

B₁ vitamininin ikili emülsiyon yöntemi ile kapsüllenmesi

Program Kodu: 1002

Proje No: 214O615

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Servet Gülüm ŞÜMNÜ

Araştırmacı:

Prof. Dr. Serpil ŞAHİN

OCAK 2016

ANKARA

ÖNSÖZ

Bu projenin ana amacı, ikili emülsiyon yöntemiyle B₁ vitamininin kapsüllenmesidir. Ayrıca stabil ikili emülsiyon elde etmek için en uygun emülgatör konsantrasyonu ve çeşidi ve en uygun homojenizasyon yöntemi belirlenmiştir. Elde edilen ikili emülsiyonlar sadece B₁ vitaminin değil suda çözünen diğer değerli bileşenlerin hapsedilmesi için kullanılabilir.

TOVAG 214O615 numaralı proje ile TÜBİTAK tarafından teçhizat, sarf malzeme ve yüksek lisans öğrencisine burs desteği verilmiştir. Projede elde edilen sonuçlardan bir adet yurt dışı makale çıkartılması planlanmaktadır.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2. GEREÇ VE YÖNTEM	4
2.1 Materyal	4
2.2 Birincil emülsiyonun hazırlanması	4
2.3 İkili emülsiyonun oluşturulması	5
2.4 Emülsiyonların karakterize edilmesi	5
2.4.1 Birincil emülsiyon çeşidinin belirlenmesi	5
2.4.2 İkili emülsiyon oluşumunun kontrol edilmesi	5
2.4.3 Parçacık boyutu analizleri	5
2.4.4 Stabilite analizleri	6
2.5 İkili emülsiyonların kaplama özelliklerinin belirlenmesi	6
2.5.1.Dış su fazına geçen vitamin miktarı ile kaplama stabilitesinin belirlenmesi	7
2.5.2.İç su fazında hapsedilen vitamin miktarı ile kaplama veriminin belirlenmesi	8
2.6 Kapsüllenmiş B ₁ vitaminin sıcaklık ve pH'ya dayanıklılığı üzerine olan etkisinin incelenmesi.....	8
2.7 İstatistiksel analizler.....	9
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	10
3.1 Birincil emülsiyon için emülgatör çeşidi ve miktarının belirlenmesi.....	10
3.2 Lesitin-PGPR karışım oranının ikili emülsiyon özelliklerine olan etkisi	12
3.3 Mikro-akışkanlaştırıcı (MA) yönteminin ikili emülsiyon üzerine etkisinin incelenmesi... 16	
3.4 Ultrasonikasyon (US) yönteminin ikili emülsiyon üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	17
3.6 İkili emülsiyonların kaplama özellikleri	26
3.6.1 Dış su fazına geçen vitaminin kaplama stabilitesi	26
3.6.2 İçteki su fazında hapsedilebilen vitaminin kaplama verimi	27
3.7 Sıcaklığın ikili emülsiyon ile kaplanan B ₁ vitaminine olan etkisi.....	28
3.7 pH'nın ikili emülsiyon ile kaplanan B ₁ vitaminine olan etkisi	29
4.SONUÇ	31
5. KAYNAKLAR.....	32

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Birincil emülsiyon çeşidinin belirlenmesi için çözünme testi sonuçları	11
Tablo 2 Lesitin– PGPR kombinasyonunun ikili emülsiyon stabilitesi üzerine olan etkisi	14
Tablo 3 Lesitin– PGPR kombinasyonunun ikili emülsiyon parçacık boyutu özellikleri üzerine etkisi	15
Tablo 4. MA döngü sayısının %1,5 lesitin ve %1,5 PGPR içeren ikili emülsiyonun stabilitesine (%) olan etkisi	17
Tablo 5. MA döngü sayısının %1,5 lesitin ve %1,5 PGPR içeren ikili emülsiyonun parçacık boyutuna olan etkisi.....	18
Tablo 6. US uygulama zamanının ikili emülsiyonun stabilitesine olan etkisi	19
Tablo 7. US uygulama zamanın ikili emülsiyonun parçacık boyutu özelliklerine etkisi	20
Tablo 8. Birincil emülsiyon oluşturma yönteminin stabilite üzerine etkisi	23
Tablo 9. Birincil emülsiyon oluşturma yönteminin parçacık boyutu özellikleri üzerine etkisi ..	24
Tablo 10. Saklama süresinin ikili emülsiyonunun kaplama stabilitesi/verimi üzerine etkisi	27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Birincil ve ikili emülsiyonların mikroskop görüntüleri.....	13
Şekil 2. Farklı yöntemler ile elde edilen birincil emülsiyonlardan hazırlanan ikili emülsiyonların mikroskop görüntüleri.....	22
Şekil 3. Birincil emülsiyon oluşturma yönteminin parçacık boyutu dağılımına etkisi.	25
Şekil 4. İkili emülsiyona farklı zamanlarda uygulanan santrifüj sonrası iç su fazındaki vitamin miktarı.....	28
Şekil 5. 90 °C sıcaklığa maruz bırakılan vitaminin zamanla değişimi.....	29
Şekil 6. B ₁ vitamin miktarının pH ile değişimi	30
Şekil 7. B ₁ vitamin miktarının havuç suyunda zamanla değişimi.....	31

ÖZET

İkili emülsiyonların pek çok kullanım alanı olmasına rağmen gıda sektöründe henüz bu yöntemle üretilen bir ürün bulunmamaktadır. Bunun ana nedeni elde edilen ürünlerin saklama sırasında dayanıklı olmamalarıdır.

Suda çözünen B₁ vitamini (tiamin) ısı, ışık, nem ve alkali ortamdaki etkilenen hassas bir vitamindir. B₁ vitamininin işlem sırasında bozulmasına engel olmak için ikili emülsiyon yöntemi ile kapsüllenmesi çözüm olabilir. B₁ vitamininin şu ana kadar bu yöntemle lesitin kullanılarak kapsülenmesi konusunda literatürde hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer suda çözünür vitaminlerin bu yöntemle kapsüllenmesi konusundaki çalışmaların hepsinde sentetik poligliserol polirisinolat esterleri (PGPR) kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı su-yağ-su (S₁/Y/S₂) ikili emülsiyonunun iç su fazında B₁ Vitamininin hapsedilmesi ve ikili emülsiyon hazırlanırken kullanılan sentetik emülgatör (PGPR) yerine kısmen de olsa doğal bir emülgatör olan lesitin kullanılmasıdır.

Değişik konsantrasyonda PGPR ve lesitin içeren birincil emülsiyonlar yüksek hızlı karıştırma (YHK), mikroakışkanlı homojenizasyon (MH) ve ultrasonikasyon (US) olmak üzere farklı yöntemler uygulanarak hazırlanmıştır. Ardından, ikili emülsiyon elde etmek amacıyla sodyum kazeinat içeren su fazı birincil emülsiyona eklenmiştir. İkili emülsiyonlar parçacık boyutu ve stabilite açısından incelenmişlerdir. Enkapsülasyon stabilitesi ve verimi açısından en uygun emülsiyon hazırlama yöntemi ve koşullarını belirlemek amacıyla analizinin B₁ vitaminine göre hızlı olması sebebiyle B₁₂ Vitaminini belirteç olarak kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, B₁₂ Vitaminini B₁ vitamini ile değiştirilmiş ve sıcaklık ve pH'nın ikili emülsiyon yöntemiyle hapsedilen B₁ vitaminine olan etkisi araştırılmıştır. Kontrol olarak kapsüllenmemiş B₁ vitamini kullanılmıştır.

En stabil S₁/Y emülsiyonları %1,5 lesitin ve %1,5 PGPR kombinasyonu kullanıldığında elde edilmiştir. Homojenizasyon metodları arasında ikili emülsiyon stabilitesi ve parçacık boyutu açısından farklılık bulunmuştur. En stabil ikili emülsiyon YHK yöntemi ile elde edilmiştir. İkili emülsiyon yöntemiyle B₁₂ vitamininin %96,7'den daha fazlasının kapsüllenebildiği bulunmuştur. İkili emülsiyon yöntemiyle kapsüllemenin B₁ vitamininin pH ile bozulmasına engel olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Emülsiyon, Enkapsülasyon, Lesitin, Stabilite, Tiamin

ABSTRACT

Although double emulsions have many applications, there is no product in the food market yet due to the instability of the products during the storage.

Water soluble vitamin B₁ (thiamin) is sensitive to heat, light, humidity and alkali medium. Using double emulsion method can be a solution to prevent loss of vitamin B₁ during processing. There is no study in literature on encapsulation of Vitamin B₁ by using this method and lecithin so far. In all studies about encapsulation of water soluble vitamins, synthetic PGPR is used. The aim of this study is to encapsulate Vitamin B₁ in water-in-oil-in-water (W₁/O/W₂) double emulsion and to replace the synthetic emulsifier (PGPR) partially with a natural one, lecithin.

Two-step homogenization method was used to prepare double emulsions. Primary emulsions, containing PGPR and lecithin at different concentrations were prepared by using different homogenization processes such as high speed homogenization (HSH), microfluidization (MF) and ultrasonication (US). Then, primary emulsion was mixed with aqueous phase containing sodium caseinate to obtain double emulsion. Particle size and stability of double emulsions were analyzed. Since its analysis is faster, Vitamin B₁₂ was used as a marker to determine the suitable method and conditions for encapsulation stability and efficiency. Considering the results, Vitamin B₁₂ was replaced by Vitamin B₁ and the effects of temperature and pH on vitamin B₁ which was entrapped was investigated. As a control uncapsulated vitamin B₁ was used.

The most stable W/O emulsions were obtained when 1.5% lecithin 1.5% PGPR combination was used. Significant difference was determined between homogenization methods in terms of stability and particle size and the most stable double emulsion was obtained by using HSH. More than 96.7% vitamin B₁₂ could be encapsulated by using double emulsion. Double emulsion method prevented the destruction of vitamin B₁ by pH.

Keywords: Emulsion, Encapsulation, Lecithin, Stability, Thiamin

1. GİRİŞ

Bu çalışmanın amacı değişik emülgatör karışımları ve farklı homojenizasyon yöntemleri kullanılarak ikili emülsiyonlar oluşturulması ve ikili emülsiyon yöntemiyle B₁ vitamininin kapsüllenmesidir. Elde edilen emülsiyonlar stabilite, parçacık boyutu ve enkapsülasyon verimi açısından analiz edilmiş ve uygulanan yöntemler karşılaştırılmıştır. Emülsiyon oluşturmada en uygun koşulların bulunması amacıyla emülgatör ve stabilizatör konsantrasyonu ve homojenizasyon yöntemi değişken olarak seçilmiştir. İkili emülsiyonun içinde su fazında hapsedilen B₁ vitamininin sıcaklığa ve pH'ya karşı göstereceği dayanıklılığın araştırılması da araştırma kapsamındadır.

Su/yağ/su ikili emülsiyonu (S₁/Y/S₂), su damlacıklarının (S₁) yağ globülleri (Y) içinde dağılması ve bu emülsiyonun ikinci bir sulu faz (S₂) içinde dağılmasıyla oluşmaktadır. İkili emülsiyon sistemi biri en içeride ve biri en dışarıda olmak üzere iki su fazı ve ortada yağ fazı ile lipofilik ve hidrofilik emülgatörlerle veya hidrokolloid ve proteinlerle stabilize edilen iki arayüz içermektedir. İkili emülsiyon değerli bileşenlerin kaplanması amacıyla son yıllarda kullanılan bir yöntemdir. Suda çözünen değerli bileşenler en içteki su fazında çözüneceğinden S₁/Y/S₂ emülsiyonları bu alanda başarıyla uygulanabilir.

B₁ vitamini şeker hastalığında, sinirsel hastalıklarda ve yaşlıların zihinsel fonksiyonlarını sürdürmeleri için gerekli olan bir vitamindir. B₁ vitaminin sıcaklıkla bozulup bozulmadığına dair literatürde çelişkili bilgiler vardır. Öte yandan B₁ vitaminin nötr ve alkali ortamlarda bozulduğu bilinmektedir. B₁₂ ve B₁ vitaminlerinin fizikokimyasal özellikleri benzerlik göstermektedir. Her ikisi de suda çözünmektedirler. B₁₂ vitaminin sıcaklık ve pH'ya dayanıklı bir vitamindir ve analizi çok kolaydır. Bu nedenle çalışmaya B₁₂ vitamini ile başlanmış ve ikili emülsiyon yöntemiyle B₁₂ vitaminin hapsedilebildiğinden emin olduktan sonra deneylere B₁ vitaminiyle devam edilmiştir. İkili emülsiyon yöntemiyle hapsedilen B₁ vitamininin sıcaklık ve pH açısından stabilitesi incelenmiştir.

