacıklarında kapsüllenmiştir. Polimer solüsyonu için SA:P oranı %82:18 ve % 43:57 olarak seçilmiştir. Ekstraktlar gum solüsyonuna yavaşça eklenmiştir. Ekstrakt içeren polimer solüsyonları düşük pH tampon çözeltisine (pH 1.2 ve pH 3) damlatılarak hidrojeller elde edilmiştir. SA-P hidrojel kapsüllerinin üretiminde çapraz bağlayıcı iyon kullanılmamıştır. Enkapsülasyon etkinliği, pH 1.2'de üretilen kapsüller için % 24,1 ve pH 3'te üretilen kapsüller için % 17 olarak rapor edilmiştir. Çalışılan tüm sıcaklıklarda (4, 24 ve 37 °C, pH 3), antosiyanin kaybı, daha çok SA içeren hidrojellerde daha yüksek olmuş ve bu durum oluşan kapsüllerin SA kaynaklı gözenekli yapısına ve pektinle gerçekleşen çapraz bağlanma sayısının azlığına bağlanmıştır. Araştırmacılar, antosiyaninlerin hidrojel kapsüller içinde kapsüllenerek meyve suları gibi düşük pH'lı gıdalara eklendiklerinde beslenme ile alınan antosiyanin miktarının arttırılabileceğini vurgulamıştır. Çift emülsiyon içeren hidrojel kapsül (emüljel kapsül) eldesi ve kapsülün elektrospreyleme ile elde edilmesi bu tez çalışmasının farklı yönleridir.

Betz ve Kulozik [169] yaban mersini antosiyanini, peynir altı suyu izolatı (WPI) bazlı hidrojel yapılarla enkapsüle etmişlerdir. WPI çözeltisi (%20, a:h) ve ekstrakt (%1, 5 ve 10, a:a) karışımının (pH 1,5 ve 3) santrifüjlenmesinden sonra üst faz, yağ içinde su emülsiyonunda (W/O) su fazı olarak kullanılmıştır. Yağ fazına %2 oranında emülgatör (Span 80 ve PCDL, fostafidilkolince fakir lesitin) eklenmiş ve yağ ile su fazı (1,5:10, a:a) 50 °C'de homojenize edilmiştir. Araştırmacılar, antosiyanin ve proteinin birbirlerine elektrostatik olarak bağlandığını ifade etmişlerdir. Ayrıca çalışmada, emülgatörlerin damlacık boyutunu küçültme ve emülsiyonu stabilize etme yeteneği araştırılmıştır. Veriler neticesinde, jelleşme sırasında emülsiyon damlacıklarının stabilize edilmesinde PCDL emülgatörünün etkili olduğu vurgulanmıştır. pH 3'te küresel olmayan mikrokapsüller elde edilmiş ve kapsüllerde agregasyon gözlenmiştir. Yabanmersini antosiyanin enkapsülasyonu için pH 1,5 ortamının ve PCDL ilavesinin kapsül boyutu ve stabilitesi açısından elverişli koşullar olduğu vurgulanmıştır. Enkapsülasyon sisteminin işlem adımları, jelleşme mekanizması, sistem bileşenleri açısından ve enkapsüle sistemin üstünlüklerinin değerlendirilmesi için uygulanacak yöntemler tez çalışmasının farklı yönlerini ortaya koymaktadır.

Bir başka çalışmada, siyah ahududu antosiyaninleri kompleks koaservasyon yöntemiyle enkapsüle edilmiş, depolama ve proses koşullarındaki stabilitesi incelenmiştir. Protein-polisakkarit interaksiyonundan yararlanılan çalışmada polimer olarak jelatin ve arabik gam kullanılmıştır. Birincil emülsiyon (W/O) için 1:2 (a:a) oranında siyah ahududu ekstraktı ile soya yağı karıştırılmış ve %3 (a/a) oranında lipofilik karakterdeki PGPR emülgatörü ilave edilmiştir. İkincil emülsiyon (W/O/W) için %1 oranında hidrofilik yapıdaki Tween 80 emülgatörü içeren jelatin solüsyonu ilave edilmiştir. Emülsiyonlar 7 °C'de 24 sa bekletilmiş ve sonrasında dondurmalı kurutucuda kurutulmuştur. Elde edilen mikrokapsüllerin ortalama çapı 35,34-80,22 μm, yükleme kapasitesi %29,67-38,54, çözünürlük %15,04-30,32 (kontrol örneği-kapsüllenmeden kurutulmuş serbest ekstraktta, % 46,72) ve nem içeriği %1,97-6,69 (kontrol örneği %15,80) arasında olduğu tespit edilmiştir [62]. Kapsül oluşturma yöntemi ve sistem bileşenleri açısından bu tez çalışmasında farklılıklar söz konusudur.

Çift emülsiyon ve kompleks koaservasyon kullanılarak antosiyanin bakımından zengin siyah pirinç ekstraktı (ATC) ve kopigment antosiyaninler (ATC-CTC) enkapsüle edilmiştir. Mikrokapsüllerin morfolojik ve kimyasal özellikleri ile depolama stabilitesi (25, 35 ve 45 °C; 60 gün) değerlendirilmiştir. Kabuğu soyulmuş siyah pirinç (*Oryza sativa* L.) antosiyanin kaynağı olarak kullanılırken yeşil çay (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) yaprakları kateşin-kopigment kaynağı olarak kullanılmıştır. Antosiyanince zengin siyah pirinç ekstraktının kateşince zengin çay ekstraktı ile kopigmentasyonu sonucunda kopigment antosiyaninler (ATC-CTC) elde edilmiştir. Çift emülsiyon sistemi için öncelikle su fazı (45 g ATC veya ATC-CTC) ve yağ fazı (pirinç kepeği yağı; 50 g, Span 80; 5 g) homojenize edilerek birincil emülsiyon (W_1/O) elde edilmiş ve W_1/O emülsiyonu hidrofilik emülgatörler (400 mL GE-AG veya CS-CMC, pH 4, 40 °C) ile 30 dk manyetik karıştırıcıda muamele edilerek kompleks koaservasyonun indüklenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, elde edilen süspansiyon ile ikincil su fazıyla (W_2) (maltodekstrin, 35 g/100 mL) karıştırılarak ve çift emülsiyon kompleks koaservatları (CCDE) elde edilmiştir. GE-AG / ATC-CTC koaservatları, yüksek antosiyanin içeriği (0,76 g /100 g) ve yüksek antioksidan kapasiteyle ($ABTS^{\bullet+}$; 5,8 μg Troloks/100 g) en iyi kimyasal özelliklere sahip koaservatlar olarak tespit

edilmiştir [64]. Kapsül oluşturma yöntemi ve sistem bileşenleri açısından bu tez çalışmasıda farklılıklar söz konusudur.

da Silva Carvalho vd. [168] yaptıkları çalışmada, *Euterpe edulis* Martius antosiyaninlerini atomizasyon tekniği ve $CaCl_2$ jelleşme ajanı kullanılarak aljinat hidrojel kapsüller içinde enkapsüle etmişlerdir. Elde edilen kapsüller antosiyanin ekstraktı ile oda sıcaklığında 90 dk boyunca karıştırılmış ve antosiyaninin kapsüllere adsorpsiyonu sağlanmıştır. Antosiyanin yüklenen kapsüller yüzeylerindeki gözeneklerin kapatılması için pH 3,5'e ayarlanan kitosan-whey protein konsantresi veya jelatin çözeltileri içinde 10 dk boyunca tutulmuştur. Üretilen kapsüllerin ortalama çapı ~1mm olup enkapsüle olan antosiyanin miktarı 5,2-10,4 mg/g kapsül olarak rapor edilmiştir. Kapsüllerin simüle edilmiş sindirim ortamında salınımları incelendiğinde, kitosanla kaplanan kapsüllerden antosiyaninlerin mide ortamında ilk 20 dk içerisinde daha yavaş salındığı, iki saat sonunda ise benzer oranda antosiyaninin (~%70) tüm sistemlerden salındığı gözlenmiştir. Bağırsak fazında ise ilk 20 dakika boyunca kapsüllerin fiziksel yapısını koruduğu, sonrasında ise tamamen bozulduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, sadece hidrojel kapsül üretimi mevcut olup kontrol örneği olarak serbest ekstrakt kullanılmamıştır.

de Moura vd. [72] tarafından gerçekleştirilen çalışma, bu tez çalışmasındaki hibrit enkapsülasyon yöntemiyle antosiyanin enkapsülasyonuna benzeyen yöntem kullanılmıştır. *Hibiscus sabdariffa* L. antosiyanin ekstratı içeren kapsülleri üretmek için damlatma-ekstrüzyon ve atomizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmada, ekstrakt önce çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$; ekstrakt/kolza yağı/pektin) ile enkapsüle edilmiş ve dış su fazında (W_2) kullanılan pektin çapraz bağlama solüsyonu ($CaCl_2$) ile muamele edilmesi sonucunda ekstrakt içeren çift emülsiyon yüklü kapsüller elde edilmiştir. Damlatma tekniği ile elde edilen mikrokapsüllerin ortalama çapı (D_{50}) 788-1119 μm ve atomizasyon ile elde edilen mikrokapsüllerin D_{50} değeri 78-275 μm arasında değiştiği gözlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği, damlatma tekniğinde %67,9-88,1 ve atomizasyon tekniğinde %84,3-93,9 arasında olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada, antosiyanin degredasyonu değerlendirilirken kontrol grubunda ekstrakt içeren hidrojel örnekleri ve serbest ekstrakt mevcut olmayıp bu anlamda hibrit sistemin sağladığı avantaj tam olarak değerlendirilememiştir. Bu tez

çalışmasında, bu çalışmadan farklı olarak, farklı sistem bileşenleri (yağ ve çapraz bağlanma polimeri ve gumlar) ve elektrospreyleme tekniği kullanılmıştır.

1.1.6 Biyoaktif Bileşen Biyoerişilebilirliği ve Biyoyararlanımı

Biyoerişilebilirlik, gıda matrisinden gastrointestinal sisteme (GI) salınan ve dolayısıyla emilmeye hazır olan bir bileşenin miktarı olarak tanımlanmaktadır [170]. Biyoyararlanım ise sindirilen besinlerin veya hipokimyasalların daha sonra normal yollarla emilip metabolize edilen kısmıdır ve normal olarak *in vivo* yöntemlerle ölçülmektedir [171]. Biyoaktif bileşiklerin biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlılığını etkilemek ve geliştirmek için işleme teknolojilerini, depolama koşullarını ve gıda matriksini çok iyi bilmek gerekmektedir. Biyoaktif bileşiklerin biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlılığını değerlendirmek için çeşitli metodolojiler kullanılmaktadır:

i) *In vitro* modeller (simüle edilmiş GI sindirimi, yapay membranlar, Caco-2 hücresi, hücre membranları),
ii) *Ex vivo* modeller (laboratuvar koşullarında GI organları),
iii) *In situ* modeller (hayvanlarda bağırsak perfüzyonu),
iv) *In vivo* modeller (hayvan ve insan çalışmaları) [172].

Çözünürlük, hidrofobiklik, moleküler ağırlık ve izomer konfigürasyonu dahil olmak üzere biyoaktif bileşiklerin kimyasal özellikleri, bunların biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlılığını etkileyen faktörler arasındadır. Örneğin, yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olan proantosiyanindinlerin bağırsak hücreleri tarafından emilmeden önce, sindirim sırasında daha küçük moleküllere parçalanması gerekmektedir [173]; *β*-glikosile edilmiş flavonoidler ince bağırsaktan yalnızca minimum miktarlarda emilim göstermektedir [174] ve eğer flavonoid şeker molekülü içeriyorsa (kuersetin gibi), bileşiğin kalın bağırsağa ulaşması ve böylece şeker moleküllerinin emilmek üzere hidrolize edilmesi gerekmektedir [175].

Biyoaktif bileşiklerin emilim mekanizmaları lipofilik (karotenoidler ve yağda çözünen vitaminler gibi) ve hidrofilik bileşikler (antosiyaninler ve hidrofilik vitaminler gibi) arasında farklılık göstermektedir.

Polimerize ve glikosile edilmiş polifenoller gibi hidrofilik bileşikler için aglikonların emilebilmesi gerekmekte ve bu sebeple öncelikle ince bağırsak epitel

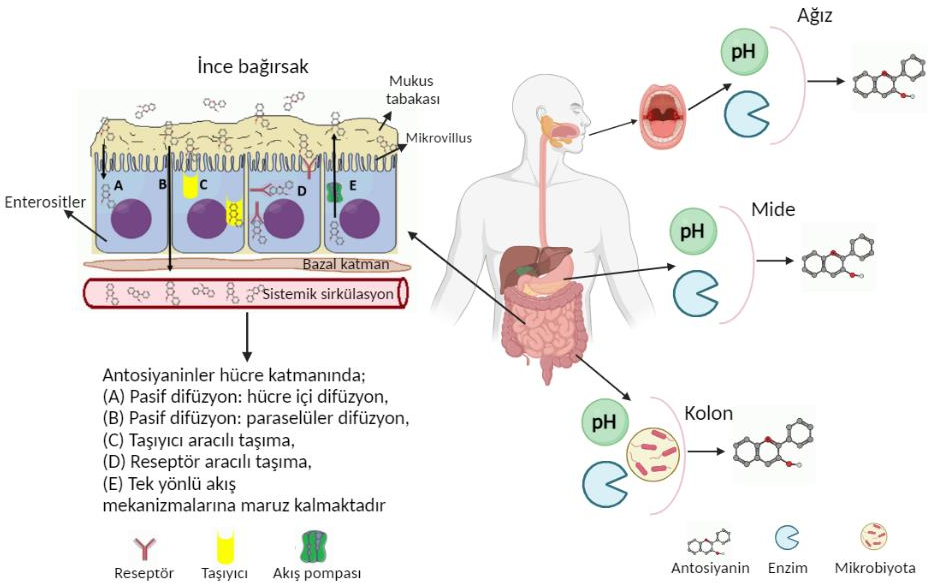
hücrelerinin fırçamsı kenarlarında enzimatik hidroliz meydana gelmektedir. İnce bağırsakta bulunan ve polifenol glikozitleri parçalama görevi gören enzimler, laktaz (filorizin hidrolaz) ve β-glikozidazdır. Ancak çoğu polifenol kalın bağırsağa geçiş yapabilmektedir. Kolona geçen biyoaktif bileşenler ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki etkileşimler ve bağırsak mikrobiyotası tarafından kolonik fermentasyon sonucunda etkili bir şekilde emilebilen metabolitlerin oluşması, tüketilen polifenollerin sağlık üzerindeki yararlı etkilerinden sorumludur [173, 176]. Kalın bağırsak (kolon) sistemindeki *Streptococcus faecium* ve *Escherichia coli* HGH21 gibi bakteriler tarafından üretilen β-glukozidaz ve α-ramnozidaz enzimlerinin polifenol glikozitleri parçaladığı bilinmektedir [177].

Karotenoidler gibi lipofilik bileşikler söz konusu olduğunda ise ince bağırsakta emilmeden önce bu bileşiklerin öncelikle gıda matrisinden salınması ve misellere dahil edilmesi gerekmektedir [178]. Ayrıca, biyoaktif bileşiklerin emilmeyen kısmı da antioksidan kapasitesi açısından mide ve bağırsak sağlığı üzerinde olumlu etkiye sahiptir. Çünkü bu organlar, diyet veya toksinlerden gelen bakterilerin aktivitesine karşı bağışıklık hücrelerinin solunumunda kaynaklanan ROS'a (reaktif oksijen türleri) sürekli olarak maruz kalmaktadırlar [179]. Bu nedenle, antioksidan kapasiteye sahip emilmeyen bileşikler, redoks dengesini koruyarak sindirim süreci sırasında ROS oluşumuna bağlı mide-bağırsak hastalıklarının gelişmesini önleyerek gastrointestinal sistem sağlığına katkı sağlamaktadır [180].

Flavonoid glikozitlerin genellikle emilim öncesinde bağırsak hücrelerinde parçalansa da antosiyaninler için durum farklıdır ve idrarda glikozit formda tespit edilmişlerdir. Bu durum gastrointestinal sistemdeki elverişsiz koşulları sonucunda emilim gerçekleşmeden önce antosiyaninlerin bozulmaları ile açıklanmaktadır [181, 182]. Gastrointestinal sistemde pH'daki geniş aralık ve dalgalanma, çeşitli enzimlerin ve mukozal bariyerlerin varlığı gibi etkenler antosiyaninlerin düşük biyoerişilebilirlik, membran geçirgenliği ve biyoyararlılık göstermesine neden olmaktadır. Dolayısıyla antosiyaninlerin biyolojik etkileri, sindirim stabilitesine, matriksten salınımına (biyoerişilebilirlik), oral fazda bozunmasına, absorbsiyonuna ve hedef dokulara ulaştırılmasına bağlı olan biyoyararlanımlarına bağlıdır. Antosiyaninler gastrointestinal sistemde, ağız fazında (pH 7,4) birçok tükürük amilazına, mide ortamında (pH 1-3) birçok pepsin, bazı lipaz ve amilazlara ve bağırsak ortamında (pH 6-7) farklı taşıma mekanizmasına maruz kalmaktadır.

Kolon ortamında (pH 7-8) ise emilmeyen antosiyaninler mikrobiyota tarafından fermente edilebilmektedir [27]. Şekil 1.17'de, antosiyaninlerin gastrointestinal sistemdeki emilimi ve bunun engelleri hakkında ayrıntılar şematik olarak gösterilmiştir.

Tüketilen antosiyanin miktarıyla karşılaştırıldığında emilen miktar minimum düzeydedir ve bu da çok düşük bir biyoyararlanım olduğunu göstermektedir. Ayrıca Kurilich vd, [183], büyük dozlarda antosiyanin tüketiminin insan plazmasındaki geri kazanımlarını önemli ölçüde azalttığını ve bu durumun sebebinin emilim mekanizmasındaki doygunluk olabileceğini vurgulamıştır. Bu sebeple antosiyaninlerin gastrointestinal koşullara dayanıklılığının arttırılmasıyla biyoerişilebilirliğin artması ve böylece emiliminin gerçekleşmesiyle biyoyararlanımının artması söz konusu olabilecektir. Bu anlamda enkapsülasyon teknolojisi kullanılarak antosiyanin biyoerişilebilirliğinin arttırılması ile ilgili çalışmalar önem kazanmaktadır.



Şekil 1.17 Gastrointestinal sistemin farklı bölgelerinde antosiyanin bozunması ve emiliminin şematik gösterimi [27]

1.2 Tezin Amacı

Günümüzde tıbbi ve aromatik bitkiler, gıdalara tat, lezzet, renk, aroma ve koruyucu olarak eklenmelerinin yanı sıra geleneksel tedavi amacıyla da kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerden birisi olan reyhan ülkemizin birçok bölgesinde yetiştirilmektedir.

Sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen ve biyoaktif özelliklere sahip tıbbi ve aromatik bitkilerden birisi olan reyhan bitkisi, yüksek antioksidan özellik gösteren antosiyanin içeriği ile dikkat çekmektedir. Antosiyaninler doğal renklendirici olmalarının yanısıra sağlık açısından da olumlu etkilere sahiptir ancak nötral koşullar dahil yüksek pH ve birçok çevresel faktörlere karşı stabilitelerini koruyamamalarından dolayı kullanımlarının ve biyoerişilebilirliklerinin sınırlı olduğu bilinmektedir. Bu kısıtlamaları azaltma yöntemlerinden birisi de gıdaya uygulanmadan önce antosiyaninlerin enkapsüle edilmesidir.

Bu amaçla çalışmamızda, antosiyanince zengin reyhan yaprak ekstraktı (RYE) önce yağ içindeki su fazında (W_1/O) enkapsüle edilmiş daha sonra bu yağ fazı, içerisinde sodyum aljinat/kappa-karragenan (SA/κ-CG) polimerlerinin bulunduğu su fazında (W_2) dağıtılarak çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$) üretilmiştir. Bu çift emülsiyon damlacıkları çapraz bağlayıcının (Ca^{+2}/K^{+}) bulunduğu bir jelleşme banyosunda emüljel kapsül haline getirilmiştir. Böylece en içteki su fazında enkapsüle olan antosiyaninlere ilave koruma sağlanması hedeflenmiştir. Çalışmada eş zamanlı olarak emülsiyon içermeyen hidrojellerde üretilmiş ve önerdiğimiz hibrit enkapsülasyon sistemi ile sonuçlar açısından karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışmasının amaçları şu şekilde özetlenebilir;

(i) Reyhan yaprağı antosiyaninlerinin emüljel sistem ile başarılı bir şekilde enkapsüle edilmesi,

(ii) Reyhan yaprağı antosiyaninlerinin *in vitro* biyoerişilebilirliklerini serbest RYE ve emülsiyon içermeyen hidrojel sisteme göre arttırılması,

(iii) Elde edilen emüljel ve hidrojel kapsüllerin karakterize (enkapsülasyon etkinliği, optik mikroskop, SEM, FTIR, TGA, DTG, DSC, jel kuvveti) edilmesi şeklindedir.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, iki farklı enkapsülasyon sisteminin, emülsiyon ve iyonik jelasyon, bir arada kullanılarak reyhan antosiyaninlerinin *in vitro* biyoerişilebilirliğinin arttırılmasının sağlanması hedeflenmiştir. Hidrojel sisteme emülsiyon eklenmesi ile elde edilen emüljellerin, bu şekilde sağlayacakları ilave koruma ile hem son enkapsüle ürünlerde (emüljel) antosiyanin tutumunu arttıracağı hem de *in vitro* mide-bağırsak sıvılarında antosiyanini zamanla salacağı ve biyoerişilebilirliğini arttıracağı iddia edilmiştir.

2
MATERYAL VE METOT

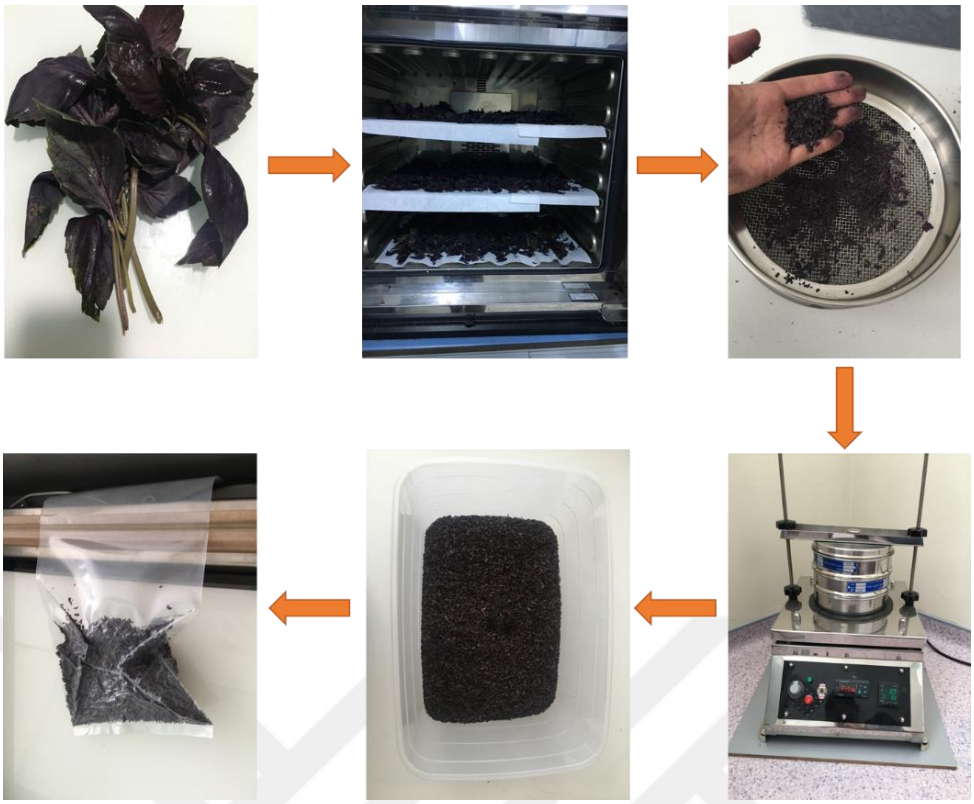
2.1 Materyal ve Kimyasallar

Reyhan bitkisi (*Ocimum basilicum* L.) ve ayçiçek yağı yerel bir tedarikçiden (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir. Gıda saflığındaki sodyum aljinat (SA) ve κ-karragenan (κ-CG), sırasıyla Adler ve Rotel (Türkiye) firmalarından satın alınmıştır. Emülgatör olarak PGPR (polyglycerol polyricinoleate) (Palsgaard, Türkiye) ve Tween 80 (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. α-amilaz (A1031), pepsin (P7012), pankreatin (P7545), safra tuzu (B3883) ve asetik asit Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kalsiyum klorür ($CaCI_2$), potasyum klorür (KCl), metanol ve asetonitril Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar ve çözeltiler analitik saflıktadır.

2.2 Antosiyanin Ekstraktı Eldesi

2.2.1 Reyhan Yaprağının Hazırlanması

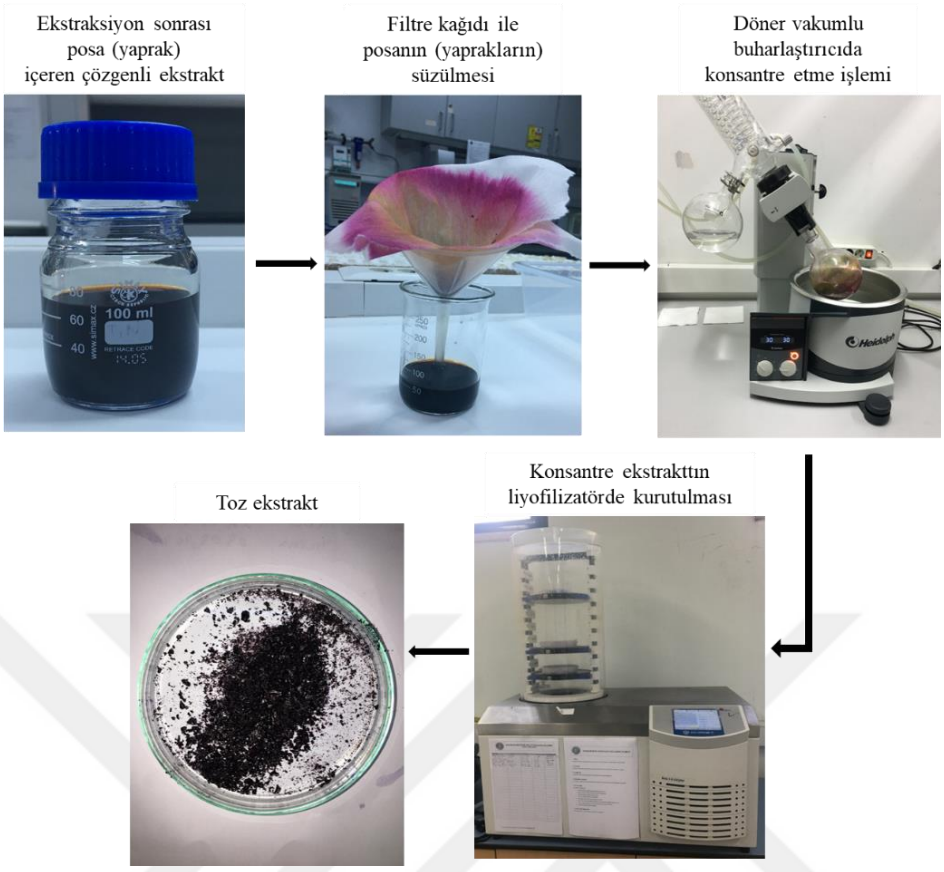
Reyhan yaprakları gövdeden ayıklanma ve temizlenme sonrası, 35 °C etüvde 48 sa süre kurutulmuştur, yaprakların son nem içeriği %3,12±0,25 (a:a) olmuştur. Kurutulan reyhan yaprakları el yardımıyla ufalanmış elek sarsma cihazı kullanılarak yaprak boyutu 1-2,2 mm olacak şekilde boyut standardı sağlanmıştır. Öğütülmüş, kurutulmuş ve elenmiş reyhan yaprakları analiz zamanına kadar vakum paketlerde oda koşullarında saklanmıştır (Şekil 2.1) [184].



Şekil 2.1 Reyhan yapraklarının analize hazır hale getirilmesi

2.2.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Özcan vd. [184] tarafından geliştirilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla yaklaşık 2,5 g kurutulmuş reyhan yaprağına, asetik asitle asitlendirilmiş 50 mL ekstraksiyon çözgeni (80:20, metanol:su, h:h, pH 3) eklenmiş, karışım 45 °C'de 30 dk ultrases destekli ekstraksiyona (ultrasonik banyo-180 W, 40 kHz) maruz bırakılmıştır. Süre sonunda reyhan yaprakları filtre kâğıdı yardımıyla süzülmüştür. Filtrat 2576 xg'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üst faz (ekstrakt) ayrılmıştır. 40 °C'de döner vakumlu buharlaştırıcıda (BÜCHI Rotavapor R-200) metanol uzaklaştırılmış, balonda kalan kısım suda çözülmüş ve liyofilizatörde (Beta 1-8 lscplus, Christ, Almanya) toz haline getirilmiştir (Şekil 2.2). Toz ekstrakt analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C'de koyu renkli hava almayan şişelerde depolanmıştır.



Şekil 2.2 Reyhan yaprak ekstraktı (RYE) eldesi

2.3 Antosiyanin Ekstraktı Karakterizasyonu

2.3.1 Toplam Antosiyanin Miktarı

Reyhan yaprak ekstraktının (RYE) toplam monomerik antosiyanin miktarı (TA) pH diferansiyel metoduna göre tespit edilmiştir [185]. Yöntemin temeli, monomerik antosiyaninlerin pH 1'de renkli oksonyum formunun, pH 4,5 de ise renksiz hemiketal formunun baskın olmasına dayanmaktadır. 0,025 M potasyum klorür çözeltisi (KCl) (pH 1) ve 0,4 M sodyum asetat ($CH_3COONa.3H_2O$) çözeltisi (pH 4,5) saf su ile hazırlanmıştır. Çözeltilerin pH'ı 1 ve pH 4,5'a ayarlanması için %37'lik HCI kullanılmıştır. Test tüpleri 30 dk oda sıcaklığında (25°C) ve karanlıkta bekletildikten sonra absorbansları 520 ve 700 nm'de spektrofotometre (Shimadzu, UV-1800, Japonya) ile ölçülmüştür. TA aşağıdaki eşitlikler (2.1 ve 2.2) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})pH1{,}0 - (A_{520nm} - A_{700nm})pH4{,}5 \quad (2.1)$$

$$TAM = (A \times MA \times sf \times 1000)/(\varepsilon \times L) \quad (2.2)$$

A: absorbansı, A_{520nm}: örneğin 520 nm'deki absorbansını, A_{700}nm: örneğin 700 nm'deki absorbansını, MA: siyanidin 3-glikozit'in molekül ağırlığını (449,2 g/mol Cy-3-gly), sf: seyreltme faktörünü, Ɛ: molar soğurma katsayısını (26,900), L: küvet optik yolu uzunluğunu (1 cm) ifade etmektedir. Sonuçlar mg siyanidin 3-glukozit (Cy-3-gly) eşdeğeri / g kuru ekstrakt (dw) şeklinde verilmiştir. Ayrıca sonuçlar g reyhan yaprağı şeklinde de hesaplanmıştır.

2.3.2 Toplam Fenolik Madde Miktarı

Reyhan yaprak ekstraktının (RYE) toplam fenolik madde (TFM) miktarı Singleton ve Rossi [186] tarafından geliştirilen metot ile hesaplanmıştır. Uygun oranda seyreltilmiş ekstrakttan 0,5 mL alınmış ve üzerine 2,5 mL 0,2 N Folin- Ciocelteau fenol çözeltisi ilave edilmiştir. Üç dakika sonra, 2 mL Na_2CO_3 (%7,5) ilave edilmiştir. Oda koşullarında (25 °C) ve karanlık bir ortamda 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra örneklerin absorbansları 760 nm'de UV/VIS spektrofotometre (Shimadzu, UV-1800, Japonya) cihazı ile ölçülmüştür. TFM Şekil 2.3a'da verilen gallik asit standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg GAE/ g kuru ekstrakt (dw) olarak verilmiştir.

2.3.3 Toplam Flavonoid Miktarı

Çalışmada, Zhinsen vd. [187] tarafından geliştirilen metot kullanılarak reyhan yaprak ekstraktının toplam flavonoid miktarı (TFVM) belirlenmiştir. Uygun oranda seyreltilmiş örnekten 1 mL alınmış, üzerine 4 mL saf su ve 0,3 mL %5'lik $NaNO_2$ çözeltisi eklenmiş ve 5 dk süre sonunda 0,3 mL %10'luk $AlCl_3$ çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. 6 dk bekletildikten sonra 2 mL 1M NaOH eklenip hacmi 10 mL'ye saf suyla tamamlanmıştır. Örneğin absorbans değeri UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu, UV-1800, Japonya) ile 510 nm dalga boyunda ölçülmüştür. TFVM Şekil 2.3b'de verilen kateşin standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg CE/g kuru ekstrakt (dw) olarak verilmiştir.