İkili emülsiyon ve doğal emülgatör lesitin kullanılarak B₁ vitamininin kaplanması üzerine literatürde çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız bu çalışmayla elde ettiğimiz sonuçlardan SCI'e kayıtlı dergilerde yayın yapılması planlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

İkili emülsiyon, kendi içinde dağılmış birincil emülsiyonu faz olarak içeren bir yapı olduğu için oldukça karmaşık bir sistemdir. Söz konusu karmaşık yapı ikili emülsiyonun ilaç, biyomedikal, kozmetik gibi pek çok alanda kullanılmasını sağlarken henüz gıda sektöründe kullanımı bulunmamaktadır. Bunun en önemli nedeni emülsiyonu oluşturmaktaki zorluk ve bu ürünlerin dayanıklı olmamasıdır. Ancak son yıllarda pek çok araştırmacı ikili emülsiyonların gıda sektöründe de kullanılması amacıyla araştırmalar yürütmektedir. Bu araştırmalar düşük kalorili ve yağ oranı düşük ürünler elde edilmesi (Taki, 2008), aroma bileşenlerinin kapsülenmesi (Malone vd. 2003) ve toksik maddelerin uzaklaştırılması (Yan ve Pal, 2001) üzerinedir.

Karmaşık bir sistem olan ikili emülsiyonları hazırlamak zor bir iştir. İkili emülsiyonlar özellikle de pek çok bileşik içeren emülsiyonlar daha az dayanıklı oldukları için ticari olarak üretimleri de zorlaşmaktadır (Dalgleish, 2001). Stabilité birincil emülsiyonlarda olduğu gibi ikili emülsiyonlarda da kontrol edilmesi gereken en önemli özelliktir. Stabil bir ikili emülsiyon elde etmek için birincil emülsiyonun iyi hazırlanması ve uzun bir süre ayrışmadan beklemesi gerekmektedir. Araştırmada birincil emülsiyon hazırlamak için yüksek hızlı karıştırma, mikroakışkanlı homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemlerinin etkileri karşılaştırmıştır. Mikroakışkanlı homojenizasyon yöntemi emülsiyon oluşturmada başarılı bir yöntemdir, ancak sistem parametresi olan basınç ve döngü sayısı iyi ayarlanmalıdır. Aksi takdirde damlacıkların istenmeyen bir şekilde birleşmesi söz konusu olmaktadır (Sugiura vd., 2004). Ultrasonikasyon da stabil bir emülsiyon oluşturmak için kullanılan diğer bir yöntemdir. Kaci vd. (2014) yüksek enerjili ultrasonikasyon yöntemi ile emülgatör kullanmadan emülsiyon hazırlamış ve karmaşık yapılara zarar vermeden emülsiyon oluşturmak için bu yöntemi önermişlerdir.

İkili emülsiyon yöntemi, değerli bileşenlerin kapsülenmesi amacıyla son yıllarda kullanılmaktadır (Vasijevic vd., 2006). Değerli bileşen en içteki su fazında çözünür ve ortadaki yağ fazında çözünmezse $S_1/Y/S_2$ ikili emülsiyonlar başarıyla kullanılabilir. Bonnet vd. (2009) ikili emülsiyon yöntemiyle magnezyum kapsülenmesi, McClements vd. (2009) beta-karoten kapsülenmesi ve Bou ve ark (2014) ise riboflavin (B_2 vitamini) kapsülenmesi üzerine çalışmışlardır. Fechner vd. (2007) ise $S_1/Y/S_2$ ikili emülsiyon yöntemi ile B_{12} vitaminini kapsüle etmiş ve kapsülasyon verimi üzerine çalışmıştır. $S_1/Y/S_2$ İkili emülsiyonları suda çözünen biyoaktif bileşiklerin taşınması için potansiyel bir yöntem olarak görülmektedir. O'Regan and Mulvihill (2009) B_{12} vitamininin $S_1/Y/S_2$ ikili emülsiyonu ile kapsüle etmiş ve bu

vitaminin çok stabil olduğunu ve çalışmalarda hazırlanacak ikili emülsiyonların kapsülasyon özelliklerini değerlendirmek için oldukça uygun bir belirteç olduğunu ifade etmiştir. Diğer yandan, Giroux vd. (2013) B₁₂ vitaminini S₁/Y/S₂ ikili emülsiyon yöntemi ile kapsülenmiş ve peyniri bu yöntem ile vitamin bakımından zenginleştirmeye çalışlardır. B₁₂ ve B₁ vitaminlerinin fizikokimyasal özellikleri benzerlik göstermektedir. Her ikisi de suda çözünmektedirler. Her iki vitamin de enkapsülasyonda kullanılan kaplama maddelerine göre küçük molekül ağırlıklarına sahiptir (B₁'in molekül ağırlığı 265.35 g/mol B₁₂'nin molekül ağırlığı 1355.37 g/mol). Bu doğrultuda, öngörülen araştırmada B₁₂ vitamini suda çözünen bileşiklerin kapsülenmesi için bir belirteç olarak kullanılacak ve istenilen özellikte ürünler elde edildikten sonra daha az stabil olan ve aynı aileden gelen B₁ Vitamini ile değiştirilerek ikili emülsiyon sisteminin kapsülasyon özellikleri araştırılacaktır. B₁ vitamini vücudun özellikle beyin enerji üretiminde kullanılan bir vitamindir. Bu vitamin öncelikle şeker hastalığında, sinirsel hastalıklarda ve yaşlıların zihinsel fonksiyonlarını sürdürmeleri için gereklidir. Cooksey vd. (1990) gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan katı- sıvı özütlemesi, ağartma işlemleri ve özellikle de alkali ortamda uygulanan ısı işlemlerin hammaddede bulunan B₁ vitaminini azalttığını belirtmişlerdir. B₁ vitamininin sıcaklıkla bozulduğuna dair literatürde çelişkili ifadeler vardır. Bazı araştırmacıların B₁ vitaminin ısıya karşı duyarlı olduğu ve pişirmenin vitamin miktarının %20 ile %56'sı arasında azalmaya neden olabileceği belirtilmektedir (Batifoulier ve ark., 2005; Martinez-Villaluenga ve ark., 2009; Mihhalevski ve ark., 2013). Diğer yandan, B₁ vitamininin ısı işlem ile azalmadığını ifade eden araştırmacılar da mevcuttur. Örneğin Lassen ve ark. (2002) domuz etini 72°C sıcaklıkta pişirmişler ve bahse konu sıcaklığın vitamin miktarında azalmaya neden olmadığını belirtmişlerdir. B₁ vitaminin ikili emülsiyon yöntemiyle enkapsülasyonu üzerine yapılan tek çalışmada PGPR ve peynir altı suyu izolesi kullanılmıştır (Benichou ve ark., 2007)

PGPR özellikle çikolata endüstrisinde az yağlı çikolata üretiminde kullanılan yağ seven bir emülgatördür. Ancak PGPR'nin gıda ürünlerinde kullanılması kısıtlıdır. Avrupa'da gıdalarda olması gereken maksimum PGPR limiti 4 g/kg'dır. Ayrıca sentetik olan PGPR herhangi bir gıda ürünüde kullanıldığı zaman etiketinde belirtilmesi gerekmektedir (Wilson vd., 1998). Aynı zamanda PGPR gıdalarda %5 den daha fazla kullanıldığında istenmeyen bir tada neden olmaktadır. Bu nedenle PGPR yerine gıdalara daha uygun emülgatörler kullanılarak ikili emülsiyonların stabilitelerinin artırılması konusu önem taşımaktadır. Lesitin doğal bir emülgatördür ve gıda endüstrisinde işlevsel bir bileşik olarak pek çok işlemden kullanılmaktadır. Bu işlevsel özelliklerinden biri de emülgatör olarak görev almasıdır (Zou ve Akoh, 2013). Çikolata sektöründe ürün özelliklerini ayarlamak amacıyla PGPR ve lesitin

beraber kullanılmaktadır (Banford vd., 1970). Bu bilgiler göz önünde bulundurularak bu araştırmanın bir amacı da PGPR'ı doğal bir emülgatör olan lesitin ile değiştirmektir.

Fındık bitkisi sadece Avrupa ve Asya ikliminde yetişen bir bitki olup, Türkiye fındık üretimi ve ihracatı açısından sırayla yaklaşık %70 ve %82 gibi rakamlarla ilk sırada yer almaktadır (FAOstat, 2010). Kimyasal içerik ve yağ asidi profili bakımından zeytinyağına benzeyen fındık yağının, sağlık açısından yararları da bilinmesine rağmen gıda endüstrisinde yeterli miktarda kullanılmamaktadır. Fındıktan üretilen ürünler genellikle pastacılık ve şekerleme sektöründe katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda ülkemize özgü olan fındıktan elde edilen fındık yağının kullanım alanını genişletmek ve literatüre konu ile ilgili bilgiler eklemek amacıyla araştırmada yağ fazında fındık yağı kullanılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Çalışmada ikili emülsiyonun yağ fazı için rafine edilmiş fındık yağı kullanılmış olup, yerel bir marketten alınarak oda koşullarında saklanmıştır. PGPR Ülker A.Ş'den tedarik edilirken, lesitin Ludwigshafen (Lipoid® S 75, Ludwigshafen, Germany) firmasından alınmıştır. B₁₂ ve B₁ Vitaminleri, sodyum kazeinat ve sodyum azide Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) firmasından alınmıştır.

2.2 Birincil emülsiyonun hazırlanması

Değişik konsantrasyonlarda lesitin ve PGPR karıştırılarak (Tablo 1) fındık yağının içerisine ilave edilmiştir. Birincil emülsiyonun fazlar arasında basınç dengesini sağlamak amacıyla 0,6 g NaCl ve mikrobiyel koruma sağlanması amacıyla 0,02 g sodyum azide 100 g saflaştırılmış suda çözündürülmüş ve birincil emülsiyonun su fazı hazırlanmıştır. Yağ ve su fazının hazır olmasının ardından, emülgatör içeren değişik oranlarda yağ fazı ile değişik miktarlardaki su fazı birincil emülsiyon oluşturmak amacıyla 3 farklı yöntem ile karıştırılmıştır (Tablo 1). Yüksek Hızda Karıştırıcı (YHK) yöntemi için hazırlanan fazlar 18,000 dev/dk hızda 7 dk karıştırılmıştır. Ultrason (US) ve mikro-akışkanlaştırıcı (MA) yöntemleri için ekipmana homojen bir çözeltinin verilmesi gerektiği için fazlar YHK ile 18,000 dev/dk hızda 5 dk karıştırılarak ön homojenizasyona tabi tutulduktan sonra işlenmişlerdir. US için ön homojenizasyondan sonra karışımlar 160 W ve %50 darbeye US cihazı (Sonic Ruptor 400, OMNI International the Homogenizer Company, Kennesaw, GA, ABD) ile farklı sürelerde (10, 15 ve 20 dk) işlem görmüştür. MA için ön homojenizasyondan sonra karışımlar 103 MPa basınçta MA (M-110Y, Microfluidics, ABD) ile farklı döngü sayılarında (1, 2 ve 3) işlem

görmüştür. Uygulanan yöntemlerin karşılaştırılması için elde edilen ikili emülsiyonlar stabilite ve parçacık boyutu özellikleri bakımından incelenmiştir.

2.3 İkili emülsiyonun oluşturulması

Birincil emülsiyon hazırlama ikili emülsiyonun oluşturulması için ilk aşamadır. İkinci aşama ise elde edilen birincil emülsiyonun dış fazdaki su fazı ile karıştırılmasıdır. İkili emülsiyonun iç su fazı ve dış su fazı arasındaki osmotik basıncın dengelenmesi için dıştaki su fazına da %0,6 (g/g) NaCl ve mikrobiyel koruma için %0,02 (g/g) sodyum azide eklenerek tuzlu su çözeltisi elde edilmesinin ardından arap zıkkı (%5 ve 15) veya %11 (g/g) sodyum kazeinat (Sodyum kazeinat) ilave edilmiştir. İkili emülsiyon hazırlanırken ev tipi Mutfak Robotu (MR) (Arçelik Robolio, Türkiye) kullanılmıştır. Öncelikle MR'ye kullanıma hazır dış su fazı konulmuş ve cihaz gücü 2'ye ayarlanarak kısa bir süre (yaklaşık 30 saniye) karıştırılmıştır. Cihaz aynı güçte çalışırken birincil emülsiyon yavaş yavaş toplam 2 dakika sürede sisteme eklenmiştir. Birincil emülsiyonun eklenmesinin tamamlanmasının ardından sistem aynı koşullarda 3 dakika daha karıştırılmış ve ikili emülsiyon elde edilmiştir.

2.4 Emülsiyonların karakterize edilmesi

2.4.1 Birincil emülsiyon çeşidinin belirlenmesi

Birincil emülsiyon tipinin S/Y veya Y/S çeşidinde olup olmadığını belirlemek amacıyla çözünme testi uygulanmıştır. Bu test çok hızlı cevap veren bir testtir. Bu testte birincil emülsiyon, su fazına ve yağ fazına ayrı ayrı damlatılmış ve emülsiyonun hangi fazda çözündüğü gözlemlenmiştir. Çözünmenin yağ fazında gözlenmesi, bu emülsiyon tipinin S/Y olduğunu göstermektedir (Vermeir ve ark., 2014).

2.4.2 İkili emülsiyon oluşumunun kontrol edilmesi

Elde edilen emülsiyonların birincil emülsiyon mu yoksa ikili emülsiyon mu olduğunu gözlemlenmek amacıyla, hazırlanan emülsiyonlar mikroskopta (Zeiss, Primo Vert, Almanya) 40x'de incelenmiştir.

2.4.3 Parçacık boyutu analizleri

Birincil emülsiyonun ikili emülsiyon içindeki parçacık boyutu dağılımlarını görebilmek için parçacık boyutu analizörü (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, İngiltere) kullanılmıştır. Ölçümler yapılırken analizörün refraktif indeksi fındık yağının indeksi 1,4675 olduğu için bu rakama ayarlanırken, mutlak kırılma indeksi için 0,01 ve opaklık aralığı için % 8-25 aralığı seçilmiştir. Ölçüm esnasında sistem 2600 dev/dk hızla karıştırılmıştır. Parçacık özellikler hacim ağırlıklı ortalama parçacık boyutunu ifade eden $D[4,3]$ değeri

(Denklem 1), span (aralık) değeri (Denklem 2) ve özgül yüzey alanı (ÖYA) olarak gösterilmiştir. Bütün sonuçlar iki deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (1)$$

$$Span = \frac{[d(v,90) - d(v,10)]}{d(v,50)} \quad (2)$$

Denklemlerde n_i parçacık sayısı, d_i parçacık çapıdır; $d(v,90)$, $d(v,50)$, ve $d(v,10)$ ise toplam hacmin sırasıyla %90, %50 ve %10 luk kısımlarıdır. Diğer bir deyişle, $[d(v,90) - d(v,10)]$ değerlerin bulunduğu aralık, $d(v,50)$ ise ortalamadır.

2.4.4 Stabilite analizleri

İkili emülsiyonların stabiliteyi anlık stabilite ve saklama stabilitesi olmak üzere iki farklı yaklaşımla ifade edilmiştir.

Hazırlanan ikili emülsiyonların anlık stabiliteyi belirlemek için emülsiyonlar 5,000 dev/dk hızda 15 dk boyunca santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj sonrasında oluşan faz ayrışması ölçülmüş ve anlık stabilite (Denklem 3) hesaplanmıştır.

$$\text{Anlık stabilite} = [(Y_0 - Y_c) / Y_0] * 100 \quad (3)$$

Denklemde Y_c ayrışan birincil emülsiyon yüksekliği (cm), Y_0 ise ilk yüksekliktir (cm).

Hazırlanan ikili emülsiyonların bekleme stabiliteyi belirlemek için emülsiyonlar cam kapaklı tüpler içerisinde 30 °C sıcaklıkta beklemeye bırakılmıştır ve belirlenen zamanlarda (24 saat ve 48 saat sonra) oluşan faz ayrışması ölçülmüştür. Ölçülen faz ayrışması ile bekleme stabilitesi (Denklem 4) hesaplanmıştır.

$$\text{Bekleme stabilitesi} = [(B_0 - B_c) / B_0] * 100 \quad (4)$$

Denklemde B_c ayrışan birincil emülsiyon yüksekliği (cm), B_0 ise ilk yüksekliktir (cm).

2.5 İkili emülsiyonların kaplama özelliklerinin belirlenmesi

Araştırmada, ikili emülsiyonun kaplama özellikleri kaplama stabilitesi ve kaplama verimi olarak değerlendirilmiştir. Kaplama stabilitesi emülsiyonun iç su fazına eklenen vitaminin zamanla dıştaki su fazına geçiş miktarını gösterirken, kaplama verimi ikili emülsiyon sistemi

ile içteki su fazında hapsedilebilen vitamin miktarını ifade etmektedir (O'Regan & Mulvihill, 2009).

Bu çalışmada ikili emülsiyonun kaplama özellikleri iki farklı yöntem uygulanarak bulunmuştur. Birinci yöntem dıştaki su fazına geçen vitamin miktarının ölçülmesine dayanırken ikinci yöntem birincil emülsiyondaki vitamin miktarının bulunmasına dayanmaktadır.

2.5.1.Dış su fazına geçen vitamin miktarı ile kaplama stabilitesinin belirlenmesi

Birincil emülsiyon lesitin ile PGPR karışımının (% 1,5 lesitin ve % 1,5 PGPR, g/g) emülgatör olarak eklenmesi ve YHK ile 18,000 dev/dk hızla 7 dakika boyunca karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Elde edilen birincil emülsiyon (%40, g/g) ile dış su faz çözeltisi (%60, g/g) MR ile karıştırılarak ikili emülsiyon hazırlanmıştır. Birincil emülsiyonun su fazına %0,3 (g/g) miktarında B₁₂ vitamini eklenmiştir. Hazırlanan ikili emülsiyon 5000 dev/dk hızla, 15 dakika boyunca emülsiyonu fazlarını ayırmak amacıyla santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucu altta biriken dış su fazından örnek alınmıştır.

Bu yöntemin en kritik basamağı sodyum kazeinatın ortamdan uzaklaştırılması aşamasıdır. Ortamda bulunan sodyum kazeinat bulanıklığa neden olmakta ve bulanıklılık spektrofotometrik ölçümlerde istenmemektedir. Bu nedenle ortamda bulunan proteinler trikloroasetik asit çözeltisi (% 20, g/g) yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Santrifüjle elde edilen ve seyreltilen dış su fazı trikloroasetik asit çözeltisi ile seyreltilerek 5000 dev/dk hızla, 5 dakika boyunca santrifüjlenerek oluşan tortular ortamdan uzaklaştırılmıştır.

B₁₂ vitamin miktarı, elde edilen örneğin 0.45 µm'lik filtre kağıdından süzülmesinin ardından, 361 nm dalga boyundaki absorbansının spektrofotometre (PG Instruments LTD, T 70, UK) ile ölçülmesiyle bulunmuştur (O'Regan & Muhvihill, 2009). Örneğin içerisindeki vitamin miktarının bulunmasının ardından ikili emülsiyonun kaplama stabilitesi belirlenen zamanlarda (0, 24 ve 48 saat sonra) (Denklem 5) hesaplanmıştır.

$$\text{Kaplama stabilitesi \%} = [(M_i - M_o) * 100] / M_i \quad (5)$$

Denklemden M_i iç su fazına eklenen vitamin miktarı (mg), M_o ise ölçülen su fazındaki vitamin (mg) miktarıdır.

2.5.2 İç su fazında hapsedilen vitamin miktarı ile kaplama veriminin belirlenmesi

Bu yöntemin en kritik basamağı elde edilen ikili emülsiyonun tamamen fazlarına ayrıştırılması aşamasıdır. Çünkü bu yöntemde ikili emülsiyonun kaplama verimi, birincil emülsiyonun su fazındaki vitamin miktarının ölçülmesi ile hesaplanmıştır. Tamamen ayrışmadan emin olmak amacıyla hazırlanan ikili emülsiyona farklı zamanlarda santrifüj uygulanmıştır.

İkili emülsiyonun hazırlanmasının ardından elde edilen emülsiyon 5000 dev/dk hızla, 20 °C sıcaklığında farklı zamanlar (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dk) boyunca emülsiyonu fazlarını ayırmak amacıyla santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucu üstte biriken birincil emülsiyondan örnek alınmıştır. Emülsiyon sistemini bozmak ve fazlarına ayırmak amacıyla YHK ile önce 15,000 dev/dk hızla 5 dakika boyunca sonra da 5000 dev/dk hızla 15 dk boyunca santrifüjlenmiştir.

B₁₂ vitamin miktarı, elde edilen örneğin 0.45 µm'lik filtre kağıdından süzülmesinin ardından, 361 nm dalga boyunda absorbansının spektrofotometre (PG Instruments LTD, T 70, UK) ile ölçülmesiyle bulunmuştur (O'Regan & Muhvihill, 2009). Örneğin içerisinde vitaminin miktarının bulunmasının ardından ikili emülsiyonun kaplama verimi (Denklem 6) hesaplanmıştır.

$$\text{Kaplama verimi (\%)} = (M_o * 100) / M_i \quad (6)$$

Denklemde M_i iç su fazına eklenen vitamin miktarı (mg), M_o ise ölçülen vitamin (mg) miktarıdır.

2.6 Kapsüllenmiş B₁ vitaminin sıcaklık ve pH'ya dayanıklılığı üzerine olan etkisinin incelenmesi

B₁₂ vitamini diğer vitaminlere göre çevresel faktörlere daha dayanıklı bir bileşiktir. Ayrıca çözündüğünde ortamı renklendirme özelliği nedeniyle spektrofotometrik analizlerde kolaylık sağladığı için ikili emülsiyonun kaplama verimi/stabilitesi B₁₂ vitamini ile çalışılmıştır. Daha sonra daha hassas olan B₁ vitamini kullanılmıştır. Dolayısıyla ikili emülsiyonların iç su fazında B₁₂ vitamini yerine, B₁ vitamini (%3, g/g) eklenerek ikili emülsiyonlar hazırlanmıştır.

İkili emülsiyon içerisinde hapsedilen B₁ vitamin konsantrasyonu yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) kullanılarak belirlenmiştir (Kumar vd.,2006). Analiz için C18 kolonu kullanılmıştır.

Sıcaklığın etkisi üzerine çalışmak için hazırlanan ikili emülsiyonlar su banyosunda farklı sıcaklıklarda (30, 45, 60, 75 ve 90 °C) 20 dk bekletilmiştir. Sıcaklığa maruz bırakılan emülsiyonlar oda sıcaklığında 30 dk soğumaya bırakılmış ve fazlarına ayırştırmak için 5,000 dev/dk hızla 20 dk boyunca santrifüjlenmiştir.

Ortamın pH değerinin vitamin üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla içerisinde % 3 (g/g) B₁ vitaminini hapseden ikili emülsiyonlar pH değeri farklı ortamlara (4,2, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0) maruz bırakılmıştır. Ortamın pH değerini ayarlamak için Manyetik Karıştırıcı (MR 3,001 K, Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Almanya) ile karışan iç su fazına 0,1 M NaOH ve/veya 0,1 M HCl eklenmiştir. pH değeri ayarlanan ortam manyetik karıştırıcıda 7500 dev/dk hızla karıştırılmaya devam edilirken %10 (g/g) oranında ikili emülsiyon damla damla eklenmiştir. Yaklaşık 3 dk içerisinde çözeltiliye ikili emülsiyonun tamamının eklenmesinin ardından sistem 1 dk daha karıştırılmış ve 2 saat beklemeye bırakılmıştır. 2 saat bekletilen sistem YHK ile 15000 dev/dk hızla 3 dk boyunca karıştırılmış ve 5000 dev/dk hızla 15 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Ayrışan fazdaki vitamin miktarı ölçülmüştür.

Ayrıca, B₁ vitaminini (%3) hapseden ikili emülsiyon 6,6 pH değerine sahip havuç suyuna eklenmiştir. Vitamince zenginleştirilen havuç suyu buzdolabı koşullarında (4⁰ C) 2 gün boyunca beklemeye bırakılmış ve belirlenen zamanlarda (0, 12, 24, 36 ve 48 saat) içerisindeki vitamin miktarı ölçülmüştür. İkili emülsiyon sisteminin etkisinin incelenmesi için B₁ vitamininin doğrudan havuç suyuna eklenmesi de kontrol olarak çalışılmıştır.

2.7 İstatistiksel analizler

Çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki farkı görebilmek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. İkili emülsiyon oluşturulması deneylerinde emülgatör cinsi, emülgatör konsantrasyonu ve uygulanan yöntem değişken olarak seçilmiştir. Vitamin analiz çalışmalarında sıcaklık ve pH değişken olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak fark bulunduğu takdirde Duncan çoklu karşılaştırma yöntemiyle karşılaştırma yapılmıştır (p≤ 0.05). Analizlerde SAS 9.1 (SAS Institute Inc., NC, ABD) programı kullanılmıştır. Kullanılan bütün değerler iki tekrarın ortalamalarıdır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Proje dört kısımdan oluşmaktadır. İlk kısım, PGPR ile lesitinin değişik konsantrasyonlarda karıştırılması ile istenilen çeşitte birincil emülsiyonların oluşturulmasıdır. İkinci kısımda, homojenizasyon yönteminin ikili emülsiyonun özelliklerine etkisi incelenmiştir. Üçüncü kısımda ikili emülsiyon sisteminin B₁₂ vitamininin kaplama özelliği üzerine çalışılmış ve son kısımda sıcaklık ve pH'nın B₁ vitamininin dayanıklılığına olan etkisi çalışılmıştır.