2.3.4 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

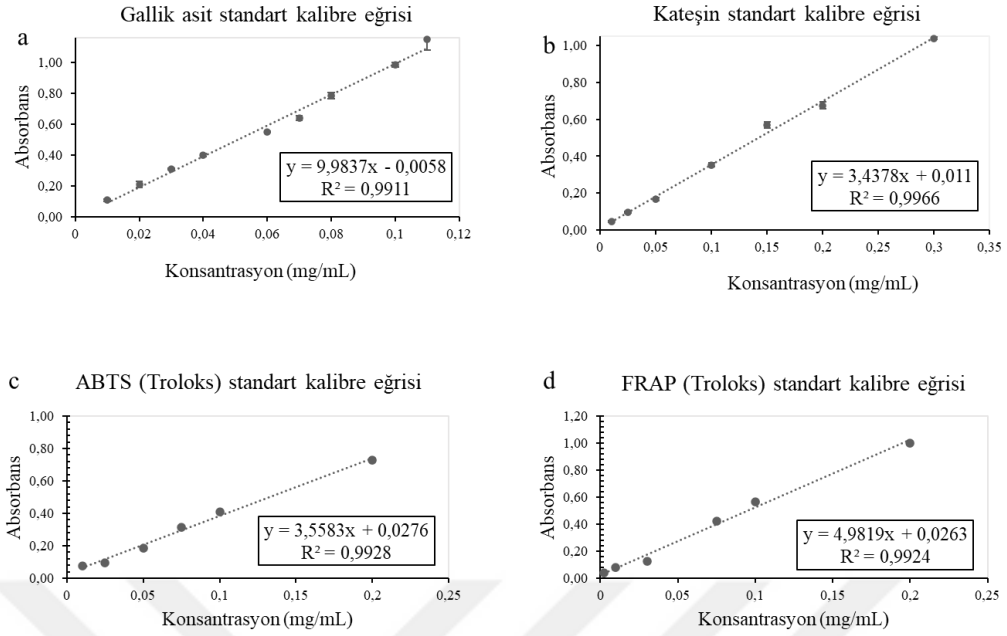
ABTS Radikalini Temizleme Yöntemi

Re vd. [188] tarafından önerilen metot kullanılmıştır. Yöntemin esası, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ile potasyum persülfatın (K_2S_2O8) oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşturulan ABTS radikali katyonunun ($ABTS^{\bullet+}$), ortama ilave edilen antioksidan maddelerle inhibisyonuna dayanmaktadır. ABTS solventinin absorbans değeri 0,700 olacak şekilde spektrofotometre cihazında ayarlama yapıldıktan sonra örneğin analizinde kullanılmıştır.

Örnekten 100 µL alınmış ve üzerine ayarı yapılmış 2 mL ABTS solventi ilave edilerek 6 dk 30 °C'de inkübe edilmiştir. UV-VIS spektrofotometre ile örneğin absorbans değerleri 734 nm'de ölçülmüştür. ABTS yöntemi için Şekil 2.3c'de verilen troloks standart kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve sonuçlar mg TE/g kuru ekstrakt (dw) olarak verilmiştir.

Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Benzie ve Strain [189] tarafından geliştirilen metot kullanılmıştır. FRAP reaktifi kullanılmadan önce 10:1:1 (h:h:h) oranında 300 mM Asetat tamponu (pH 3,6), 10 mM 2, 4, 6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) çözeltisi ve 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ karıştırılarak hazırlanmıştır. 300 mM asetat tamponu, 0,31 g sodyum asetat trihidrat ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) 1,6 ml asetik asit ile karıştırılıp son hacim 100 mL'ye gelinceye kadar saf su ile seyreltilerek elde edilmiştir. TPTZ çözeltisi, 40 mM HCI içerisinde 10 mM TPTZ'nin çözdürülmesiyle hazırlanmıştır. 100 µL örnek, sırasıyla 900 µL saf su ve 2 mL FRAP reaktifi ile karıştırılıp oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildikten sonra 593 nm'de UV-VIS spektrofotometre ile absorbansı ölçülmüştür. FRAP yöntemi için Şekil 2.3d'de verilen troloks standart kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve sonuçlar mg TE/g kuru ekstrakt olarak verilmiştir.



Şekil 2.3 Toplam fenolik (TFM), toplam flavonoid (TFVM) miktarları ve antioksidan aktivite değerlerinin belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrileri

2.3.5 Antosiyanin Profilinin HPLC ile belirlenmesi

Reyhan yaprak ekstraktının (RYE) antosiyanin madde profilinin HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) sistemi (LC-20AD pompa, DGU-20A5R degazör, SIL-20A HT autosampler, CTO-10ASVP kolon fırını, SPDM20A DAD dedektör ve CMB-20A iletişim modülü; Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) ile belirlenmesi için Karadag vd. [190] tarafından geliştirilen metot kullanılmıştır. RYE asitlendirilmiş (%0.1, h:h) metanol içinde çözülmüş, 0,22 µm'lik filtreden şırınga yardımı ile süzülerek, cihaza enjekte edilmiştir. Ayrım, bir Inertsil ODS-3 (10 × 4 mm, 5 µm partikül boyutu, GL Sciences, Tokyo, Japonya) koruyucu guard kolonu ile birleştirilmiş Inertrsil® ODS-3C-18 ters fazlı kolonda (250 ×4,6 mm, 5 µm partikül boyutu, GL Sciences, Tokyo, Japonya) 40°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A solventi olarak %0,1 (h:h) trifloroasetik asit (TFA) içeren saf su ve B solventi olarak % 0,1 (h:h) trifloroasetik asit içeren asetonitril kullanılmıştır. Doğrusal gradiyent elüsyonlar 0. dk: %95 A ve %5 B, 50. dk: %65 A ve %35 B, 52. dk: %25 A ve 75% B olup işlem süresi 59 dk sürmektedir. Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır. Kromatografik ölçümler 517 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kantitatif analiz ve tanımlama

işlemleri, alıkonma zamanı ve standart eğrileri baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar µg ANT (PGE)/g ekstrakt olarak verilmiştir. Antosiyaninlere ait pikler mevcut standartlarla belirlenemediğinde pik alanı, peonidin 3-*O*-glukosit (PGE) esas alınarak hesaplanmış olup sonuçlar µg peonidin 3-*O*-glikosit eşdeğeri (PGE)/g ekstrakt olarak verilmiştir.

2.4 Emüljel ve Hidrojel Kapsül Üretimi

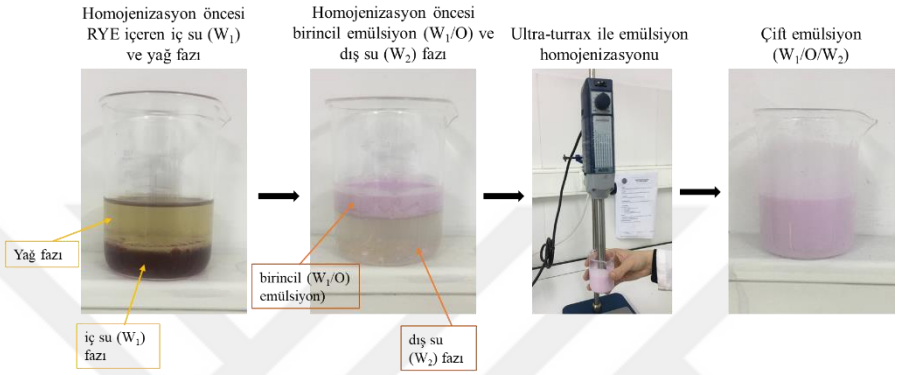
2.4.1 Çift Emülsiyonların ($W_1/O/W_2$) ve Biyopolimer Çözeltilerinin Hazırlanması

RYE yüklü emüljel kapsül eldesinde kullanılacak olan çift emülsiyon üretimi için ilk önce birincil emülsiyon (W_1/O) hazırlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak RYE %1 (a:h) oranında iç su fazında (W_1, pH 3,0, 0,1 M asetat tamponu) çözdürülmüştür. Sonrasında RYE çözeltisi (W_1) ve ayçiçek yağı (O, yağ fazı) ve lipofilik emülgatör olan PGPR ile 40:57:3 (a:a:a) oranında birleştirilip ultra-turrax (HG15D, Daihan) ile 13750 rpm'de 15 dk karıştırılmıştır. Elde edilen birincil emülsiyon hidrofilik emülgatör olan %1 (a:a) oranında Tween 80 içeren biyopolimer (SA ve κ-CG) çözeltileri (W_2) ile 30:70 (a:a) oranında birleştirilmiş ve 11000 rpm'de 4 dk boyunca ultra-turrax ile homojenize edilerek çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$) üretilmiştir (Şekil 2.4). Elde edilen birincil ve çift emülsiyonlar, emülsiyon stabilitesini anlamak ve faz ayrımının olup olmadığını gözlemlemek için oda koşullarında 3 gün boyunca muhafaza edilmiş ve herhangi bir faz ayrımı gerçekleşmediği gözlemlenmiştir (Şekil 2.5). Kapsül üretiminde her analiz öncesi besleme çözeltileri taze olarak hazırlanmış ve elektrosprey işlemi gerçekleştirilmiştir.

RYE yüklü hidrojel kapsül üretiminde kullanılacak olan biyopolimer solüsyonu (besleme çözeltisi), hidrojel ve emüljel kapsüllerin karşılaştırılabilir olması için, emüljel formülasyonundaki son RYE ve polimer (SA ve κ-CG) miktarları aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu nedenle polimer (besleme) çözeltisi için %0,4 (a:h) RYE (asetat tampon, pH 3,0, 0,1 M) polimer çözeltileriyle 30:70 (a:a) oranında karıştırılmıştır.

SA ve κ-CG, asetat tamponunda (pH 3,0, 0,1 M) %2 (a:h) oranda çözdürülerek polimer stok çözeltisi elde edilmiş ve Tablo 2.1'de verilen oranlarda kullanılarak kapsüllerin üretiminde kullanılmıştır. Polimer stok çözeltisi, Ma vd. [191]

tarafından geliştirilen metot modifiye edilerek hazırlanmıştır. İlk önce 80 °C'ye ısıtılan (pH 3,0, 0,1 M) asetat tamponunda κ-CG sabit hızda (600 rpm) manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırılarak çözülmüştür. Daha sonra karışım 40 °C'ye soğutularak SA ilave edilmiş ve karışım 2 saat daha karıştırıldıktan sonra belirlenen oranda RYE eklenmiştir. Bütün bileşenlerin homojen dağılması için solüsyon 1 saat daha sabit sıcaklık (40 °C) ve hızda (600 rpm) karıştırılmıştır. Çift emülsiyonda dış su fazını (W_2) fazını hazırlamak için de yukarıda bahsedilen metot kullanılmıştır.



Şekil 2.4 Çift emülsiyon (W_1/O/W_2) eldesi



Şekil 2.5 Faz ayrımı gerçekleşmeyen çift emülsiyonlar

2.4.2 Elektrosprey Yöntemi

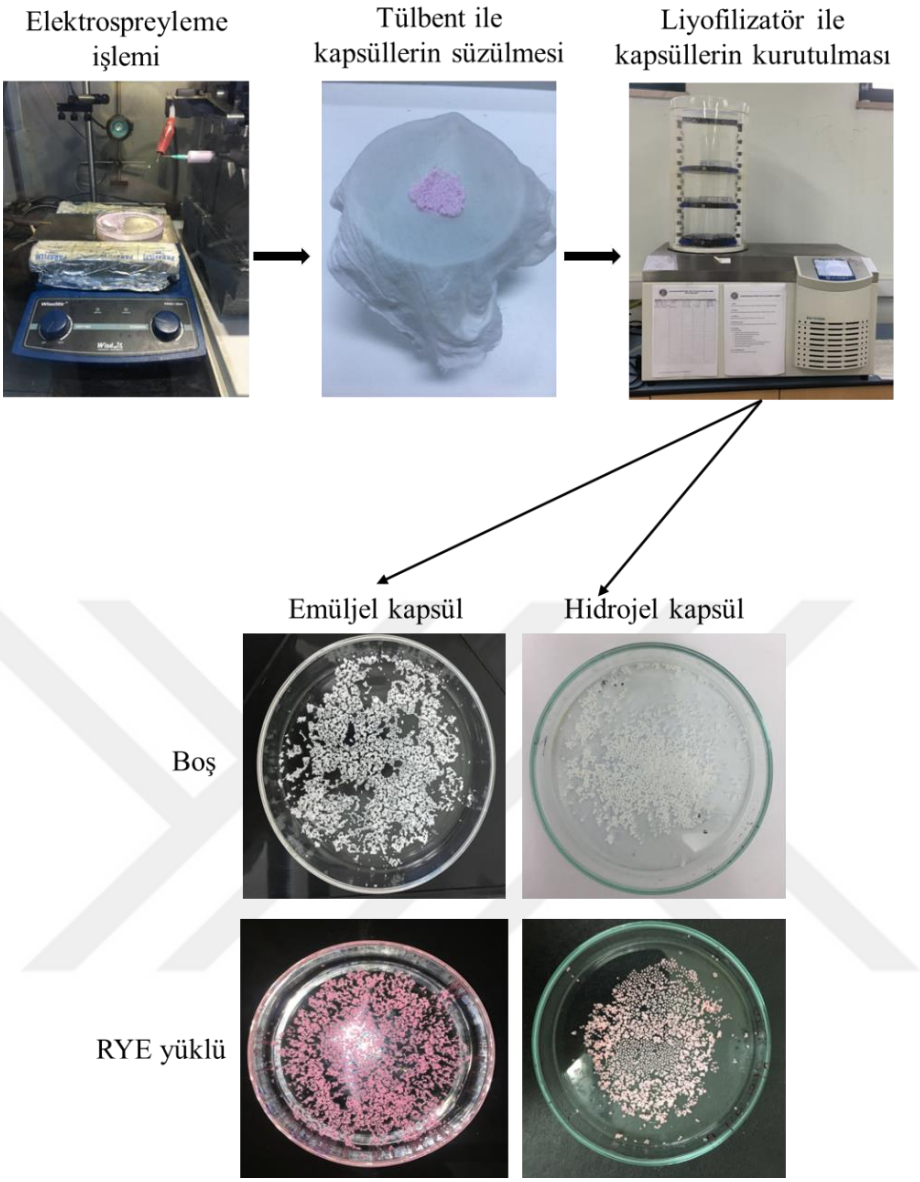
Emüljel ve hidrojel kapsüller laboratuvar ölçekli bir nanofiber elektrospin ünitesi (HONFES-0434, Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd., Hindistan) kullanılarak damlama modunda besleme çözeltisinin (çift emülsiyon / biyopolimer solüsyonu) tuz banyosuna (çapraz bağlama çözeltisi) ($CaCl_2$ ve KCl) elektrospreylenmesiyle elde edilmiştir. Elektrospreyleme yönteminde: gerilim 6 kV; akım 1 µA; besleme hızı 1,2 mL/sa; şırınga ucu (21G) ile toplayıcı banyo arasındaki mesafe 10 cm

olarak ayarlanmıştır [109]. Elektrospreyleme işleminden sonra tuz banyosundaki kapsüller oda koşullarında 15 dk bekletildikten sonra süzülmüş ve kapsüller saf su ile birkaç kez yıkanmıştır. Gerekli analizler için kapsüller liyofilizatörde kurutulmuştur (Şekil 2.6). Her kapsül üretme işlemi öncesi tuz banyosu Tablo 2.1'de verildiği oranlarda $CaCl_2$ ve KCl kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 2.1 Kapsüllerin formülasyonu ve isimlendirilmesi

SA: κ-CG (a:a)	$CaCl_2$:KCl (a:a)	Emüljel kapsül	Hidrojel kapsül
1:0	1:0	E	H
1:0	1:1	E-K	H-K
1:0,075	1:0	EC1	HC1
1:0,075	1:1	EC1-K	HC1-K
1:0,15	1:0	EC2	HC2
1:0,15	1:1	EC2-K	HC2-K

SA: Sodyum aljinat; κ-CG: kappa karragenan



Şekil 2.6 Elektrosprey ile kapsül üretimi ve liyofilizatörde kurutulması

2.5 Kapsül Karakterizasyonu

2.5.1 Optik Mikroskop ile Boyut ve Küresellik Faktörünün belirlenmesi

Yaş kapsüllerin şekli ve boyutu 5X objektif lensi olan optik mikroskop (Olympus CKX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ile belirlenmiştir (Şekil 2.7). Optik mikroskopta görüntüsü alınan ortalama 60 adet kapsülün boyutları ImageJ (National Institutes of Health, USA) programı ile hesaplanmış, elde edilen veriler ile boyut histogram dağılımı çizilmiş ve kapsüllerin küresellik faktörleri (SF, Sphericity Factor) hesaplanmıştır. Küresellik Faktörleri (SF), eşitlik (2.3)'e göre hesaplanmıştır. SF=0 mükemmel küresel kapsül olarak tanımlanmakta ve değer

yükseldikçe şekil bozulması görülmektedir. Genel olarak; SF ≤ 0,05 olan kapsüller küresel olarak kabul edilmektedir [192].

$$Küresellik\ Faktörü\ (SF) = \frac{(dmax - dper)}{(dmax + dper)} \quad (2.3)$$

d_{max}: merkezden geçen maksimum çap (mm), d_{per}: d_{max}'a dik olan çap (mm) uzunluğunu ifade etmektedir.



Şekil 2.7 Optik mikroskop ile kapsüllerin incelenmesi

2.5.2 Yüzey Morfolojisinin SEM ile Belirlenmesi

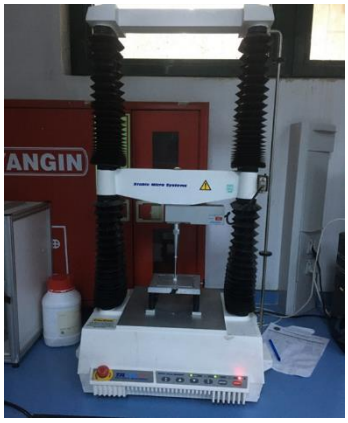
Dondurularak kurutulmuş kapsüllerin yüzey ve kesit alan morfolojisi taramalı elektron mikroskobu, SEM, (FEI Quanta 450 FEG, Graz, Avusturya) ile belirlenmiştir. Kesit alan incelemesi için analiz öncesinde kapsüller bistüri yardımıyla kesilmiştir. Çift taraflı bant kullanılarak alüminyum numune kaplarına yerleştirilen kapsüller (Şekil 2.8) ve 40 mA akım yoğunluğunda 40 s boyunca vakum altında ince bir altın film tabakası ile kaplanmıştır. Düşük vakum altında, 100X ile 5000X arasında değişen büyütmelerde, 6,5 mm mesafe ve 10 kV hızlanma geriliminde analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.8 SEM analizi

2.5.3 Jel Kuvveti

Kapsüllerin jel kuvveti, oda sıcaklığında (25 ºC) 5 mm'lik silindirik bir prob ile 5 kg yük hücresi ile donatılmış tekstür analiz cihazı (TA.XT2 Plus SMS, UK) ile ölçülmüştür. Analiz için, 0,2 g yaş kapsül kullanılmış olup 2 mL'lik bir cam şişe (10 mm çap x 31 mm yükseklik) içinde ölçümler gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.9). Kapsüller 1 mm/saniye test hızı ile ilk yüksekliklerinin %70'ine kadar sıkıştırılmış ve sonuçlar kuvvet (g) cinsinden verilmiştir [100].



Şekil 2.9 Tekstür cihazı ile jel kuvveti analizi

2.5.4 Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi

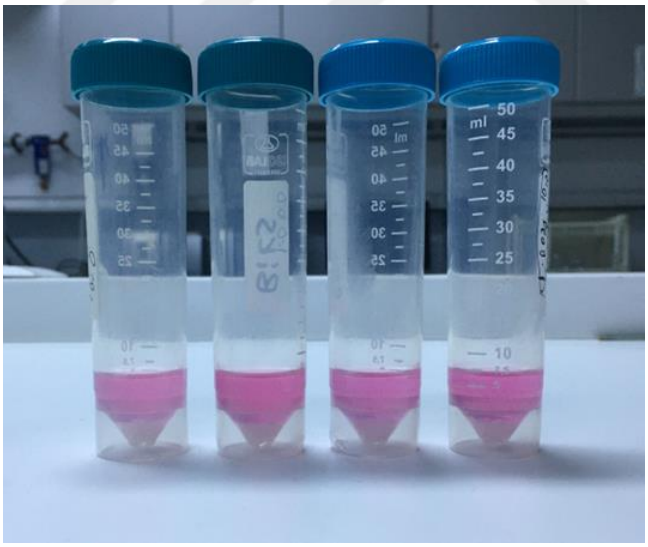
Dondurularak kurutulmuş kapsüller asitlendirilmiş (%0,1 HCl) %50 metanol:su (h:h) ile 1:20 (a:h) oranında karıştırılarak 16 sa boyunca 150 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir (Şekil 2.10). Süre sonunda, kapsüllerin içindeki ekstraktın geçtiği üst fazı almak için 1680 xg'de (4 °C, 10 dk) santrifüj edilmiştir. Kapsüller

parçalanıncaya kadar 150 rpm'de 4 sa boyunca çalkalama devam etmiştir. Tekrardan santrifüj edildikten sonra birleştirilen süpernatantlar 0,22 µm şırınga filtreden geçirilerek HPLC ile antosiyanin (ANT) analizi yapılmıştır. Böylece kapsüllerin içindeki RYE miktarı hesaplanmıştır. Başlangıçta kapsül içine eklenen RYE miktarı bilindiği için % Enkapsülasyon etkinliği, eşitlik (2.4)'e göre hesaplanmıştır.

$$Enkapsülasyon\ etkinliği, EE\ (\%) = \frac{salınan\ ANT\ miktarı}{başlangıçta\ yüklenen\ ANT\ miktarı} \qquad (2.4)$$

Yükleme kapasitesi, kuru kapsüllerin birim ağırlığındaki toplam antosiyanin (ANT) miktarını ifade etmektedir. Bu amaçla eşitlik (2.5) kullanılmıştır.

$$Yükleme\ kapasitesi, LC\ (\frac{\mu g}{g}) = \frac{kapsüldeki\ ANT\ miktarı}{kuru\ kapsül\ miktarı} \qquad (2.5)$$



Şekil 2.10 Enkapsülasyon etkinliği analizi

2.5.5 FTIR Analizi

Kapsüllerin ve formülasyondaki bileşenlerin (SA, κ-CG ve ayçiçek yağı) FTIR spektrumları FTIR (Bruker Tensor 27, Almanya) spektrometresi ile belirlenmiştir. Her ölçümden önce hava ölçümü yapılarak zemin taraması alınmış olup örneklerin FTIR ölçümleri ATR aksesuarı üzerinde örneklerin sıkıştırılmasıyla elde edilmiştir.

Yazılım olarak OPUS versiyon 7.2 (Bruker, Almanya) kullanılarak cihaz kontrolü ve ölçüm taraması yapılmıştır. Analiz öncesinde tüm örnekler dondurmalı kurutucuda kurutulmuş ve havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Tarama aralığı 4000-600 cm^{-1}, çözünürlük 2 cm^{-1} ve ortalama tarama sayısı 100 olarak ayarlanmıştır.

2.5.6 Termal Davranış

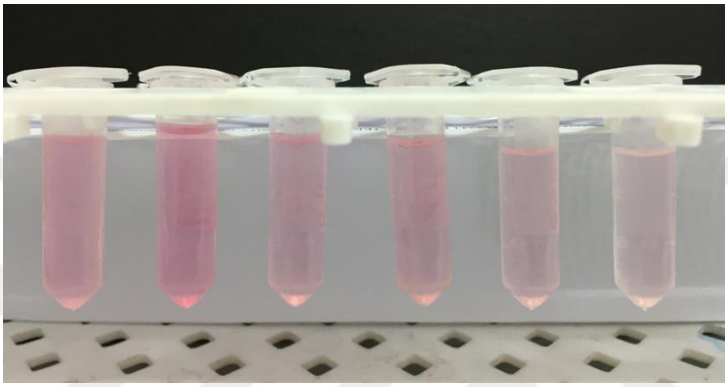
Dondurularak kurutulmuş kapsüllerin ve formülasyondaki bileşenlerin (SA, κ-CG, RYE ve ayçiçek yağı) termal analizi, termogravimetrik ve diferansiyel termal analiz (TG-DTA) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC, TA Q100 Thermo, New Castle, ABD) kullanılarak nitrojen atmosferi altında (20 mL/dk) gerçekleştirilmiştir. Alüminyum kaplara yerleştirilen numuneler 25 °C'den 600 °C'ye 10 °C/dk hızla ısıtılmıştır.

2.5.7 Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Koşullarında Antosiyanin Salınımı

Gastrointestinal sindirimin serbest RYE ve kapsül içindeki antosiyaninler üzerindeki etkisi, Brodkorb vd. [193] tarafından açıklanan yönteme göre belirlenmiştir. Sindirim analizi için, simüle ağız sıvısı (SSF), simüle mide sıvı (SGF) ve simüle bağırsak sıvısı (SIF) stok çözeltileri hazırlanmış ve kullanılmadan önce tüm sıvılar 37 ºC sıcaklığa getirilmiştir. 1M HCl ve 1M NaOH çözeltileri kullanılarak sindirim sıvılarının pH ayarlaması yapılmış ve her sıvı ortamına özgü enzimler kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

0,5 g kapsüller test tüpünde SSF, α-amilaz (75 U mL^{-1}) ve $CaCl_2$ (0,75 mM) ve yeterli miktarda saf su eklenerek (örnek:ağız sıvısı 1:1 (a:h) oranında olacak şekilde) pH 7'de, 37°C'de, su banyosunda 100 rpm'de 2 dk boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra test tüpüne, toplam hacim ağız sıvısı:simüle mide sıvısı 1:1 (h:h) oranında olacak şekilde SGF, $CaCl_2$ (0,075 mM), pepsin (2000 U mL^{-1}) ve saf su eklenerek pH 3'te, 37°C'de, su banyosunda 100 rpm'de 2 sa boyunca inkübe edilmiştir. Mide sindirimin bitiminde, test tüpüne toplam hacim mide sıvısı:simüle bağırsak sıvısı 1:1 (h:h) oranında olacak şekilde pH 7'de SIF, $CaCl_2$ (0,3 mM), pankreatin (100 U mL^{-1}), safra (10 mM) ve saf su eklenmiş çalkalayıcılı su banyosunda 3 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Örnek tüpleri sindirimin her adımında (2 dk ağız ve her 30 dk'da mide ve bağırsak fazında) alınmış ve 1075 xg

4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir (Şekil 2.11). Süpernatantlar 0,22 µm şırınga filtreden geçirilerek -80 °C'de depolanmış ve HPLC analizi için liyofilizatör ile kurutulmuş, sonrasında asitlendirilmiş (%0,1 HCl) %50 metanol:su (h:h) içerisinde çözdürülmüştür. Sindirim sıvılarının alt fazında kalan kapsüller asitlendirilmiş (%0,1 HCl) %50 metanol:su (h:h) içerisinde ve 3780 xg'de 30 dk boyunca santrifüjlenmiş, kapsüller parçalanmış ve üst faz analize alınmıştır. Kapsüllerden salınan antosiyaninlerin miktarının belirlenmesi için her adımda sindirim sıvılarının üst ve alt fazı (kapsüller) ayrı ayrı analiz edilmiştir.



Şekil 2.11 Gastrointestinal sindirim koşullarında elde edilen ve antosiyanin içeren süpernatantlar

2.6 İstatistiksel Analizler

Sonuçlar istatistiksel olarak varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak %95 güven düzeyinde ($p \leq 0,05$), SPSS İstatistik Yazılımı (IBM version 20, Armonk, NY, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, üç paralelin ortalaması ± standart sapma değerleri olarak ifade edilmiştir.

3
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Reyhan Yaprak Ekstraktı (RYE) Karakterizasyonu

Kurutulmuş reyhan yaprak ekstraktının (RYE), kuru ekstrakt (dw) bazında toplam antosiyanin miktarı (TA) 7,45±0,05 mg CGE/g dw, toplam fenolik madde (TFM) miktarı 109,96±0,6 mg GAE/g dw ve toplam flavonoid madde (TFVM) miktarı 86,03±1,75 mg CE/g dw olarak tespit edilmiştir. Kuru ekstraktının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için ABTS ve FRAP yöntemleri kullanılmış olup sırasıyla 477,64±3,97 ve 276,68±3,12 mg TE/g dw değerleri elde edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Reyhan yaprak ekstraktının TA, TFM ve TFVM içeriği ile ABTS ve FRAP antioksidan kapasitesi değerleri

Parametreler	**Birim**	
TA	mg CGE/g dw	7,45±0,05
TFM	mg GAE/g dw	109,96±0,60
TFVM	mg CE/g dw	86,03±1,75
Antioksidan kapasite		
ABTS	mg TE/g dw	477,64±3,97
FRAP		276,68±3,12

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (TA: pH-diferansiyel metot bazlı toplam antosiyanin madde miktarı, TFM: Toplam fenolik madde içeriği; TFVM: Toplam flavonoid madde içeriği; CGE: Siyanidin-3-glukozit eşdeğeri; GAE: Gallik asit eşdeğeri; CE: Kateşin eşdeğeri; TE: Troloks eşdeğeri; ABTS: (2,2′ -azino-bis (3-ethylbenzothiazoline6-sulphonic acid) radikalini temizleme yöntemi; FRAP: Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Güç; dw: Kuru ekstrakt bazlı ağırlık)

Ekstrakt için belirlenen TA değeri başlangıç materyali göz önüne alınarak kuru yaprak bazında 1,47 mg CGE/g kuru yaprak şeklinde hesaplanmıştır. Bu değer ekstraksiyon solventinin sadece su olduğu önceki çalışmamızda [184] reyhan yaprakları için belirlenen TA değerinden (0,27 mg CGE/g kuru yaprak) daha yüksektir. Şimdiki çalışmamızda elde edilen TA değeri, benzer ekstraksiyon çözgeni kullanan McCance vd. [46]'nin bulduğu TA (2,07-9,72 mg CGE/g kuru yaprak) değerinden daha düşük iken, 21,62 mg GAE/g kuru yaprak olarak elde

edilen TFM değeri, aynı çalışmanın sonucu (3,30-20,08 mg GAE/g kuru yaprak) ile benzerlik göstermiştir. Başka bir çalışmada, bu tez çalışmasında olduğu gibi reyhan yaprak ekstraksiyonu için %80 metanol çözgeni kullanılmış ve ekstraktın TFM değeri 57,94 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak tespit etmiştir [5]. Başka bir çalışmada, su (100 °C ve 30 dk) kullanılarak elde edilen reyhan yaprağı ekstraktı dondurularak kurutulmuş ve TFM miktarı ile ABTS antioksidan kapasite değerleri sırasıyla 55,64 mg GAE/g ve 57,63 mg TE/g kuru ekstrakt olarak elde edilmiştir [17]. Yapılan bir çalışmada, sekiz reyhan çeşidinde TFM miktarı 13,09-26,92 mg GAE/g kuru yaprak ve FRAP antioksidan kapasite değeri 24,6-34,8 mmol/100 g kuru yaprak aralığında değiştiği saptanmıştır [14]. Nazir vd. [194] tarafından yapılan çalışmada, TFM içeriği 0,2-11,56 mg GAE/g kuru yaprak ve antioksidan kapasite (FRAP) değeri 417,88-656,04 mM TE/g kuru yaprak olarak elde edilmiştir.

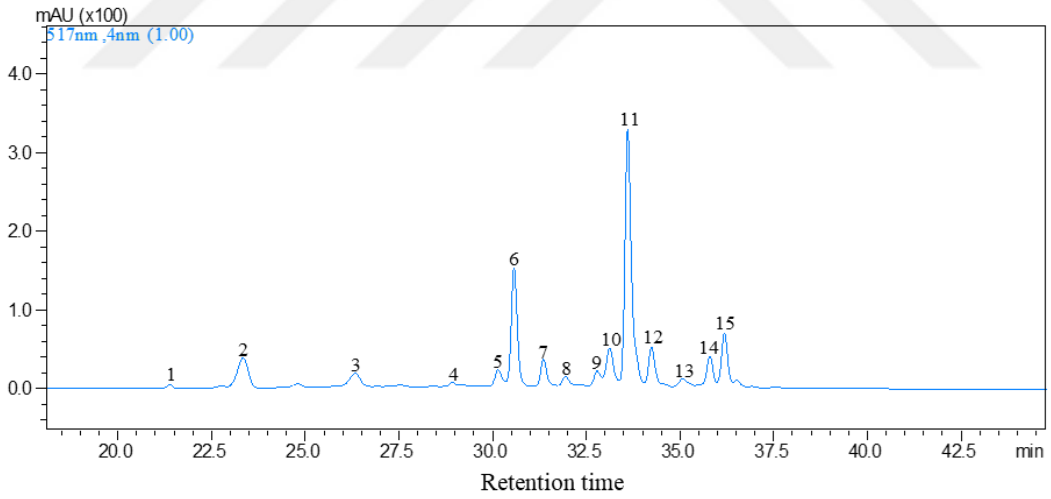
Çalışmamızda elde ettiğimiz toplam polifenolik madde (TA, TFM ve TFVM) ve antioksidan kapasite (ABTS ve FRAP) sonuçlarının, literatürdeki bazı çalışmalardan farklı değerlerde olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, farklı reyhan çeşitlerinin farklı oranlarda biyoaktif bileşen içermesi sonucunda olduğu söylenebilir [1, 45].