3.1 Birincil emülsiyon için emülgatör çeşidi ve miktarının belirlenmesi

Çalışmanın en önemli amaçlarından birisi kimyasal emülgatör olan PGPR'ın doğal bir emülgatör olan lesitin ile kısmen de olsa değiştirilme olasılığının incelenmesidir. PGPR, ikili emülsiyon üzerine çalışan pek çok araştırmacı tarafından kullanılmakta ancak PGPR'ın vücuda alımı ile ilgili bir kısıtlama olduğu için gıda sektöründe kullanılmasında sıkıntıların yaşanması söz konusudur. (Wilson ve ark., 1998). Bu kapsamda, PGPR yerine doğal ve gıda sektöründe kullanılmasında sınırlama olmayan lesitin ile değiştirilmesi amaçlanmıştır (CODEX, 2013). Ancak çözünme testi sonuçları çalışmada kullandığımız lesitin ile S/Y (su içinde yağ) çeşidinde birincil emülsiyonun oluşturulamadığını göstermiştir (Tablo 1). İstenilen çeşitte birincil emülsiyon oluşturmak için seçilen parametreler emülgatör çeşidi, emülgatörlerin karışım konsantrasyonları ve emülsiyon fazlarının oranıdır. Elde edilen birincil emülsiyonların çeşidi çözünme testi ile belirlenirken diğer yandan oda sıcaklığında 3 saat bekletilen örneklerin stabilitelere bakılmıştır. Tablo 1'de görüldüğü gibi lesitin sadece Y/S (yağ içinde su) çeşidinde emülsiyon oluştururken PGPR sadece S/Y çeşidinde birincil emülsiyon oluşturmuştur. Bu noktada ikili emülsiyon sistemlerinde PGPR'ın miktarının azaltılması için PGPR ile lesitin karıştırılmış ve istenilen çeşitte diğer bir deyişle S/Y birincil emülsiyonun oluşturulabileceği tespit edilmiştir.

Tablo 1. Birincil emülsiyon çeşidinin belirlenmesi için çözünme testi sonuçları

Emülgatör çeşidi	Emülgatör Konsantrasyonu (g /100 g emülsiyon)	Faz Oranı (g su /g yağ)	Çeşit	Stabilite
Lesitin	8	40/60	Y/S	+
Lesitin	5	40/60	Y/S	+
Lesitin	2	40/60	Y/S	+
Lesitin	1	40/60	Y/S	+
Lesitin	5	20/80	*	-
Lesitin	2	20/80	*	-
Lesitin	1	20/80	*	-
Lesitin	3	80/20	Y/S	+-
Lesitin	6	60/40	Y/S	+-
PGPR	2	20/80	S/Y	+
PGPR	2	40/60	S/Y	+
PGPR	3	40/60	S/Y	+
Lesitin ve PGPR	1,5 ve 0,5	40/60	Y/S	+
Lesitin ve PGPR	1,5 ve 1,0	40/60	Y/S	+
Lesitin ve PGPR	1,5 ve 1,5	40/60	S/Y	+
Lesitin ve PGPR	2,0 ve 1,5	40/60	Y/S	+
Lesitin ve PGPR	0,5 ve 1,5	40/60	S/Y	+
Lesitin ve PGPR	1,5 ve 2,5	40/60	S/Y	+

“*” Her iki fazda da net bir çözünme yok

“+” Stabil emülsiyon elde edilmesi

“-” 30 dk sonra çökelme gözlenmesi ve bulanık bir süspansiyon elde edilmesi

“+” 3 saat içinde tamamen ayrışma gözlenmesi

S/Y ve Y/S tipindeki emülsiyonların stabilite mekanizmaları birbirinden farklıdır. Y/S tipi emülsiyonlar sterik ve elektrostatik geri itme kuvvetlerinin birlikte etkisi ile stabil hale gelirken, S/Y tipinde emülsiyonlar için baskın olan kuvvet sürekli fazın düşük elektrik iletkenliğinden kaynaklanan sterik kuvvetlerdir (Claesson ve ark., 2004). Bundan dolayı, farklı emülgatör çeşit ve oranları ile farklı çeşitte birincil emülsiyon oluşturulmasının nedeninin sistemde bulunan elektrotlarla emülgatörlerin farklı reaksiyonlar göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Mishchuk ve ark., 2004). Elektrot yoğunluğu sistemin hidrofilik/lipofilik

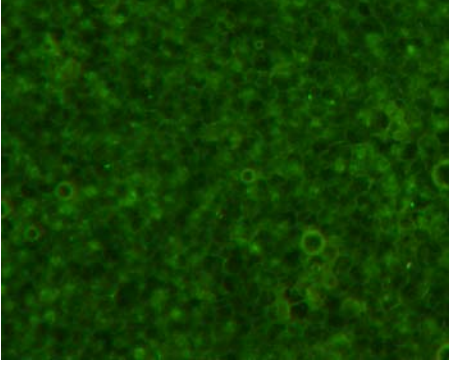
dengesini etkilemektedir (Kawashima ve ark., 1992). Dolayısıyla çalışmada emülsiyonun su fazına eklenen NaCl'ün lesitin ve PGPR üzerine farklı etkilerinin olabileceği düşünülmektedir. Thakur ve ark., (2007)'nin yapmış olduğu çalışma da bu düşüncüyü desteklemektedir. Emülgatör olarak lesitin kullanan Thakur ve arkadaşları (2007) ortamın tuz yoğunluğunu değiştirerek her emülsiyon sisteminin stabil olması için elektrotların içerilmesi gerektiğini (Kanouri ve ark., 2002) ve sistemde bulunan NaCl'ün ikili emülsiyonun stabilitesi ve kaplama özelliklerinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Sapei ve ark., 2012 and Scherze ve ark., 2006).

3.2 Lesitin-PGPR karışım oranının ikili emülsiyon özelliklerine olan etkisi

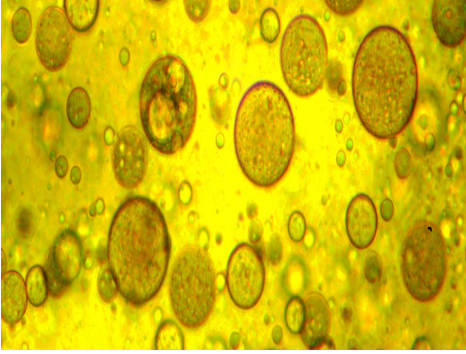
Çözünme testi sadece lesitin kullanılarak değil ancak lesitin ile PGPR birlikte kullanıldığında istenilen çeşitte birincil emülsiyonun elde edileceğini göstermektedir (Tablo 1). Çözünme testi sonuçları aynı zamanda karışımın hangi konsantrasyonlarda olabileceği konusunda da fikir vermektedir. Bu fikirler doğrultusunda, emülsiyonda PGPR miktarı sabit tutularak, PGPR ile lesitin farklı konsantrasyonlarda karıştırılmış ve bu karışımlardan elde edilen emülsiyonlar stabilite ve parçacık boyutu özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır.

İkincil emülsiyonda arap zıncı kullanıldığında dayanıklı bir emülsiyon elde etmek mümkün olmamıştır. Bu nedenle deneylere sodyum kazeinat kullanılarak devam edilmiştir.

Birincil emülsiyon ve ikili emülsiyonların oluşup oluşmadığından emin olmak amacıyla hazırlanan örnekler mikroskop altında incelenmiştir. Şekil 1, birincil emülsiyon ile ikili emülsiyon arasındaki farkı net bir şekilde ortaya koymaktadır. Birincil emülsiyonda 2 ayrı faz mevcutken, ikili emülsiyonda iç içe 3 ayrı faz bulunmaktadır.



A. Birincil emülsiyon



B. İkili emülsiyon

Şekil 1. Birincil ve ikili emülsiyonların mikroskop görüntüleri

Tablo 2, farklı PGPR-lesitin kombinasyonu ve sadece PGPR kullanılarak elde edilen ikili emülsiyonların anlık ve bekleme stabilitelerini göstermektedir. Tablodan da anlaşılacağı gibi sadece PGPR (1,5, 2,0 ve 3,0 g/100 g birincil emülsiyon) ve az miktarda lesitin içeren (0,5 g lesitin-1,5 g PGPR kombinasyonu ve 1,0 g lesitin-1,5 g PGPR kombinasyonu) ikili emülsiyonların bekleme stabiliteleri arasında istatistiksel bir fark bulunmazken ($p>0,05$), 1,5 g lesitin ve 1,5 g PGPR/100 g birincil emülsiyon içeren ikili emülsiyonlar diğerlerinden daha stabildir ve hazırlanan emülsiyonun yaklaşık olarak %95'i ayrışmadan kalabilmiştir ($p\leq 0,05$). Ayrıca, bu emülsiyon zamanla da diğerlerine göre daha stabil olup, 24 saat sonraki ayrışma oranı ile 48 saat sonra elde edilen ayrışma oranı istatistiksel olarak aynı bulunmuştur ($p>0,05$), diğer emülsiyonların stabiliteleri ise zamanla azalmıştır ($p<0,05$).

Tablo 2. Lesitin– PGPR kombinasyonunun ikili emülsiyon stabilitesi üzerine olan etkisi

Emülgatör çeşidi	Emülgatör Konsantrasyonu (g /100 g emülsiyon)	Anlık Stabilite (%) t=0	Bekleme Stabilitesi (%) t=24 saat	Bekleme Stabilitesi (%) t=48 saat
PGPR ve Lecithin	1,5 ve 0,5	47,1±0,51 ^{dc}	89,2±0,52 ^b	80,5±0,95 ^b
PGPR ve Lecithin	1,5 ve 1,0	52,9±1,51 ^b	91,4±0,45 ^b	83,8±0,45 ^b
PGPR ve Lecithin	1,5 ve 1,5	56,1±1,69 ^a	94,8±1,03 ^a	93,6±0,53 ^a
PGPR	1,5	44,4±0,11 ^{de}	89,6±0,06 ^b	80,0±1,26 ^b
PGPR	2,0	42,6±0,79 ^e	89,9±0,64 ^b	80,7±2,00 ^b
PGPR	3,0	48,7±1,41 ^c	90,8±1,53 ^b	82,3±2,05 ^b

Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a, b), değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Ushikubo ve Cunha (2014) içerisinde lesitin ve PGPR'ın da bulunduğu farklı emülgatörlerle S/Y tipinde emülsiyonlar elde edilmesi üzerine çalışmış ve 14 gün bekletilen örneklerde PGPR ile hazırlananların homojen olduğu ancak lesitin ile hazırlananlarda jelimsi bir yapı olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada da lesitin miktarındaki artış bahse konu jelimsi yapının güçlenmesini sağlamış, dolayısıyla daha stabil emülsiyon oluşmasını sağlamış olabilir.

PGPR-lesitin ya da sadece PGPR içeren S/Y tipindeki birincil emülsiyonların ikili emülsiyonun parçacık boyutu özelliklerine etkisi de incelenmiştir. Tablo 3 parçacık boyutu özelliklerini ve zamanla bu özelliklerin nasıl değiştiğini göstermektedir. Emülgatör miktarı ve çeşidinin ikili emülsiyon içerisinde dağılan birincil emülsiyonun D[4,3] değeri üzerinde etkisinin olduğu bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Ölçümler emülsiyon hazırlandıktan hemen sonra yapıldığında en düşük parçacık boyutu %1,5 lesitin ve %1,5 PGPR kombinasyonunu içeren emülsiyonlarda bulunmuştur. Sadece PGPR ile elde edilen ikili emülsiyonların aralık değerleri yaklaşık 1,2 olarak bulunurken, PGPR'a 0.5 g/100 gram emülsiyondan daha fazla miktarda lesitin eklenmesi aralık değerinin artarak yaklaşık 1,5 olmasını sağlamıştır. ÖYA bakımından ise %1,5 lesitin-PGPR kombinasyonunu ile %3,0 PGPR arasında bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), lesitin eklenmesi ise parçacık boyutunu azaltmıştır.

Tablo 3. Lesitin– PGPR kombinasyonunun ikili emülsiyon parçacık boyutu özellikleri üzerine etkisi

Emülgatör Çeşidi ve konsantrasyonu (%)	t=0			t=24 saat			t=48 saat		
	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Span	Aralık
PGPR (1.5) + Lecithin (0.5)	19,5±0,2 ^c	1,195±0,0 ^b	1481±15 ^c	18,7±0,1 ^b	1,294±0,1 ^a	1455±5 ^a	19.1±0.1 ^{ab}	1.290±0.0 ^a	1388±13 ^b
PGPR (1.5) + Lecithin (1.0)	17,2±0,1 ^e	1,438±0,0 ^a	1545±6 ^b	16,6±0,2 ^b	1,373±0,1 ^{ab}	1496±27 ^a	17.1±0.1 ^a	1.307±0.0 ^b	1367±10 ^b
PGPR (1.5) + Lecithin (1.5)	16,5±0,1 ^f	1,506±0,0 ^a	1663±11 ^a	16,4±0,0 ^a	1,379±0,1 ^b	1485±13 ^b	15.7±0.3 ^b	1.319±0.0 ^b	1471±17 ^b
PGPR (1.5)	23,8±0,1 ^a	1,073±0,0 ^b	1463±2 ^c	22,4±0,4 ^b	1,246±0,0 ^a	1400±2 ^b	23.8±0.1 ^a	1.220±0.0 ^a	1324±18 ^c
PGPR (2.0)	21,9±0,0 ^b	1,113±0,0 ^b	1518±4 ^b	20,9±0,2 ^b	1,67±0,1 ^a	1455±6 ^b	21.6±0.0 ^a	1.247±0.0 ^a	1400±01 ^c
PGPR (3.0)	17,8±0,3 ^d	1,166±0,0 ^b	1642±22 ^a	16,5±0,4 ^a	1,210±010 ^a	1518±30 ^b	17.3±0.9 ^a	1.294±0.0 ^a	1564±42 ^{ab}

Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a, b) değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir (p≤ 0.05).

ÖYA: özgül yüzey alanı

Ölçümler yapılmadan önce ikili emülsiyonun içinde dağılan birincil emülsiyonun parçalarının zamanla bir araya geleceği ve daha büyük parçalar oluşturabileceği beklenmekte idi ancak tüm çalışma boyunca öngörülen bu durum gözlemlenmemiştir. Parçacık boyutu özellikleri zamanla değişmemiştir. Literatürde benzer sonuçların gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur. Spaei ve ark. (2012) ile Khalid ve ark. (2013) elde ettikleri $S_1/Y/S_2$ tipi ikili emülsiyonun içinde dağılan yağ damlacıklarının ortalama çapında 1 ay boyunca değişmediğini ölçmüşlerdir. Diğer yandan, Aditya ve ark. (2015) 15 gün boyunca beklendikleri ikili emülsiyonun $D[4,3]$ değerinde bir artış gözlemlenmemişler. McClements (2004) emülsiyon sistemlerinde elde edilen damlacıklar uygun bir emülgatör ile kaplandığında damlacıkların deformasyona karşı direnç gösterdiğini belirtmiştir.

3.3 Mikro-akışkanlaştırıcı (MA) yönteminin ikili emülsiyon üzerine olan etkisinin incelenmesi

Çalışmada birincil emülsiyonun hazırlanmasında MA kullanıldığında ikili emülsiyonun stabilitesi ve parçacık boyutu üzerine olan etkileri incelenmiştir. MA cihazına homojen bir çözelti sunmak gerektiğinden öncelikle ön homojenizasyon işlemi olarak YHK uygulanmıştır. Ön homojenizasyonun ardından, işlem 103 Mpa basınçta ve 1, 2 ve 3 döngü sayılarında gerçekleştirilmiştir. Değişik döngü sayılarının etkisini gözlemlenmek amacıyla %1,5 g lesitin ve %1.5 g PGPR kombinasyonu içeren örnek kullanılmıştır.

Tablo 4, MA döngü sayısının ikili emülsiyonun stabilitesi üzerine etkisini göstermektedir. MA döngü sayısının artması stabilitede azalmaya neden olmuştur. 2 gün bekletilen örneklerde 1 kez cihazdan geçirilen (döngü sayısı 1) birincil emülsiyon ile hazırlanan ikili emülsiyonun cihazdan 2 kez ve 3 kez geçirilen örnekler göre (döngü sayısı 2 ve 3) daha stabil olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, döngü sayısı 2 ve 3 olan örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır. Döngü sayısı arttıkça daha az stabil ikili emülsiyon oluşturulmasının nedeninin çözeltinin fazla işlenmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Jafari ve ark. (2008) MA ile emülsiyonun fazla işlenmesinin kısa süre içerisinde daha fazla sayıda ve daha hızlı çarpışmaların oluşmasına, çarpışmalar sonucu çok küçük damlacıkların oluşmasına, fakat bu damlacıkları kaplayacak yeterli miktarda emülgatörün olmamasından dolayı yeni oluşan bu damlacıkların çok hızlı bir şekilde birleşmesine neden olabileceğini göstermişlerdir. Emülsiyon çok hassas bir yapı olduğu için MA döngü sayısı arttıkça emülsiyon fazla işlenmeye başlayıp daha az stabil bir yapı oluşturabilir.

Tablo 4. MA döngü sayısının %1,5 lesitin ve %1,5 PGPR içeren ikili emülsiyonun stabilitesine (%) olan etkisi

Döngü sayısı	Anlık Stabilite	Bekleme Stabilitesi	
		24 saat	48 saat
1	45,2±1.07 ^a	85,4±0.53 ^a	76,8±0.66 ^a
2	39,9±0.77 ^b	82,1±1.06 ^{ba}	71,0±0.63 ^b
3	38,2±0.35 ^b	79,5±2.64 ^b	68,3±2.19 ^b

Aynı kolonda farklı harfler (a, b) değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$).

MA döngü sayısının elde edilen ikili emülsiyonun parçacık özelliklerine bakıldığında ise (Tablo 5) döngünün aralık değeri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). D[4,3] değeri ve ÖYA bakımından ise döngü sayısı 2 ile 3 döngü sayısı arasında fark görülmezken ($p > 0.05$), daha az döngü uygulanarak elde edilen ikili emülsiyonun D[4,3] değerinin daha yüksek ve yüzey alanının ise daha düşük olduğu bulunmuştur.

3.4 Ultrasonikasyon (US) yönteminin ikili emülsiyon üzerindeki etkisinin incelenmesi

Çalışmada birincil emülsiyonun hazırlanmasında ayrıca ultrason (US) yönteminin kullanılmasının ikili emülsiyon özellikleri üzerine etkisi de incelenmiştir. US cihazına homojen bir çözelti sunmak amacıyla öncelikle YHK yöntemi ile ön homojenizasyon uygulanmıştır. Ön homojenizasyonun ardından, uygulama zamanı 10, 15 ve 20 dakika olarak 3 farklı zamanda US uygulanarak birincil emülsiyonlar elde edilmiştir. Böylece US uygulama zamanının ikili emülsiyonun stabilite ve parçacık özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir.

US ile homojenizasyonda uygulama süresi 24 saat ve 48 saat bekletilen örneklerde önemli bir fark yaratmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 5. MA döngü sayısının %1,5 lesitin ve %1,5 PGPR içeren ikili emülsiyonun parçacık boyutuna olan etkisi

Döngü sayısı	t=0			t=24 saat			t=48 saat		
	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Aralık	ÖYA
1	19,9±0,1 ^b	1,191±0,0 ^c	875±5 ^b	20,6±0,4 ^a	1,217±0,1 ^a	900±16 ^b	19,7±0,1 ^a	1,486±0,1 ^a	1070±25 ^a
2	18,9±0,1 ^{bc}	1,669±0,0 ^b	1065±13 ^a	21,5±0,6 ^a	1,588±0,1 ^a	810±19 ^b	19,4±0,3 ^b	1,647±0,0 ^a	989±0 ^c
3	18,4±0,3 ^c	1,698±0,0 ^a	1091±11 ^a	18,3±1,3 ^a	1,975±0,2 ^a	1045±96 ^a	19,4±0,5 ^a	1,670±0,0 ^a	900±7 ^a

Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a,b) değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir (p≤ 0.05).

ÖYA: özgül yüzey alanı

Tablo 6. US uygulama zamanının ikili emülsiyonun stabilitesine olan etkisi

Uygulama zamanı (dk)	Anlık Stabilite t=0	Bekleme Stabilitesi t=24 saat	Bekleme Stabilitesi t=48 saat
10	45,5±0,13 ^{ba}	82,1±2,11 ^a	74,8±0,53 ^a
15	46,1±0,03 ^a	80,2±1,58 ^a	73,8±0,40 ^a
20	43,0±1,96 ^b	83,2±0,53 ^a	74,9±0,93 ^a

Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a, b) değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$).

ÖYA: özgül yüzey alanı

Üzerinde durulan bir diğer konu ise uygulanan US zamanının elde edilen ikili emülsiyonların parçacık özelliklerine etkisidir. Beklenildiği gibi, lesitin-PGPR içeren ikili emülsiyonlar, sadece PGPR içeren emülsiyona göre daha küçük parçacık boyutuna (D[4,3]) sahiptir (Tablo 7). Farklı zamanlar uygulanarak elde edilen emülsiyonların D[4,3] ve aralık değerleri arasında fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 7. US uygulama zamanının ikili emülsiyonun parçacık boyutu özelliklerine etkisi

zaman	t=0			t=24 saat			t=48 saat		
	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Aralık	ÖYA
10	22,2±0,2 ^b	1,492±0,0 ^a	1475±90 ^a	22,7±0,0 ^a	1,368±0,0 ^a	1316±9 ^a	22,7±0,2 ^a	1,517±0,1 ^a	1346±6 ^a
15	22,2±0,1 ^b	1,140±0,0 ^a	1354±23 ^a	21,9±0,0 ^a	1,260±0,2 ^a	1322±5 ^a	21,2±0,3 ^a	1,438±0,0 ^a	1326±25 ^a
20	21,7±0,4 ^b	1,273±0,2 ^a	445±49 ^b	21,3±0,2 ^a	1,355±0,0 ^a	1210±6 ^a	21,4±0,3 ^a	1,296±0,0 ^a	1195±7 ^a

Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a, b), değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$).

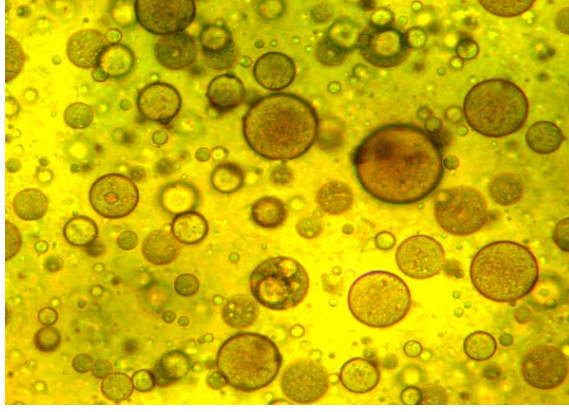
ÖYA: özgül yüzey alanı

3.5 Birincil emülsiyon hazırlama yöntemlerinin karşılaştırılması

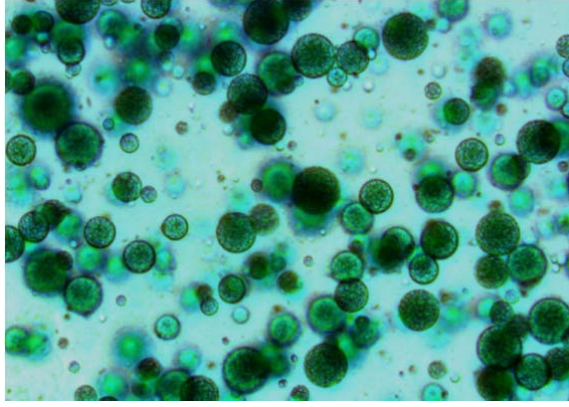
Çalışmanın önemli bir amacı birincil emülsiyon oluşturmada kullanılan homojenizasyon yöntemlerinin ikili emülsiyon üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Emülgatör olarak PGPR-lesitin karışımı kullanılmıştır. Birincil emülsiyon oluşturmak için YHK, MA ve US olmak üzere üç farklı yöntem kullanılmıştır.

Uygulanan her bir yöntemle ikili emülsiyon oluşturulup oluşturulmadığını kontrol etmek amacıyla elde edilen emülsiyonlar mikroskop altında incelenmiştir. Şekil 2, uygulanan tüm yöntemler ile istenilen çeşitte birincil emülsiyon elde edildiğini ve bu birincil emülsiyonun sodyum kazeinat çözeltisi içinde uygun bir şekilde dağıtılarak ikili emülsiyonun hazırlanabildiğini göstermektedir.