3.2 HPLC ile Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi

Reyhan yaprak ekstraktında, 517 nm dalga boyunda 15 farklı pik tespit edilmiş (Şekil 3.1), tanımlanan piklerin mevcut standartlara göre isimleri ve konsantrasyonları Tablo 3.2'de verilmiştir. Tanımlanan antosiyaninler ve konsantrasyonları, siyanidin 3-*O*-glukosit (176,69±0,11 µg/g dw, 0,03 mg/g kuru yaprak), peonidin 3-*O*-glukosit (2751,82±1,50 µg/g dw, 0,54 mg/g kuru yaprak) ve siyanidin (2234,07±38,26 µg/g dw, 0,44 mg/g kuru yaprak) şeklindedir. Benzer şekilde, Nazir vd, [195] tarafından yapılan çalışmada, reyhanda siyanidin ve peonidin düzeyleri sırasıyla 0,45 mg ve 0,22 mg/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının reyhan yaprağındaki antosiyanin seviyesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, peonidin ile siyanidinin yapraklardaki miktarları sırasıyla 0,09-10,77 mg/g kuru yaprak ve 0,14-16,39 mg/g kuru yaprak aralığında değişmiştir [194]. Zaman vd. [196], reyhanda peonidin ve siyanidin miktarlarını

sırasıyla 2,70 mg/g kuru yaprak ve 1,57 mg/g kuru yaprak olarak tespit etmiştir. Phippen ve Simon [45], reyhan yaprağı çeşitlerinde HPLC analizi ile tanımlanan 14 antosiyanin onbir tanesinin siyanidin bazlı, geri kalan üçünün ise peonidin bazlı olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, reyhan bitkisinin bol miktarda açillenmiş ve glikoside antosiyanin pigmenti içerdiği ve gıda endüstrisi için stabil bir pigment kaynağı olabileceği vurgulanmıştır. Başka bir çalışmada, Szymanowska vd. [197] siyanidin 3,5-di-*O*-glukosit, siyanidin 3-*O*-glukosit ve siyanidini reyhanda tespit etmiş ettiği 12 farklı pigment arasında belirtmişti.

3 farklı reyhan çeşidi ile çalışan McCance vd. [46], incelenen tüm çeşitlerde tüm olgunluk seviyelerinde tespit edilen ve konsantrasyon olarak en çok bulunan dört antosiyaninin, Luna vd. [198] tarafından yapılan çalışmanın sonucuna banzer şekilde, siyanidin bazlı *p*-kumaril ve malonil glukosit türevleri olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer şekilde, Fernandes vd. [199] tarafından yapılan araştırmada, reyhanda 26 adet fenolik bileşik tespit edilmiş olup 13 tanesinin antosiyanin pigmenti olduğu ve bu pigmentlerin ana bileşiğinin siyanidin bazlı *p*-kumaril glukosit türevi olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 3.1 Reyhan yaprağı ekstraktında bulunan antosiyanin moleküllerinin HPLC kromatogramı

Tablo 3.2 Reyhan yaprak ekstraktının antosiyanin profili

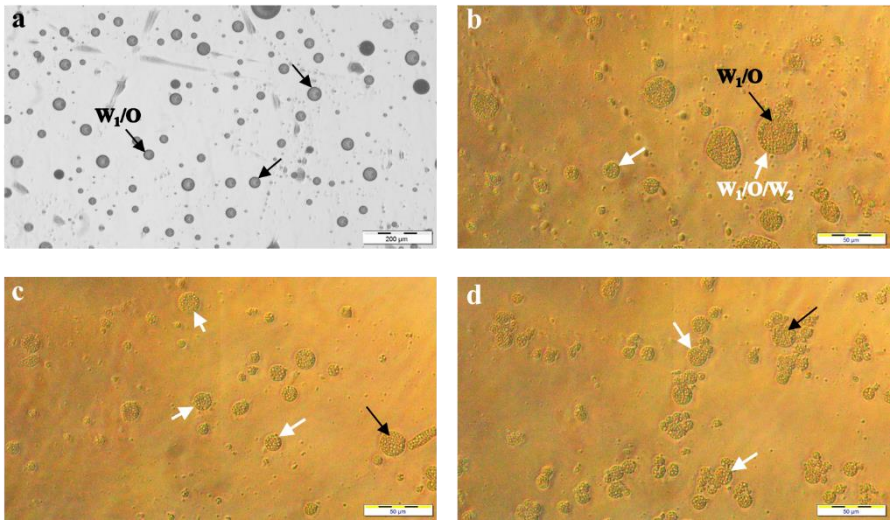
Antosiyanin Pik no	**µg/g dw**	**µg PGE/g dw**
(1) Siyanidin 3-*O*-glukosit	176,69±0,11	265,68±0,1
(2) Peonidin 3-*O*-glukosit	2751,82±1,50	2751,82±1,50
(3) RT26.33	-	1770,97±27,35
(4) Siyanidin	2234,07±38,26	496,18±11,23
(5) RT30.14	-	1198,68±8,33
(6) RT30.57	-	6020,18±0,46
(7) RT31.35	-	1712,27±7,50
(8) RT31.94	-	845,40±12,29
(9) RT32.76	-	1043,71±13,05
(10) RT33.12	-	2532,25±0,15
(11) RT33.60	-	13532,65±16,12
(12) RT34.24	-	2435,73±124,41
(13) RT35.07	-	877,90±14,96
(14) RT35.79	-	1917,38±11,30
(15) RT36.18	-	2814,01±11,02
TA	mg PGE/g dw	40,21±0,17

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (TA: 517 nm'deki toplam pik alanına dayalı toplam antosiyanin madde miktarı; PGE: Peonidin 3-*O*-glukosit eşdeğeri; RT: Alıkonma zamanı (dk); dw: Kuru ekstrakt bazlı ağırlık)

3.3 Emüljel ve Hidrojel Kapsül Karakterizasyonu

3.3.1 Kapsüllerin Boyut ve Şekli

Çift emülsiyon ($W_1/O/W_2$) yüklü hidrojel kapsül (emüljel kapsül) elde etmek için öncelikle, PGPR kullanılarak yağ (ayçiçek yağı) içinde su birincil emülsiyonu (W_1/O) üretilmiş ve sonrasında polimerleri (SA:κ-CG) içeren dış su fazı (W_2) ile Tween 80 kullanılarak çift emülsiyon oluşturulmuştur. Elde edilen W_1/O ve $W_1/O/W_2$ emülsiyonların optik mikroskop görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.



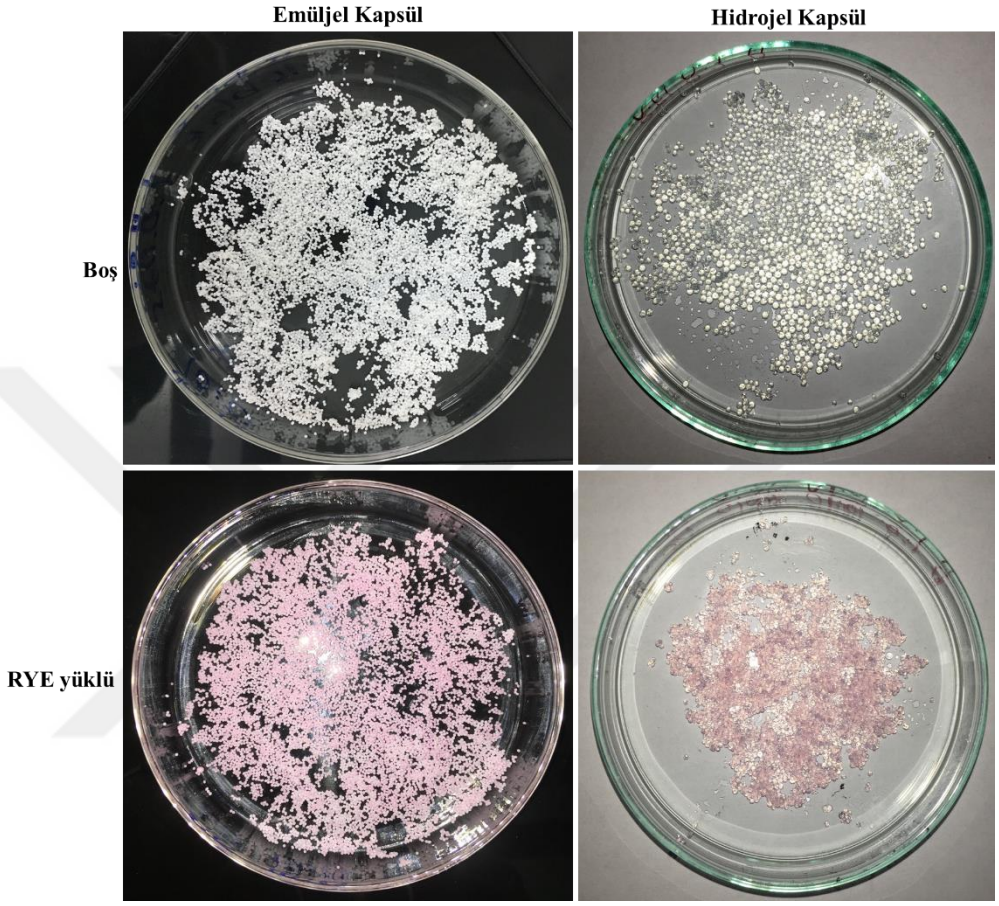
Şekil 3.2 (a) Birincil (W_1/O) emülsiyon ile **(b)** dış su fazında (W_2) yalnızca SA, **(c)** SA:κ-CG (1:0,075, a:a) ve **(d)** SA:κ-CG (1:0,15, a:a) içeren çift emülsiyonların ($W_1/O/W_2$) optik mikroskop görüntüleri.

Şekil 3.2a-d'de görüldüğü gibi, içinde çok sayıda küçük damlacık (siyah oklar) içeren daha büyük damlacıkların (beyaz oklar) varlığı çift emülsiyonun oluşumunu desteklemektedir.

Zayıf kolloidal stabiliteleri nedeniyle çift emülsiyonların gıdada kullanımı oldukça sınırlıdır. Bu sebeple, çift emülsiyonun dış katmanında (W_2) anyonik polisakkarit kullanmak emülsiyon stabilitesini geliştirmek için önemli bir yaklaşım olarak belirtilmiştir [200]. Anyonik polisakkaritlerden SA ve κ-CG, güçlü jelleşme, kalınlaşma ve stabilize etme özelliklerine sahip çift emülsiyon üretmek için yaygın olarak kullanılan polielektrolitlerdir [201]. Çift emülsiyonun en dış katmanındaki (W_2) bu polisakkaritler viskoziteyi arttırarak damlacıkların hareketlerini kısıtladıklarından emülsiyonların fiziksel stabilitesini büyük ölçüde geliştirebilmektedir [106, 202].

Hem RYE içeren hem de içermeyen çift emülsiyon formülasyonları ve bunlara karşılık gelen emülsiyon içermeyen polimer çözeltileri, elektrosprey yönteminde besleme çözeltileri olarak kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcıları içeren tuz banyosuna elektrospreyleme işlemi sonrasında üretilen boş (RYE içermeyen) emüljel ve hidrojel (emülsiyon içermeyen) kapsüller ve RYE yüklü emüljel ve hidrojel kapsüllerin fotoğrafları Şekil 3.3'te, optik mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te verilmiştir.

Boş emüljel kapsüllerin süt beyazı ve emülsiyon içermeyen kapsüllerin (hidrojel kapsül) renksiz ve şeffaf olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, Zhang vd. [103] çift emülsiyon yüklü SA hidrojel kapsüllerin süt rengi bir görünüme sahip olduğunu belirtmiştir.



Şekil 3.3 Yaş emüljel ve hidrojel kapsüller

Tablo 3.3'te görüldüğü gibi, emüljel (emülsiyon yüklü) kapsüllerin ortalama boyutu, RYE yüklenmeden önce (boş), 1,00-1,18 mm arasında iken RYE yüklenmesiyle 1,17-1,33 mm arasında değişmiştir. Çapraz bağlanma yoluyla meydana gelen hacim azalması, RYE yüklü kapsüllerde, RYE içermeyen onun yerine sadece su içeren kapsüllere göre daha az gerçekleşmiş ve sonucunda yüklü kapsüllerde daha büyük kapsül boyutu meydana gelmiştir. Hidrojel kapsüllerin ortalama boyutunun boş ve RYE yüklü iken sırasıyla 0,96-1,22 mm ve 0,99-1,11 mm arasında olduğu tespit edilmiştir. Böylece, emüljel kapsüllerin boyutu ve şeklinin RYE yüklenmesinden etkilendiği fakat hidrojel kapsüllerde bu durumun gözlenmediği söylenebilir.

SF (küresellik faktörü) değeri boş emüljel kapsüllerde 0,03-0,19 iken RYE yüklenmesiyle bu 0,15-0,23 aralığında değişmiştir. Kapsüllere RYE dolayısıyla antosiyanin yüklendiğinde, antosiyaninler (W_1 fazı) ve PGPR arasındaki etkileşime bağlı olarak yağ-su (W_1/O) arayüzündeki arayüzey gerilimi değişmiş [86] ve böylece daha büyük kapsül boyutuna neden olan daha fazla damlacık oluşumu ve daha fazla şekil bozulması meydana gelmiş olabilir.

de Moura vd. [72] tarafından yapılan çalışmada, *Hibiscus sabdariffa* L. antosiyaninleri, çift emülsiyon içeren pektin hidrojel kapsülleri içinde enkapsüle edildiğinde kapsüllerin ortalama çapı 0,79-1,12 mm aralığında tespit edilmiştir.

Tablo 3.3 Kapsüllerin boyutu ve küresellik faktörü (SF)

	Emüljel kapsül			Hidrojel kapsül	
	Boyut (mm)	SF		Boyut (mm)	SF
			Boş		
E	1,02±0,02^{g}	0,03±0,01^{G}	H	1,22±0,09^{a}	0,03±0,01^{AB}
E-K	1,00±0,02^{g}	0,05±0,01^{FG}	H-K	1,09±0,04^{cd}	0,04±0,02^{A}
EC1	1,06±0,03^{f}	0,04±0,01^{FG}	HC1	1,07±0,03^{de}	0,04±0,02^{A}
EC1-K	1,06±0,02^{f}	0,06±0,01^{F}	HC1-K	1,14±0,05^{b}	0,04±0,02^{A}
EC2	1,11±0,04^{e}	0,09±0,02^{E}	HC2	1,04±0,04^{e}	0,03±0,02^{AB}
EC2-K	1,18±0,04^{d}	0,19±0,06^{B}	HC2-K	0,96±0,06^{g}	0,04±0,02^{A}
			Yüklü		
E	1,17±0,05^{d}	0,16±0,03^{CD}	H	0,99±0,03^{f}	0,04±0,02^{A}
E-K	1,23±0,03^{c}	0,18±0,04^{BC}	H-K	0,99±0,05^{fg}	0,03±0,02^{AB}
EC1	1,23±0,04^{c}	0,15±0,03^{D}	HC1	1,08±0,08^{cd}	0,03±0,01^{AB}
EC1-K	1,28±0,07^{b}	0,18±0,04^{B}	HC1-K	1,11±0,04^{c}	0,02±0,01^{AB}
EC2	1,27±0,05^{b}	0,18±0,04^{B}	HC2	1,09±0,06^{cd}	0,04±0,02^{A}
EC2-K	1,33±0,06^{a}	0,23±0,04^{A}	HC2-K	1,06±0,07^{de}	0,04±0,02^{A}

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a-g) emüljel ve hidrojel kapsüllerin boş ve yüklü olması durumundaki boyut farklılıklarını göstermektedir. Aynı sütundaki farklı büyük harfler (A-G) emüljel ve hidrojel kapsüllerin boş ve yüklü olması durumunda SF değerlerindeki farklılıklarını göstermektedir ($p<0,05$). (RYE: Reyhan yaprak ekstraktı; Boş: RYE içermeyen; Yüklü: RYE içeren)

Sonuçlara göre (Tablo 3.3), hidrojel sisteme çift emülsiyonun dahil edilmesi sadece SA ile elde edilen kapsüllerde az da olsa boyut küçülmesine sebep olmuştur (H:1,22, H-K:1,09 ve E:1,02, E-K:1,00 mm). Benzer şekilde, başka bir çalışmada, çift emülsiyonun SA hidrojel kapsüllere dahil edilmesinin (11,1 μm), emülsiyon içermeyen SA hidrojellere (17,1 μm) göre daha küçük kapsül boyutu ile sonuçlandığı rapor edilmiştir [105]. Boyuttaki bu azalma Beldarrain-Iznaga vd. [203] tarafından da gözlenmiş ve bu durum, emülsiyon, polimer zinciri ve çapraz bağlayıcı iyon arasındaki etkileşim nedeniyle daha birleşmiş yüzey yapısının ve dolayısıyla daha sıkışmış bir hidrojel kapsül yapısının oluşabileceğine atfedilmiştir.

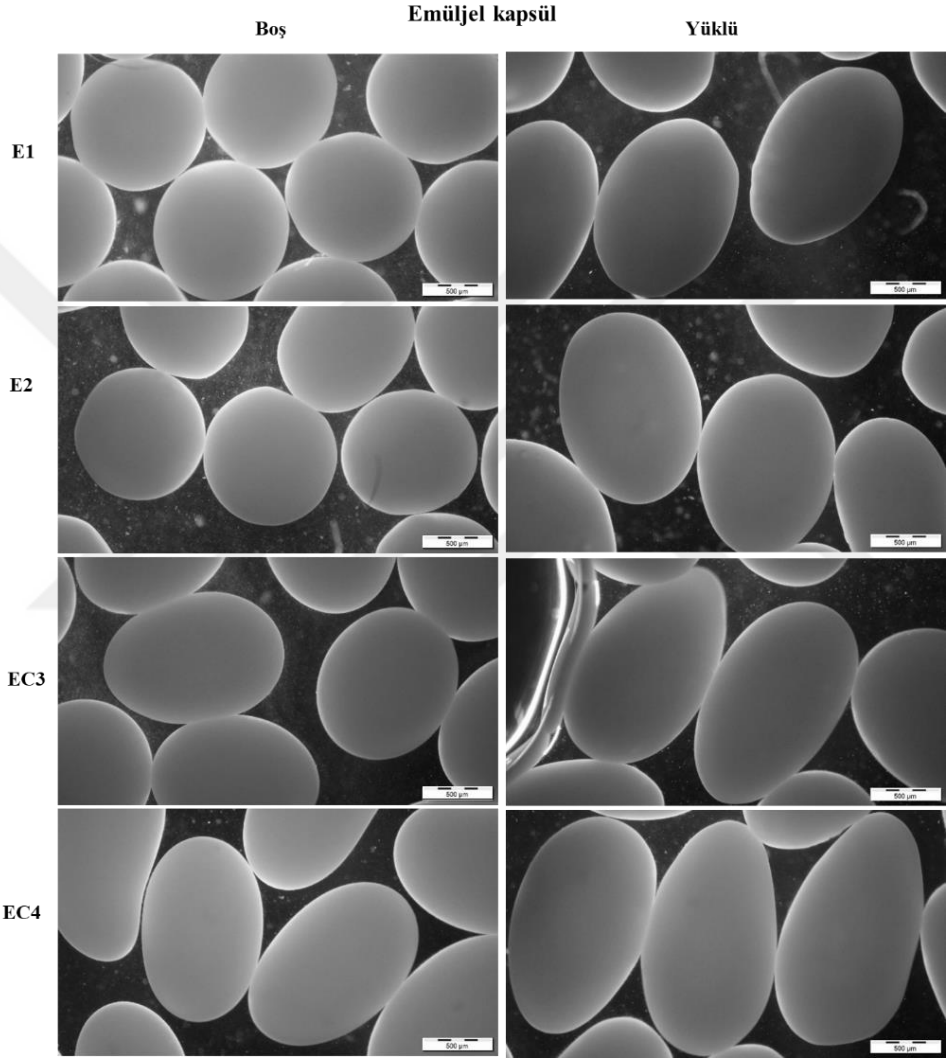
Formülasyona κ-CG'nin eklenmesi boş hidrojel kapsüllerin (H, HC1 ve HC2) boyutunda az da olsa azalmaya sebep olurken RYE yüklü hidrojel ve emüljel kapsüllerde aynı eğilim gözlenmemiştir. κ-CG polimerinin varlığı emüljel kapsüllerde ise daha fazla boyut artışına neden olmuştur. Bu, κ-CG içeren polimer çözeltisinin sadece SA içeren çözeltiye göre daha viskoz bir yapıda olması ile ilişkili olabilir. Çünkü elektrospreylenmiş kapsüllerin boyutu ve şekli, diğer işlem parametreleri sabit olduğundan, besleme çözeltilerinin özelliğine, viskozitesine ve yüzey gerilimine bağlı olmaktadır [109]. Sonuçlarımıza benzer şekilde, yapılan bir çalışmada, üretilen mikrokapsüllerin parçacık boyutunun kullanılan besleme biyopolimer çözeltilerinin viskozitesine bağlı olduğu ve daha yüksek viskozitelerin daha büyük parçacık boyutuna neden olduğu bildirilmiştir [204]. Başka bir çalışmada, polisakkarit çözeltisinin viskozitesi ile hidrojel kapsülün boyutu arasında pozitif bir korelasyon olması sonucu ile SA kapsüllere κ-CG eklenmesinin boyutta artışa sebep olduğu rapor edilmiştir [205]. Sankalia vd. [206] tarafından yapılan çalışmada, papain içeren κ-CG hidrojel kapsüllerin, artan κ-CG konsantrasyonu sonucunda artan viskozite ile daha büyük boyutta kapsül üretimine sebep olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, yüksek KCl konsantrasyonu ve tuz banyosunda bekletme süresinin artması sonucunda yüksek derecede çapraz bağlanma meydana gelmesi dolayısıyla daha küçük boyutta kapsül elde edildiği vurgulanmıştır. Başka bir çalışmada, SA çözeltisine inülin polimeri eklenmesiyle çözeltinin viskozitesinin arttığı ve besleme çözeltisinin viskozitesinin kapsüllerin boyutu üzerindeki etkisinin bir sonucu olarak kapsüllerin boyutunda artış olduğu rapor edilmiştir [207]. Bulgularımızı destekleyici şekilde, SA/κ-CG hidrojel kapsülünün (2,75 mm) boyutunun yalnızca SA içeren hidrojel kapsüllerden (2,69

mm) daha büyük olduğu rapor edilmiştir [155]. Diğer taraftan, Li vd. [208] yaptıkları çalışmada, elde edilen kapsüllerin 2,68-2,87 mm arasında değiştiğini ve en düşük viskoziteye sahip polimer çözeltisi ile elde edilen kapsüllerin en büyük kapsül boyutuna sebep olduğunu ifade etmişlerdir. Polimerlerin su tutma kapasitesinin de kapsül boyutunun belirlenmesinde önemli olduğu söylenebilir. Bu doğrultuda, κ-CG varlığında meydana gelen boyut artışı, Ca^{+2}/SA jel ağı içinde, κ-CG polimerinin sineresis etkisini azaltması ve ardından sertleşme (tuz banyosunda çapraz bağlanma) işlemi sırasında SA/κ-CG hidrojel kapsüllerin büzülmesini etkilemesiyle ilgili olabilir. Bu durum, κ-CG konsantrasyonu arttığında kapsüllerin daha az küçülmesi (yani daha büyük kapsül boyutuna yol açması) gerçeğiyle desteklenmektedir [209].

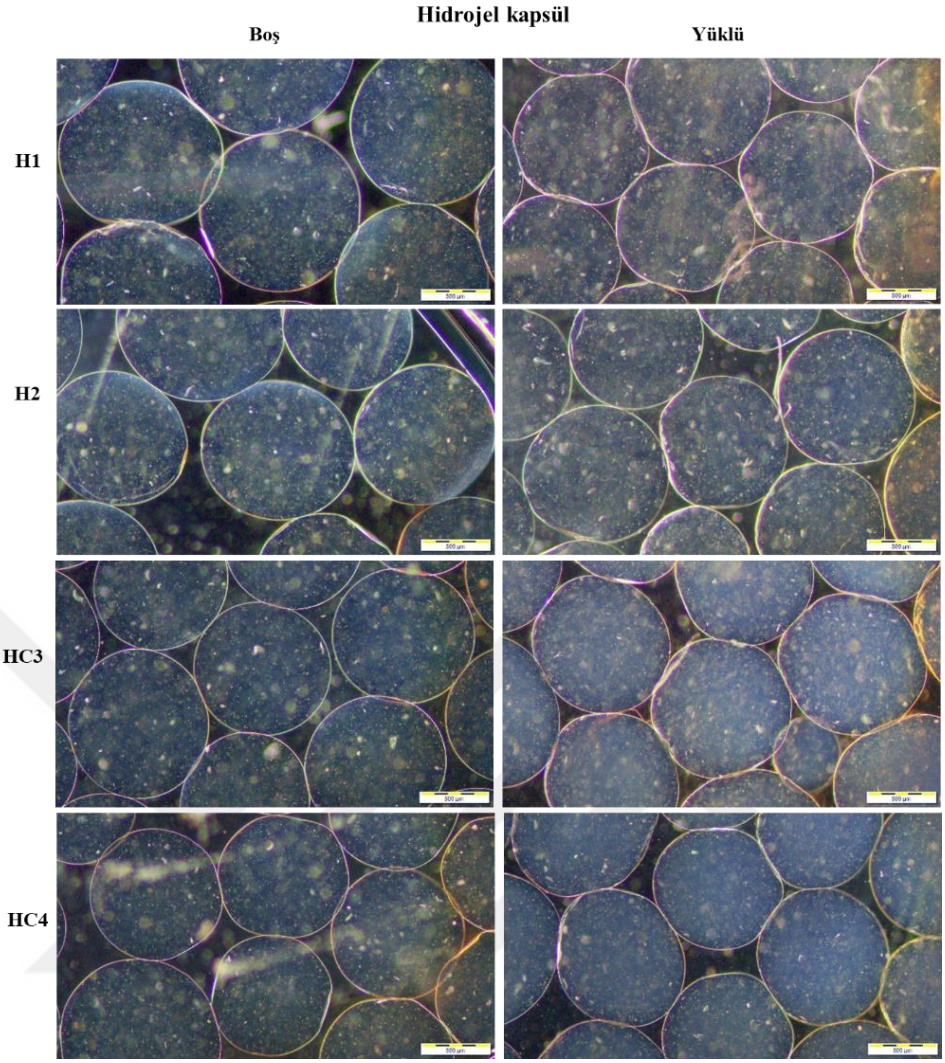
κ-CG varlığı hidrojel kapsüllerde emüljel kapsüllerde olduğu gibi belirgin bir farkla boyut artışına neden olmamıştır. Bu durum benzer şekilde, emülsiyon varlığının besleme çözeltilerinin viskosizetisini arttırması ile açıklanabilir. Bulgumuzu destekleyici şekilde, Sathasivam vd. [210] tarafından yapılan çalışmada, yağın ve emülgatörlerin plastikleştirici görevi gördüğü ve plastikleştirici varlığında yüksek viskoziteli çözeltiler oluştuğu belirtilmiştir.

Emüljel kapsüllerin şekli, κ-CG konsantrasyonu arttıkça daha da bozulmuş ve SF (küresellik faktörü) değeri, yalnızca $CaCl_2$ ile jelleştirilen kapsüllerde 0,03'ten 0,09'a ve iki çapraz bağlayıcı tuz ($CaCl_2$ ve KCl) ile jelleştirilen kapsüllerde ise 0,05'ten 0,19'a artmıştır (Tablo 3.3 ve Şekil 3.4). κ-CG ile elde edilen jellerde, K^+ , galaktoz kalıntısından (3-*β*-D galaktoz) sülfat grubuyla iyonik bir bağ oluşturur ve bitişik çift veya tek sarmallar arasında moleküller arası kararlılığı sağlamak için başka bir galaktoz kalıntısının anhidro-O-3,6 halkasıyla da elektrostatik etkileşime girmektedir. Buna karşılık Ca^{+2}, komşu tek veya çift sarmallardaki sülfat gruplarıyla çapraz bağlanma yapmaktadır. Bu iyonik kuvvetler ve moleküller arası ilişkiler, zincir stabilitesini arttırmaktadır [211]. Karışım (iki polimeri de içeren) jel kapsüllerde, κ-CG'nin varlığı daha yoğun ve daha sıkı bir ağ yapısına neden olabilir, çünkü aynı hacimde daha fazla polisakkarit molekülü bulunmakta [155] ve böylece şeklin bozulmasına neden olabilmektedir. Wu vd. [104] tarafından yapılan çalışmada, resveratrol yüklü Pickering emülsiyonlar Ca^{+2}/K^+ iyonları ile çapraz bağlanan SA/κ-CG hidrojel kapsüllere dahil edilmiştir. Çalışmada, kapsüllerin boyutunun 1,2 μm'den büyük olduğu ve K^+ artması sonucunda κ-CG jelinin

yoğunlaştığı, sineresis etkisinin azaldığı ve kapsül boyutunun arttığı rapor edilmiştir. Bulgularımızı destekler nitelikte, yapılan bir başka çalışmada, K^+ ile çapraz bağlanan κ-CG kapsüllerin küresel olmayan silindir benzeri geometriye sahip olduğu, Ca^{+2} ile elde edilen SA kapsüllerin ise küresel şekiller gösterdiği rapor edilmiştir [212].



Şekil 3.4 Boş ve RYE yüklü emüljel kapsüllerin optik mikroskop görüntüleri



Şekil 3.5 Boş ve RYE yüklü hidrojel kapsüllerin optik mikroskop görüntüleri

3.3.2 Yüzey Morfoloji Özellikleri (SEM)

Kapsül üretiminde kullanılan polimerlerin davranışı ve bunların emüljel ve hidrojel kapsüllerin morfolojisine olan etkileri SEM analizi ile incelenmiştir. Emüljel ve hidrojel kapsüllerin sırasıyla yüzeyine ait görüntüler Şekil 3.6a-c ve Şekil 3.7a-c'de, kesit görüntüleri ise Şekil 3.6d-f ve Şekil 3.7d-f'de verilmiştir.