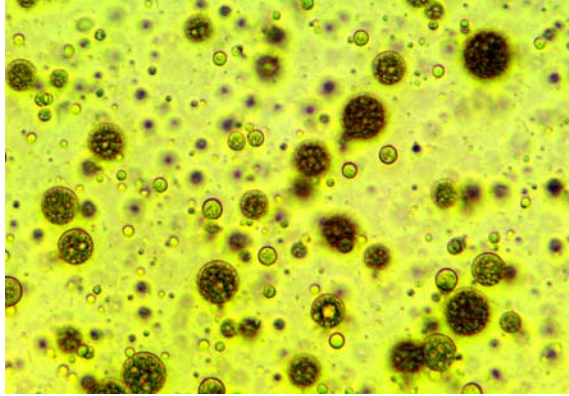
Uygulanan yöntemler ile istenilen tipte birincil emülsiyon ve ikili emülsiyon hazırlandığının gözlemlenmesinin ardından, yöntemler stabilite ve parçacık boyutu özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Tablo 8, yöntemlerin stabilite üzerine olan etkisini göstermektedir. MA ve US yöntemi uygulanarak elde edilen ikili emülsiyonların anlık stabiliteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken ($p>0.05$), bekleme stabiliteleri bakımından farklı oldukları görülmüştür ($p<0.05$).



(a)



(b)



(c)

Şekil 2. Farklı yöntemler ile elde edilen birincil emülsiyonlardan hazırlanan ikili emülsiyonların mikroskop görüntüleri

(a): MF (Mikro-akışkanlaştırıcı), (b): YHK (yüksek hızlı karıştırma), (c): US (Ultrason)

Tablo 8. Birincil emülsiyon oluşturma yönteminin stabilite üzerine etkisi

Yöntem	Anlık Stabilite	Bekleme Stabilitesi	Bekleme Stabilitesi
	t=0	t=24 saat	t=48 saat
MF	45.2±1.07 ^b	85.4±0.53 ^b	76.8±0.66 ^b
US	46.1±0.03 ^b	80.2±1.58 ^c	73.8±0.40 ^b
YHK	56.1±1.69 ^a	94.8±1.12 ^a	93.6±0.53 ^a

Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a, b), değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$).

MF: Mikro-akışkanlaştırıcı, YHK: yüksek hızlı karıştırma, US: Ultrason

En stabil ikili emülsiyon YHK yöntemi ile elde edilirken, stabilite açısından yöntemler YHK, MA ve US olarak sıralanmaktadır. YHK ile elde edilen ikili emülsiyonun 2 gün sonra yaklaşık %94'ü ayrışmadan kalabilirken, diğerleri %80'nin altındadır.

Araştırmacılar arasında küçük damlacıklara sahip emülsiyonların daha stabil olacağı konusunda genel bir yaklaşım söz konusudur. Bu nedenle, yöntemler arasında en kararlı emülsiyon olan YHK ile elde edilen ikili emülsiyonun daha küçük yağ damlacıklarına sahip olması beklenmekteydi. Stabilite ile ikili emülsiyonun içinde dağılan birincil emülsiyon damlacıklarının parçacık boyutları arasında uyumlu bir ilişki olduğu saptanmıştır. En yüksek stabiliteye sahip YHK ile elde edilen ikili emülsiyonun daha küçük ve dolayısıyla yüzey alanı daha büyük damlacıklara sahip olduğu görülmüştür (Tablo 9). YHK ile elde edilen ikili emülsiyonun aralık değeri diğerlerine göre oldukça yüksek olup, YHK aralık değerinin yaklaşık 1,1'den 1,5'e kadar çıkmasını sağlamıştır. Aynı şekilde, YHK ile elde edilen ikili emülsiyonun D[4,3] değeri US uygulandığındaki D[4,3] değerine göre %25,7, MA uygulandığındaki D[4,3] değerine göre ise %17,1 daha düşüktür. Dolayısıyla, birincil emülsiyonun hazırlanma yöntemi ikili emülsiyonun parçacık boyutu özellikleri ve stabilitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ($p < 0.05$).

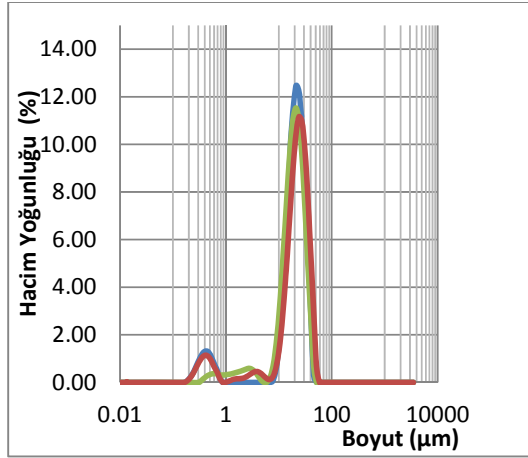
Tablo 9. Birincil emülsiyon oluşturma yönteminin parçacık boyutu özellikleri üzerine olan etkisi

Yöntem	t=0			t=24 saat			t=48 saat		
	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Aralık	ÖYA	D[4,3]	Aralık	ÖYA
MA	9.9±0.1 ^b	1.191±0.0 ^b	875±5 ^c	20.6±0.4 ^a	1.217±0.1 ^a	900±16 ^b	19.7±0.1 ^a	1.486±0.1 ^a	1070±25 ^a
US	22.2±0.1 ^a	1.140±0.0 ^c	1354±23 ^b	21.9±0.1 ^{ab}	1.260±0.2 ^a	1322±5 ^a	21.2±0.3 ^b	1.438±0.0 ^a	1326±25 ^a
YHK	16.5±0.1 ^c	1.506±0.0 ^a	1663±11 ^a	16.4±0.0 ^a	1.379±0.0 ^b	1485±13 ^b	15.7±0.3 ^b	1.319±0.0 ^b	1471±17 ^b

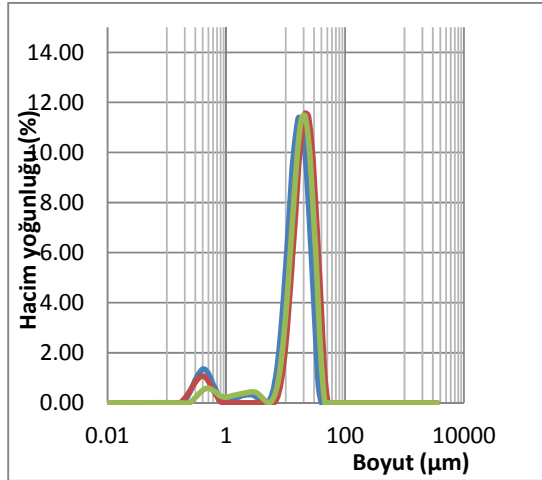
Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a, b), değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir (p≤ 0.05).

MF: Mikro-akışkanlaştırıcı, YHK: yüksek hızlı karıştırma, US: Ultrason

Şekil 3, birincil emülsiyon hazırlanmak amacıyla uygulanan yöntemlerin parçacık boyutu dağılımını göstermektedir. Farklı yöntemler hacim boyutunu değiştirmekte ancak hacim yoğunluğunu etkilememektedir. Her birinden %1.5 (g/g) PGPR ve lesitin içeren emülsiyonda ise YHK yöntemi emülsiyon hacim yoğunluğu artırmaktadır. Diğer yöntemlerle yaklaşık olarak %11 olarak belirlenen hacim yoğunluğu YHK ile yaklaşık %13'e yükselmektedir (Şekil 3A).



(a)



(b)

Şekil 3. Birincil emülsiyon oluşturma yönteminin parçacık boyutu dağılımına etkisi.

Farklı renkler uygulanan yöntemleri gösterirken: Mavi YHK'ı, yeşil MA'yı ve kırmızı US'yi ifade etmektedir. (a): %1,5 Lesitin ve %1,5 PGPR içeren emülsiyon, (b): %2 PGPR içeren emülsiyon

Emülsiyon sistemlerinde içteki fazın sürekli faz içerisine dağıtılma verimi kullanılan ekipmanın uyguladığı gücün çeşidi ile ilgilidir (Scherze ve ark., 2006). Kullanılan

yöntemlerde farklı homojenizasyon mekanizmaları uygulandığından elde edilen ikili emülsiyonların özellikleri birbirinden farklı olmuştur. Emülsiyon oluşturma konusunda YHK yöntemindeki mekanizma, sıvının hızının artmasıyla duvara çarpması sonucu oluşan mekanik çarpışma ve kayma gerilimi iken MA yöntemindeki mekanizma akış boyunca oluşan kavis ile eylemsizlik kuvvetidir (Jafari ve ark., 2008). US yönteminde ise sonikatör probu aracılığıyla üretilen titreşimlerin oluşturduğu kavitasyon sayesinde emülsiyon oluşmaktadır (Behrend ve ark., 2000; Eberth & Merry 1983). Sonuç olarak homojenizasyon mekanizmalarındaki farklılıktan dolayı farklı özellikleri olan ikili emülsiyonların elde edildiği düşünülmektedir.

3.6 İkili emülsiyonların kaplama özellikleri

3.6.1 Dış su fazına geçen vitaminin kaplama stabilitesi

Elde edilen ikili emülsiyonun vitamin kaplama özelliklerini belirlemek için suda çözünen B₁₂ vitamini birincil emülsiyonun su fazına eklenmiş ve B₁₂ vitaminin ikili emülsiyonun dıştaki su fazına geçtiği miktar ölçülmüştür. PGPR ve lesitin (% 1,5 lesitin ve % 1,5 PGPR) içeren birincil emülsiyon ile dış su fazının YHK yöntemi ile oluşturmuş olduğu ikili emülsiyon sisteminin B₁₂ vitaminin kaplanması konusunda çok verimli bir yöntem olduğu bulunmuştur. Sisteme eklenen vitaminin %99,9'nun muhafaza edilmesi eklenen tüm vitaminin iç fazda hapsedildiğini göstermektedir. Çalışma sonuçları diğer araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Giroux ve ark. (2013) peynirin B₁₂ vitamini açısından zenginleştirilmesi amacıyla ikili emülsiyon yöntemi üzerine çalışmışlar ve B₁₂ vitaminin % 96-99 oranında ikili emülsiyon yöntemi ile kaplayabildiklerini belirtmişlerdir. Diğer yandan, O'Regan ve Mulhivill (2009) ikili emülsiyon sistemlerinde B₁₂ vitaminin suda çözünen vitaminleri temsilen kaplama amaçlı kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak üzere çalışma yürütmüşler ve B₁₂ vitaminin ikili emülsiyonun iç su fazında eşit olarak dağıldığı ve ikili emülsiyon yöntemi ile eklenen vitaminin %99,3'nün içteki su fazında hapsedildiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda vitaminin ne kadar kaplandığının yanında içteki su fazına eklenen vitaminin dıştaki su fazına geçişi üzerine de çalışılmıştır. Tablo 10'dan da anlaşılacağı üzere 1 gün boyunca vitamin tamamıyla içteki fazda korunurken ($p>0.05$) ikinci günde ise dıştaki su fazına geçmeye başlamıştır ($p<0.05$). Azalmaya başlasa da hapsedilen miktar hala yüksektir, %96,5.

Tablo 10. Saklama süresinin ikili emülsiyonunun kaplama stabilitesi/verimi üzerine etkisi

Zaman (saat)	verim/stabilite (%)
0	99,9±0.09 ^a
24	99,4±0.07 ^a
48	96,5±0.35 ^b

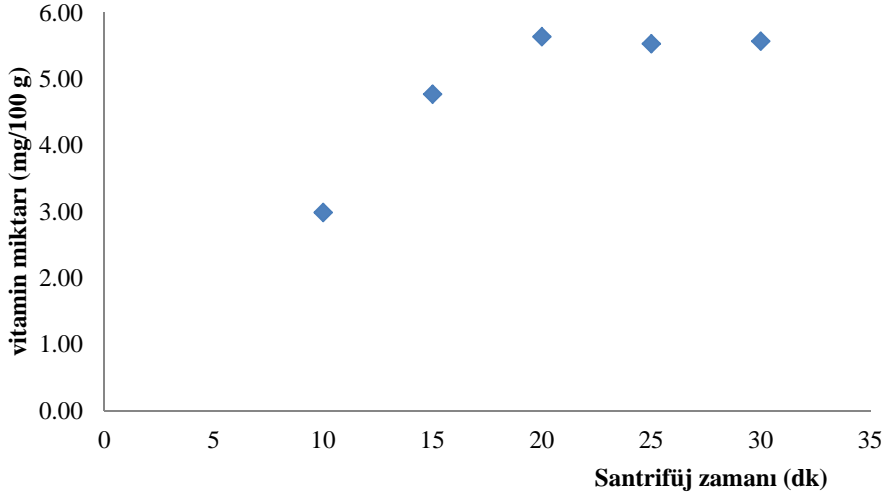
Aynı kolonda bulunan farklı harfler (a, b), değerler arasında anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Araştırmada ikinci emülgatör olarak kullanılan sodyum kazeinatın yoğun konsantrasyonda olması dış su fazında bulunan vitamin miktarını belirleme yönteminde zorluk ortaya çıkartmıştır. B₁₂ vitaminin miktarı spektrofotometrik ölçüm yapılarak bulunduğu için örneğin şeffaf olması ve içerisinde bulanıklık yapacak herhangi bir madde bulunmaması gerekmekte idi. Çift emülsiyonun dış su fazında yüksek konsantrasyonda sodyum kazeinat olması bulanıklık oluşturmuştur. Ortamda bulunan fazla sodyum kazeinat'ın uzaklaştırılması için ortama yoğun bir asit çözeltisi eklenmiş, bulanıklılığa neden olan sodyum kazeinat çökelti oluşturmuş ve ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Ancak araştırmanın genel olarak amacı ikili emülsiyon aracılığıyla hassas ve sağlıklı beslenme açısından değerli maddelerin hapsedilerek gıda maddelerinin zenginleştirme olduğu düşünülürse, bahse konu ortamda bu maddelerde asitten etkilenmeleri muhtemeldir. Dolayısıyla bu yöntem ile ikili emülsiyonunun iç fazında neredeyse %100 verimli kaplamanın olduğu bulunmuştur ancak sıcaklık, pH gibi parametrelere ikili emülsiyonun koruyucu etkisinin çalışılması için yeni bir yöntem de ihtiyaç duyulduğu da açıktır. Bu nedenle ikili emülsiyonun kaplama özellikleri kapsamında birincil emülsiyonda kalan vitamin miktarının ölçülmesi üzerine de çalışılmıştır.

3.6.2 İçteki su fazında hapsedilebilen vitaminin kaplama verimi

İç su fazındaki vitamin miktarının bulunması yöntemi santrifüj sonrası üst kısma toplanan birincil emülsiyonun alınıp YHK ile emülsiyonun parçalanmasına ve yağ fazının ortamdaki uzaklaştırılmasına dayanmaktadır. Bu noktada en kritik basamak ikili emülsiyonun tamamıyla birincil emülsiyon ve dış su faz olarak fazlarına ayrıştığından emin olduktan sonra birincil emülsiyondaki vitaminin ölçülmesidir. Tamamıyla ayrışmadan emin olmak için, hazırlanan ikili emülsiyona farklı zamanlarda (10, 15, 20, 25 ve 30 dk) santrifüj uygulanmış ve birincil emülsiyondaki vitamin miktarı ölçülmüştür.

Şekil 4, uygulanan santrifüj zamanı sonrası birincil emülsiyonda bulunan vitamin miktarını göstermektedir. Görüldüğü üzere, elde edilen ikili emülsiyonlara 20 dk boyunca santrifüj uygulanması emülsiyonun tamamen fazlarına ayrıştığını göstermektedir.



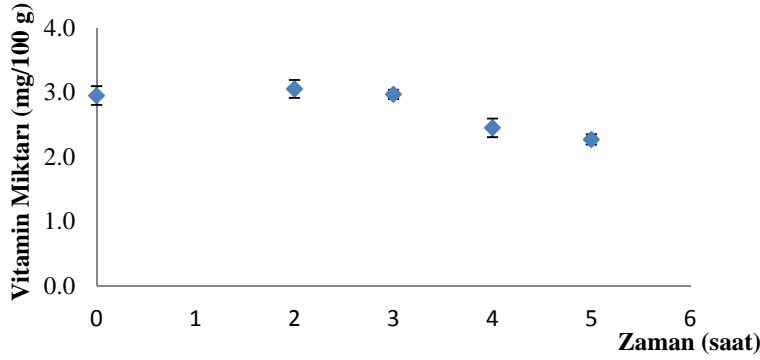
Şekil 4. İkili emülsiyona farklı zamanlarda uygulanan santrifüj sonrası iç su fazındaki vitamin miktarı

Elde edilen ikili emülsiyonun %100 kaplama özelliğine sahip olması durumunda elde edilmesi gereken miktar 6,0 mg/100 g olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan birincil emülsiyon kontrol olarak kullanılmış ve birincil emülsiyonun içerisinde bulunan vitamin miktarı yaklaşık 5,54 (mg/100 g) olarak ölçülmüştür. Bu durumda eklenen vitaminin yaklaşık % 7,7'lik kısmının emülsiyon oluşturma ve/veya vitamin ölçme deneylerinde kaybı uğradığı bulunurken, iç su fazındaki vitamin miktarının ölçülmesi yöntemiyle de $S_1/Y/S_2$ tipi ikili emülsiyon sisteminin eklenen vitaminin neredeyse tamamının kaplanabildiği bulunmuştur.

3.7 Sıcaklığın ikili emülsiyon ile kaplanan B_1 vitaminine olan etkisi

İkili emülsiyon sistemiyle B_{12} vitaminin neredeyse tamamının kaplanabildiği tespit edildikten sonra ile B_{12} vitamini B_1 vitaminiyle aynı şekilde kaplanarak ısıya ve pH'ya karşı dayanıklılığı araştırılmıştır. Literatüre bakıldığında bazı araştırmacıların B_1 vitaminin ısıya karşı duyarlı olduğu ve pişirmenin vitamin miktarının %20 ile % 56'sı arasında azalmaya neden olabileceği belirtilmektedir (Batifoulie ve ark., 2005; Martinez-Villaluenga ve ark., 2009; Mihhalevski ve ark., 2013). Diğer yandan, B_1 vitaminin sıcaklık işlemi ile azalmadığını ifade eden araştırmacılar da mevcuttur. Örneğin Lassen ve ark. (2002) domuz etini 72°C sıcaklıkta pişirmişler ve sıcaklığın vitamin miktarında azalmaya neden olmadığını raporlamışlardır.

Kapsüllenmemiş B₁ vitamini değişik sıcaklıklarda işlem gördüğünde vitaminde bozulma olmadığı görülmüştür. Sıcaklığın B1 vitamininin azalıp azalmamasına neden olup olmadığı konusunda emin olmak amacıyla vitamin (%3, g/g) saf su içinde çözülmüş ve 90°C sıcaklıktaki su banyosunda bekletilmiştir. Şekil 5'de gösterilen grafik, vitaminin 3 saat boyunca stabil kaldığı ve sonrasında ise sıcaklığın etkisi ile azalmaya başladığını göstermektedir. Böylece çalışmada kullanılan B₁ vitamininin sıcaklığa karşı çok hassas olmadığı anlaşılmıştır.



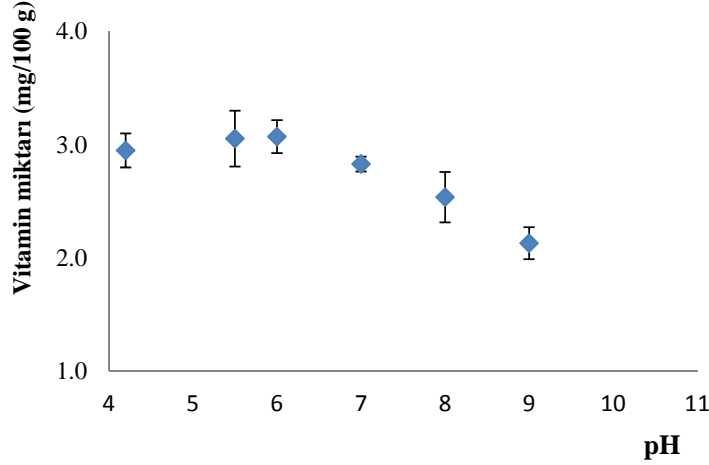
Şekil 5. 90 °C sıcaklığa maruz bırakılan vitaminin zamanla değişimi

Sierra ve Vidal-Valderde (2001) sıcaklığın sütteki B₁ vitaminine etkisi üzerine çalışmışlar ve 90-120°C sıcaklık aralığına maruz bırakılan sütteki vitamin miktarında önemli bir azalma bulamamışlardır. Unlu mamullerde B₁ vitamininin işlem sırasında kayba uğradığı ve ürünlerde az miktarda bulunduğu bilinmektedir. Söz konusu vitaminin azalma nedeni olarak unlu gıda ürünlerinin hazırlanması aşamasında kabartma tozunun kullanılması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir çünkü eklenen kabartma tozu ortamı bazikleştirmektedir (Leskova ve ark., 2006). Çalışmada da bu noktadan yola çıkılarak ortam pH değerinin B₁ vitamini üzerindeki etkisinin de çalışılmasına karar verilmiştir.

3.7 pH'nın ikili emülsiyon ile kaplanan B₁ vitaminine olan etkisi

Ön çalışmalar ortamın pH değerinin B₁ vitamin miktarını etkileyebileceğini ve bazik ortamın vitaminde kayıplara neden olabileceğini göstermiştir. Bu kapsamda, ortam pH değerinin B₁ vitamini miktarına etkisinin incelenmesi için B₁ vitamini (% 3, g/g) farklı pH değerlerine maruz bırakılmıştır ve Şekil 6'da gösterildiği üzere nötr ve bazik koşulların vitamin miktarında azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Öte yandan asidik ortamda vitamin miktarı sabit kalmaktadır. Sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Ball (1994) gıda maddelerinin bazik ortamda pişirilmesi ve işlenmesinin B₁ vitamin miktarında çok fazla azalmaya yol açacağını ifade ederken, Leskova ve ark.(2006) nötr ortamın da vitaminde

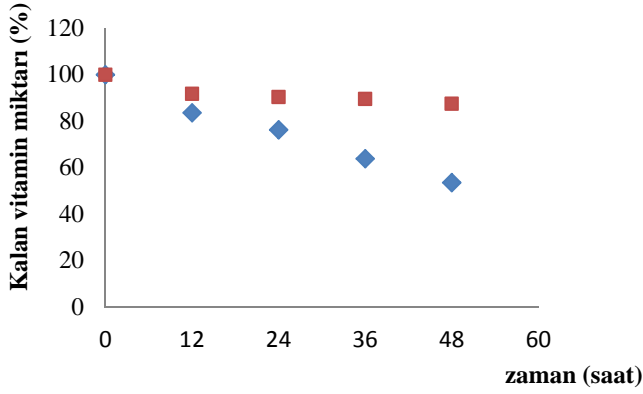
kayıplara yol açtığını bildirmişlerdir. Ayrıca 9'dan daha yüksek pH değerine sahip ortamda vitamin eklendiğinde, çözeltinin sarımsı bir renk aldığı gözlemlenmiş ve vitamin miktarında tutarlı sonuçlar alınamamıştır. Bunun nedeni yoğun bazik koşullarda B1 vitamini bozulmakta, bozulmaya bağlı olarak yan ürünler oluşmakta ve bu da ortamda sarı renk oluşmasına neden olmaktadır (Farrer, 1948).



Şekil 6. B₁ vitamin miktarının pH ile değişimi

pH'a karşı hassas olan B₁ vitaminini hapseden ikili emülsiyon, 6.6±0.14 pH değerine sahip taze sıkılmış havuç suyuna eklenmiş ve vitamin miktarındaki değişim 2 gün boyunca izlenmiştir. Kapsüllenmemiş vitaminin doğrudan havuç suyuna eklenmesi kontrol olarak kullanılmıştır.

Şekil 7'den anlaşılacağı üzere vitamin direk olarak havuç suyuna eklendiğinde, 2 gün boyunca vitamin miktarında hızlı bir azalış gözlemlenirken 2. günün sonunda eklenen vitaminin %46'sı kayba uğramıştır. Diğer yandan vitamin, ikili emülsiyon sistemi ile hapsedilerek havuç suyuna eklendiğinde vitamin miktarının yaklaşık %12'si kayba uğramıştır.



Şekil 7. B₁ vitamin miktarının havuç suyunda zamanla değişimi

(◆): kapsüllenmemiş B₁ vitamini, (■): kapsüllenmiş B₁ vitamini

Sonuç olarak, B₁ vitamini pH'a karşı hassas bir vitamin olduğundan havuç suyuna eklendiğinde zamanla kayba uğramaktadır. Bu nedenle havuç suyuna B₁ vitaminince zenginleştirmek amacıyla vitamin ikili emülsiyonun iç su fazında hapsedilerek eklenebilir. Sonuçlar, ikili emülsiyonun iç su fazında hapsedilen hassas bileşiklerin gıda maddesiyle doğrudan temasını engellendiğini göstermektedir.

4.SONUÇ

Bu çalışmada, S₁/Y/S₂ çeşidinde ikili emülsiyon oluşturmada lesitin sentetik PGPR'nin yerine kullanılması ve birincil emülsiyon hazırlamak için uygulanan homojenizasyon tekniklerinin ikili emülsiyon özelliklerine olan etkisi üzerine çalışılmıştır. Sadece lesitin kullanılarak S/Y çeşidinde birincil emülsiyon oluşturulamadığından, hidrofilik emülgatör olarak lesitin-PGPR karışımı kullanılmıştır. %1,5 lesitin %1,5 PGPR ile birlikte kullanılmasının ikili emülsiyonun stabilitesini arttırdığı bulunmuştur. Birincil emülsiyon hazırlarken kullanılan homojenizasyon yöntemlerinin ikili emülsiyon özelliklerini etkilediği bulunmuştur. En stabil ikili emülsiyon YHK yöntemi ile elde edilmiştir.