Emüljel kapsüllerin daha az küresel olan şekli, yaş kapsüllerin kullanıldığı optik mikroskop görüntülerinde (Şekil 3.4) daha belirginken, liyofilize kapsüllerin kullanıldığı SEM analizi görüntülerinde emüljel kapsüller hidrojel kapsüllere göre şekil olarak daha küresel iken yüzeyleri de daha pürüzsüz olmuştur (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Bunun sebebi diğer bazı çalışmalarda da bildirildiği gibi, kapsüllerin SEM analizi öncesinde dondurarak kurutma işlemi sırasında gerçekleşen su kaybı ile ilişkilidir [204, 205, 213]. Dondurularak kurutma, yüzey kaplama işlemi (SEM

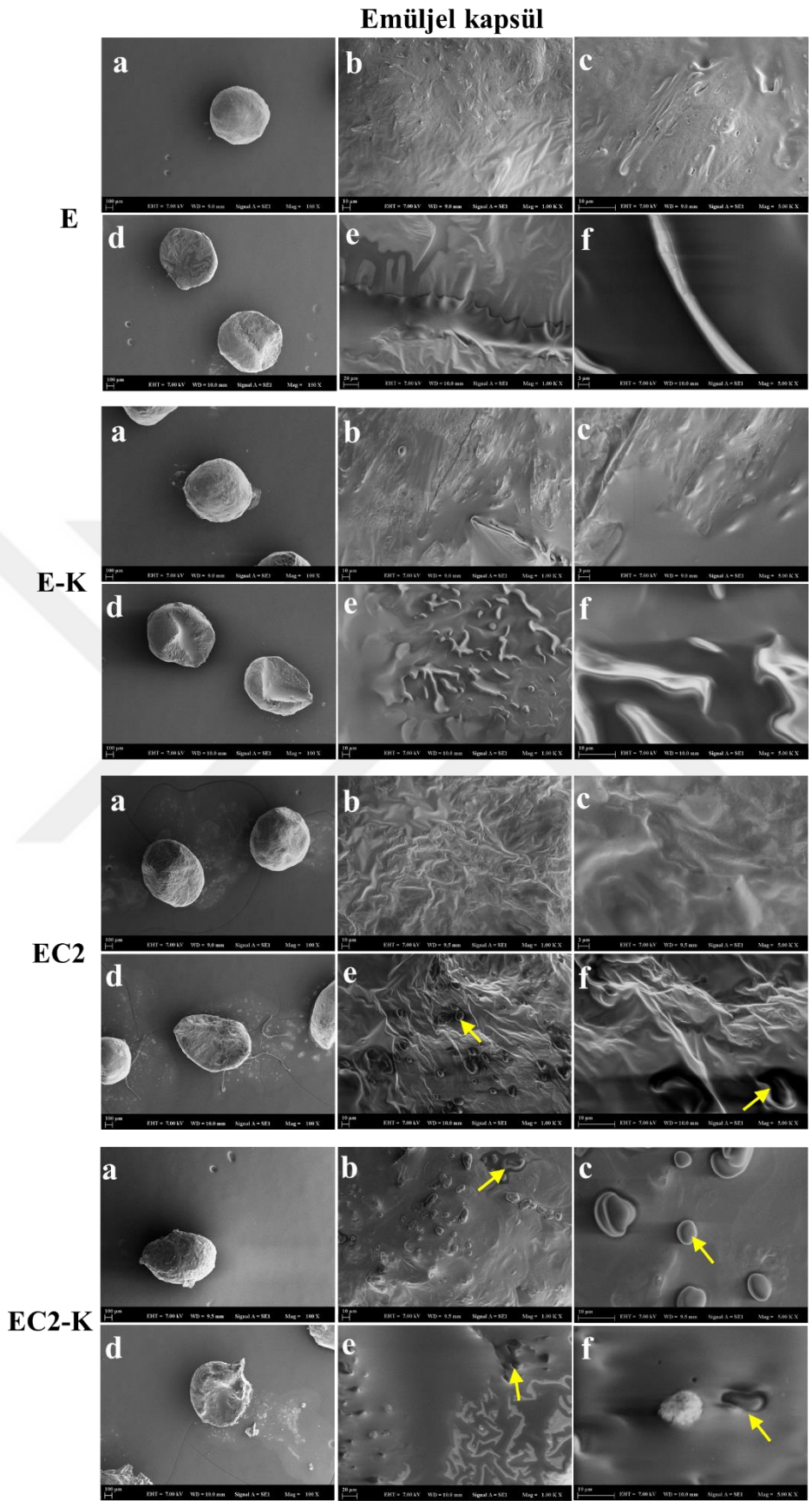
analizi öncesinde) ve yüksek vakum uygulamaları, (SEM analizi sırasında) emüljel/hidrojel matriksinde hapsolan suyun süblimleşmesine neden olmaktadır, dolayısıyla suyun uzaklaşması ve uygulanan vakum işlemi jel yapının yüzeyinin daralmasına, büzülmesine ve çökmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle, dondurularak kurutulmuş emüljel ve hidrojel kapsüllerin morfolojisi arasındaki belirgin fark, kapsül içindeki su uzaklaştırıldığında hidrojel kapsüllerde gözlemlenen yapıların çökmesine karşın emüljel kapsüllerin yapısında bulunan yağ damlacıklarına atfedilebilir. Bulgularımıza benzer şekilde, Li vd. [208] tarafından yapılan çalışmada, dondurularak kurutulmuş SA kapsüllerin yüzeylerinde birçok gözenek ve çatlak görülmüş ancak O/W emülsiyonu içeren SA kapsüllerde yağ damlacıklarının varlığı nedeniyle daha pürüzsüz yüzeyler gözlendiği rapor edilmiştir. Grubumuz tarafından gerçekleşen bir önceki çalışmada emüljel kapsüllerde (çift emülsiyon içeren), emülsiyon içemeyen hidrojel kapsüllere göre daha pürüzsüz bir yüzey morfolojisi olduğu rapor edilmiştir [109]. Ayrıca, yağın ve emülgatörlerin plastikleştirici etkisi olduğu ve O/W emülsiyon yüklü karboksimetilselüloz kapsüllerin dondurularak kurutulduktan sonra diğer formülasyonlara göre küreselliğini koruduğu da rapor edilmiştir [210].

Sadece SA ile üretilen emüljel kapsüllerin (E ve E-K) morfolojisinin jelleşme ortamında K^+ iyonu bulunsun veya bulunmasın küresel ve pürüzsüz olduğu fakat formülasyona κ-CG polimeri eklenmesiyle (EC2 ve EC2-K) yüzeyde pürüzlülük ve şekilde bozulma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, bu durum özellikle jelleşme ortamında K^+ iyonunun varlığında daha belirgin hale gelmiştir. Benzer şekilde, SA ile elde edilen kapsüllerin formülasyonlarına ikinci polimer olarak maltodekstrin, gam arabik ve kitosan eklendiği bir çalışmada, SEM analizinde tüm kapsüllerin yüzeyinde farklı derecelerde çatlaklar olduğu ve bunun dondurarak kurutmanın farklı polimerler üzerindeki farklı oranda çökmeler meydana getirebileceği belirtilmiştir [134]. Ayrıca, bu durum daha yoğun çapraz bağlanma sonucunda kapsül duvarının (polimer tabakası) daha kırılgan olması ve dondurarak kurutma ile daha fazla çatlakların oluşması ile de ilgili olabilir [210]. Li vd. [214], Ca^{+2}/SA hidrojel kapsüllerde kompakt ve pürüzsüz yüzey gözlendiğini fakat κ-CG ilavesiyle boyut ve şeffaflığın artışı ile yüzeyde çatlaklar meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

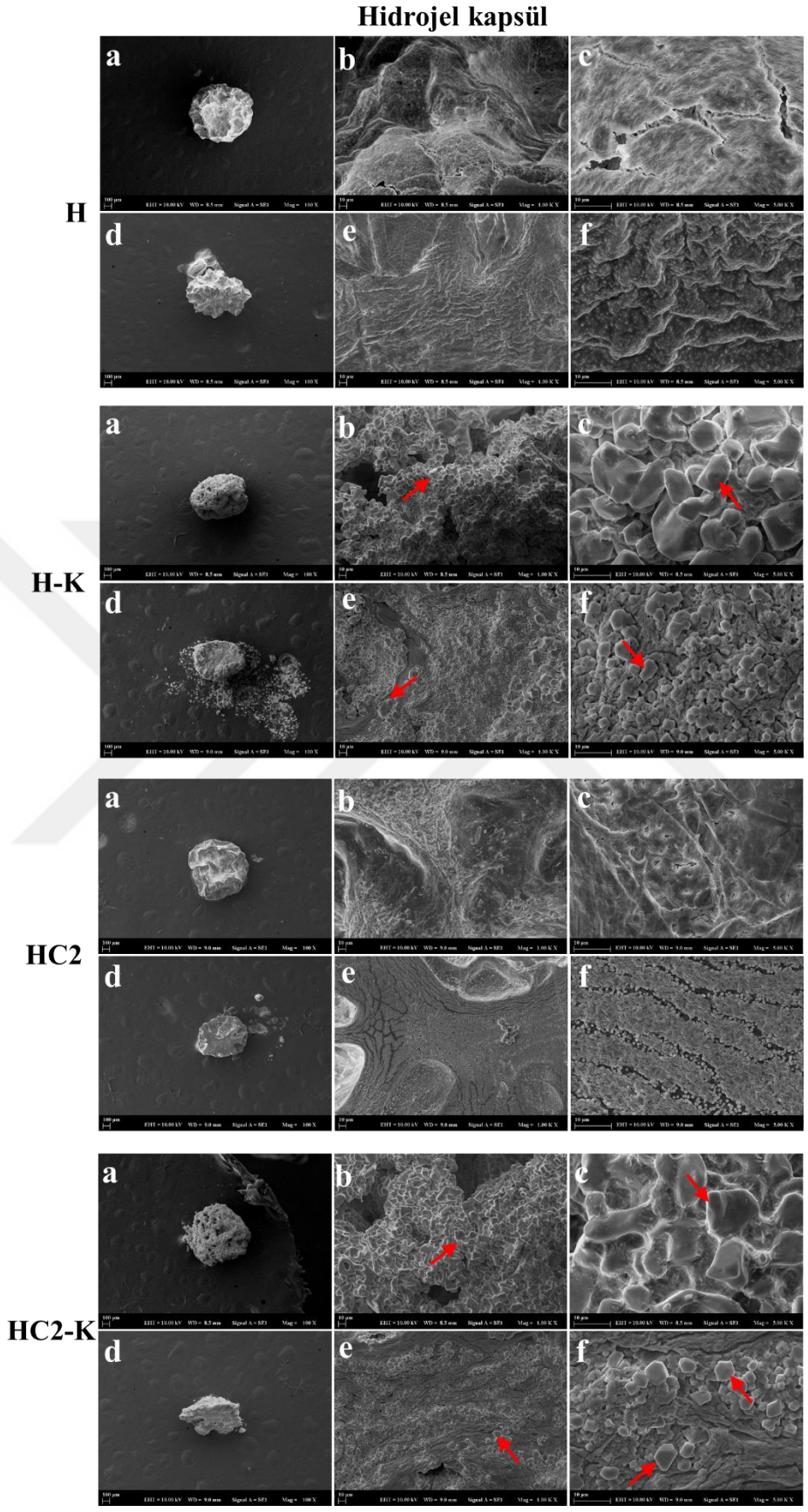
SA/κ-CG ile elde edilen emüljel kapsüllerin (sarı oklar, EC2 ve EC2-K, Şekil 3.6) yüzeyinde küçük damlacıklar-kabarcıklar gözlenmiştir. Bu durum, K^+ iyonun κ-CG

ile bağlanması, Ca^{+2} iyonun SA ile bağlanmasından daha yavaş gerçekleşmesi sonucunda daha yumuşak jeller elde edilmesine [212] ve böylece dondurarak kurutma sırasında yağ damlacıklarının çatlaklardan yüzeye sızması şeklinde açıklanabilir. Ayrıca, κ-CG içermeyen emüljel kapsüllerde, SA'nın Ca^{+2} iyonu ile daha fazla çapraz bağlanması sonucunda daha sıkı (kompakt) bir yapı oluşması sonucunda yağ damlacıkları jel matriksinin içinde daha güçlü bir şekilde tutularak yüzeye sızmaları önlenmiş olabilir.

Hidrojel kapsüllerin yüzeylerinde (kırmızı oklar, H-K ve HC2-K, Şekil 3.7) kümeler halinde gruplanmış düzensiz geometrik formlu yapılar gözlenmiştir. Bu yapıların, K^{+} varlığında, jel yapısındaki Ca^{+2} iyonların dağılması/yer değiştirmesi sonucunda meydana geldiği söylenebilir [215].



Şekil 3.6 Emüljel kapsüllerin yüzey (a, b ve c) ve kesitinin (d, e ve f) SEM görüntüleri



Şekil 3.7 Hidrojel kapsüllerin yüzey (a, b ve c) ve kesitinin (d, e ve f) SEM görüntüleri

3.3.3 Jel Kuvveti

Tablo 3.4'te emüljel ve hidrojel kapsüllerin jel kuvveti verilmiştir. Emüljel kapsüllerin jel kuvveti 9,39-14,65 g arasında değişirken hidrojel kapsüllerde 10,84-13,51 g aralığında elde edilmiştir.

Sonuçlara göre, formülasyona κ-CG eklenmesiyle emüljel ve hidrojel kapsüllerin jel kuvvetinde azalma söz konusudur. Bu durum, κ-CG ile Ca^{+2} arasında oluşan çapraz bağlanma ağının SA ile Ca^{+2} arasında oluşan ağa göre daha zayıf olması sonucunda jellerin esnekliğinin artması şeklinde açıklanabilir [164]. Sonuçlarımıza benzer şekilde, Oi vd. [205] tarafından yapılan çalışmada, κ-CG ilavesinin sadece SA ile elde edilen hidrojel kapsüllere göre, jel kuvvetinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, sadece SA ile elde edilen kapsüllerin jel kuvvetinde, formülasyona ikinci polimerin eklenmesiyle (kitosan, jelatin ve peynir altı suyu protein konsantresi) azalma gözlendiği ve eklenen polimerlerin plastikleştirici olarak görev alıp kapsüllerin esnekliğini arttırmış olabileceği ifade edilmiştir [168]. Yine SA ile elde edilen kapsüllerin jel kuvvetinin (2,87 N/m^2), SA/gam arabik (1,88 N/m^2) ve SA/maltodekstrin (1,99 N/m^2) formülasyonuna sahip kapsüllerinkinden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [134].

Tuz banyosuna (jelleşme banyosu) K^+ iyonlarının dahil edilmesi, hidrojel kapsüllerin jel kuvvetinde artışa sebep olurken emüljel kapsüllerde azalmaya neden olmuştur. Hidrojel kapsüllerdeki artış, jelleştirici ajanın konsantrasyonunun artması sonucunda polimerlerin çapraz bağlanmasındaki artış ile açıklanabilir. Bulgumuzu destekleyici şekilde, Li vd. [214], çapraz bağlayıcı iyon konsantrasyonu artışının çift polimerli jellerde ekstra hidrojen bağlanması sağlayabileceğini, böylece jellerin çapraz bağlanma yoğunluğunu ve mekanik kuvvetini artırabileceğini ifade etmişlerdir. Bununla beraber, emüljel kapsüllerdeki azalma, kapsüldeki emülsiyon damlacıkların, κ-CG çift sarmallarının bağlanmasını ve ekstra çapraz bağlanmayı engellemesiyle açıklanabilir.

κ-CG içermeyen emüljel ve hidrojel kapsüller (E, H, E-K ve H-K) arasında, emüljel kapsüller az da olsa daha yüksek jel kuvveti göstermiştir. Bununla birlikte, κ-CG içeren emüljel kapsüller aynı formülasyona sahip hidrojel kapsüllerden daha düşük jel kuvveti göstermiştir. Bu, emüljel kapsüllerdeki yağ damlacıklarının plastikleştirici etkisi sonucunda kapsüllerin jel kuvvetinde azalma ve esnekliğinde

artma meydana gelmesi ile açıklanabilir [216]. Li vd. [208] tarafından yapılan çalışmada, aljinat hidrojel kapsüle emülsiyon yüklendiğinde jel kuvvetinin 118,52 N değerinden 103,19 N değerine azaldığı bildirilmiştir. Emüljel kapsüllerdeki emülsiyon damlacıkları, jel matrisi ile emülsiyonu stabilize etmek için kullanılan emülgatörler arasındaki etkileşime bağlı olarak aktif veya inaktif dolgu materyali gibi davranabilir. Ayrıca, dolgu materyalinin (örn., emülsiyon damlacıkları) boyutu, kapsüllerin ortalama gözenek boyutundan daha büyük olduğunda, parçacığın polimer matriksi ile etkileşime girip girmediğine bakılmaksızın damlacıkların jeli zayıflatacak şekilde hareket ettiği de rapor edilmiştir [217].

Tablo 3.4 Kapsüllerin jel kuvveti

Emüljel kapsül	**Jel kuvveti (force, g)**	**Hidrojel kapsül**	**Jel kuvveti (force, g)**
E	$14,65\pm0,28^{ax}$	H	$12,20\pm0,69^{by}$
E-K	$13,55\pm0,28^{bx}$	H-K	$13,48\pm0,24^{ax}$
EC1	$11,66\pm0,04^{cx}$	HC1	$12,53\pm0,34^{aby}$
EC1-K	$10,65\pm0,12^{dx}$	HC1-K	$13,51\pm0,13^{ay}$
EC2	$10,17\pm0,57^{dex}$	HC2	$10,84\pm0,59^{dx}$
EC2-K	$9,39\pm0,42^{ex}$	HC2-K	$11,48\pm0,21^{bcy}$

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütundaki farklı üst simge küçük harfler (a-e) örnekler arasındaki (emüljel ve hidrojel kapsüller kendi içinde) farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$). Aynı satırdaki farklı üst simge küçük harfler (x-y) örnekler arasındaki (aynı satırdaki emüljel ve hidrojel kapsüller birbiriyle) farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.4 Antosiyaninlerin Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi

Enkapsülasyon etkinliği analizi HPLC analizi ile tespit edilmiş ve sonuçları Tablo 3.5'te verilmiştir. Emüljel kapsüllerde, antosiyaninlerin enkapsülasyon etkinliği (EE) %70,73-87,89 arasında, hidrojel kapsüllerde ise %13,50-20,67 arasında değişmiştir. Ayrıca, emüljel kapsüllerde antosiyaninlerin yükleme kapasitesi 16,10-20,07 µg ANT(PGE)/g kapsül iken hidrojel kapsüllerde 2,44-3,72 µg ANT(PGE) /g kapsül olarak elde edilmiştir. Önceki çalışmalarda, kuş üzümü, kırmızı soğan ve patlıcan kabuğu ekstraktların SA hidrojel kapsüllerde antosiyaninlerin kapsülleme etkinliği sırasıyla %69-72, %25-60 ve %51,08-72,79 olarak rapor edilmiştir [129, 131, 133].

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, hidrojel kapsül sistemine çift emülsiyonun dahil edilmesi (emüljel hibrit sistemi) antosiyaninlerin kapsül içinde tutulmasını dolayısıyla enkapsülasyon etkinliğini arttırmaktadır.

Bu durum, çift emülsiyonun iç su fazında enkapsüle edilen RYE'nin, antosiyanin difüzyonunu sınırlayan ek bir bariyer görevi görerek, ekstrüzyon işlemi sırasında jel oluşurken, yapının büzülmesi ile RYE'nin jelleşme banyosuna sızmasının engellemesi ile açıklanabilir [86]. Çalışmamıza benzer şekilde, Norcino vd. [105] tarafından yapılan çalışmada, üzüm kabuğundan elde edilen antosiyaninler çift emülsiyonun ($W_1/O/W_2$) iç su fazında kapsüllenmiş ve SA ve pektin polimerleri kullanılarak emülsiyon yüklü hidrojel (emüljel) kapsüller üretilmiştir. Emülsiyon içermeyen hidrojel kapsüllerde %EE, SA ve pektin kapsüller için sırasıyla %64 ve %46 olarak bulunmuştur. Hidrojel kapsüllere çift emülsiyonun dahil edilmesiyle antosiyaninlerin %EE değeri SA kapsüllerde %89'a pektin kapsüllerde %76'ya artmıştır.

Tuz banyosunda (jelleştirme çözeltisi) Ca^{+2} ve K^{+} çapraz bağlayıcı iyonların beraber bulunması, sadece SA kullanılarak üretilen emüljel ve hidrojel kapsüllerde antosiyaninlerin %EE değerinin artmasına neden olmuştur. %EE değeri, emüljel kapsüllerde %79,32 (E)'den %87,89 (E-K)'a yükselirken hidrojel kapsüllerde %13,50 (H)'den %18,52 (H-K)'ye artmıştır. Bu durum, tuz banyosuna K^{+} iyonu ilavesi sonucunda çapraz bağlayıcı ajanın konsantrasyonundaki artışın SA jel matrisinde daha yoğun çapraz bağlanmaya sebep olması ve böylece yüklenen antosiyaninlerin jelleşme sırasında tuz banyosuna difüzyonunu azaltması ile açıklanabilir [155]. Önceki bir çalışmada, yetersiz çapraz bağlanma nedeniyle hidrojel kapsüllerin gevşeyebileceği ve oldukça gözenekli hale gelebileceği ve bunun da aktif bileşen sızıntısına yol açabileceği belirtilmiştir [132]. Yapılan bir çalışmada, tuz konsantrasyonun ($CaCl_2$/KCl) serum albuminin SA/κ-CG hidrojel kapsüllerdeki enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisi incelenmiş ve düşük tuz konsantrasyonlarındaki düşük enkapsülasyon etkinliği yetersiz çapraz bağlanma ile açıklanmıştır [165].

Emüljel ve hidrojel kapsüllerde, formülasyona κ-CG eklendiğinde %EE değeri artmıştır (E:%79,32, EC1:%86,79 ve H:%13,50, HC1:%15,08). Polimerik hidrojel kapsüllerde genellikle kapsüllenmiş bileşiğin yapıdan sızması söz konusudur ve ikinci bir polimerin ve/veya katmanın varlığı antosiyaninlerin jelleşme ortamına

difüzyonunu sınırlayabilir. İkinci polimerin varlığı ile daha yoğun ağ yapısının oluşması söz konusu olabilir. *Syzygium cumini* antosiyaninlerinin SA hidrojel kapsüllerde enkapsüle edildiği çalışmada, ikinci polimer olarak maltodekstrin (MD), kitosan (K) ve gam arabik (GA) kullanılmış ve ikinci polimerler varlığında SA hidrojel kapsüllerin %EE değerinde artış olduğu gözlenmiştir (SA: %83,25, SA-MD: %84,42, SA-GA: %91,17 ve SA-K: %92,4) [134].

SA ve κ-CG polimerleri sırasıyla yüksek karboksil ve hidroksil grubu içeriğine sahiptirler dolayısıyla bu biyopolimerler hidrojen bağları ve iyonik etkileşimlerle çapraz bağlanmaları sonucu sıkı şekilde paketlenmiş ağ yapıları oluşturabilirler. İyonik bağlanma sırasında SA ve κ-CG molekülleri arasındaki mesafede bir azalma meydana gelmekte ve daha sıkı paketlenmiş bir ağ yapısının oluşması sağlanmaktadır [164]. İnsülin aspart (analog insülin) bileşiğinin enkapsüle edildiği bir çalışmada, Ca^{+2}/SA hidrojelinde %EE değeri %26 iken formülasyona %0,1 oranında κ-CG ilave edilmesi EE değerini %19'a azalmıştır. Bu durum, κ-CG polimerindeki negatif yüklü sülfat grubunun varlığının, negatif yüklü çekirdek materyalini (insülin aspart) ittiği, dolayısıyla kapsülün çapraz bağlanması sırasında yapıdaki gözeneklerden daha yüksek miktarda insülin aspartının sızmasıyla ilişkilendirilmiştir. Çalışmadaki diğer bulgu ise ilginç bir şekilde, κ-CG konsantrasyonunun %0,1'den %1'e artmasıyla insülin aspartın %EE değerinin %28'e artmasıdır. Bunun nedeni, SA matriksi içine nüfuz eden daha yoğun bir Ca^{+2}/κ-CG hidrojel ağının oluşması sonucunda insülin aspartın dışarıya doğru difüzyonuna karşı daha büyük bir direnç meydana gelmesi ile açıklanmıştır [209].

Diğer taraftan, çalışmamızda, κ-CG içeren emüljel ve hidrojel kapsüllerde, K^+ iyonlarının varlığı daha düşük %EE değeri ile sonuçlanmıştır. %EE deki azalma, SEM analizinde (Bölüm 3.3.2) bahsedildiği gibi, κ-CG bulunan kapsüllerde ortamda K^+ iyonu bulunmasıyla yüzeyde artan pürüzlülük ve çatlakların, kapsül içindeki enkapsüle edilen maddenin sızıntılarına karşı gösterilen direncin azalmasıyla açıklanabilir. Çalışmamıza benzer şekilde, resveratrol yüklü Pickering emülsiyonların SA/κ-CG hidrojel kapsüllere dahil edildiği çalışmada, %EE değerinin artan K^+ konsantrasyonuyla azaldığını bildirmiştir [104].

Tablo 3.5 Antosiyaninlerin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi

Emüljel kapsül	EE (%)	YK (μg ANT/ g kapsül)	Hidrojel kapsül	EE (%)	YK (μg ANT/ g kapsül)
E	79,32±0,42^{c}	18,10±0,10^{C}	H	13,50±0,53^{f}	2,44±0,10^{E}
E-K	87,89±0,42^{a}	20,07±0,07^{A}	H-K	18,52±0,30^{c}	3,22±0,06^{C}
EC1	86,79±0,39^{a}	19,81±0,12^{A}	HC1	15,08±0,11^{e}	2,75±0,02^{D}
EC1-K	72,30±0,60^{d}	16,51±0,13^{D}	HC1-K	17,52±0,08^{d}	3,19±0,02^{C}
EC2	82,09±0,59^{b}	18,72±0,12^{B}	HC2	20,67±0,06^{a}	3,72±0,01^{A}
EC2-K	70,73±1,00^{d}	16,10±0,18^{E}	HC2-K	19,42±0,11^{b}	3,50±0,01^{B}

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütundaki farklı üst simge küçük ve büyük harfler (a-f, A-E) örnekler arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$). (EE: enkapsülasyon etkinliği; YK: yükleme kapasitesi; ANT: antosiyanin)

3.3.5 FTIR Analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimi ile meydana gelen frekanslar sonucu oluşan absorpsiyon pikleriyle, maddenin organik veya inorganik bileşiklerin karakterize edilmesini sağlayan önemli bir enstrümental analiz yöntemidir. Bu yöntemde her maddenin kendine özgü, parmak izi olarak adlandırılan spektrumu oluşmaktadır. Enkapsülasyon çalışmalarında kullanılan çekirdek malzemesi, kaplama materyali ve diğer bileşenlerin birbiri ile olan etkileşimin tespitinde, sıklıkla kullanılan bir karakterizasyon yöntemidir. Kapsül üretiminde kullanılan SA, κ-CG ve ayçiçek yağı ile örnekleri temsilen emüljellerden E, E-K, EC2 ve EC2-K ile hidrojellerden HC2 ve HC2-K analizlenmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

Kapsül üretiminde kullanılan SA, κ-CG ve ayçiçek yağı ile kapsüllerin arasındaki moleküler etkileşimler, 600-4000 cm^{-1} aralığında (Şekil 3.8) ve 800-1500 cm^{-1} aralığında normalize edilmiş (Şekil 3.9) FTIR spektrumları incelenerek tespit edilmiştir.

Şekil 3.8'de görülen 1020-1083 cm^{-1} arasındaki geniş bant C-O-C (siklik ester) gerilme titreşimi, 2940-2977 cm^{-1} bölgesindeki pikler C-H gerilmesi ve 3200-3400 cm^{-1} bölgesindeki bantlar ise -OH gruplarının varlığı ile ilişkili olup SA ve κ-CG polisakkaritlerinin ortak bantlarıdır [71, 214, 215].

SA spektrumunda görülen 1595 ve 1405 cm^{-1}'deki karakteristik bantlar sırasıyla karboksil anyonunun ($-COO^-$) asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerini ifade etmektedir [71, 218].

κ-CG spektrumundaki 842 cm^{-1} ve 921 cm^{-1} pikleri karakteristik olup sırasıyla D-galaktoz-4-sülfat gerilmesi ve 3,6-anhidro-D-galaktoz varlığı ile ilişkilendirilmiştir [216, 219]. Ayrıca, 1629 ve 1224 cm^{-1}'de görülen pikler sırasıyla Amid I ve sülfat ester (O=S=O) gruplarına atfedilmiştir [206, 216, 219].

Ayçiçek yağının 3050-2800 cm^{-1} ve 1456 cm^{-1} bölgelerindeki karakteristik tepe noktaları, alifatik CH_2 (metilen) ve CH_3 (metil) gruplarının simetrik ve asimetrik C-H gerilme titreşimine atfedilmiş olup 1743 cm^{-1}'deki keskin tepe noktasının, ester gruplarından gelen C=O çift bağ gerilme titreşiminden kaynaklandığı saptanmıştır [220].

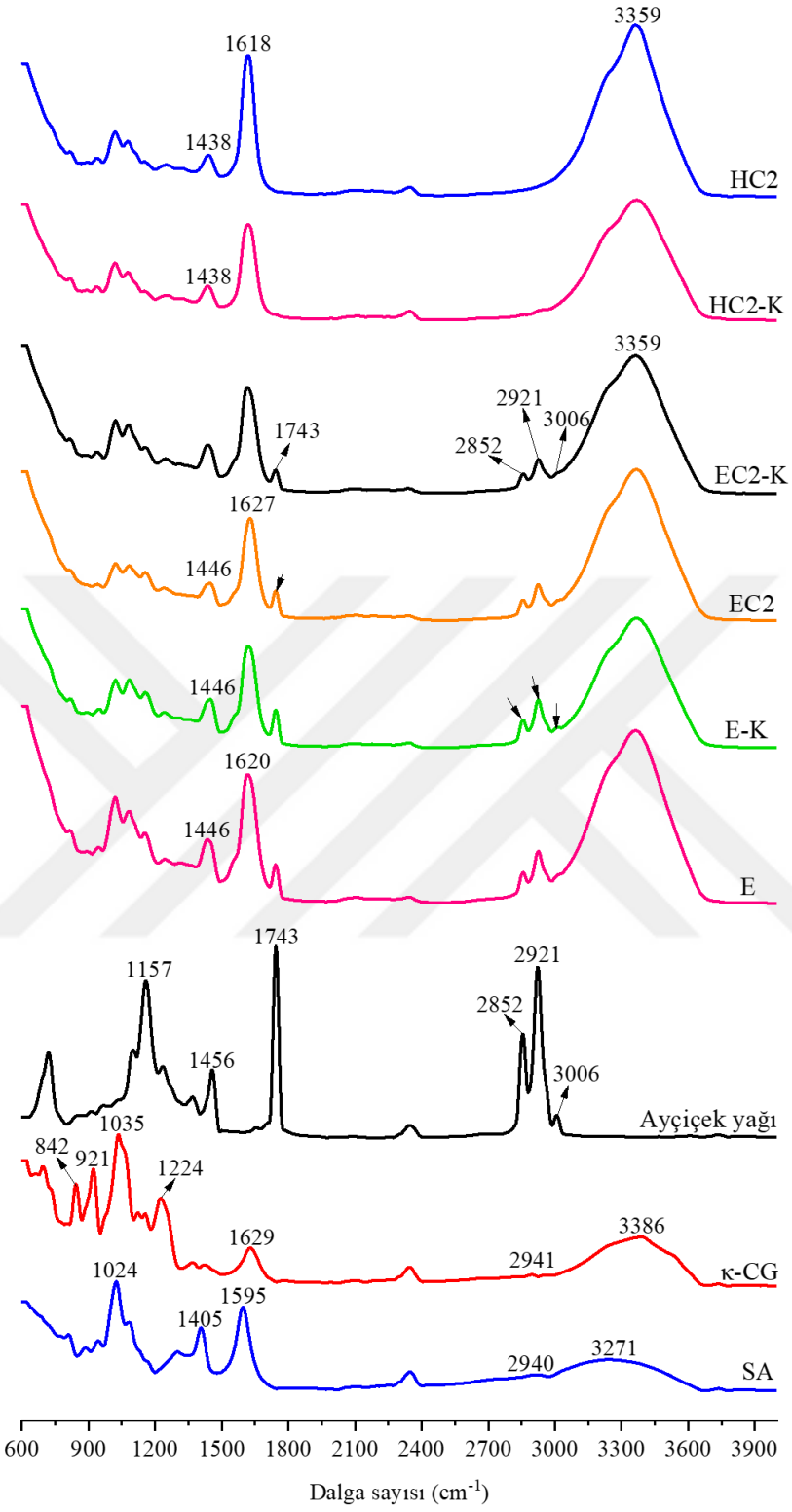
Kapsül oluşumu sırasında SA'nın Ca^{+2} ile çapraz bağlanması sonucunda, SA polimerinin karakteristik pikleri (1595 ve 1405 cm^{-1}) E ve E-K emüljel kapsülünde 1620 ve 1446 cm^{-1}'e, EC2 ve EC2-K emüljel kapsülde 1627 ve 1446 cm^{-1}'e, HC2 ve HC2-K hidrojel kapsüllerinde 1618 ve 1438 cm^{-1}'e kaydığı tespit edilmiştir (Şekil 3.8). Önceki çalışmalarda, SA'nın asimetrik ve simetrik gerilme tepe noktalarının, Ca^{+2} iyonlarının çapraz bağlanmasıyla, yoğunluğun azalmasının yanı sıra daha yüksek bir dalga sayısına doğru kayma gösterdiği rapor edilmiştir [215, 221]. Çalışmamıza benzer şekilde, ellajik asit yüklü kitosan kaplı SA/pektin hidrojel kapsüllerin geliştirildiği çalışmada, aljinatın Ca^{+2} tarafından çapraz bağlanmasının, bu piklerin daha yüksek dalga boyuna kaymasına sebep olduğu belirtilmiştir [100].

Yine SA ve κ-CG spektrumlarında görülen 1024 ve 1035 cm^{-1}'deki piklerin alanlarında, kapsül oluşumu sırasında Ca^{+2} ve K^+ iyonlarının çapraz bağlanması sonucunda azalma [100] olduğu saptanmıştır (Şekil 3.9).

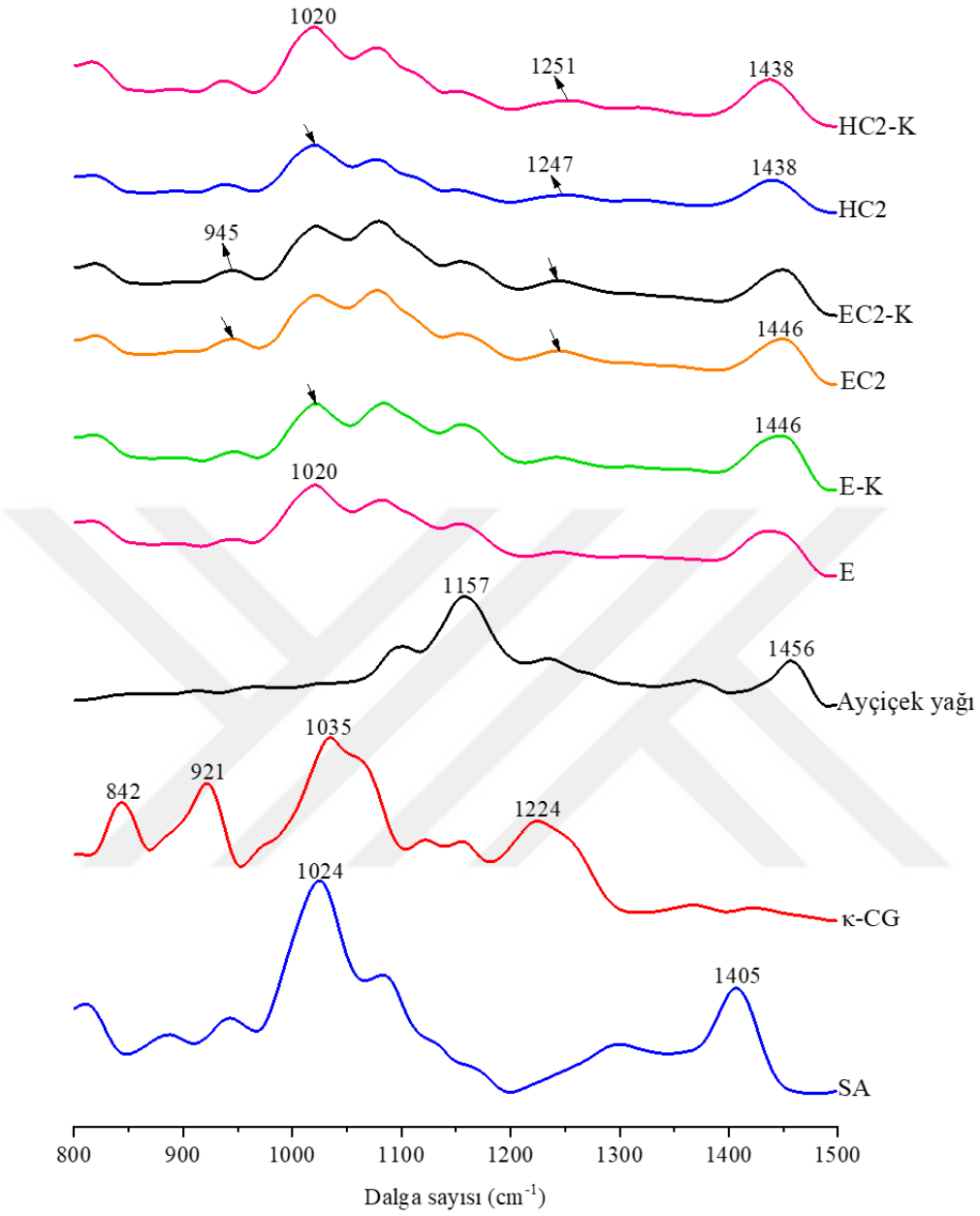
Önceki çalışmalarda, κ-CG polimerinin K^+ ve Ca^{+2} tarafından çapraz bağlanması sonucunda S=O gerilme tepe noktasının (1224 cm^{-1}) yer değiştirdiği [206, 214, 215] ve bu pikin alanının azaldığı rapor edilmiştir [206]. Bu tez çalışmasında, κ-CG polimerinin 1224 cm^{-1}'deki pikinin örneklerde 1247-1251 cm^{-1} aralığına kaydığı saptanmıştır (Şekil 3.9). Bu kayma, negatif yüklü sülfat ester gruplarının pozitif yüklü çapraz bağlayıcılarla reaksiyona girmesiyle açıklanmıştır [206].

Ayrıca, emüljel kapsüllerde 2852 cm^{-1}, 2921 cm^{-1} ve 3006 cm^{-1} de gözlenen piklerin hidrojel kapsüllerde (emülsiyon içermeyen) olmadıkları gözlenmiştir (Şekil 3.8).

Emüljel ve hidrojel kapsüllerin FTIR analiz sonuçları incelendiğinde, piklerin kayması ve tepe yükseklikleri/alanlarının değişmesi haricinde herhangi bir spektral fark gözlenmemesi, bu polimerlerin fiziksel olarak karışabildiğini ve çapraz bağlanmaları oluşturabildiğini göstermektedir.



Şekil 3.8 SA, κ-CG, ayçiçek yağı ve E; E-K; EC2; EC2-K emüljel kapsüller ile HC2 ve HC2-K hidrojel kapsüllerin 600-4000 cm^{-1} aralığındaki FTIR spektrumları



Şekil 3.9 SA, κ-CG, ayçiçek yağı ve E; E-K; EC2; EC2-K emüljel kapsüller ile HC2 ve HC2-K hidrojel kapsüllerin 800-1500 cm^{-1} aralığında normalize edilmiş FTIR spektrumları

3.3.6 Termal Davranış

Termal yöntemler, sıcaklık ile bir sistemin kütle, reaksiyon hızı veya hacim gibi bazı özellikleri arasındaki dinamik ilişkinin incelenmesine dayanmaktadır. Bu tez çalışmasında, TGA, DTG ve DSC termal analiz yöntemleri ile kapsüllerin ve kapsül oluşumunda kullanılan bileşenlerin termal davranışı/stabilitesi incelenmiştir.

TGA (Termogravimetrik analiz), bir numunenin ağırlığının kontrollü bir sıcaklık programı altında sürekli olarak ölçüldüğü bir tekniktir. TGA eğrisinden yararlanılarak, numune ağırlığının sıcaklığa veya zamana göre değişimine bağlı olan DTG (türev termogravimetrik) eğrisi elde edilir [222]. DSC (Diferansiyel tarama kalorimetri) analizi, camsı geçiş sıcaklıklarını belirlemek ve termal geçişlerde yer alan ısıyı ölçmek için kullanılan bir yöntemdir [223].

3.3.6.1 TGA

Kapsüllerin ve kapsül oluşumunda kullanılan bileşenlerin (SA, κ-CG, ayçiçek yağı ve RYE) TGA termogramları Şekil 3.10'da verilmiştir.

SA ve κ-CG termogramlarına göre (Şekil 3.10a), polimerlerin ilk bozunma bölgesi 25 °C ile 190 °C arasında, ikinci bozunma bölgesi 191 °C ile 300 °C arasında ve son bozunma bölgesi 300 °C'nin üzerindedir. SA ve κ-CG için ilk kütle kaybı sırasıyla %17,62 ve %15,85 oranında saptanmış olup ilk bozunma bölgesindeki bu kayıp, az miktarda adsorbe edilmiş ve bağlı suyun varlığıyla ilgilidir [68, 224]. Ayçiçek yağında, 337 °C'de yağ asitlerinin ayrışmasından [225] kaynaklanan %5,37 kütle kaybı meydana gelmiş ve 450 °C'den sonra herhangi bir kütle kaybı gözlenmemiştir.

Emüljel kapsüllerin ilk bozunma bölgesi 25-310 °C aralığında, hidrojel kapsüllerin ise 25-126 °C aralığında tespit edilmiştir. Bu bölgede meydana gelen kütle kayıplarının dehidrasyondan kaynaklandığı söylenebilir. Bu kütle kayıpları, E, E-K, EC2 ve EC2-K emüljel kapsüllerde sırasıyla %8,81, %16,06, %7,87 ve %7,19 ve H, H-K, HC2 ve HC2- K hidrojel kapsüllerde sırasıyla %22,91, %20,37, %32,28 ve %14,55 olarak gözlenmiştir (Şekil 3.10b). Formülasyonda κ-CG bulunan emüljel ve hidrojel kapsüllerin çapraz bağlanmasında K^+ iyonunun varlığı gözlenen kütle kaybını azaltmıştır.

Emüljel ve hidrojel kapsüllerin ilk bozunma bölge sıcaklıkları ve kütle kayıpları göz önüne alındığında, hidrojel kapsüllere emülsiyon damlacıklarının eklenmesinin

termal kararlılığı artırdığı ve kapsüllerdeki hapsolan su miktarını azalttığı sonucuna varılabilir. Sonuçlarımıza benzer şekilde, $W_1/O/W_2$ emülsiyonun kitosan filme dahil edilmesinin kütle kaybını önemli ölçüde azaldığı ve bu durumun filmin stabilitesinin arttığının göstergesi olduğu Yuan vd. [226] tarafından rapor edilmiştir.

SA ve κ-CG polimerlerinde (sırasıyla 201 °C ve 222 °C'de) meydana gelen termal dekompozisyonuna atfedilen sırasıyla %23,76 ve %20,14 oranında kütle kaybı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, başka bir çalışmada, κ-CG ve SA'nın degredasyon bölgesi olan ikinci kütle kaybının gerçekleştiği sıcaklıklar sırasıyla 240 °C ve 210 °C olarak tespit edilmiştir [224]. Yapılan bir çalışmada, SA polimerinin ikinci bozunma bölgesinin %38 kütle kaybı ile 205-345 °C aralığında olduğu, bu kaybın karboksilat grubunun degredasyonu sonucunda CO_2 salınımı ve Na_2CO_3 oluşumuna bağlı olduğu belirtilmiştir [227].

İkinci kütle kaybının gerçekleştiği sıcaklıklar göz önüne alındığında κ-CG'nin daha yüksek termal stabilite göstermektedir. Bu, κ-CG'nin SA'ya kıyasla daha az sayıda hidrofilik -OH grubu içermesiyle ilişkilendirilmiştir [212]. Zhang vd. [228] tarafından yapılan çalışmada, SA polimerinde 244,7 °C'de %51,43 kütle kaybı meydana gelirken SA/κ-CG kompleksinde 267,9 °C'de kaybın %44,58 olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar κ-CG polimeri eklenmesinin SA'nın termal stabilitesini arttırdığını vurgulamıştır. Benzer şekilde, başka bir çalışmada SA'nın termal stabilitesini iyileştirmek için kitosan ve κ-CG kullanılmıştır [22].

Hidrojel kapsüllerde, ikinci kütle kaybı 126-300°C aralığında gerçekleşmiştir. Kütle kayıpları H, H-K ve HC2, HC2-K kapsülleri için sırasıyla %14,99, %17,37 ve %12,35, %16,41 olarak tespit edilmiştir. Hidrojel kapsüllerin sonuçları göz önüne alındığında, K^+ ilavesinin hidrojel kapsüllerin bu bölgedeki kütle kaybını arttırdığı gözlenmiştir. Emüljel kapsüllerde, ikinci bozunma sıcaklığı 310-450 °C aralığında olup kütle kaybı %75,33 (E), %54,85 (E-K) ve %75,93 (EC2) ve %61,94 (EC2-K) olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.10b). K^+ ilavesinin ise emüljel kapsüllerde kütle kaybını azalttığı gözlenmiştir.

Ayrıca, kapsüllerin termal dekompozisyon sıcaklıklarının (ikinci bozunma bölgesi) κ-CG ve SA polimerlerin sıcaklıklarından daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu, κ-CG ve SA'nın çapraz bağlanmasının kapsül formülasyonlarının termal

stabilizasyonuna katkıda bulunduğunu gösterebilir. Aynı şekilde, κ-CG ve SA'nın ikinci bozunma bölge sıcaklığı SA/κ-CG hidrojel kapsüllerinkinden daha düşük olarak elde edilmiş ve kullanılan polimerlerin kapsüllerin termal stabilitesini arttırdığı rapor edilmiştir [224].

Polimerler ve kapsüller, 300-450°C'den sonra desülfürizasyon, deasetilasyon ve depolimerizasyonların meydana gelmesiyle kalıntı oluşmuş ve kütle kayıpları durmuştur [228].

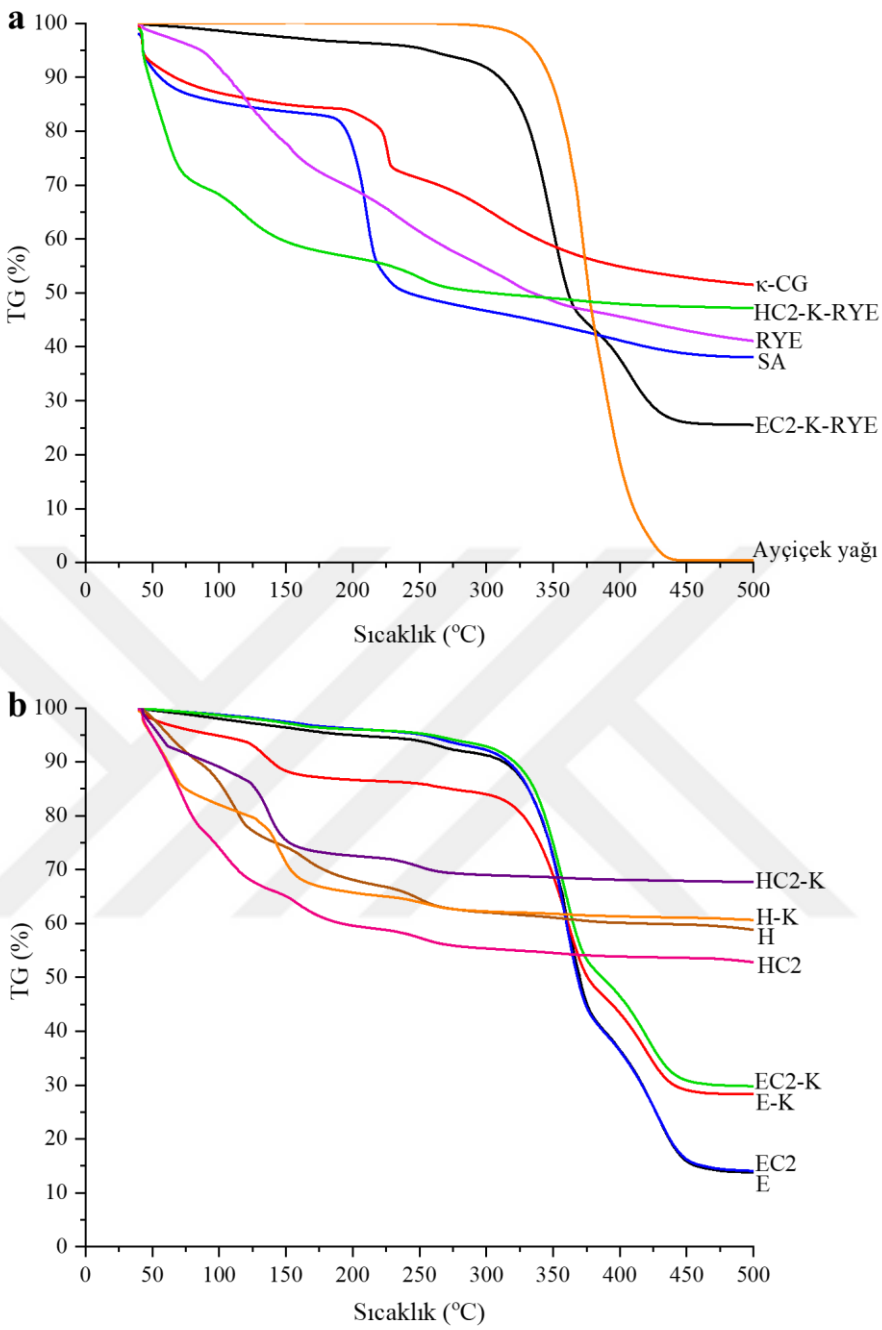
Emüljel kapsüllerde 450 °C'den sonra kütle kaybı gözlenmemiş ve toplam kütle kaybı %69,14-84,14 aralığında tespit edilmiştir. Hidrojel kapsüllerde ise 300 °C'den sonra kütle kaybı olmayıp toplam kütle kaybı %31,77-44,65 aralığında meydana gelmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında, toplam kütle kaybının emüljel kapsüllerde daha fazla olduğu ve bunun emülsiyonlardaki yağ fazından kaynaklandığı söylenebilir.

RYE'nin termal bozunma süreci üç bölgeye ayrılmıştır (Şekil 3.10a). 25-88 °C aralığındaki ilk bölgede %5,15 kütle kaybı adsorbe olan suyun buharlaşmasıyla ilgilidir. %23,49 oranında kütle kaybı tespit edilen 88-183,5 °C aralığındaki ikinci bölge, ANT'lerin yapısında bulunan hidroksil gruplarının bozunmasıyla ilişkilendirilebilir [66]. 183,5-500 °C'deki son bozunma bölgesinde meydana gelen %30,27 kütle kaybı, deglikosilasyon ve halka açılma reaksiyonları sonucunda ANT'lerin fenolik asitlere ve aldehitlere ayrışması ile ilgili olduğu söylenebilir [68].

RYE yüklü, EC2-K-RYE ve HC2-K-RYE kapsüllerinin ikinci bozunma aralığı (sırasıyla 303-450 °C ve 100-275 °C) serbest RYE'den (88-183,5 °C) önemli ölçüde daha yüksek olmuştur, bu durum RYE'nin termal stabilitesinin kapsülleme yoluyla iyileştirildiğini göstermektedir [68]. Benzer şekilde, üzüm kabuğu antosiyaninlerinin W/O emülsiyon yüklü SA mikrokapsüllere yüklendiği çalışma, antosiyaninlerin yüksek sıcaklık gibi olumsuz çevre koşullarına karşı stabilize edilebileceğini kanıtlayıcı niteliktedir [229]. Bununla birlikte, EC2-K-RYE (303 °C) ve HC2-RYE'nin (100 °C) T_{max} (maksimum kütle kaybı hızının olduğu sıcaklık) değerleri, karşılık gelen RYE içermeyen (boş) emüljel ve hidrojel kapsüllerden (sırasıyla 310 ve 126 °C, Şekil 3.10b) daha düşüktür. Bu durum RYE yüklemenin kapsüllerin termal kararlılığını azalttığını gösterir. Sonuçlarımızı destekler şekilde, Woo ve Lee, [230] yaptıkları çalışmada, *Aronia melanocarpa*

antosiyanlerinin varlığının elektrospin ile elde ettikleri nanoliflerin termal stabilitesini azalttığını belirtmişlerdir.

Ayrıca, RYE yüklü (EC2-K-RYE ve HC2-K-RYE için sırasıyla %9,38 ve %28,26) kapsüllerin su kaybına atfedilen ilk bozunma bölgesindeki kütle kayıpları, yüksüz kapsüllerden (EC2-K ve HC2-K için sırasıyla %7,19 ve %14,55) daha yüksektir. Bu durum, yüklü kapsüllerde, suyun daha zayıf bağlandığını gösterebilir [224].



Şekil 3.10 (a) SA, κ-CG, RYE, ayçiçek yağı, RYE yüklü EC2-K emüljel ve HC2-K hidrojel kapsüllerin ve **(b)** RYE içermeyen E, H; E-K, H-K; EC2, HC2 ve EC2-K, HC2-K emüljel ve hidrojel kapsüllerin TGA termogramları

3.3.6.2 DTG

DTG analizinde, kütle kaybı hızı (mg/dk) sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kaydedilmiştir. Kapsüllerin ve kapsül oluşumundaki bileşenlerin (SA, κ-CG, ayçiçek yağı ve RYE) DTG termogramları Şekil 3.11'de verilmiştir.

SA ve κ-CG'nin DTG termogramlarında sırasıyla 47,71 ve 62,50 °C'de yer alan ilk endotermik pikler su desorpsiyonu ile ilgilidir (Şekil 3.11a). Benzer şekilde, SA'da 65,8 °C'de gözlenen ilk endotermik pikin nem kaybıyla ilgili olduğu belirtilmiştir [231].

κ-CG ve SA polimerlerinin ikinci (keskin) endotermik pikleri sırasıyla 226,62 °C ve 210,83 °C'de gözlenmiştir. Baybaş vd. [231] κ-CG için ikinci degredasyonun 327,8 °C'de gerçekleştiğini belirtmiştir. SA ve κ-CG polimerlerindeki glikozidik bağların yıkımından kaynaklanan bu keskin endotermik pikler kıyaslandığında κ-CG pikinin daha yüksek sıcaklıkta olmasından dolayı κ-CG'nın SA'ya göre daha yüksek termal kararlılık gösterdiği ifade edilebilir [215]. Benzer şekilde, 260 °C'de ikinci endotermik pike sahip olan κ-CG polimerinin SA'dan daha stabil olduğu Paşcalau vd. [215] tarafından belirtilmiştir.

SA polimerine ait 365-500 °C aralığındaki geniş pik, polimerin monomerlerinin -şeker ünitelerinin-parçalanmasıyla ilişkilidir [232]. Benzer şekilde, Baybaş vd. [231] tarafından yapılan çalışmada, SA'nın son endotermik piki 380-500 °C sıcaklık aralığında tespit edilmiş ve polimerdeki şeker birimlerinin yanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, κ-CG bozunmasının termogravimetrik analiz ve kütle spektroskopisi kombinasyonuyla araştırılan çalışmada, ikinci bozunmanın karbondioksit ve kükürt dioksitin ayrılması ve karbonhidrat omurgasının parçalanmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir [233]. Ayçiçeği yağının 300 ve 445 °C aralığındaki endotermik pikin doymamış yağ asitlerinin bozunmasıyla ilişkilidir [225].

Emüljel kapsüllerin 258-269 °C aralığındaki ilk endotermik pikleri dehidrasyon ve glikozidik bağların kopmasıyla ilişkilidir [234]. Dehidrasyon ile ilgili olan hidrojel kapsüllerin ilk endotermik pikleri ise 57-73 °C aralığında tespit edilmiştir.

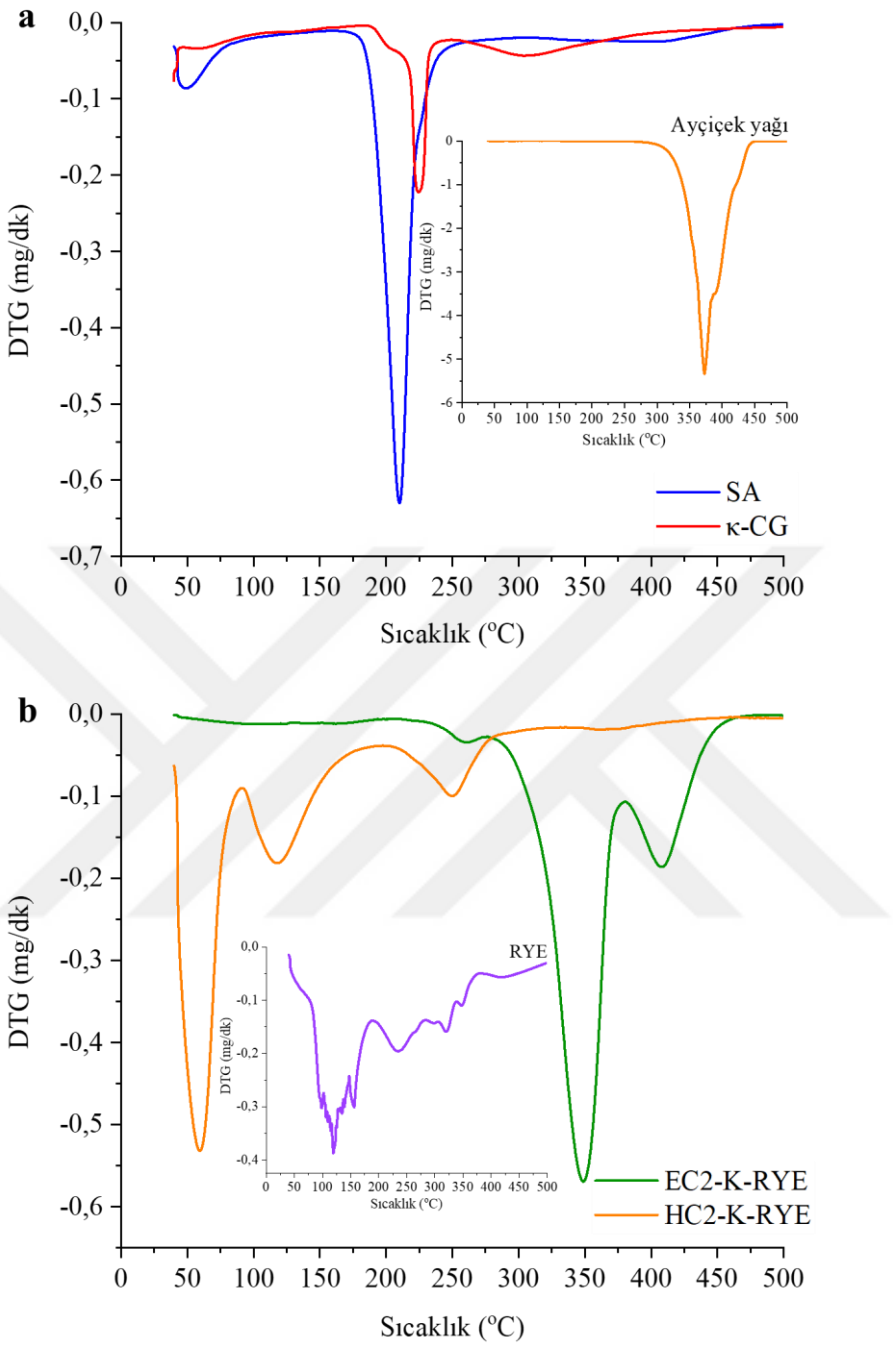
Tüm emüljel kapsüllerin ikinci endotermik pik sıcaklığı (356 ile 360 °C arasında değişen değerlerde, Şekil 3.11c) hidrojel kapsüllere (104 ile 145 °C arasında değişen değerlerde Şekil 3.11d) kıyasla daha yüksek değerlerde elde edilmiştir.

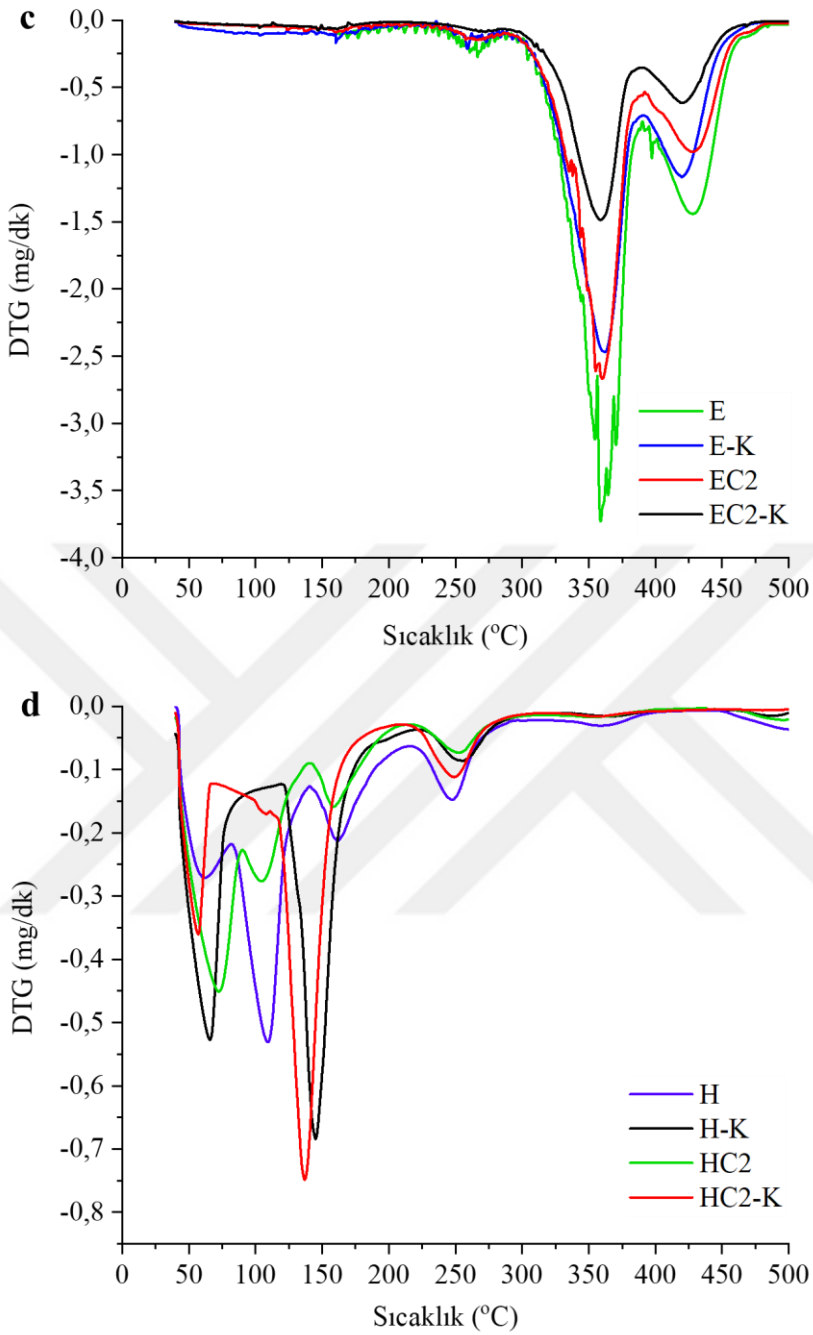
Böylece, emüljel kapsüllerdeki emülsiyon damlacıkların termal kararlılığı arttığı söylenebilir [226].

Ayrıca, emüljel kapsüllerin ikinci endotermik pikleri, κ-CG (226,62 °C) ve SA (210,83 °C) polimerlerinkinden daha yüksek sıcaklıkta (356-360 °C) meydana gelmiştir. Bu durum, Postolovic vd. [224] tarafından yapılan çalışmada, polimerlerin iyonik olarak bağlanmasının emüljel kapsüllerde termal kararlılığı arttırması ile açıklanmıştır. Bununla birlikte, tüm hidrojel kapsüllerin ikinci endotermik pikleri (104-145 °C), κ-CG ve SA ile karşılaştırıldığında daha düşük bir sıcaklıkta meydana gelmiştir. Bu, hidrojel kapsüllerde SA ve κ-CG polimerlerinin daha az kompakt yapı oluşturması ile açıklanabilir [215]. Bu anlamda, formülasyona emülsiyon dahil edilmesinin termal stabilite açısından farklılık yarattığı anlaşılmaktadır.

Hidrojel kapsüllerde K^+ varlığında elde edilen kapsüllerin (H-K ve HC2-K için sırasıyla 144,56 °C ve 137,05 °C) ikinci degredasyon pikleri, sadece Ca^{+2} ile çapraz bağlanmış kapsüllere (H ve HC2 için sırasıyla 109,54 °C ve 104,60 °C) göre daha yüksek sıcaklıklardadır. Bu durum, artan polimer çapraz bağlanması sonucunda daha yüksek termal stabilite ve artan jel kuvvetiyle açıklanabilir (Tablo 3.4) [235].

Serbest RYE'nin ikinci endotermik piki 118 °C iken RYE yüklü HC2-K-RYE hidrojel kapsülün ise 120,10 °C'de meydana gelmiştir. Ayrıca, emüljel kapsüllerde ilk endotermik pikler bile RYE yüklü veya boş olması fark etmeksizin serbest RYE'ye göre çok daha yüksek sıcaklıklarda meydana gelmiştir. Bu sebeple, enkapsülasyon işleminin RYE'nin termal stabilitesinin iyileştirildiği söylenebilir [236].


a
DTG (mg/dk)
Sıcaklık (°C)
Ayçiçek yağı
SA
κ-CG
b
DTG (mg/dk)
Sıcaklık (°C)
RYE
EC2-K-RYE
HC2-K-RYE



Şekil 3.11 (a) SA, κ-CG ve ayçiçek yağı, **(b)** serbest RYE, RYE yüklü EC2-K emüljel ve HC2-K hidrojel kapsüller ile RYE içermeyen **(c)** emüljel ve **(d)** hidrojel kapsüllerin DTG termogramları

3.3.6.3 DSC

Kapsüllerin ve kapsül oluşumundaki bileşenlerin (SA, κ-CG, ayçiçek yağı ve RYE) DSC termogramları Şekil 3.12'de verilmiştir.

κ-CG ve SA polimerlerin termogramında sırasıyla 124-188 °C (145,62 °C'de maksimum) ve 94-177 °C (130,56 °C'de maksimum) aralığında geniş endotermik pik gözlenmiştir (Şekil 3.12a). Bu endotermik pikler önceki çalışmalarda [237, 238], polimerlerin su kaybı ile ilişkilendirilmiştir. κ-CG ve SA polimerlerinin maksimum pik sıcaklıkları göz önüne alındığında, TGA ve DTG sonuçlarını destekleyici şekilde, κ-CG polimerinin SA'dan daha yüksek termal stabilite gösterdiği söylenebilir. κ-CG'nın termal stabilitesinin yapısındaki sülfat gruplarından kaynaklandığı Mohamadnia vd, [212] tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir.

SA termogramında 240 °C'de gözlenen keskin ekzotermik pik, polimerin moleküler yapısının bozunmasıyla ilişkilidir [96, 237]. Bununla birlikte, kapsüllerin termogramında ekzotermik dekompozisyon piki gözlenmemiştir. Bu, kapsül oluşumu sırasında SA polimerinin tuz çözeltisindeki iyonlar (Ca^{+2}/K^{+}) tarafından çapraz bağlanmasıyla ilişkilendirilebilir. Vincekovic vd. [239], κ-CG polimerinde gözlemlediği keskin ekzotermik pikin kısmi bozunmayla ve endotermik pikin ise camsı geçiş ile ilgili olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde, başka bir çalışmada, saf κ-CG eğrisinde 245 °C'de ortaya çıkan keskin ekzotermik pikin polimerin yapısının bozunmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir [238]. Ayrıca, tannaz (bir enzim) yüklenen ve yüklenmeyen SA hidrojel kapsüllerin bozulmasının, sakkarit halkalarının dehidrasyonunun yanı sıra C-H ve C-O-C glikozit bağlarının parçalanmasının bir sonucu olarak 200 °C'nin üzerinde başladığı rapor edilmiştir [240].

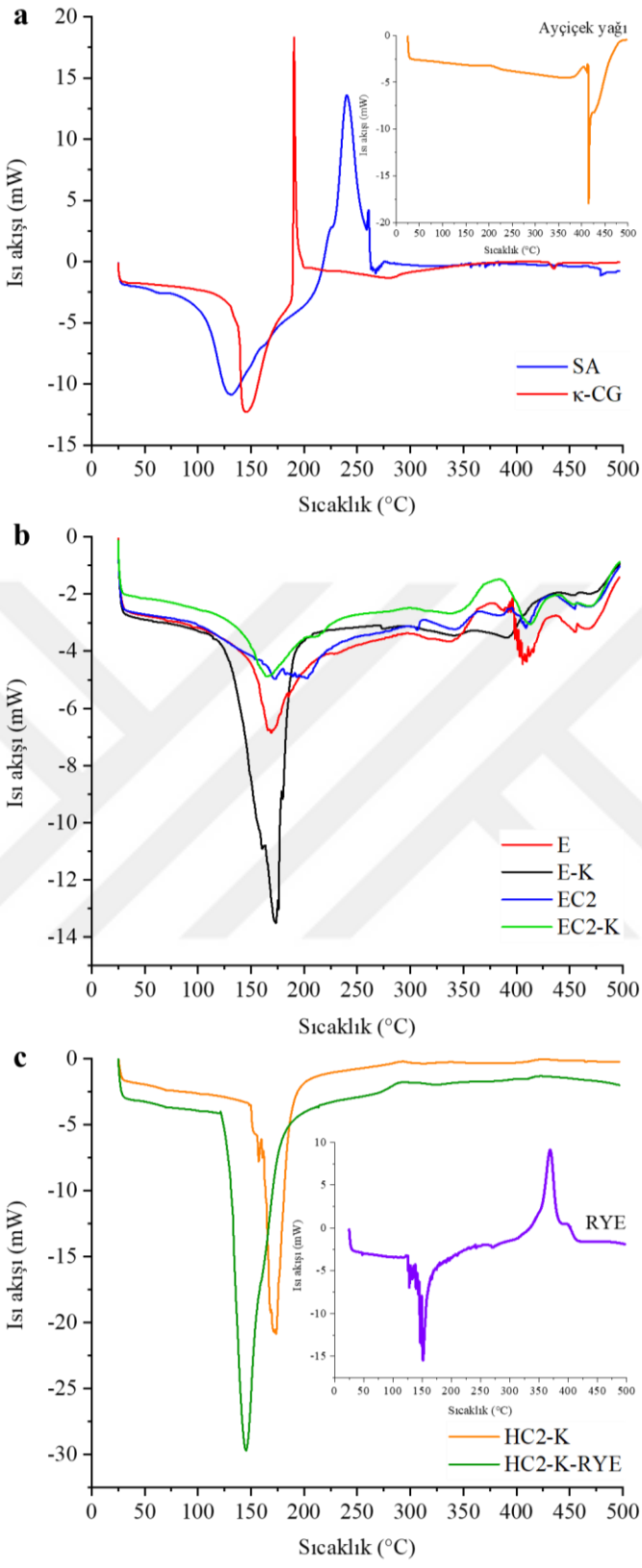
Şekil 3.12b'de görüldüğü gibi emüljel kapsüllerde 166-174 °C aralığında endotermik pikler mevcuttur. Bu piklerin kapsüllerin erime noktalarına karşılık geldiği söylenebilir [62]. Ayrıca, kapsüllerin erime sıcaklıklarının (faz geçiş sıcaklığı), kullanılan SA (130,56 °C) ve κ-CG (145,62 °C) polimerlerinin erime sıcaklıklarından daha yüksek olduğu görüşmüştür. Benzer şekilde, likopenin SA/κ-CG kapsüllerinde enkapsüle edildiği çalışmada, SA polimeri ile karşılaştırıldığında, SA ve κ-CG kapsüllerinde daha yüksek faz geçiş sıcaklığı tespit edilmiştir. Bunun temel nedenin, polimerlerin etkili bir şekilde hidrojen bağı oluşturması ve hidrojen

bağının kırılma sırasında ısıyı soğurarak kompleksin yapısal bozunmasının yavaşlaması olduğu belirtilmiştir [228].

Sadece SA polimeri ve Ca^{+2} iyonu kullanılarak elde edilen E emüljel örneği 168,8 °C'de endotermik pik gösterirken, tuz banyosuna K^{+} iyon ilavesiyle elde edilen E-K emüljel örneğinde daha yüksek sıcaklıkta (173,09 °C) erime gözlenmiştir. Bununla birlikte, SA/κ-CG ve Ca^{+2} ile elde edilen EC2 örneğinin termogramında gözlenen 173,39 °C'deki pik, ilave K^{+} varlığında elde edilen EC2-K örneğinde daha düşük sıcaklığa (166,03 °C) kaymıştır. Bu düşük termal kararlılık, yağ damlacıklarının, κ-CG çift sarmallarının bağlanması ve ilave K^{+} ile polimer çapraz bağlanması üzerindeki olumsuz etkiye sahip olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Hidrojel kapsüllerin termogramında (Şekil 3.12c) gözlenmeyen ama emülgel kapsüllerin termogramlarında, 380 °C'de gözlenen ekzotermik geçişler muhtemelen yağ asitlerinin polimerizasyonuna karşılık gelmekte ve ayrıca 411 °C civarında gözlenen endotermik geçişler de ayçiçeği yağının doymuş ve doymamış yağ asitlerinin termal bozunmasını temsil etmektedir [225].

RYE termogramında 151,33 °C'de gözlenen endotermik pik muhtemelen yapısal termal bozunmayı ifade etmektedir (Şekil 3.12c). RYE içermeyen (boş) HC2-K hidrojel örneğinde 173,17 °C'deki endotermik tepe noktası RYE yüklü HC2-K-RYE örneğinde daha düşük bir sıcaklığa (144,88 °C) kaymıştır. Böylece, kapsüllere RYE yüklendiğinde erime noktasının düştüğü ve termal stabilitenin azaldığı söylenebilir. Benzer şekilde, *Aronia melanocarpa* antosiyaninleri nanoliflere eklendiğinde erime sıcaklığının azaldığı dolayısıyla nanoliflerin termal ayrışması için gereken ısı miktarının azaldığı anlamına geldiği rapor edilmiştir [230].



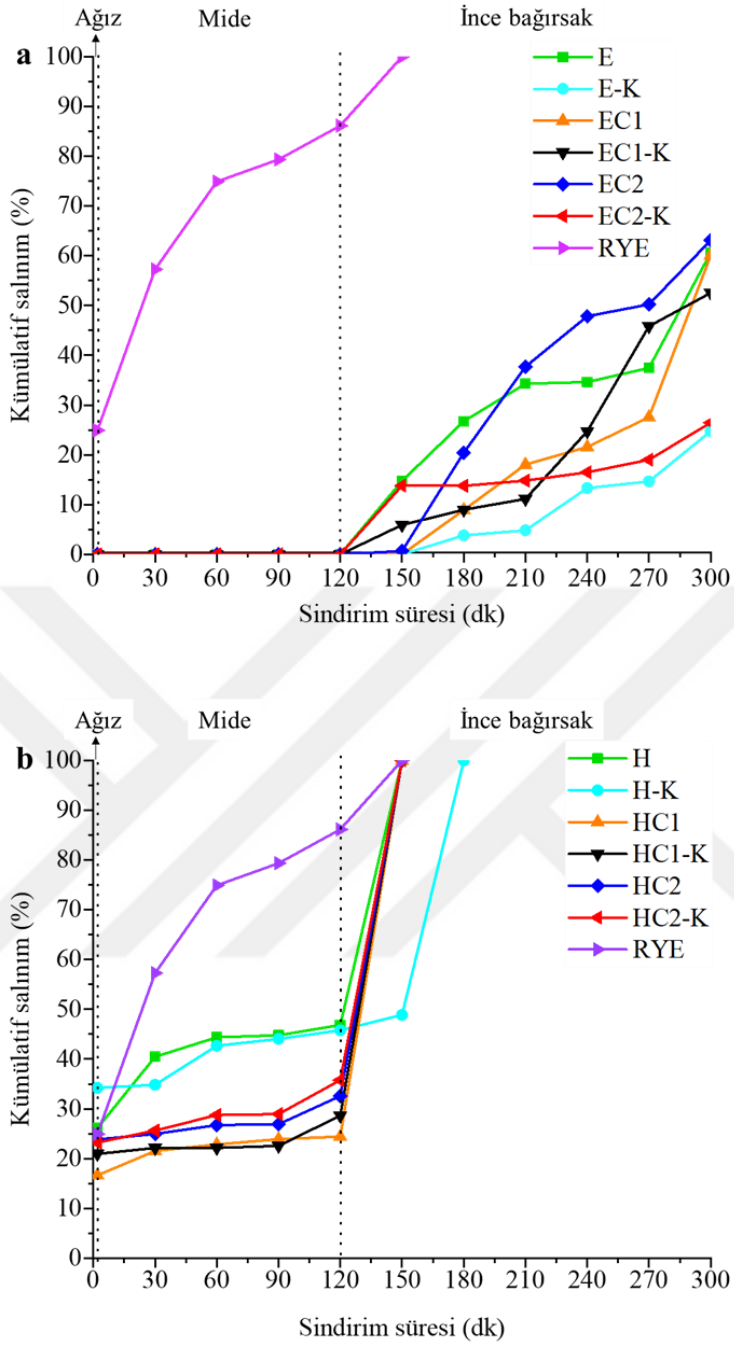
Şekil 3.12 (a) SA, κ-CG ve ayçiçek yağının, **(b)** RYE içermeyen E, E-K, EC2 ve EC2-K emüljel kapsüllerin ve **(c)** serbest RYE, RYE içermeyen ve RYE yüklü HC2-K hidrojel kapsüllerin DSC termogramları

3.3.7 Antosiyaninlerin Kapsüllerden *in Vitro* Salınımı

Antosiyaninler, çok düşük biyoerişilebilirlik ve biyoyararlanım ile karakterize edilmektedir. Bu biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesiyle belirli bir ortamda salınımları artırılarak biyoyararlanımları geliştirilebilir ve insan vücudu tarafından daha iyi emilmeleri sağlanabilir [241]. He vd. [242] tarafından yapılan çalışmada, kapsüllenmiş yaban mersini antosiyaninlerin kapsüllenmeyenlere göre daha yavaş salınım gösterdiği rapor edilmiş ve yavaş salınımın, antosiyaninlerin bozulmasını azaltabileceği ve böylece gastrointestinal sistemde emilimin arttırılarak biyoyararlanımı iyileştirilebileceği vurgulanmıştır.

Bu nedenle, bu tez çalışmasında, çift emülsiyon yüklü SA/κ-CG hidrojel kapsül (emüljel sistem) yaklaşımının bağırsak koşulları altında, antosiyaninleri stabilize etmek için uygun bir matris olarak kabul edilip edilemeyeceğini açıklığa kavuşturmak amacıyla simüle edilmiş *in vitro* gastrointestinal sindirim sisteminde kapsüllerden antosiyanin salınımı araştırılmıştır.

Şekil 3.13, *in vitro* sindirim sistemine (ağız, mide ve bağırsak aşamaları) uğratılan emüljel ve hidrojel kapsüllerden sindirim süresi boyunca toplam antosiyanin salınımını göstermektedir.



Şekil 3.13 Serbest RYE'den, RYE yüklü **(a)** emüljel ve **(b)** hidrojel kapsüllerden simüle edilmiş *in vitro* gastrointestinal sindirim sırasında antosiyaninlerin (%) kümülatif salınımı

Ağız fazında, serbest halde bulunan RYE'deki antosiyaninlerin başlangıç miktarına göre %24,92'sinin çözündüğü tespit edilmiştir. Diğer taraftan emüljel kapsüllerden antosiyanin salınımı gözlenmemiştir (Şekil 3.13a). Hidrojel kapsüllerde ise başlangıçta (sindirim öncesi) yüklenen antosiyaninin miktarının %16,65 (H-K) -

34,21 (H-C1)'inin salındığı gözlenmiştir (Şekil 3.12b). H ve H-K için sırasıyla ağız sıvısında sindirim öncesi örneklere yüklenen ANT'in %26,13 ve %34,21'i ve HC1 ve HC1-K örneklerinden ise %16,65 ve %20,93 'u salınmıştır. Hidrojel üretiminde çapraz bağlayıcı olarak K^+ iyonlarının varlığının hidrojel kapsüllerden antosiyanin salınımında artışa, κ-CG varlığının ise azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

Mide (gastrik) fazında, serbest RYE'nin çözünmesi çok büyük oranla tamamlanmıştır (%86,13). Emüljel kapsüllerde antosiyanin salınımı gözlenmemiş, bütün emüljel kapsüller çekirdek materyallerini korumaya devam etmişlerdir. Benzer şekilde, tartrazinin çift emülsiyon ve çift emülsiyon yüklü SA hidrojel (emüljel) kapsüllerde enkapsüle edildiği bir çalışmada, mide fazında çift emülsiyonlarda salınım gözlenirken, emüljel kapsüllerden salınan tartrazin tespit edilmemiştir [106].

Hidrojel kapsüllerinin mide sindirimi (120 dk) sonrasında, antosiyaninleri sindirim öncesindeki miktarına göre %24,43-46,84 oranında saldıkları tespit edilmiştir. Hidrojel kapsüllerde, en yüksek salınım sadece SA polimeri ile üretilen kapsüllerde gözlenmiş ve κ-CG varlığının salınımı azalttığı saptanmıştır. En yüksek oranda salınım gösteren H ve H-K hidrojel örnekleri için bu değer sırasıyla %46,84 ve %45,77 şeklindedir. Bu durum, Ca^{+2}/SA ağı içindeki $-COO^-$ grubunun protonasyonu ile açıklanabilir. Asidik ortamda (mide fazında), SA jel ağındaki $-COO^-$ grupları -COOH gruplarına dönüşmektedir. Dolayısıyla, karboksil grupları (-COOH) arasında hidrojen bağları oluşarak çekirdek materyalinin sızmasına neden olan bir ağ daralması meydana gelir [243]. Ayrıca, κ-CG varlığında SA hidrojel kapsüllerden antosiyaninlerin daha yavaş salınması, SA/κ-CG jel ağının gastrik ortam altında SA jel ağına göre daha az hidroliz olmasıyla ilişkili olabilir [244]. Diğer taraftan, asidik koşullar altında antosiyaninler, daha stabil ve katyon formda olan flavilyum yapısındadır [229]. Ayrıca, asidik koşullar altında κ-CG, SA'dan daha güçlü negatif yüke sahiptir [155]. Böylece, kapsül yapısında κ-CG olduğunda, pozitif yüklü antosiyaninler ile kapsül jel ağı arasında daha fazla elektrostatik çekici etkileşimler meydana gelir ve antosiyaninlerin kapsül içinde tutulması daha kolay olur. Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada, yumurta sarısı immünoglobulin Y'yi (IgY) kapsüllemek ve simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında salınımını değerlendirmek için SA/κ-CG hidrojel kapsülleri geliştirilmiştir. Araştırmacılar, SA hidrojel kapsüllere %0,3 oranında κ-CG eklenmesinin, mide koşulları altında pozitif yüklü IgY salınımını tamamen engellediğini belirtmiştir [155]. Zhang vd.

[228] tarafından yapılan çalışmada, likopen içeren emülsiyon yüklü SA/κ-CG kapsüller elde edilmiştir. Araştırmacılar, asidik koşullar altında, kapsüldeki emülsiyonun pozitif yüklü, kapsül polimerlerinin ise zıt yüklü (negatif) olması sonucunda, elektrostatik etkileşim meydana geldiğini belirterek bunun kapsüldeki emülsiyonun salınımını önlediği ve böylece çekirdek materyalinin (likopen) salınımın azaldığı vurgulanmıştır.

Antosiyanin salınımı, HC1 ve HC1-K için sırasıyla %24,43 ve %28,61, HC2 ve HC2-K için sırasıyla %32,58 ve %35,76'dır. Sonuçlara göre, SA/κ-CG hidrojel kapsüllerde, K^+ iyonu varlığının az da olsa antosiyanin salınımını arttırdığı söylenebilir. Bu durum, SEM analizinde (Bölüm 3.3.2) tartışıldığı gibi, K+ varlığında yüzeydeki gözeneklerin artması sonucunda çekirdek materyalinin salınımın kolaylaşması ile ilişkili olabilir [104, 105].

Mide fazı sonuçlarımıza benzer şekilde, üzüm kabuğundan elde edilen antosiyaninler, mide fazında, serbest haldeyken %70 oranında çözünmüş, diğer taraftan enkapsüle edildiğinde emüljel kapsüllerden hidrojel kapsüllere göre daha düşük oranda salınmıştır [105].

İnce bağırsak ortamında, hidrojel kapsüller (H-K örneği hariç) ve serbest RYE için sindirimin 150. dk'sında (bağırsak fazının 30. dk'sı) antosiyanin tespit edilmemiştir. H-K hidrojel kapsül ise sindirimin 180. dk'sına kadar (bağırsak ortamının 60. dk'sına kadar) içeriğini salmaya devam etmiş ve bu dakikadan sonra antosiyanin salınımı gözlenmemiştir (Şekil 3.13b). Emüljel kapsüllerde antosiyanin salınımı ince bağırsak ortamında başlamıştır. E-K, EC1 ve EC2 emüljel kapsüller içeriklerini sindirimin 150. dk'sından sonra salmaya başlamıştır (Şekil 3.13a).

Asidik mide fazının aksine, bağırsak fazının pH'sı 7'dir ve bu durum kapsülün yapısında dramatik değişime sebep olur. Bağırsak ortamında, SA polimerindeki -COOH grupları, $-COO^-$ gruplarına dönüşür ve güçlü itme kuvvetleri oluşur. Bunun sonucunda polimer zinciri büyük ölçüde genişler ve bu da jel ağına bol miktarda suyun difüze olmasına yol açar. Kapsülün şişmesinin ardından kapsüldeki Ca^{+2} iyonları ortama sızar ve bu da Ca^{+2}/SA jel ağının çözülmesi ile sonuçlanır [243]. Böylece, kapsülde meydana gelen büyük gözenekler nedeniyle çekirdek materyali hızlı bir şekilde sindirim ortamına salınır.

Ayrıca, asidik koşulların aksine (mide fazı), nötr koşullarda (bağırsak fazı) antosiyaninler kararsız form olan anyonik baz yapısındadır [229]. Böylece, antosiyaninler ile negatif yüklü SA/κ-CG polimerleri arasında daha az elektrostatik

çekim söz konusudur. Bu nedenle, bağırsak fazında, antosiyaninlerin kapsül içinde tutulması zorlaşır ve salınımı artar.

Sonuçlarımıza benzer şekilde başka bir çalışmada, üzüm kabuğundan elde edilen antosiyaninler, serbest halde mide ortamında %65 oranında degrade olurken bağırsak ortamında %99 oranında degredasyon gözlenmiştir. Bu durum, antosiyaninlerin düşük pH değerlerinde (gastrik ortam, pH 2,0) yüksek pH değerlerinden (bağırsak ortamı, pH 6,8) daha stabil olmasıyla açıklanmıştır. Ayrıca, emülsiyon yüklü SA hidrojel kapsüllerdeki antosiyanin salınımı mide ortamında %17-30 aralığında iken bağırsak ortamında %75,5-85 aralığında olduğu rapor edilmiştir[229].

Sindirim sürecinin sonunda (ince bağırsak fazının 180. dk'sında, toplam sindirimin 300. dk'sında) antosiyaninlerin kümülatif salımı E-K ve EC2-K emüljel kapsüllerde en düşük oranda olup sırasıyla %24,75 ve %26,46 şeklindedir. Emüljel kapsüller arasında E-K ve EC2-K, E (%39,36) ve EC2 (%36,88) örneklerine kıyasla antosiyaninlere karşı daha yüksek koruma (yaklaşık %75) sağlamıştır. Bu örnekler arasındaki fark jelleşme ortamındaki K^+ iyonudur; bu durum kapsüller ilave K^+ iyonları ile çapraz bağlandıkları zaman, Ca^{+2} iyonun bağırsak ortamındaki Na^+ iyonu ile yer değiştirmesinin veya PO_4^{-3} iyonlarıyla şelatlanmasının azalabileceğini göstermektedir. Çünkü, Ca^{+2} iyonları bağırsak ortamında bulunan iyonlarla yer değişebilmekte veya şelatlanabilmektedir, bu durum daha düşük çapraz bağ yoğunluğuna ve sonuç olarak matrisin daha fazla erozyonuna neden olabilmektedir [100].

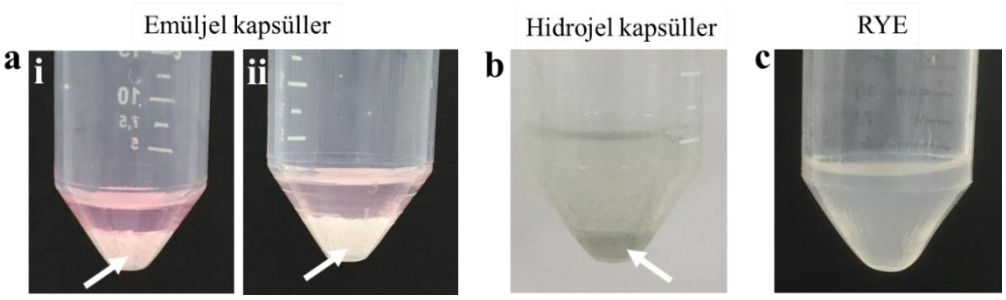
Yaklaşık %25 oranında salınım gözlenen E-K ve EC2-K kapsüllerin dışında diğer emüljel kapsüllerde (E, EC1, EC2 ve EC1-K) sindirim sonunda (300 dk) yaklaşık %60 oranında antosiyanin içeriğinin salındığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla hidrojel kapsüllere ve serbest RYE kıyasla, emüljel kapsüllerin ANT içeriklerini daha iyi korudukları saptanmıştır. Benzer şekilde, soya fasulyesi yağı içeren çift emülsiyon yüklü SA hidrojel kapsüllerinin (emüljel kapsül), sindirimin son aşamasında SA hidrojel kapsüllerden (emülsiyon içermeyen) daha düşük antosiyanin salınımı gösterdiği [105] tarafından rapor edilmiştir.

Emüljel kapsüllerde, antosiyaninlerin çift emülsiyonun iç su fazına (W_1/O) hapsedilmesinden dolayı, hidrojel kapsüllerden farklı olarak, ANT sindirim sıvılarına geçmesi için emülsiyonun yağ parçalayan enzimler tarafından hidrolize edilmesi gerekmektedir. Yağ fazının sindirimi için, sindirim sıvısılarındaki lipaz

enzimi jel ağına yayılmalı ve enzimatik katalizi başlatmak için yağ damlacıklarının yüzeyine adsorbe olabilmelidir ancak emülsiyonun etrafındaki polimerik jel matrisi, enzim ve safra tuzlarının difüzyonunu geciktirecek [109], dolayısıyla ANT' lere ilave bir koruma sağlanmış olacaktır.

Benzer şekilde, askorbik asidin (AA) çift emülsiyon yüklü SA hidrojel kapsüllerden (emüljel) *in vitro* salınım davranışının araştırıldığı Zhang vd. [103] tarafından yapılan çalışmada, AA yüklü çift emülsiyonla karşılaştırıldığında, emüljel kapsüllerden AA'nın kontrollü bir şekilde salındığı ifade edilmiştir. Bu sonuç, iyonlar tarafından çapraz bağlanarak oluşan üç boyutlu polimer ağının, emülsiyondaki yağ tabakasının yapısını stabilize etmesi ve yağ damlacıklarının hareketini azaltması ile ilişkilendirilmiştir. Başka bir çalışmada, çift emülsiyon yüklü SA hidrojel kapsüller (emüljel) için, 120 dk süren mide sindiriminde en fazla %2 tartrazin (bir azo boya) salınımı gözlendiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan, bağırsak sindirimi sırasında, SA jel ağının parçalanması, yağ damlacıklarının salınımı ve lipazın etkisiyle tartrazin salınımının önemli ölçüde arttığı vurgulanmıştır [166]. Wu vd. [104] tarafından yapılan çalışmada, Pickering emülsiyonlar (PE'ler) ile karşılaştırıldığında, Pickering emülsiyon yüklü SA/κ-CG hidrojel kapsüllerde lipid sindirim sürecinin geciktiği, dolayısıyla kapsüllenmiş resveratrolün daha yavaş salındığını ve biyoerişilebilirliğinin arttığı bildirilmiştir.

Şekil 3.14'te, simüle edilmiş gastrointestinal sindirime tabi tutulan serbest RYE ve emüljel (EC1-K) ile hidrojel (HC1-K) kapsüllerin fotoğrafları verilmiştir. Sindirimin bağırsak aşamasından sonra, emüljel kapsüller yapılarını daha iyi korurken, hidrojel kapsüller daha fazla tahrip olmuştur (beyaz oklar, Şekil 3.14a,b). Sindirimin 150. dk'sında hem hidrojel kapsüller hem de serbest RYE (Şekil 3.14b,c) renksiz hale gelirken, antosiyaninler sindirimin 300. dk'sına kadar emüljel kapsüllerden hala salınabilmektedir.

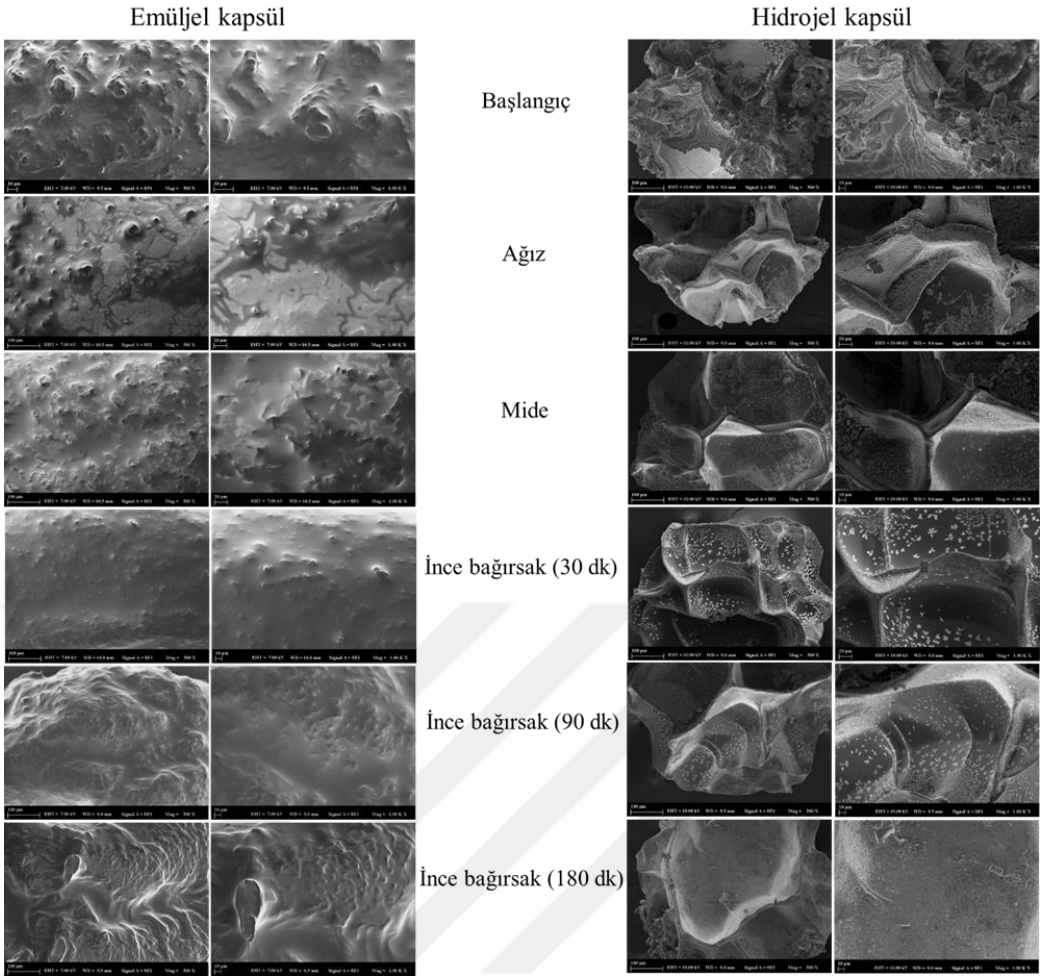


Şekil 3.14 (a) Emüljel kapsülün (EC1-K) 150 dk **(i)** ve 300 dk **(ii)**, **(b)** hidrojel kapsülün (HC1-K) ve **(c)** serbest RYE'nin 150 dk sonraki simüle edilmiş gastrointestinal sindirimdeki fotoğrafları

Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim sisteminin kapsül morfolojisi üzerindeki etkisi SEM analizi ile incelenmiştir. Simüle edilmiş sindirim sırasındaki emüljel (EC1-K) ve hidrojel (HC1-K) kapsüllerin yüzeyine ait SEM görüntüleri Şekil 3.15'te verilmiştir.

SEM görüntülerine göre, EC1-K emüljel kapsülün başlangıç ortamından ağız ve mide koşullarına geçtikten sonra yüzey morfolojisinde önemli ölçüde değişiklik meydana gelmediği görülmüştür. Ancak, mide ortamından sonra ince bağırsak ortamına 30 dk boyunca maruz kalması sonucunda, yüzeydeki gözenekliliğin az da olsa azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, yüklü antosiyaninlerin bağırsak ortamına salınımıyla sonuçlanan kapsül yüzeyindeki polimerik ağın hidrolizi ile ilişkili olduğu söylenebilir.

Diğer taraftan, HC1-K hidrojel kapsülün gastrointestinal sindirim sırasında morfolojisinde önemli değişiklikler meydana geldiği saptanmıştır. HC1-K hidrojel kapsülün ağız fazında 2 dk maruziyetten sonra başlangıç ortamına göre yüzeyinde önemli ölçüde çökmeler oluştuğu gözlenmiştir. Özellikle ince bağırsak koşullarında HC1-K hidrojel kapsülün yapısında dramatik değişiklikler meydana gelmiştir. Sindirimin 300. dk'sından sonra elde edilen görüntülere göre, polimerik ağın hidrolizi ile ortaya çıkan daha pürüzsüz bir yüzey meydana gelmiştir. Sonuç olarak, emüljel kapsüllerin yapısı hidrojel kapsüllerle karşılaştırıldığında sindirim ortamına daha fazla direnç gösterdiği ve bu da kapsüllerdeki çekirdek malzemelerin etkili bir şekilde korunmasıyla sonuçlandığı ifade edilebilir.



Şekil 3.15 Simüle edilmiş gastrointestinal sindirim aşamaları sırasında EC1-K emüljel ve HC1-K hidrojel kapsüllerin yüzeyine ait SEM görüntüleri

In vitro sindirim analizi sonuçlarına göre, emüljel kapsüllere yüklenen RYE antosiyaninlerin belirli bir miktarı ince bağırsak ortamında salındıktan sonra kalan miktarın sindirimin devamı olarak kolona geçeceği düşünülmektedir. Kolondaki mikrobiyota, antosiyanin metabolizmasında rol oynamakta ve kararsız antosiyanidin formlarını fenolik asitlere indirgemektedir [245]. Ayrıca, antosiyaninler bağırsak mikrobiyal topluluk kompozisyonunu modüle ederek sağlığa yararlı etkiler göstermektedir [246].

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

Tıbbi ve aromatik bitkiler, insanlık tarihinin başlangıcından itibaren gıda, ilaç ve kozmetik sektörü gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, antimikrobiyal, antifungal, antialerjik, antidiyabetik, kardiyovasküler sistemi koruyucu, antioksidan, antikanser, antienflamatuvar, spazm çözücü ve ağrı kesici özelliği gibi sağlık üzerine olumlu etkileri olan ikincil bileşikleri yüksek oranda içermektedirler.

Günümüzde sağlıklı beslenme bilincinin artmasıyla beraber, bu bitkiler üzerine olan çalışmaların sayısı da artan bir ivme ile hız kazanmıştır. Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) tıbbi ve aromatik bitkilerden bir tanesidir. Reyhan, flavonoidlerin önemli bir sınıfı olan antosiyaninleri yüksek miktarda içermektedir. Pembe-mor renklere sahip doğal pigmentler olmalarının yanı sıra antosiyaninlerin sağlık üzerine olumlu etkileri mevcuttur, ancak bu bileşikler sıcaklık, ışık, pH değişimi gibi çeşitli çevresel faktörlere karşı stabilitelerini koruyamamaktadır, ayrıca beslenme yoluyla alındıkları zaman düşük biyoyararlanıma sahiptiler. Bundan dolayı, bu bileşiklerin stabilitelerini arttırmak amacıyla önerilen enkapsülasyon teknolojileri de önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, antosiyaninlerin sindirim koşullarına karşı stabilitesini ve dolayısıyla biyoerişilebilirliğini arttırmak amacıyla, kurutulmuş reyhan yaprağından elde edilen antosiyanin ekstraktı (RYE), dış su fazında (W_2) aljinat/kappa-karragenan (SA/κ-CG) bulunan bir çift emülsiyonun iç su fazına (W_1) yüklenmiş, daha sonra bu emülsiyon farklı çapraz bağlayıcılar (Ca^{+2}/K^{+}) kullanılarak elektrospreyleme yöntemi ile çift emülsiyon yüklü hidrojel kapsüllere (emüljel) dönüştürülmüştür. Emülsiyon ve iyonik jelasyon teknikleri kullanılarak elde edilen emüljel hibrit enkapsülasyon sisteminin karşılaştırılması için, eş zamanlı olarak aynı polimer karışımları ve çapraz bağlayıcılarla emülsiyon içermeyen hidrojel kapsüller de üretilmiştir. İkincil polimer olarak κ-CG ve çapraz bağlayıcı ajan olarak Ca^{+2}/K^{+} iyon oranlarının SA kapsüllerinin fiziksel yapıları üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, RYE antosiyanin profili HPLC ile belirlenmiş, kapsüllerin karakterizasyonu için optik mikroskop, jel kuvveti, SEM,

FTIR ve termal (TGA, DTG, DSC) analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, antosiyaninlerin kapsüllerdeki enkapsülasyon etkinliği ve simüle edilmiş *in vitro* sindirim koşulları altında emüljel ve hidrojel kapsüllerden salınımı değerlendirilmiştir.

RYE'nin HLPC analizinde, 517 nm dalga boyunda 15 farklı pik tespit edilmiş ve siyanidin 3-*O*-glukozit (176,69±0,11 µg/g ekstrakt), peonidin 3-*O*-glukozit (2751,82±1,50 µg/g ekstrakt) ve siyanidin (2234,07±38,26 µg/g ekstrakt) antosiyaninleri tanımlanmıştır.

SA/κ-CG hidrojel kapsüllerine çift emülsiyonun ($W_1/O/W_2$) dahil edilmesiyle elde edilen emüljel kapsüller, aynı koşullar altında üretilen hidrojel kapsüllere kıyasla, optik mikroskopta küresel olmayan şekillerde ve SEM analizinde yağ damlacıklarının yüzeydeki çatlaklardan sızmasını işaret eden baloncuklar gözlenmiştir. Emüljel kapsüllerde hidrojel kapsüllere kıyasla, yağ fazının plastikleştirici etkisiyle ilişkilendirilen daha düşük jel kuvveti elde edilmiştir.

Çift emülsiyon yüklü hidrojel kapsüllerde (emüljel kapsül), hidrojel kapsüllere (emülsiyon içermeyen) göre daha yüksek enkapsülayon etkinliği elde edilmiştir. Bu durum, emüljel kapsüllerdeki çift emülsiyonun yağ fazının (ayçiçek yağı) SA/κ-CG polimerik ağı ile etkileşime girmesi, jel ağındaki kimyasal bağları güçlendirmesi ve böylece kapsül içine yüklenen antosiyaninlerin jelleşme banyosuna difüzyonunu engelleyen ek bir fizikokimyasal bariyer oluşturmasıyla ilişkili olduğu söylenebilir.

Termal analizlere (TGA, DTG ve DSC) göre, tuz banyosunda (jelleşme ortamı) K^+ iyonlarının varlığı emüljel kapsüllerde daha yüksek termal stabiliteyle sonuçlanırken kapsüllere RYE yüklenmesi termal stabiliteyi azaltmıştır.

In vitro gastrointestinal sindirim analizinde, emüljel kapsüller 300 dk süren sindirim sonrasında bile belirli oranlarda içeriklerini korurken serbest RYE ve hidrojel kapsüllerde 150 dk sonra antosiyanin tespit edilmemiştir. Dolayısıyla emüljel kapsüllerin simüle edilmiş sindirim aşamalarında antosiyaninler açısından daha yüksek koruma sağladığı ve bunun jel matrisindeki çift emülsiyonun iç su fazında kapsüllenen RYE-antosiyaninlerin sindirim enzimleri ve safra tuzlarının etkisinin engellenmesiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, çalışmada elde edilen emüljel hibrit enkapsülasyon sistemin, sindirim sırasında antosiyaninlerin kontrollü salınımını gerçekleştirebileceği ve biyoerişilebilirliğini artırabileceği için birçok

çevresel faktöre karşı oldukça hassas olan antosiyaninler açısından potansiyel bir dağıtım sistemi olabileceği düşünülmektedir.

Çalışma sonuçlarına göre, emüljel kapsüllere yüklenen RYE-antosiyaninlerin ağız, mide ve ince bağırsak sindiriminden sonra, kapsül içinde kalan miktarının kolona geçtiği ve kolon mikrobiyota tarafından metabolize edildiği düşünülmektedir. Bu nedenle, sindirim koşulları altında serbest ve kapsüllenmiş RYE-antosiyanin metabolitlerinin profilini çıkarmak için daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir. Ayrıca, kapsülleme yönteminde kullanılan polimerler ile kolona geçen antosiyaninler arasındaki etkileşimin, *in vitro* insan kolon modelleri ile incelenmesi, gelecekteki çalışmalara araştırılma konusu olabilir.

KAYNAKÇA

[1] E. M. Kwee and E. D. Niemeyer, "Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars," *Food Chem*, vol. 128, no. 4, pp. 1044–1050, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.011.

[2] J. S. Franklyne, S. Iyer, A. Ebenazer, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran, "Essential oil nanoemulsions: antibacterial activity in contaminated fruit juices," *Int J Food Sci Technol*, vol. 54, no. 9, pp. 2802–2810, 2019, doi: 10.1111/ijfs.14195.

[3] K. Torpol, S. Sriwattana, J. Sangsuwan, P. Wiriyacharee, and W. Prinyawiwatkul, "Optimising chitosan–pectin hydrogel beads containing combined garlic and holy basil essential oils and their application as antimicrobial inhibitor," *Int J Food Sci Technol*, vol. 54, no. 6, pp. 2064–2074, Jun. 2019, doi: 10.1111/ijfs.14107.

[4] S. Amrani *et al.*, "Hypolipidaemic Activity of Aqueous *Ocimum basilicum* Extract in Acute Hyperlipidaemia Induced by Triton WR-1339 in Rats and its Antioxidant Property," *Phytother. Res*, vol. 20, pp. 1040–1045, 2006, doi: 10.1002/ptr.

[5] Y. Gökçe, H. Kanmaz, B. Er, K. Sahin, and A. A. Hayaloglu, "Influence of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) extract and essential oil on hyperlipidemia and oxidative stress in rats fed high-cholesterol diet," *Food Biosci*, vol. 43, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.fbio.2021.101228.

[6] A. G. Pirbalouti, E. Mahdad, and L. Craker, "Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces," *Food Chem*, vol. 141, no. 3, pp. 2440–2449, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.098.

[7] İ. Yiğitvar, "Arapgir Mor Reyhan Çayi ve Şerbetinin Üretim Olanaklarinin Araştirilmasi," Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı , 2017.

[8] B. Prinsi, S. Morgutti, N. Negrini, F. Faoro, and L. Espen, "Insight into composition of bioactive phenolic compounds in leaves and flowers of green and purple basil," *Plants*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/plants9010022.

[9] V. Ebrahimi, A. Mohammadi Nafchi, M. Bolandi, and H. Baghaei, "Fabrication and characterization of a pH-sensitive indicator film by purple basil leaves extract to monitor the freshness of chicken fillets," *Food Packag Shelf Life*, vol. 34, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.fpsl.2022.100946.

[10] H. Gurkan, O. S. Boran, and A. A. Hayaloglu, "Influence of purple basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on chemical composition, rheology and antioxidant activity of set-type yoghurt," *Mljekarstvo*, vol. 69, no. 1, pp. 42–52, 2019, doi: 10.15567/mljekarstvo.2019.0104.

[11] H. Gurkan and A. A. Hayaloglu, “Volatiles and sensory characteristics of yogurt manufactured by incorporating basil (*Ocimum basilicum* L.),” *Int J Food Prop*, vol. 20, pp. S779–S789, Dec. 2017, doi: 10.1080/10942912.2017.1311344.

[12] J. M. Beltrame *et al.*, “Chemical Composition of the Essential Oil Obtained from *Ocimum basilicum* (Basil) Cultivated in Two Regions from South Brazil,” *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, vol. 17, no. 4, pp. 658–663, Jul. 2014, doi: 10.1080/0972060X.2014.895212.

[13] A. O. Tursun, “Impact of soil types on chemical composition of essential oil of purple basil,” *Saudi J Biol Sci*, vol. 29, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103314.

[14] P. M. Flanigan and E. D. Niemeyer, “Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.),” *Food Chem*, vol. 164, pp. 518–526, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.061.

[15] J. Javanmardi, A. Khalighi, A. Kashi, H. P. Bais, and J. M. Vivanco, “Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran,” *J Agric Food Chem*, vol. 50, no. 21, pp. 5878–5883, Oct. 2002, doi: 10.1021/jf020487q.

[16] Y. Yeşiloglu and L. Şit, “Antioxidant properties of various solvent extracts from purple basil,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 95, pp. 100–106, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.saa.2012.04.036.

[17] H. Kanmaz, Y. Gokce, and A. A. Hayaloglu, “Volatiles, phenolic compounds and bioactive properties of essential oil and aqueous extract of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) and antidiabetic activity in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats,” *Food Chemistry Advances*, vol. 3, p. 100429, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.focha.2023.100429.

[18] M. J. Lee, J. S. Park, D. S. Choi, and M. Y. Jung, “Characterization and quantitation of anthocyanins in purple-fleshed sweet potatoes cultivated in Korea by HPLC-DAD and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS,” *J Agric Food Chem*, vol. 61, no. 12, pp. 3148–3158, Mar. 2013, doi: 10.1021/jf3055455.

[19] N. Echegaray *et al.*, “Recent advances in food products fortification with anthocyanins,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, no. 6. Taylor and Francis Ltd., pp. 1553–1567, 2022. doi: 10.1080/10408398.2020.1844141.

[20] A. Escalante-Aburto, M. Y. Mendoza-Córdova, G. B. Mahady, D. A. Luna-Vital, J. A. Gutiérrez-Uribe, and C. Chuck-Hernández, “Consumption of dietary anthocyanins and their association with a reduction in obesity biomarkers and the prevention of obesity,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 140. Elsevier Ltd, Oct. 01, 2023. doi: 10.1016/j.tifs.2023.104140.

[21] D. D. Herrera-Balandrano, Z. Chai, T. Beta, J. Feng, and W. Huang, “Blueberry anthocyanins: An updated review on approaches to enhancing their bioavailability,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 118. Elsevier Ltd, pp. 808–821, Dec. 01, 2021. doi: 10.1016/j.tifs.2021.11.006.

[22] X. Sun, C. Liu, A. M. Omer, L. Y. Yang, and X. kun Ouyang, “Dual-layered pH-sensitive alginate/chitosan/kappa-carrageenan microbeads for colon-targeted release of 5-fluorouracil,” *Int J Biol Macromol*, vol. 132, pp. 487–494, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.225.

[23] M. Teixeira *et al.*, “Anthocyanin-rich edible flowers, current understanding of a potential new trend in dietary patterns.,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 138. Elsevier Ltd, pp. 708–725, Aug. 01, 2023. doi: 10.1016/j.tifs.2023.07.010.

[24] L. C. Kerio, F. N. Wachira, J. K. Wanyoko, and M. K. Rotich, “Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification,” *Food Chem*, vol. 131, no. 1, pp. 31–38, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.005.

[25] Z. Chai *et al.*, “A comparative analysis on the anthocyanin composition of 74 blueberry cultivars from China,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 102, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.jfca.2021.104051.

[26] R. Ullah, M. Khan, S. A. Shah, K. Saeed, and M. O. Kim, “Natural antioxidant anthocyanins—a hidden therapeutic candidate in metabolic disorders with major focus in neurodegeneration,” *Nutrients*, vol. 11, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2019. doi: 10.3390/nu11061195.

[27] A. G. Tarone, C. B. B. Cazarin, and M. R. Marostica Junior, “Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation,” *Food Research International*, vol. 133. Elsevier Ltd, Jul. 01, 2020. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109092.

[28] G. P. Łysiak, “Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties,” *Foods*, vol. 11, no. 7. MDPI, Apr. 01, 2022. doi: 10.3390/foods11070948.

[29] G. Mazza, J. E. Cacace, and C. D. Kay, “Methods of Analysis for Anthocyanins in Plants and Biological Fluids,” *Journal of AOAC International*, vol. 87, no. 11, pp. 29–145, Jan. 01, 2004. doi:10.1093/jaoac/87.1.129

[30] A. Alejo-Armijo, A. J. Parola, and F. Pina, “PH-Dependent Multistate System Generated by a Synthetic Furanoflavylium Compound: An Ancestor of the Anthocyanin Multistate of Chemical Species,” *ACS Omega*, vol. 4, no. 2, pp. 4091–4100, Feb. 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b03696.

[31] S. Peñaloza, C. Delesma, J. Muñiz, and A. López-Ortiz, “The anthocyanin’s role on the food metabolic pathways, color and drying processes: An experimental and theoretical approach,” *Food Bioscience*, vol. 47. Elsevier Ltd, Jun. 01, 2022. doi: 10.1016/j.fbio.2022.101700.

[32] D. Ghosh and T. Konishi, “Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function,” *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, vol.16 (2) pp.200-208, 2007.

[33] R. Mattioli, A. Francioso, L. Mosca, and P. Silva, “Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases,” *Molecules*, vol. 25, no. 17. MDPI AG, Sep. 01, 2020. doi: 10.3390/molecules25173809.

[34] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6. pp. 1841–1856, Mar. 23, 2005. doi: 10.1021/jf030723c.

[35] H. Guo and M. Xia, “Anthocyanins and diabetes regulation,” in *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*, Elsevier, 2018, pp. 135–145. doi: 10.1016/B978-0-12-813006-3.00012-X.

[36] G. Janarny, K. D. P. P. Gunathilake, and K. K. D. S. Ranaweera, “Nutraceutical potential of dietary phytochemicals in edible flowers—A review,” *Journal of Food Biochemistry*, vol. 45, no. 4. Blackwell Publishing Ltd, Apr. 01, 2021. doi: 10.1111/jfbc.13642.

[37] A. Rossi *et al.*, “Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation,” *Free Radical Research*, vol. 37, no. 8. pp. 891–900, Aug. 01, 2003. doi: 10.1080/1071576031000112690.

[38] D. X. Hou *et al.*, “Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: Structure-activity relationship and molecular mechanisms,” *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 1, pp. 29–36, Jan. 2004, doi: 10.1093/carcin/bgg184.

[39] K. A. Youdim, J. Mcdonald, W. Kalt, and J. A. Joseph, “Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, Elsevier, vol. 13, pp. 282–288, 2002.

[40] K. A. Youdim, A. Martin, J. A. Joseph, and J. Mayer, “Incorporation of the Elderberry Anthocyanins by Endothelial Cells Increases Protection Against Oxidative Stress,” *Free Radical Biology & Medicine*, Elsevier, Vol. 29, No. 1, pp. 51–60, 2000.

[41] A. Castañeda-Ovando, M. de L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez, and C. A. Galán-Vidal, “Chemical studies of anthocyanins: A review,” *Food Chemistry*, vol. 113, no. 4. pp. 859–871, Apr. 15, 2009. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001.

[42] J. K. Prasain, C. C. Wang, and S. Barnes, “Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 37, no. 9. pp. 1324–1350, Nov. 01, 2004. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.026.

[43] Ø. M. Andersen and K. R. Markham, “*Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications,”* CRC, Taylor & Francis, 2006.

[44] J. S. Barnes, H. P. Nguyen, S. Shen, and K. A. Schug, “General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry,” *J Chromatogr A*, vol. 1216, no. 23, pp. 4728–4735, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.032.

[45] W.B. Phippen and J.E. Simon, “Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.),” *J. Agric. Food Chem*. Vol. 46(5) pp. 1734–1738, 1998. https://doi.org/10.1021/jf970887r.

[46] K. R. McCance, P. M. Flanigan, M. M. Quick, and E. D. Niemeyer, “Influence of plant maturity on anthocyanin concentrations, phenolic

composition, and antioxidant properties of 3 purple basil (Ocimum basilicum L.) cultivars," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 53, pp. 30–39, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jfca.2016.08.009.

[47] B. Enaru, G. Drețcanu, T. D. Pop, A. Stănilă, and Z. Diaconeasa, "Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation," *Antioxidants*, vol. 10, no. 12. MDPI, Dec. 01, 2021. doi: 10.3390/antiox10121967.

[48] B. F. Feitosa, B. L. A. Decker, E. S. de Brito, S. Rodrigues, and L. R. B. Mariutti, "Microencapsulation of anthocyanins as natural dye extracted from fruits – A systematic review," *Food Chemistry*, vol. 424. Elsevier Ltd, Oct. 30, 2023. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136361.

[49] W. da S. Martins *et al.*, "Lemongrass (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf) essential oil microparticles: Development, characterization, and antioxidant potential," *Food Chem*, vol. 355, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129644.

[50] J. S. Ribeiro and C. M. Veloso, "Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review," *Food Hydrocolloids*, vol. 112. Elsevier B.V., Mar. 01, 2021. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106374.

[51] X. Wang, X. Li, L. Chen, F. Xie, L. Yu, and B. Li, "Preparation and characterisation of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components," *Food Chem*, vol. 126, no. 3, pp. 1218–1225, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.006.

[52] J. de C. G. Rocha *et al.*, "Microencapsulation by atomization of the mixture of phenolic extracts," *Powder Technol*, vol. 343, pp. 317–325, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.powtec.2018.11.040.

[53] J. K. Rutz *et al.*, "Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes," *Carbohydr Polym*, vol. 98, no. 2, pp. 1256–1265, 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.07.058.

[54] J. C. Ayala-Fuentes and R. A. Chavez-Santoscoy, "Nanotechnology as a key to enhance the benefits and improve the bioavailability of flavonoids in the food industry," *Foods*, vol. 10, no. 11. MDPI, Nov. 01, 2021. doi: 10.3390/foods10112701.

[55] Z. Yin, T. Zheng, C. T. Ho, Q. Huang, Q. Wu, and M. Zhang, "Improving the stability and bioavailability of tea polyphenols by encapsulations: a review," *Food Science and Human Wellness*, vol. 11, no. 3. Elsevier B.V., pp. 537–556, May 01, 2022. doi: 10.1016/j.fshw.2021.12.011.

[56] S. Akbari-Alavijeh, R. Shaddel, and S. M. Jafari, "Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers," *Food Hydrocolloids*, vol. 105. Elsevier B.V., Aug. 01, 2020. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105774.

[57] A. Karadağ, "Türkiye'deki Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antioksidan Potansiyalleri ve Fenolik Kompozisyonları," *European Journal of Science and Technology*, no. 16, pp. 631–637, Aug. 2019, doi: 10.31590/ejosat.592711.

[58] M. X. Quintanilla-Carvajal *et al.*, “Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing,” *Food Engineering Reviews*, vol. 2, no. 1, pp. 39–50, Mar. 2010, doi: 10.1007/s12393-009-9012-6.

[59] P. N. Ezhilarasi, P. Karthik, N. Chhanwal, and C. Anandharamakrishnan, “Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 6, no. 3. Springer Science and Business Media, LLC, pp. 628–647, Mar. 01, 2013. doi: 10.1007/s11947-012-0944-0.

[60] S. S. Ayyaril *et al.*, “Recent progress in micro and nano-encapsulation techniques for environmental applications: A review,” *Results in Engineering*, vol. 18. Elsevier B.V., Jun. 01, 2023. doi: 10.1016/j.rineng.2023.101094.

[61] D. J. Mcclements, E. A. Decker, Y. Park, and J. Weiss, “Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 49, no. 6, pp. 577–606, Jun. 2009, doi: 10.1080/10408390902841529.

[62] R. Shaddel, J. Hesari, S. Azadmard-Damirchi, H. Hamishehkar, B. Fathi-Achachlouei, and Q. Huang, “Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation,” *Int J Biol Macromol*, vol. 107, pp. 1800–1810, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044.

[63] L. M. Devi, A. B. Das, and L. S. Badwaik, “Effect of gelatin and acacia gum on anthocyanin coacervated microcapsules using double emulsion and its characterization,” *Int J Biol Macromol*, vol. 235, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123896.

[64] N. Kanha, S. Surawang, P. Pitchakarn, and T. Laokuldilok, “Microencapsulation of copigmented anthocyanins using double emulsion followed by complex coacervation: Preparation, characterization and stability,” *LWT*, vol. 133, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110154.

[65] S. Chadorshabi, S. Hallaj-Nezhadi, and Z. Ghasempour, “Liposomal system based on lyophilization of a monophase solution for stabilization of bioactives from red onion skin,” *LWT*, vol. 172, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2022.114174.

[66] F. N. dos Santos *et al.*, “Encapsulation of Anthocyanic Extract of Jambolan (Syzygium cumini (L.)) in Zein Sub-micron Fibers Produced by Electrospinning,” *Food Biophys*, vol. 18, no. 1, pp. 133–147, Mar. 2023, doi: 10.1007/s11483-022-09758-3.

[67] M. Mehran, S. Masoum, and M. Memarzadeh, “Improvement of thermal stability and antioxidant activity of anthocyanins of Echium amoenum petal using maltodextrin/modified starch combination as wall material,” *Int J Biol Macromol*, vol. 148, pp. 768–776, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.197.

[68] X. Cai, X. Du, D. Cui, X. Wang, Z. Yang, and G. Zhu, “Improvement of stability of blueberry anthocyanins by carboxymethyl starch/xanthan gum combinations microencapsulation,” *Food Hydrocoll*, vol. 91, pp. 238–245, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.034.

[69] A. C. Pereira Souza, P. Deyse Gurak, and L. Damasceno Ferreira Marczak, "Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 102, pp. 186–194, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.fbp.2016.12.012.

[70] J. Guo, M. M. Giusti, and G. Kaletunç, "Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency," *Food Research International*, vol. 107, pp. 414–422, May 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.035.

[71] M. Sharma, K. K. Dash, and L. S. Badwaik, "Physicochemical and release behaviour of phytochemical compounds based on black jamun pulp extracts-filled alginate hydrogel beads through vibration dripping extrusion," *Int J Biol Macromol*, vol. 194, pp. 715–725, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.116.

[72] S. C. S. R. de Moura, C. L. Berling, S. P. M. Germer, I. D. Alvim, and M. D. Hubinger, "Encapsulating anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles," *Food Chem*, vol. 241, pp. 317–327, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.095.

[73] D. J. McClements, "Food emulsions: principles, practices, and techniques," *CRC press*, Third edition, 2015.

[74] L. M. Julio, C. N. Copado, B. W. K. Diehl, V. Y. Ixtaina, and M. C. Tomás, "Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids," *LWT*, vol. 89, pp. 581–590, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.044.

[75] J. Xiao, X. Lu, and Q. Huang, "Double emulsion derived from kafirin nanoparticles stabilized Pickering emulsion: Fabrication, microstructure, stability and in vitro digestion profile," *Food Hydrocoll*, vol. 62, pp. 230–238, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.014.

[76] C. A. Zentner, F. Anson, S. Thayumanavan, and T. M. Swager, "Dynamic Imine Chemistry at Complex Double Emulsion Interfaces," *J Am Chem Soc*, vol. 141, no. 45, pp. 18048–18055, Nov. 2019, doi: 10.1021/jacs.9b06852.

[77] N. P. Aditya, S. Aditya, H. Yang, H. W. Kim, S. O. Park, and S. Ko, "Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion," *Food Chem*, vol. 173, pp. 7–13, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.131.

[78] N. Prichapan, D. J. McClements, and U. Klinkesorn, "Utilization of multilayer-technology to enhance encapsulation efficiency and osmotic gradient tolerance of iron-loaded W1/O/W2 emulsions: Saponin-chitosan coatings," *Food Hydrocoll*, vol. 112, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106334.

[79] N. Leister and H. P. Karbstein, "Evaluating the stability of double emulsions— A review of the measurement techniques for the systematic investigation of instability mechanisms," *Colloids and Interfaces*, vol. 4, no. 1. MDPI AG, Mar. 01, 2020. doi: 10.3390/colloids4010008.

[80] W. Lu, A. L. Kelly, and S. Miao, “Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 47. Elsevier Ltd, pp. 1–9, Jan. 01, 2016. doi: 10.1016/j.tifs.2015.10.015.

[81] L. Chen, F. Ao, X. Ge, and W. Shen, “Food-grade pickering emulsions: Preparation, stabilization and applications,” *Molecules*, vol. 25, no. 14. MDPI AG, Jul. 01, 2020. doi: 10.3390/molecules25143202.

[82] X. Yan, C. Ma, F. Cui, D. J. McClements, X. Liu, and F. Liu, “Protein-stabilized Pickering emulsions: Formation, stability, properties, and applications in foods,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 103. Elsevier Ltd, pp. 293–303, Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/j.tifs.2020.07.005.

[83] S. Ge *et al.*, “Pickering emulsion stabilized by zein/Adzuki bean seed coat polyphenol nanoparticles to enhance the stability and bioaccessibility of astaxanthin,” *J Funct Foods*, vol. 88, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.jff.2021.104867.

[84] D. de Almeida Paula *et al.*, “Increased thermal stability of anthocyanins at pH 4.0 by guar gum in aqueous dispersions and in double emulsions W/O/W,” *Int J Biol Macromol*, vol. 117, pp. 665–672, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.219.

[85] B. S. B. Bamba *et al.*, “Coencapsulation of polyphenols and anthocyanins from blueberry pomace by double emulsion stabilized by whey proteins: Effect of Homogenization parameters,” *Molecules*, vol. 23, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.3390/molecules23102525.

[86] J. Liu, Y. Tan, H. Zhou, J. L. Muriel Mundo, and D. J. McClements, “Protection of anthocyanin-rich extract from pH-induced color changes using water-in-oil-in-water emulsions,” *J Food Eng*, vol. 254, pp. 1–9, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.02.021.

[87] L. E. Kurozawa and M. D. Hubinger, “Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation,” *Current Opinion in Food Science*, vol. 15. Elsevier Ltd, pp. 50–55, Jun. 01, 2017. doi: 10.1016/j.cofs.2017.06.004.

[88] F. Maestrelli, N. Zerrouk, M. Cirri, N. Mennini, and P. Mura, “Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 34, no. 1, pp. 1–11, May 2008, doi: 10.1016/j.ejps.2008.02.001.

[89] P. Burey, B. R. Bhandari, T. Howes, and M. J. Gidley, “Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 48, no. 5, pp. 361–377, May 2008, doi: 10.1080/10408390701347801.

[90] B. Balanč *et al.*, “Calcium-Alginate-Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract,” *J Food Sci*, vol. 81, no. 1, pp. E65–E75, Jan. 2016, doi: 10.1111/1750-3841.13167.

[91] E. S. Kim, J. S. Lee, and H. G. Lee, “Calcium-alginate microparticles for sustained release of catechin prepared via an emulsion gelation technique,” *Food Sci Biotechnol*, vol. 25, no. 5, pp. 1337–1343, Oct. 2016, doi: 10.1007/s10068-016-0210-8.

[92] A. López Córdoba, L. Deladino, and M. Martino, “Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants,” *Carbohydr Polym*, vol. 95, no. 1, pp. 315–323, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.019.

[93] A. L. Córdoba, L. Deladino, and M. Martino, “Release of yerba mate antioxidants from corn starch-alginate capsules as affected by structure,” *Carbohydr Polym*, vol. 99, pp. 150–157, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.026.

[94] R. Yamdech, P. Aramwit, and S. Kanokpanont, “Stability of Anthocyanin in Mulberry Fruits Extract Adsorbed on Calcium Alginate Beads,” *1st Mae Fah Luang University International Conference*, 2012.

[95] D. T. Santos, J. Q. Albarelli, M. M. Beppu, and M. A. A. Meireles, “Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO2 as solvent,” *Food Research International*, vol. 50, no. 2, pp. 617–624, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.019.

[96] A. Belščak-Cvitanovic *et al.*, “Emulsion templated microencapsulation of dandelion (Taraxacum officinale L.) polyphenols and β-carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin,” *Food Hydrocoll*, vol. 57, pp. 139–152, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.01.020.

[97] V. Guarino, R. Altobelli, and L. Ambrosio, “Chitosan microgels and nanoparticles via electrofluidodynamic techniques for biomedical applications,” *Gels*, vol. 2, no. 1, Mar. 2016, doi: 10.3390/gels2010002.

[98] B. Bugarski, Q. Li, M. F. A. Goosen, D. Poncelet, R. J. Neufeld, and G. Vunjak, “Electrostatic droplet generation: Mechanism of polymer droplet formation,” *AIChE Journal*, vol. 40, no. 6, pp. 1026–1031, 1994, doi: 10.1002/aic.690400613.

[99] Y. Fukui *et al.*, “Preparation of monodispersed polyelectrolyte microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 370, no. 1–3, pp. 28–34, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.08.039.

[100] C. Y. Karakas, H. R. Ordu, F. Bozkurt, and A. Karadag, “Electrosprayed chitosan-coated alginate–pectin beads as potential system for colon-targeted delivery of ellagic acid,” *J Sci Food Agric*, vol. 102, no. 3, pp. 965–975, Feb. 2022, doi: 10.1002/jsfa.11430.

[101] A. Panwar, *et al.*, "Emulgel: A review," *Asian J Pharm Life Sci*, Vol. 1 (3), July-Sept, 2011.

[102] M. S. B. Kute, “Emulsified gel A Novel approach for delivery of hydrophobic drugs: An overview.” [Online]. Available: www.japer.in

[103] M. Zhang, R. Sun, and Q. Xia, “An ascorbic acid delivery system based on (W1/O/W2) double emulsions encapsulated by Ca-alginate hydrogel beads,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 60, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101929.

[104] B. Wu, Y. Li, Y. Li, H. Li, and Q. Xia, “The influence of Ca2+/K+ weight ratio on the physicochemical properties and in vitro digestion behavior of resveratrol-loaded Pickering emulsions encapsulated in alginate/κ-

carrageenan hydrogel beads," *React Funct Polym*, vol. 181, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105414.

[105] L. B. Norcino, J. F. Mendes, J. de A. Figueiredo, N. L. Oliveira, D. A. Botrel, and L. H. C. Mattoso, "Development of alginate/pectin microcapsules by a dual process combining emulsification and ultrasonic gelation for encapsulation and controlled release of anthocyanins from grapes (Vitis labrusca L.)," *Food Chem*, vol. 391, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133256.

[106] R. Sun and Q. Xia, "In vitro digestion behavior of (W1/O/W2) double emulsions incorporated in alginate hydrogel beads: Microstructure, lipolysis, and release," *Food Hydrocoll*, vol. 107, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105950.

[107] J. Santos, M. C. Alfaro, L. A. Trujillo-Cayado, N. Calero, and J. Muñoz, "Encapsulation of β-carotene in emulgels-based delivery systems formulated with sweet fennel oil," *LWT*, vol. 100, pp. 189–195, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2018.10.057.

[108] L. A. Báez, J. Santos, P. Ramírez, L. A. Trujillo-Cayado, and J. Muñoz, "Development of emulgels formulated with sweet fennel oil and rhamsan gum, a biological macromolecule produced by Sphingomonas," *Int J Biol Macromol*, vol. 129, pp. 326–332, May 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.114.

[109] C. Y. Karakaş, R. M. Yildirim, and A. Karadag, "Encapsulation of Lactobacillus plantarum ELB90 by electrospraying in a double emulsion (W1/O/W2) loaded alginate beads to improve the gastrointestinal survival and thermal stability," *J Sci Food Agric*, vol. 103, no. 7, pp. 3427–3436, May 2023, doi: 10.1002/jsfa.12494.

[110] W. Zhang and J. W. Rhim, "Recent progress in konjac glucomannan-based active food packaging films and property enhancement strategies," *Food Hydrocolloids*, vol. 128. Elsevier B.V., Jul. 01, 2022. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107572.

[111] I. Gupta, L. Cherwoo, R. Bhatia, and H. Setia, "Biopolymers: Implications and application in the food industry," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 46. Elsevier Ltd, Nov. 01, 2022. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102534.

[112] M. S. Pacheco, D. Barbieri, C. F. da Silva, and M. A. de Moraes, "A review on orally disintegrating films (ODFs) made from natural polymers such as pullulan, maltodextrin, starch, and others," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 178. Elsevier B.V., pp. 504–513, May 01, 2021. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.180.

[113] L. Bacakova *et al.*, "Versatile application of nanocellulose: From industry to skin tissue engineering and wound healing," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2019. doi: 10.3390/nano9020164.

[114] J. Tan *et al.*, "Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 239. Elsevier B.V., Jun. 01, 2023. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124275.

[115] J. Liu, S. Yang, X. Li, Q. Yan, M. J. T. Reaney, and Z. Jiang, “Alginate Oligosaccharides: Production, Biological Activities, and Potential Applications,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 18, no. 6. Blackwell Publishing Inc., pp. 1859–1881, Nov. 01, 2019. doi: 10.1111/1541-4337.12494.

[116] H. Zhang *et al.*, “Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine,” 2021, doi: 10.3390/md.

[117] C. Maity and N. Das, “Alginate-Based Smart Materials and Their Application: Recent Advances and Perspectives,” *Topics in Current Chemistry*, vol. 380, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, Feb. 01, 2022. doi: 10.1007/s41061-021-00360-8.

[118] E. Godek and E. Grządka, “Alginates-structure, properties, applications,” *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*, vol. 74(1), pp. 109-124, 2019. doi: 10.17951/aa.2019.74.1.109-124.

[119] I. A. Brownlee *et al.*, “Alginate as a source of dietary fiber,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 45, no. 6, pp. 497–510, Sep. 2005, doi: 10.1080/10408390500285673.

[120] M. E. Sears, “Chelation: Harnessing and enhancing heavy metal detoxification - A review,” *The Scientific World Journal*, vol. 2013. 2013. doi: 10.1155/2013/219840.

[121] Y. Wang *et al.*, “Doubling growth of egg-box structure during Calcium-mediated molecular assembly of alginate,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 634, pp. 747–756, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.jcis.2022.12.096.

[122] C. Hu, W. Lu, A. Mata, K. Nishinari, and Y. Fang, “Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 177. Elsevier B.V., pp. 578–588, Apr. 30, 2021. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.086.

[123] M. B. Stewart, S. R. Gray, T. Vasiljevic, and J. D. Orbell, “Exploring the molecular basis for the metal-mediated assembly of alginate gels,” *Carbohydr Polym*, vol. 102, no. 1, pp. 246–253, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.11.034.

[124] S. Vicini, M. Castellano, M. Mauri, and E. Marsano, “Gelling process for sodium alginate: New technical approach by using calcium rich micro-spheres,” *Carbohydr Polym*, vol. 134, pp. 767–774, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.08.064.

[125] Y. Zhang, Y. Yang, X. Zhao, and J. Gao, “Investigation on ionical cross-linking of alginate by monovalent cations to fabrication alginate gel for biomedical application,” *React Funct Polym*, vol. 183, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105484.

[126] H. M. Fahmy, A. A. Aly, S. M. Sayed, and A. Abou-Okeil, “Κ-carrageenan/Na-alginate wound dressing with sustainable drug delivery properties,” *Polym Adv Technol*, vol. 32, no. 4, pp. 1793–1801, Apr. 2021, doi: 10.1002/pat.5218.

[127] C. H. Goh, P. W. S. Heng, and L. W. Chan, “Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications,”

Carbohydrate Polymers, vol. 88, no. 1. pp. 1–12, Mar. 17, 2012. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.11.012.

[128] M. George and T. E. Abraham, "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review," *Journal of Controlled Release*, vol. 114, no. 1. pp. 1–14, Aug. 10, 2006. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.017.

[129] G. Carine Raddatz *et al.*, "Use of red onion (*Allium cepa* L.) residue extract in the co-microencapsulation of probiotics added to a vegan product," *Food Research International*, vol. 161, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111854.

[130] I. Dalponte Dallabona *et al.*, "Development of alginate beads with encapsulated jabuticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive," *Int J Biol Macromol*, vol. 163, pp. 1421–1432, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.256.

[131] D. Chatterjee and P. Bhattacharjee, "Encapsulation of colour from peels of eggplant in calcium alginate matrix," *Nutrafoods*, vol. 14, no. 2, pp. 87–96, Jun. 2015, doi: 10.1007/s13749-015-0001-5.

[132] Y. Wang, C. Tan, S. M. Davachi, P. Li, P. Davidowsky, and B. Yan, "Development of microcapsules using chitosan and alginate via W/O emulsion for the protection of hydrophilic compounds by comparing with hydrogel beads," *Int J Biol Macromol*, vol. 177, pp. 92–99, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.089.

[133] I. Ćorković, A. Pichler, I. Ivić, J. Šimunović, and M. Kopjar, "Microencapsulation of chokeberry polyphenols and volatiles: Application of alginate and pectin as wall materials," *Gels*, vol. 7, no. 4, Dec. 2021, doi: 10.3390/gels7040231.

[134] M. Abdin, M. A. Salama, R. M. A. Gawad, M. A. Fathi, and F. Alnadari, "Two-Steps of Gelation System Enhanced the Stability of *Syzygium cumini* Anthocyanins by Encapsulation with Sodium Alginate, Maltodextrin, Chitosan and Gum Arabic," *J Polym Environ*, vol. 29, no. 11, pp. 3679–3692, Nov. 2021, doi: 10.1007/s10924-021-02140-3.

[135] S. R. Kanatt, S. Tari, and S. P. Chawla, "Encapsulation of extract prepared from irradiated onion scales in alginate beads: a potential functional food ingredient," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 12, no. 2, pp. 848–858, Jun. 2018, doi: 10.1007/s11694-017-9699-7.

[136] F. Fathordoobady, M. Jarzębski, A. Pratap-Singh, Y. Guo, and Y. Abd-Manap, "Encapsulation of betacyanins from the peel of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* L.) in alginate microbeads," *Food Hydrocoll*, vol. 113, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106535.

[137] S. Mohammadalinejhad, A. Almonaitytė, I. J. Jensen, M. Kurek, and J. Lerfall, "Alginate microbeads incorporated with anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) using electrostatic extrusion: Microencapsulation optimization, characterization, and stability studies," *Int J Biol Macromol*, vol. 246, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125684.

[138] S. Kanokpanont, R. Yamdech, and P. Aramwit, “Stability enhancement of mulberry-extracted anthocyanin using alginate/chitosan microencapsulation for food supplement application,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 46, no. 4, pp. 773–782, May 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1339050.

[139] F. Seke, V. E. Manhivi, R. M. Slabbert, Y. Sultanbawa, and D. Sivakumar, “*In Vitro* Release of Anthocyanins from Microencapsulated Natal Plum (*Carissa macrocarpa*) Phenolic Extract in Alginate/Psyllium Mucilage Beads,” *Foods*, vol. 11, no. 17, Sep. 2022, doi: 10.3390/foods11172550.

[140] R. Sun and Q. Xia, “Nanostructured lipid carriers incorporated in alginate hydrogel: Enhanced stability and modified behavior in gastrointestinal tract,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 574, pp. 197–206, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.04.082.

[141] G. Azevedo, M. D. Torres, I. Sousa-Pinto, and L. Hilliou, “Effect of pre-extraction alkali treatment on the chemical structure and gelling properties of extracted hybrid carrageenan from Chondrus crispus and Ahnfeltiopsis devoniensis,” *Food Hydrocoll*, vol. 50, pp. 150–158, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.03.029.

[142] N. D. Machado, M. A. Fernández, M. Häring, C. Saldías, and D. D. Díaz, “Niosomes encapsulated in biohydrogels for tunable delivery of phytoalexin resveratrol,” *RSC Adv*, vol. 9, no. 14, pp. 7601–7609, 2019, doi: 10.1039/C8RA09655D.

[143] D. A. S. Agostinho *et al.*, “Properties of κ-carrageenan aerogels prepared by using different dissolution media and its application as drug delivery systems,” *Mater Chem Phys*, vol. 253, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.123290.

[144] M. Khotimchenko *et al.*, “Antitumor potential of carrageenans from marine red algae,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 246. Elsevier Ltd, Oct. 15, 2020. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116568.

[145] A. M. Bakry, J. Huang, Y. Zhai, and Q. Huang, “Myofibrillar protein with κ- or λ-carrageenans as novel shell materials for microencapsulation of tuna oil through complex coacervation,” *Food Hydrocoll*, vol. 96, pp. 43–53, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.04.070.

[146] V. T. N. T. Bui, B. T. Nguyen, T. Nicolai, and F. Renou, “Mobility of carrageenan chains in iota- and kappa carrageenan gels,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 562, pp. 113–118, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfa.2018.11.017.

[147] L. Li, Z. Zhang, and J. Xu, “A generalized nonlinear H∞ filter design for discrete-time Lipschitz descriptor systems,” in *Nonlinear Analysis: Real World Applications*, Jan. 2014, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.nonrwa.2013.04.003.

[148] K. Alba and V. Kontogiorgos, “Seaweed polysaccharides (agar, alginate carrageenan),” in *Encyclopedia of Food Chemistry*, Elsevier, 2018, pp. 240–250. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21587-4.

[149] J. Rey Apostol Romal and S. Kee Ong, “Marine polysaccharide-based hydrogels for critical materials selective removal and recovery: A review,”

Coordination Chemistry Reviews, vol. 482. Elsevier B.V., May 01, 2023. doi: 10.1016/j.ccr.2023.215054.

[150] J. Liu, X. Zhan, J. Wan, Y. Wang, and C. Wang, "Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects," *Carbohydrate Polymers*, vol. 121. Elsevier Ltd, pp. 27–36, May 05, 2015. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.11.063.

[151] S. Kara, E. Arda, B. Kavzak, and Ö. Pekcan, "Phase transitions of κ-carrageenan gels in various types of salts," *J Appl Polym Sci*, vol. 102, no. 3, pp. 3008–3016, Nov. 2006, doi: 10.1002/app.24662.

[152] M. Tako, Y. Tamaki, T. Teruya, and Y. Takeda, "The Principles of Starch Gelatinization and Retrogradation," *Food Nutr Sci*, vol. 05, no. 03, pp. 280–291, 2014, doi: 10.4236/fns.2014.53035.

[153] Q. Xiao, Y. Xiao, and H. Tan, "Changes to soil conservation in the Three Gorges Reservoir Area between 1982 and 2015," *Environ Monit Assess*, vol. 192, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1007/s10661-019-7983-1.

[154] R. C. Silva, M. G. Trevisan, and J. S. Garcia, "B-galactosidase Encapsulated in Carrageenan, Pectin and Carrageenan/Pectin: Comparative Study, Stability and Controlled Release," *An Acad Bras Cienc*, vol. 92, no. 1, 2020, doi: 10.1590/0001-3765202020180609.

[155] L. Gu, D. J. McClements, J. Li, Y. Su, Y. Yang, and J. Li, "Formulation of alginate/carrageenan microgels to encapsulate, protect and release immunoglobulins: Egg Yolk IgY," *Food Hydrocoll*, vol. 112, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106349.

[156] C. Soukoulis *et al.*, "Modulation of chemical stability and *in vitro* bioaccessibility of beta-carotene loaded in kappa-carrageenan oil-in-gel emulsions," *Food Chem*, vol. 220, pp. 208–218, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.175.

[157] Z. Zhang *et al.*, "Encapsulation of curcumin in polysaccharide-based hydrogel beads: Impact of bead type on lipid digestion and curcumin bioaccessibility," *Food Hydrocoll*, vol. 58, pp. 160–170, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.02.036.

[158] Z. Zhang, R. Zhang, L. Chen, and D. J. McClements, "Encapsulation of lactase (β-galactosidase) into κ-carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity," *Food Chem*, vol. 200, pp. 69–75, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.014.

[159] C. Xie, Q. Wang, R. Ying, Y. Wang, Z. Wang, and M. Huang, "Binding a chondroitin sulfate-based nanocomplex with kappa-carrageenan to enhance the stability of anthocyanins," *Food Hydrocoll*, vol. 100, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105448.

[160] S. Kahya, E. K. Solak, and O. Şanli, "Sodium alginate/poly(vinyl alcohol) alloy membranes for the pervaporation, vapour permeation and vapour permeation with temperature difference separation of dimethylformamide/water mixtures: A comparative study," *Vacuum*, vol. 84, no. 9, pp. 1092–1102, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.vacuum.2010.01.033.

[161] N. G. Voron'ko, S. R. Derkach, M. A. Vovk, and P. M. Tolstoy, "Complexation of κ-carrageenan with gelatin in the aqueous phase analysed by 1H NMR kinetics and relaxation," *Carbohydr Polym*, vol. 169, pp. 117–126, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.010.

[162] S. R. Derkach *et al.*, "Molecular structure and properties of κ-carrageenan-gelatin gels," *Carbohydr Polym*, vol. 197, pp. 66–74, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.063.

[163] J. Feng *et al.*, "Preparation of black-pearl reduced graphene oxide–sodium alginate hydrogel microspheres for adsorbing organic pollutants," *J Colloid Interface Sci*, vol. 508, pp. 387–395, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.jcis.2017.07.113.

[164] F. Yu, T. Cui, C. Yang, X. Dai, and J. Ma, "K-Carrageenan/Sodium alginate double-network hydrogel with enhanced mechanical properties, anti-swelling, and adsorption capacity," *Chemosphere*, vol. 237, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124417.

[165] S. Sarıyer, D. Duranoğlu, Ö. Doğan, and İ. Küçük, "pH-responsive double network alginate/kappa-carrageenan hydrogel beads for controlled protein release: Effect of pH and crosslinking agent," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 56, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101551.

[166] W. Wang, R. Sun, and Q. Xia, "Influence of gelation of internal aqueous phase on *in vitro* controlled release of W1/O/W2 double emulsions-filled alginate hydrogel beads," *J Food Eng*, vol. 337, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2022.111246.

[167] C. Yang, Z. Zhang, L. Liu, Y. Li, X. Dong, and W. Chen, "Fabrication of soy protein isolate/κ-carrageenan hydrogels for release control of hydrophilic compounds: Flax lignans," *Int J Biol Macromol*, vol. 223, pp. 821–829, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.007.

[168] A. G. da Silva Carvalho, M. T. da Costa Machado, H. D. de Freitas Queiroz Barros, C. B. B. Cazarin, M. R. Maróstica Junior, and M. D. Hubinger, "Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation," *Powder Technol*, vol. 345, pp. 283–291, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.powtec.2019.01.016.

[169] M. Betz and U. Kulozik, "Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels," *Procedia Food Sci*, vol. 1, pp. 2047–2056, 2011, doi: 10.1016/j.profoo.2011.10.006.

[170] R. P. Heaney, "Bioavailability of Nutrients and Other Bioactive Components from Dietary Supplements." *Factors Influencing the Measurement of Bioavailability*, 2001.

[171] V. S. Srinivasan, "Bioavailability of nutrients: a practical approach to *in vitro* demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products", *The Journal of nutrition*, vol. 131(4), pp.1349S-1350S, 2001.

[172] J. M. Carbonell-Capella, M. Buniowska, F. J. Barba, M. J. Esteve, and A. Frígola, "Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A

review," *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 13, no. 2, pp. 155–171, Mar. 2014, doi: 10.1111/1541-4337.12049.

[173] M. J. Rein, M. Renouf, C. Cruz-Hernandez, L. Actis-Goretta, S. K. Thakkar, and M. da Silva Pinto, "Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy," *Br J Clin Pharmacol*, vol. 75, no. 3, pp. 588–602, Mar. 2013, doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.

[174] P. C. H. Hollman A', M. N. C. E. B1jsman, Y. Van Gameren, E. E. Cnossen, J. H. M. De, and M. B. Katan, "The Sugar Moiety is a Major Determinant of the Absorption of Dietary Flavonoid Glycosides in Man," *Free radical research*, Vol. 31, pp. 569-573, 1999.

[175] I. Erlund *et al.*, "Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers," *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 56, no. 8, pp. 545–553, 2000, doi: 10.1007/s002280000197.

[176] G. Williamson and M. N. Clifford, "Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity?," *British Journal of Nutrition*, vol. 104, no. SUPPL.3. Oct. 2010. doi: 10.1017/S0007114510003946.

[177] K. Németh *et al.*, "Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans," *Eur J Nutr*, vol. 42, no. 1, pp. 29–42, Jan. 2003, doi: 10.1007/s00394-003-0397-3.

[178] D. B. Rodrigues, L. R. B. Mariutti, and A. Z. Mercadante, "An: *In vitro* digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: Moving forward towards standardization," *Food Funct*, vol. 7, no. 12, pp. 4992–5001, Dec. 2016, doi: 10.1039/c6fo01293k.

[179] B. Halliwell, J. Rafter, and A. Jenner, "Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? 1-4," 2005.

[180] F. J. Barba, L. R. B. Mariutti, N. Bragagnolo, A. Z. Mercadante, G. V. Barbosa-Cánovas, and V. Orlien, "Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 67. Elsevier Ltd, pp. 195–206, Sep. 01, 2017. doi: 10.1016/j.tifs.2017.07.006.

[181] P. E. Milbury, G. Cao, R. L. Prior, and J. Blumberg, "Bioavailablility of elderberry anthocyanins," *Mechanisms of Ageing and Development*, Elsevier Ltd, vol. 123 pp. 997–10062002.

[182] G. J. McDougall, P. Dobson, P. Smith, A. Blake, and D. Stewart, "Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system," *J Agric Food Chem*, vol. 53, no. 15, pp. 5896–5904, Jul. 2005, doi: 10.1021/jf050131p.

[183] A. C. Kurilich, B. A. Clevidence, S. J. Britz, P. W. Simon, and J. A. Novotny, "Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots," *J Agric Food Chem*, vol. 53, no. 16, pp. 6537–6542, Aug. 2005, doi: 10.1021/jf050570o.

[184] B.E. Ozcan, O. Sagdic, S. Karasu, K. Ozkan, A. Akcicek, “Optimization of phenolic compounds extraction from purple basil leaf by conventional and microwave assisted extraction methods”, *Latin American Applied Research*, vol. 51, no. 4, pp. 285–292, 2021, doi: 10.52292/j.laar.2021.569.

[185] M.M. Giusti, R.E. Wrolstad, “Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy,” *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00.

[186] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, “Analysis of Total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent,” *Methods in Enzymol*, Elsevier, Vol. 299, pp.152–178, 1999. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

[187] J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming, “The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals,” *Food Chem*istry. 64 (4) Elsevier, pp. 555–559, 1999. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2.

[188] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26 (9–10), pp. 1231–1237, 1999. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

[189] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, “I.F.F. Benzie, J.J. Strain, “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “‘antioxidant power’”: the FRAP assay,” *Analytical Biochemistry*, Elsevier, vol. 239 (1), pp. 70–76, 1996. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292.

[190] A. Karadag *et al.*, “Enrichment of lecithin with phenolics from olive mill wastewater by cloud point extraction and its application in vegan salad dressing,” *J Food Process Preserv*, vol. 46, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.1111/jfpp.16645.

[191] D. Ma, Z. C. Tu, H. Wang, Z. Zhang, and D. J. McClements, “Microgel-in-Microgel Biopolymer Delivery Systems: Controlled Digestion of Encapsulated Lipid Droplets under Simulated Gastrointestinal Conditions,” *J Agric Food Chem*, vol. 66, no. 15, pp. 3930–3938, Apr. 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.8b00132.

[192] E. S. Chan, B. B. Lee, P. Ravindra, and D. Poncelet, “Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 338, no. 1, pp. 63–72, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.jcis.2009.05.027.

[193] A. Brodkorb *et al.*, “INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion,” *Nat Protoc*, vol. 14, no. 4, pp. 991–1014, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.

[194] M. Nazir *et al.*, “Differential Production of Phenylpropanoid Metabolites in Callus Cultures of Ocimum basilicum L. With Distinct *in Vitro* Antioxidant Activities and in Vivo Protective Effects against UV stress,” *J Agric Food Chem*, vol. 67, no. 7, pp. 1847–1859, Feb. 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.8b05647.

[195] M. Nazir *et al.*, "Interactive effect of melatonin and UV-C on phenylpropanoid metabolite production and antioxidant potential in callus cultures of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*)," *Molecules*, vol. 25, no. 5, Feb. 2020, doi: 10.3390/molecules25051072.

[196] G. Zaman *et al.*, "Effects of yeast extract on the production of phenylpropanoid metabolites in callus culture of purple basil (Ocimum Basilicum L. var purpurascens) and their in-vitro evaluation for antioxidant potential," *Plant Cell Tissue Organ Cult*, vol. 150, no. 3, pp. 543–553, Sep. 2022, doi: 10.1007/s11240-022-02303-7.

[197] U. Szymanowska, U. Złotek, M. Karaś, and B. Baraniak, "Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors," *Food Chem*, vol. 172, pp. 71–77, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.043.

[198] M. C. Luna, F. Bekhradi, F. Ferreres, M. J. Jordán, M. Delshad, and M. I. Gil, "Effect of Water Stress and Storage Time on Anthocyanins and Other Phenolics of Different Genotypes of Fresh Sweet Basil," *J Agric Food Chem*, vol. 63, no. 42, pp. 9223–9231, Oct. 2015, doi: 10.1021/acs.jafc.5b04131.

[199] F. Fernandes *et al.*, "*Ocimum basilicum* var. Purpurascens leaves (red rubin basil): A source of bioactive compounds and natural pigments for the food industry," *Food Funct*, vol. 10, no. 6, pp. 3161–3171, Jun. 2019, doi: 10.1039/c9fo00578a.

[200] F. Shi, Y. Chang, J. Shen, G. Chen, and C. Xue, "A comparative investigation of anionic polysaccharides (sulfated fucan, ι-carrageenan, κ-carrageenan, and alginate) on the fabrication, stability, rheology, and digestion of multilayer emulsion," *Food Hydrocoll*, vol. 134, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108081.

[201] C. Burgos-Díaz, T. Wandersleben, A. M. Marqués, and M. Rubilar, "Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 25. Elsevier Ltd, pp. 51–57, Oct. 01, 2016. doi: 10.1016/j.cocis.2016.06.014.

[202] F. Shi, X. Tian, Y. Chang, J. Shen, and C. Xue, "Structure-function relationships between the primary structural properties and multilayer emulsion-fabricating function of an anionic polysaccharide (sulfated fucan)," *Food Hydrocoll*, vol. 125, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.107426.

[203] T. Beldarrain-Iznaga, R. Villalobos-Carvajal, J. Leiva-Vega, and E. Sevillano Armesto, "Influence of multilayer microencapsulation on the viability of *Lactobacillus casei* using a combined double emulsion and ionic gelation approach," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 124, pp. 57–71, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.fbp.2020.08.009.

[204] A. Bušić *et al.*, "Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (Taraxacum officinale L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials," *Food Research International*, vol. 111, pp. 244–255, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.034.

[205] X. Qi, S. Simsek, B. Chen, and J. Rao, "Alginate-based double-network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated

sequential gastrointestinal digestion: Effect of biopolymer type and concentrations," *Int J Biol Macromol*, vol. 165, pp. 1675–1685, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.028.

[206] M. G. Sankalia, R. C. Mashru, J. M. Sankalia, and V. B. Sutariya, "Physicochemical characterization of papain entrapped in ionotropically cross-linked kappa-carrageenan gel beads for stability improvement using Doehlert shell design," *J Pharm Sci*, vol. 95, no. 9, pp. 1994–2013, 2006, doi: 10.1002/jps.20665.

[207] J. Moreira Mar *et al.*, "Development of alginate/inulin carrier systems containing non-conventional Amazonian berry extracts," *Food Research International*, vol. 139, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109838.

[208] Q. Li *et al.*, "Improving probiotic (Lactobacillus casei) viability by encapsulation in alginate-based microgels: Impact of polymeric and colloidal fillers," *Food Hydrocoll*, vol. 134, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108028.

[209] H. P. Lim, C. W. Ooi, B. T. Tey, and E. S. Chan, "Controlled delivery of oral insulin aspart using pH-responsive alginate/κ-carrageenan composite hydrogel beads," *React Funct Polym*, vol. 120, pp. 20–29, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2017.08.015.

[210] T. Sathasivam, S. Muniyandy, L. H. Chuah, and P. Janarthanan, "Encapsulation of red palm oil in carboxymethyl sago cellulose beads by emulsification and vibration technology: Physicochemical characterization and *in vitro* digestion," *J Food Eng*, vol. 231, pp. 10–21, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2018.03.008.

[211] M. T. Nickerson and A. T. Paulson, "Rheological properties of gellan, κ-carrageenan and alginate polysaccharides: Effect of potassium and calcium ions on macrostructure assemblages," *Carbohydr Polym*, vol. 58, no. 1, pp. 15–24, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.carbpol.2004.06.016.

[212] Z. Mohamadnia, M. J. Zohuriaan-Mehr, K. Kabiri, A. Jamshidi, and H. Mobedi, "Ionically cross-linked carrageenan-alginate hydrogel beads," *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 19, no. 1, pp. 47–59, Jan. 2008, doi: 10.1163/156856208783227640.

[213] M. Yao *et al.*, "Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles," *Food Hydrocoll*, vol. 83, pp. 246–252, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.05.024.

[214] L. Li, J. Zhao, Y. Sun, F. Yu, and J. Ma, "Ionically cross-linked sodium alginate/κ-carrageenan double-network gel beads with low-swelling, enhanced mechanical properties, and excellent adsorption performance," *Chemical Engineering Journal*, vol. 372, pp. 1091–1103, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.cej.2019.05.007.

[215] V. Paşcalau *et al.*, "The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films," in *Journal of Alloys and Compounds*, Sep. 2012. doi: 10.1016/j.jallcom.2011.12.026.

[216] E. Sogut, A. M. Ili Balqis, Z. A. Nur Hanani, and A. C. Seydim, "The properties of κ-carrageenan and whey protein isolate blended films containing pomegranate seed oil," *Polym Test*, vol. 77, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.polymertesting.2019.05.002.

[217] S. H. Ching, N. Bansal, and B. Bhandari, "Alginate gel particles–A review of production techniques and physical properties," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 57, no. 6, pp. 1133–1152, Apr. 2017, doi: 10.1080/10408398.2014.965773.

[218] E. A. Günter and O. V. Popeyko, "Delivery system for grape seed extract based on biodegradable pectin-Zn-alginate gel particles," *Int J Biol Macromol*, vol. 219, pp. 1021–1033, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.040.

[219] L. Jaiswal, S. Shankar, and J. W. Rhim, "Carrageenan-based functional hydrogel film reinforced with sulfur nanoparticles and grapefruit seed extract for wound healing application," *Carbohydr Polym*, vol. 224, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115191.

[220] A. Rohman and Y. B. Che Man, "Quantification and classification of corn and sunflower oils as adulterants in olive oil using chemometrics and FTIR spectra," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1100/2012/250795.

[221] C. Sartori, D. S. Finch, B. Ralph, and K. Gilding, "Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR. spectroscopy," *Polymer (Guildf)*, Elsevier, vol. 38 pp. 43–51, 1997. https://doi.org/10.1016/S0032-3861(96)00458-2.

[222] Q. V. Bach and W. H. Chen, "Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review," *Bioresource Technology*, vol. 246. Elsevier Ltd, pp. 88–100, Dec. 01, 2017. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.087.

[223] C. Schick, "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, no. 6. pp. 1589–1611, Nov. 2009. doi: 10.1007/s00216-009-3169-y.

[224] K. S. Postolović, M. D. Antonijević, B. Ljujić, M. M. Kovačević, M. G. Janković, and Z. D. Stanić, "pH-Responsive Hydrogel Beads Based on Alginate, κ-Carrageenan and Poloxamer for Enhanced Curcumin, Natural Bioactive Compound, Encapsulation and Controlled Release Efficiency," *Molecules*, vol. 27, no. 13, Jul. 2022, doi: 10.3390/molecules27134045.

[225] A. Gouveia de Souza, J. C. Oliveira Santos, M. M. Conceição, M. C. Dantas Silva, and S. Prasad, "A Thermoanalytic and Kinetic Study of Sunflower Oil," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 21, no. 02, pp. 265–273.

[226] D. Yuan, X. Hao, G. Liu, Y. Yue, and J. Duan, "A novel composite edible film fabricated by incorporating W/O/W emulsion into a chitosan film to improve the protection of fresh fish meat," *Food Chem*, vol. 385, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132647.

[227] Z. Feyissa, G. D. Edossa, N. K. Gupta, and D. Negera, “Development of double crosslinked sodium alginate/chitosan based hydrogels for controlled release of metronidazole and its antibacterial activity,” *Heliyon*, vol. 9, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e20144.

[228] D. Zhang *et al.*, “Loadings of lycopene in emulsion and sodium alginate–K-carrageenan composite systems: Preparation, characterization, bioaccessibility, and kinetics,” *J Food Sci*, vol. 87, no. 6, pp. 2463–2473, Jun. 2022, doi: 10.1111/1750-3841.16167.

[229] R. Zhang *et al.*, “Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by spray/freeze-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility,” *LWT*, vol. 123, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2020.109097.

[230] H. W. Woo and J. S. Lee, “Characterization of electrospun Aronia melanocarpa fruit extracts loaded polyurethane nanoweb,” *Fashion and Textiles*, vol. 8, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s40691-021-00250-z.

[231] D. Baybaş, G. Serdaroğlu, and B. Semerci, “The composite microbeads of alginate, carrageenan, gelatin, and poly(lactic-co-glycolic acid): Synthesis, characterization and Density Functional Theory calculations,” *Int J Biol Macromol*, vol. 181, pp. 322–338, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.128.

[232] K. Chen and H. Zhang, “Alginate/pectin aerogel microspheres for controlled release of proanthocyanidins,” *Int J Biol Macromol*, vol. 136, pp. 936–943, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.138.

[233] M. Thommes, W. Blaschek, and P. Kleinebudde, “Effect of drying on extruded pellets based on κ-carrageenan,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 31, no. 2, pp. 112–118, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.ejps.2007.02.010.

[234] M. C. Otálora, J. G. Carriazo, L. Iturriaga, C. Osorio, and M. A. Nazareno, “Encapsulating betalains from Opuntia ficus-indica fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads,” *Food Chem*, vol. 202, pp. 373–382, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.115.

[235] G. Lee, S. In Park, H. Yi Shin, H. I. Joh, S. S. Kim, and S. Lee, “Simultaneous reactions of sulfonation and condensation for high-yield conversion of polystyrene into carbonaceous material,” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 122, pp. 426–436, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.jiec.2023.02.042.

[236] H. Gharanjig, M. Iri, M. Hosseinnezhad, K. Gharanjig, and S. M. Jafari, “Enhanced thermal stability of anthocyanins through natural polysaccharides from Angum gum and cress seed gum,” *J Food Sci*, vol. 87, no. 2, pp. 585–598, Feb. 2022, doi: 10.1111/1750-3841.16016.

[237] B. Bosio, P. Camiscia, P. Fuciños, L. Pastrana, G. A. Picó, and N. W. Valetti, “Adsorption properties and physical characterization of carrageenan/alginate macro and microspheres blended with flexible chain polymers,” *Food and Bioproducts Processing*, vol. 138, pp. 116–125, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.fbp.2023.01.006.

[238] A. George and P. S. Shrivastav, “Preparation and evaluation of chitosan-alginate/carrageenan hydrogel for oral drug delivery in the treatment of diabetes,” *J Bioact Compat Polym*, 2023, doi: 10.1177/08839115231183487.

[239] M. Vinceković *et al.*, “Structural and thermal study of mesomorphic dodecylammonium carrageenates,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 341, no. 1, pp. 117–123, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.jcis.2009.09.021.

[240] C. Larosa *et al.*, “Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses,” *Int J Biol Macromol*, vol. 115, pp. 900–906, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.138.

[241] D. Pedrali, S. Barbarito, and V. Lavelli, “Encapsulation of grape seed phenolics from winemaking byproducts in hydrogel microbeads – Impact of food matrix and processing on the inhibitory activity towards α-glucosidase,” *LWT*, vol. 133, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2020.109952.

[242] B. He *et al.*, “Loading of anthocyanins on chitosan nanoparticles influences anthocyanin degradation in gastrointestinal fluids and stability in a beverage,” *Food Chem*, vol. 221, pp. 1671–1677, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.120.

[243] B. Song, “Lotus leaf-inspired design of calcium alginate particles with superhigh drug encapsulation efficiency and pH responsive release,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 172, pp. 464–470, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.09.001.

[244] S. Saikia, N. K. Mahnot, and C. L. Mahanta, “Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying,” *Food Chem*, vol. 171, pp. 144–152, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.064.

[245] K. Kawabata, Y. Yoshioka, and J. Terao, “Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols,” *Molecules*, vol. 24, no. 2. MDPI AG, Jan. 21, 2019. doi: 10.3390/molecules24020370.

[246] M. Hidalgo *et al.*, “Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth,” *J Agric Food Chem*, vol. 60, no. 15, pp. 3882–3890, Apr. 2012, doi: 10.1021/jf3002153.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Ozcan, B. E., Karadag, A., Karakas, C. Y., & Saroglu, O. "Encapsulation of Anthocyanins of Purple Basil Leaf" International Maldia Health Sciences Congress, 14-16 October, 2022, Malatya, Turkey, oral presentation, p.p. 247.

Makaleler

1. Ozcan, B. E., Saroglu, O., Karakas, C. Y., & Karadag, A. 2023. Encapsulation of purple basil leaf extract by electrospraying in double emulsion (W/O/W) filled alginate-carrageenan beads to improve the bioaccessibility of anthocyanins. *International journal of biological macromolecules*, 250, 126207.

Projeler

1. "Reyhan Yaprağı Antosiyaninlerinin Emüljel Hibrit Sistem ile Enkapsülasyonu", Tübitak 1002-Hızlı Destek Programı, Yürütücü: Başak Ebru ÖZCAN, Danısman: Ayşe KARADAĞ, 01/09/2022-01/09/2023