İkili emülsiyonun kaplama özellikleri üzerine çalışmak için suda çözünen bileşikleri temsil eden B₁₂ vitamini kullanılmış ve bu vitaminin %96,7'den daha fazlasının ikili emülsiyon yöntemi ile hapsedilebildiği görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan B₁₂ vitamini pH'a karşı duyarlı olan B₁ vitamini ile değiştirilmiş ve havuç suyuna eklenmiştir. İkili emülsiyonun B₁ vitaminini pH değişimine karşı koruduğu bulunmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlar suda çözünür bileşenlerin kaplanması için yol gösterici olacaktır. Bu nedenle, ileriki çalışmalarda elde edilen ikili emülsiyonlar kullanılarak işlem koşullarına hassas değerli bileşenlerin kaplanması üzerinde çalışılabilecektir.

5. KAYNAKLAR

Aditya, N.P., Aditya, S., Yang, H., Kim, H.W., Park, S.O., Ko S. 2015. "Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion". Food Chemistry, 173, 7-13.

Banford, H.F., Gardiner, K.J., Howat, G.R., Thomson, A.F. 1970. "The Use of Polyglycerol Polyricinoleate in Chocolate", Confectionery Production, 36, 359-365.

Ball, G.F.M. 1994. Water-Soluble Vitamin Assay in Human Nutrition. New York: Chapman & Hall,

Batifoulier, F., Verny, M.A., Chanliaud, E., Remesy, C., Demigne, C., 2005. "Effect of different bread making methods on thiamine, riboflavin and pyridoxine contents of wheat bread". Journal of Cereal Science, 42, 101–108.

Behrend, O., Ax, K., Schubert, H. 2000. "Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound". Ultrasonics Sonochemistry, 7, 77–85.

Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. 2007. "W/O/W double emulsions stabilized with WPI–polysaccharide complexes", Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 294, 20-32.

Bou, R., Cofrades, S., Jimenez-Colmenero, F. 2014. "Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources", LWT - Food Science and Technology, 59, 621-628

Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M., Leal-Calderon, F. 2009. "Release Rate Profiles of Magnesium from Multiple W/O/W Emulsions", Food Hydrocolloids, 23, 92-101

Claesson, P. M., Blomberg, E., Poptoshev, E. 2004. "Surfaces forces and emulsion stability". Editörler Friberg, S. E., Larsson, K., Sjöblom, J. Food emulsions (4. baskı). New York: Marcel Dekker, 257-297

CODEX General Standard for Food Additives (2013). CODEX STAN 192-1995: Page 140.

Cooksey, K., Klein, B. Mckeith, F., 1990. "Thiamin retention and other characteristics of cooked beef loin roasts", Journal of Food Science, 55, 863–864.

Dagleish, D. G., 2001. Sayfa 207-232. "Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology". Editör: Sjöblom J. New York: Marcel Dekker.

Eberth, K., & Merry, J., 1983. "A comparative-study of emulsions prepared by ultrasound and by a conventional method—Droplet size measurements by means of a Coulter-Counter and microscopy". International Journal of Pharmaceutics, 14, 349–353.

FAOstat. 2014. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü. "Hazelnut Production". <http://www.fao.org/docrep/003/x4484e/x4484e03.htm> Son erişim tarihi: 26 Ağustos 2014.

Farrer, K. 1948. "The Thermal Destruction of Vitamin B1". British Journal of Nutrition. 2, 242-248.

Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I., Muschiolik, G. 2007. "Stability and Release Properties of Double-Emulsions Stabilized by Caseinate-Dextran Conjugates", Food Hydrocolloids, 21, 943-952.

Giroux, H. J., Constantineau, S., Fustier, P., Champagne, C. P. St-Gelais D., Lacroix M., Whitney, E., Rolfes, S.R. 2011. Understanding Nutrition. CA: Thomson Wadsworth.

Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. 2008. "Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification". Food Hydrocolloids, 22, 1191-1202.

Kaci, M., Meiani, S., Arab-Tehrany, E., Gillet, G., Desjardins-Lavisse, I., Desobry, S. 2014. "Emulsification by High Frequency Ultrasound Using Piezoelectric Transducers: Formation and Stability of Emulsifier Free Emulsion", Ultrasonics Sonochemistry, 21, 1010-1017.

Kawashima, Y., Hino, T., Takeuchi, H., Niwa, T. 1992. "Stabilization of water/oil/water multiple emulsion with hypertonic inner aqueous phase". *Chem. Pharm. Bulletin*, 40, 1240-1246.

Khalid N., Kobayashi I., Neves M:A., Uemura, K., Nakajima, M. 2013. "Preparation and Characterization of Water-in-Oil-in-Water Emulsions Containing a High Concentration of L-Ascorbic Acid". *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry* 77, 1171-1178.

Kumar, S., Aalbersberg, B. 2006. "Nutrient retention in foods after earth-oven cooking compared to other forms of domestic cooking 2. Vitamins", *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 311-320.

Lassen A., Kall M., Hansen K. & Ovesen, L. 2002. "A comparison of the retention of vitamins B1, B2 and B6, and cooking yield in pork loin with conventional and enhanced meal-service systems". *European Food Research and Technology*, 215, 194–199.

Leskova, E., Kubikova, J., Kovacikova, E., Kosicka, M., Porubská, J., Holcikova, K. 2006. "Vitamin losses: retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models". *Journal of Food Composition and Analysis*, 19. 252-276.

Malone, M. E., Appelqvist, I. A. M., Norton, I. T. 2003. "Oral Behaviour of Food Hydrocolloids and Emulsions", *Food Hydrocolloids*, 17, 775-784.

Martinez-Villaluenga, C., Michalska, A., Frias, J., Piskula, M.K., Vidal-Valverde, C., Zielinski, H. 2009. "Effect of flour extraction rate and baking on thiamine and riboflavin content and antioxidant capacity of traditional rye bread". *Journal of Food Science*, 74, 49–55.

McClements D. 2004. *Food Emulsions: Principles, practice and Techniques*. Boca Raton: CRC Press,

McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J. 2009. "Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods", *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 49, 577–606.

Mihhalevski, A., Nisamedtinov, I., Halvin, K., Oseka, A., Paalme, T., 2013. "Stability of B-complex vitamins and dietary fiber during rye sourdough bread production". *Journal of Cereal Science* 57, 30–38.

Mishchuk, N. A., Sanfeld, A.,Steinchen, A. 2004. Interparticle interaction on concentrate water-oil emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 112. 129-157.

O'Regan J., Mulvihill D. M. 2009. Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23, 2339-2345.

Sapei L., Naqvi M. A., & Rousseau D. (2012). Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, 27, 316-323.

Scherze I., Knoth A. & Muschioilk G. 2006. Effect of emulsification method on the properties of lecithin – and PGPR- stabilized water-in-oil-emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 27, 427-434.

Sierra, I., Vidal-Valverde, C., 2001. Vitamin B1 and B6 retention in milk after continuous flow microwave and conventional heating at high temperatures. *Journal of Food Protection*, 64, 890–894.

Sugiura, S., Nakajima, M., Yamamoto, K., Iwamoto, S. Oda, T., Satale, M., Seki, M. 2004. "Preparation Characteristics of Water-in-Oil-in-Water Multiple Emulsions Using Microchannel Emulsification", *Journal of Colloid and Interface Science*, 270, 221-228.

Taki, J. 2008. "W1/O/W2-Type double emulsion dressing and method for production thereof". WO 2007/043678.

Thakur R.K., Villette C., Aubry J.M., Delaplace G. 2007. Formulation composition map of a lecithin-based emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng.* 310, 55-61.

Ushikubo, F.Y., Cunha, R.L. 2014. "Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions". *Food Hydrocolloids*, 34, 145-153.

Vasijevic, D., Parojcic, V. J., Primorac, M., Vuleta, M.G. 2006. "An Investigation into the Characteristics and Drug Release Properties of Multiple W/O/W Emulsion Systems Containing Low Concentration of Lipophilic Polymeric Emulsifier", *International Journal of Pharmaceutis*, 309, 171-177.

Vermeir, L., Sabatino, P., Balcaen, M., Ranst, G. V., & Meeren, P. V. 2014. "Evaluation of the effect of homogenization energy input on the enclosed water volume of the concentrated W/O/W emulsions by low-resolution T2- relaxometry". *Food Hydrocolloids*, 34, 34-38.

Wilson R., Van Schie B. J., & Howes D. 1998. "Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR) ". *Food and Chemical Toxicology*, 36, 711-718.

Yan, J., Pal, R. 2001. "Osmotic swelling behavior of globules of W/O/W emulsion liquid membranes", *Journal of Membrane Science*, 190, 79-91.

Zou, L., Akoh, C.C. 2013. "Characterization and Optimization of the Physical and Oxidative Stability of Structured Lipid-Based Infant Formula Emulsion: Effects of Emulsifiers and Biopolymer Thickeners", *Food Chemistry*, 141, 2486-2494.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. SERVET GÜLÜM ŞÜMNÜ
Proje No:	214O615
Proje Başlığı:	B1 Vitaminin İkili Emülsiyon Yöntemi İle Kapsüllemesi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	10
Araştırmacılar:	SERPİL ŞAHİN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/01/2015 - 15/11/2015
Onaylanan Bütçe:	27300.0
Harcanan Bütçe:	25500.0
Öz:	<p>İkili emülsiyonların pek çok kullanım alanı olmasına rağmen gıda sektöründe henüz bu yöntemle üretilen bir ürün bulunmamaktadır. Bunun ana nedeni ikili emülsiyonların karmaşık yapılarından dolayı hazırlanmalarının zorluğu ve elde edilen ürünlerin saklama sırasında dayanıklı olmamalarıdır.</p> <p>Suda çözünen B1 vitamini (tiamin) ısı, ışık, nem ve alkali ortamdan etkilenen hassas bir vitamindir. B1 vitamininin işlem sırasında bozulmasına engel olmak ve stabilitesini arttırmak için ikili emülsiyon yöntemi ile kapsüllemesi çözüm olabilir. B1 vitamininin şu ana kadar bu yöntemle lesitin kullanılarak kapsüllemesi konusunda literatürde hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer suda çözünür vitaminlerin bu yöntemle kapsüllemesi konusundaki çalışmaların hepsinde sentetik poligliserol polirisinolat esterleri (PGPR) kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı su-yağ-su (S1/Y/S2) ikili emülsiyonunun iç su fazında B1 Vitamininin hapsedilmesi ve ikili emülsiyon hazırlanırken kullanılan sentetik emülgatör (PGPR) yerine kısmen de olsa doğal bir emülgatör olan lesitin kullanılmasıdır.</p> <p>Değişik konsantrasyonda PGPR ve lesitin içeren birincil emülsiyonlar yüksek hızlı karıştırma (YHK), mikroakışkanlı homojenizasyon (MH) ve ultrasonikasyon (US) olmak üzere farklı yöntemler uygulanarak hazırlanmıştır. Ardından, ikili emülsiyon elde etmek amacıyla sodyum kazeinat içeren su fazı birincil emülsiyona eklenmiştir. İkili emülsiyonlar parçacık boyutu ve stabilite açısından incelenmişlerdir. Enkapsülasyon stabilitesi ve verimi açısından en uygun emülsiyon hazırlama yöntemi ve koşullarını belirlemek amacıyla analizinin B1 vitaminine göre hızlı olması sebebiyle B12 Vitaminini belirteç olarak kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, B12 Vitaminini B1 vitamini ile değiştirilmiş ve sıcaklık ve pH'nın ikili emülsiyon yöntemiyle hapsedilen B1 vitaminine olan etkisi araştırılmıştır. Kontrol olarak kapsüllememiş B1 vitamini kullanılmıştır.</p> <p>En stabil S1/Y emülsiyonları %1,5 lesitin ve %1,5 PGPR kombinasyonu kullanıldığında elde edilmiştir. Homojenizasyon metodları arasında ikili emülsiyon stabilitesi ve parçacık boyutu açısından farklılık bulunmuştur. En stabil ikili emülsiyon YHK yöntemi ile elde edilmiştir. İkili emülsiyon yöntemiyle B12 vitamininin %96,7'den daha fazlasının kapsüllenebildiği bulunmuştur. İkili emülsiyon yöntemiyle kapsüllemenin B1 vitamininin pH ile bozulmasına engel olduğu tespit edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Emülsiyon, Enkapsülasyon, Lesitin, Stabilite, Tiamin
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır