KAPSAİSİN YÜKLÜ NANOEMULSİYONLARIN TASARLANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Program Kodu: 1002

Proje No: 214O436

Proje Yürütücüsü:

Yrd.Doç.Dr.Mecit H. ÖZTOP

Araştırmacı(lar):

U. Betül Söyler

Danışman(lar):

Bursiyer(ler):

Elif Akbaş

Simge Tutku Yıldırım

Damla Dağ

OCAK 2016

ANKARA

ÖNSÖZ

Bu rapor TÜBİTAK tarafından desteklenen "**Kapsaisin Yüklü Nanoemulsiyonların Tasarlanması ve Karakterizasyonu**" başlıklı projenin sonuç raporu olup acı biberin özü olarak bilinen esansiyel yağ kapsaisinin antimikrobiyal özelliğinin ve biyoyararlılığının arttılması için kullanılacak nanoemülsiyon sistemlerinin formülasyonu ve karakterizasyonunu hedeflemiştir.

İçindekile

ÖNSÖZ.....i
İçindekiler.....ii
Tablolar Listesi.....v
Resimler Listesi.....vi
Şekiller Listesi.....vii
ÖZET.....xi
ABSTRACT.....xii
1. GİRİŞ.....1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....2
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....9
3.1 Gereçler.....9
3.2 Kapsaisin İçeriğinin Belirlenmesi.....9
3.3 Nanoemülsiyonlarda Kullanılacak Olan Kapsaisin Oleoresin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....10
3.4 Nanoemülsiyonlarda Kullanılacak Su Fazının Hazırlanması.....11
3.5 Emülsiyonların Hazırlanması.....12
3.5.1 Mikroakışkanlaştırma.....12
3.5.2 Ultrasonikasyon.....13
3.5.3 Biyopolimer Ekleme.....13
3.6 Parçacık Boyut Analizi.....13
3.7 Nanoemülsiyonlarda Renk ve Bulanıklık Deneyleri.....13
3.8 NMR Relaksometre Deneyleri.....14
3.9 DPPH Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi.....14
3.10 Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi.....15
3.11 Enkapsülasyon Verimi.....17
3.12 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....18
3.13 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....19
3.14 Viskozite Deneyleri.....19
3.15 Zeta potansiyel (Yüzey Elektrik Yükü) Ölçümü.....19
3.16 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK).....20
3.17 İstatistiksel Analiz.....20
4. BULGULAR.....21

4.1 Nanoemülsiyonlarda Parçacık Boyutu.....21
4.1.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....21
4.1.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....24
4.2 NMR Relaksometre Deneyleri.....27
4.2.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....28
4.2.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....29
4.3 Bulanıklık.....31
4.3.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....31
4.3.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....33
4.4 Renk Ölçümleri.....35
4.4.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....35
4.4.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....38
4.5 Enkapsülasyon verimi.....40
4.5.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....40
4.5.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....41
4.6 Antioksidan Aktivite Sonuçları.....42
4.6.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....43
4.6.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....45
4.7 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....46
4.7.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....48
4.7.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....51
4.8 Nanoemülsiyonların Stabilitelerinin İncelenmesi.....53
4.8.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi.....53
i. Tween 80.....53
ii. Lesitin.....56
iii. Sükroz monopalmitat.....59
4.8.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi.....61
i. Tween 80.....61
ii. Lesitin.....63

iii. Sükroz monopalmitat.....65
4.9 Transmisyon Elektron Mikroskobu ve Atomik Kuvvet Mikroskobu Deneyleri.....66
4.10 Viskozite Sonuçları.....68
4.11 Zeta Potansiyel Sonuçları.....69
4.12 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK).....70
4.13 Biyopolimer eklenmiş nanoemülsiyonların tasarlanması ve karakterizasyonu.....72
4.13.1 Parçacık boyutu.....72
4.13.2 NMR Relaksometre Deneyleri.....73
4.13.3 Bulanıklık.....74
4.13.4 Renk Ölçümleri.....75
4.13.5 Enkapsülasyon verimi.....77
4.13.6 Zeta Potansiyel.....78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....81

Tablolar ListesiY

Tablo 1. Nanoemülsiyon formülasyonlarında kullanılacak konsantrasyonlar, etkisi incelenecek parametreler ve kullanılacak karakterizasyon teknikleri.....7

Tablo 2. Proje iş paketi çizelgesi.....8

Tablo 3. Oleoresin kapsikum konsantrasyonlarının (KAP) zamana karşı (dakika, dk)*E. coli* üzerinde etkisi.....11

Tablo 4. Mikroakışkanlaştırma- Sürfektan "Tween 80", "Lesitin", "Sükroz monopalmitat (SMP)" viskozite sonuçları.....69

Tablo 5. Belirli emülsiyonlar için ölçülen zeta potansiyeli sonuçları: TWE, Tween 80; SMP, sükroz monopalmitat; ULT, ultrasonikasyon; MFL, mikroakışkanlaştırmayı temsil etmektedir. 70

Resimler Listesi

Resim 1. %1'lik kapsaisin yüklü nanoemülsiyona daldırılmış kâğıt diskin *Penicillum italicum* üzerindeki etkisi.....10

Resim 2. Çeşitli kapsaisin konsantrasyonlarının Penicillium italicum üzerine etkisi; a-)1.gün b-) 6.gün.....48

Resim 3. Sürfektan "Tween 80" ile hazırlanan nanoemülsiyonlar a-) ilk gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH3.8-pH3.8, gliserol; b-) 28.gün,pH7.4-pH7.4,gliserol-pH3.8-pH3.8,gliserol 54

Resim 4. Sürfektan "Lesitin" a-) ilk gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün, pH3.8-pH3.8, gliserol-pH3.8,ısıtma-pH3.8,gliserol,ısıtma; d-) 28.gün, pH3.8, gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma.....56

Resim 5. Sürfektan "Sükroz monopalmitat"; a-)ilk gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün, pH3,8, gliserol-pH3,8,ısıtma-pH3,8,gliserol,ısıtma; d-) 28.gün, pH3,8, gliserol-pH 3.8,ısıtma- pH3.8, gliserol,ısıtma.....59

Resim 6. Sürfektan "Tween 80" ; a-)ilk gün. pH7.4-pH7.4.gliserol-pH3.8-pH3.8. gliserol; b-) 28.gün.pH7.4-pH7.4.gliserol-pH3.8-pH3.8,gliserol.....61

Resim 7. Sürfektan "Lesitin"; a-) ilk gün. pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4,ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün. pH7.4,gliserol-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,ısıtma-pH3.8.gliserol,ısıtma; d-) 28.gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma.....63

Resim 8. Sürfektan "Sükroz monopalmitat"; a-) ilk gün. pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4,ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün. pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma; d-) 28.gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma.....65

Resim 9. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A)Tween 80. B)Lesitin. C)Sükroz monopalmitat TEM sonucu.....67

Resim 10. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Tween 80. B)Lesitin. C)Sükroz monopalmitat AKM sonuçlarını göstermektedir.....68

Şekiller Listesi

Şekil 1. Antioksidan aktivite DPPH kalibrasyon eğrisi.....15

Şekil 2. Antioksidan aktivite FRAP kalibrasyon eğrisi.....16

Şekil 3. Enkapsülasyon verimi kalibrasyon eğrisi.....17

Şekil 4. Mikroakışkanlaştırma tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin parçacık boyutu sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve G en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....24

Şekil 5. Ultrasonikasyon tekniğiA)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin parçacık boyutu sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....26

Şekil 6. Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlar üzerinde iki homojenizasyon tekniğinin karşılaştırılması. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve G en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....27

Şekil 7. Mikroakışkanlaştırma tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin T2 sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....29

Şekil 8. Ultrasonikasyon tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin T2 sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....30

Şekil 9. Mikroakışkanlaştırma tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin bulanıklık sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....33

Şekil 10. Ultrasonikasyon tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin bulanıklık sonuçlarını göstermektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....35

Şekil 11. Mikroakışkanlaştırma tekniği A,B,C)Tween 80, D,E,F) Lesitin, G,H,I) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin renk sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en

büyük ve H en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....37

Şekil 12. Ultrasonikasyon tekniği A,B,C)Tween 80, D,E,F) Lesitin, G,H,I) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin renk sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve H en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....39

Şekil 13. Mikroakışkanlaştırma tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin enkapsülasyon verimi sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....41

Şekil 14. Ultrasonikasyon tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin enkapsülasyon verimi sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....42

Şekil 15. Mikroakışkanlaştırma tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antioksidan aktivite DPPH vee FRAP sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....44

Şekil 16. Ultrasonikasyon tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antioksidan aktivite DPPH vee FRAP sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....46

Şekil 17. Mikroakışkanlaştırma tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antimikrobiyal aktivite E.coli ve S.aureus sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....50

Şekil 18. Ultrasonikasyon tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antimikrobiyal aktivite E.coli ve S.aureus sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....52

Şekil 19. Mikroakışkanlaştırma-Sürfektan "Tween 80" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk vee 28.gün sonunda.....55

Şekil 20. Mikroakışkanlaştırma-Sürfektan "Lesitin" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk vee 28.gün sonunda.....58

Şekil 21. Mikroakışkanlaştırma-Sürfektan "Sükroz monopalmitat" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk vee 28.gün sonu.....60

Şekil 22. Ultrasonikasyon-Sürfektan "Tween 80" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk vee 28.gün sonu.....62

Şekil 23. Ultrasonikasyon-Sürfektan "Lesitin" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk vee 28.gün sonu.....64

Şekil 24. Ultrasonikasyon-Sürfektan "Sükroz monopalmitat" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F) Renk sonuçlarını ilk ve 28.gün sonunda.....66

Şekil 25. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) pH7.4-Tween 80, B)pH3.8-Tween 80, C)pH7.4-Lesitin, D)pH3.8-Lesitin, E)pH7.4-Sükroz monopalmitat, F)pH3.8-Sükroz monopalmitat numuneleri için diferansiyel taramalı kalorimetri sonuçları.....71

Şekil 26. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat,D)SMP-jelatin numuneleri için parçacık boyutu sonuçları: PASP, peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....73

Şekil 27. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat,D)SMP-jelatin numuneleri için T2 sonuçları: PASP,peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve C en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....74

Şekil 28. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat,D)SMP-jelatin numuneleri için bulanıklık sonuçları: PASP, peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve C en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....75

Şekil 29. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A,B,C) Lesitin-PASP D,E,F)SMP-PASP, G,H,I)SMP-aljinat J,K,L)SMP-jelatin numuneleri için renk sonuçları: PASP, peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....77

Şekil 30. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat,D)SMP-jelatin numuneleri için enkapsülasyon verimi sonuçları: PASP, peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve B en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....78

Şekil 31. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat,D)SMP-jelatin numuneleri için zeta potansiyeli sonuçları: PASP, peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve B en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir.....80

ÖZET

Tıp, ilaç ve gıda endüstrisinde kullanımı artan nanoemülsiyonlar, fonksiyonel özellik gösteren bileşenleri enkapsüle ederek bu bileşenlerin etkili ve kontrollü salınımını, daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalarını ve biyoyararlılıklarının artmasını sağlamaktadır. Emülsiyonlar, emülgatör molekülüyle çevrelenmiş her bir yağ damlacığının oluşturduğu yağ fazının su faz içinde dağılmasıyla oluşmaktadır. Kapsaisin, acı biberin birincil etken maddesidir ve literatürde hidrofobik kapsaisinin, hem kardiyovasküler, solunum ve sinir sistemleri üzerindeki biyoaktivitesinin hem de *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Helicobacter pylori* gibi patojenler üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın hedefi, mikroakışkanlaştırma ve ultrasonik homojenizasyon yöntemleri ile antimikrobiyal aktiviteyi arttırmak için kapsaisin yüklü nanoemülsiyon sistemlerinin hazırlanması ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. Projede, nanoemülsiyon oluşumunda mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonik homojenizasyonunun, sürfektan tipinin, pH ve sıcaklığın etkileri incelenmiştir. Nanoemülsiyonların karakterizasyonu ve fiziksel dayanıklılığın ölçülmesi için NMR Relaksometre başlıca metot olarak kullanılmış bunun yanında karakterizasyon amaçlı, parçacık boyut analizi, zeta potansiyel, transmisyon elektron mikroskopi, atomik kuvvet mikroskopisi de kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite denemeleri yüzeye yayma yöntemi ile *Escherichia coli* için VRBA, *Staphylococcus aureus* için BPA ve disk difüzyonu yöntemi ile *Penicillium italicum* için DRBC kullanılarak yapılmıştır. %2'lik kapsaisin oleoresin içeren nanoemülsiyonların 15 dakika temas süresi sonunda *E. coli*populasyonunda 3.4 log, *S. aureus* için ise 2 saat temas süresi sonunda 5.89 log düşüş görülürken *Penicillium italicum* üzerinde inhibisyon görülememiştir. %2'lik kapsaisin yüklü nanoemülsiyonların antioksidan aktivitesi, DPPH metoduna göre en yüksek 1.36 mg DPPH/ L bulunurken FRAP metoduna göre 0.14 mM Fe(II)/L olarak ultrasonikasyon tekniği ile sürfektan sükroz mono palmitat kullanılarak elde edilmiştir. Sürekli fazda gliserolün, her iki sistem ile sonuçlar üzerinde olumlu etki oluşturduğu gözlenmiştir. Mikroakışkanlaştırma yoluyla işlenmiş nanoemülsiyonlar, gelişmiş bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir.NMRrelaksometri ile nanoemülsiyonların moleküler düzeyde yapılarında meydana gelen değişiklikler gözlenip parçacık boyutu, bulanıklık gibi diğer metotlarla ilişkilendirilebilmiştir.Böylece nanoemülsiyon sistemi ile etkisi zenginleştirilmiş gıdanın ihtiyacına yönelik kapsaisin içeren nanoemülsiyon sistemleri geliştirilebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kapsaisin, nanoemülsiyon, NMR Relaksometre, antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT

The application of nanoemulsions to food, medical and pharmaceutical industries has received great attention among the researchers especially for encapsulation of functional components for controlled release purposes and ensuring the prevention of degradation of active substances, increased rates of bioavailability and antimicrobial effect. Emulsions consist of a lipid phase dispersed in an aqueous continuous phase, with each oil droplet being surrounded by a thin interfacial layer consisting of emulsifier molecules. The primary active ingredient of chili pepper, capsaicin, is a hydrophobic substance that in the literature, it is proved to be a compound with a large bioactivity with manifested actions over the cardiovascular, respiratory and nervous systems and showing good antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Helicobacter pylori*. The aim of the proposed study is to prepare and characterize capsaicin loaded nanoemulsion systems by using microfluidization and ultrasonic homogenization techniques. In the project, effect of microfluidization, ultrasonication, emulsifier type, pH and temperature on nanoemulsion formation will be investigated. For characterization of the capsaicin-loaded nanoemulsions, the nondestructive technique NMR Relaxometry will be used. At the same time, particle size analysis, zeta potential, transmission electron and atomic force microscopy techniques will be used for characterization. Antimicrobial activity of nanoemulsions were evaluated using spread plate technique against *Escherichia coli* by using VRBA, *Staphylococcus aureus* by using BPA and disc diffusion technique against *Penicillium italicum* by using DRBC. In the experiments, nanoemulsion containing 2% capsaicin showed 3.4 log reductions of E. coli population after 15 min of contact time and 5.89 log reductions of *S.aureus*population after 2 hours of contact time whereas the same concentration of nanoemulsions showed no inhibition on *Penicillium italicum*. Nanoemulsion containing 2% capsaicin showed highest antioxidant activity according to the DPPH method with 1.36 mg DPPH / L as well as according to FRAP method with 0.14 mM of Fe (II) / L by using surfactant sucrose monopalmitate and ultrasonication technique. Addition of glycerol to the continuous phase showed enhanced effect on the results within both systems. On the other hand, nanoemulsions processed by microfluidization were exhibited an enhanced antimicrobial activity. NMR relaxometry technique was helped to track changes in nanoemulsions at a molecular level that could be associated with the other methods such as particle size, turbidity. Therefore, nanoemulsions with an improved functionally which obtained by using essential oil capsaicin have been shown to meet the needs of food industry.

Keywords: Capsaicin, nanoemulsion, NMR Relaxometry, antimicrobial activity

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar tarafından gıdalarda meydana gelen bozulmalar gıdada istenmeyen tat ve kokuların oluşumuna sebep olduğu için tüketici açısından oldukça önemlidir. Ayrıca bu sorun endüstri açısından büyük maddi kayıplara neden olurken tüketici açısından da patojen (hastalık yapıcı) nitelikte oldukları zaman sağlık açısından risk oluştururlar. Antimikrobiyal özellik gösteren doğal maddelerin gıdalara direk ya da indirekt olarak eklenmesi (antimikrobiyal özellik gösteren paketleme malzemelerinin tasarımı), stabilitelerinin arttırılması ve uzun süre aktivite gösterebilmeleri için enkapsüle edilmesi literatürde çalışılmış konulardır. Kapsaisinin kendi başına antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği ve nanoemülsiyonlara entegre edilip terapatik etkisinin de incelendiği çalışmalar mevcuttur. Bu proje, antimikrobiyal özellik gösteren kapsaisininin antimikrobiyal aktivitesini arttırmak için farklı sürfektanlar (doğal ve sentetik) kullanarak, nanoemülsiyon sistemlerinin içerisine hapsedip fonksiyonel bir emülsiyon sistemi tasarlanmasını inceleyen özgün bir çalışmadır. Daha önceden de belirtildiği gibi doğal sürfektanlar kullanarak kapsaisin içeren nanoemülsiyonlar tasarlanmamış ve bu nanoemülsiyonların gıda kaynaklı patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri incelenmemiştir. Nanoemülsiyon sistemlerinin geliştirilmesi sürecinde düşük rezolüsyonlu NMR Relaksometre gibi tahribatsız bir tekniğin kullanılması da çalışmanın özgünlük değerini artırmaktadır. Bu tekniğin artık daha ucuz ekipman kullanılarak gerçekleştirilebilmesi, uygulama alanlarının yaygınlaştırılmasını sağlaması açısından da bu projeyi önemli bir noktaya koymaktadır. Literatürde NMR Relaksometre kullanarak nanoemülsiyon tabanlı enkapsülasyon sistemlerinin tasarımını yapan ve gıda uygulamasını inceleyen bir çalışma henüz yoktur. Çalışma sonucunda elde edilen sistemler fonksiyonel gıda tasarlanmasında kullanılabilmesi (duyusal analiz çalışmaları ile paralel olarak) , paketleme malzemelerine entegre etme potansiyeline sahip olduğundan daha farklı proje önerinin sunulabilmesine olanak sağlamıştır.

1. LİTERATÜR ÖZETİ

Nanoteknoloji, gıda sanayisi için geliştirmekte olan, büyük potansiyele sahip bir teknolojidir (Huang vd., 2010; Luykx vd., 2008). Nanoteknoloji, 100 nm'den daha küçük yapıların karakterizasyonu, yapımı ve işlenmesi üzerine yoğunlaşır (Quintanilla-Carvajal vd., 2010). Nanoteknolojinin gıda endüstrisindeki uygulama alanlarından biri gıdaların besin öğelerince zenginleştirilmesi ve yeni ürün geliştirilmesidir. Gıda alanında nanoteknoloji uygulamaları, tekstür, tat, diğer duyusal özellikler, renk verme gücü, işlenebilirlik ve raf ömrü süresince stabilite gibi gıdanın birçok özelliğinde modifikasyon sağlayarak yeni ürünlerin üretilmesine öncülük etmektedir. Ayrıca, nanoteknoloji uygulamalarının, fonksiyonel bileşenlerin suda çözünürlük, termal stabilite ve biyoyararlılıklarını arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Huang vd., 2010; McClements vd.,2007, 2009). Nanoemülsiyonlar, bu teknolojinin en ilgi çeken alanlarından biridir. Nanoemülsiyonlar, nutrasötikler, ilaçlar, tatlandırıcılar, antioksidanlar ve antimikrobiyal ajanlar gibi lipofilik bileşikler için taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır (McClements vd.,2007; Jiahui vd., 2004; Kesisoglu vd., 2007; Sanguansri ve Augustin, 2006; Weiss vd., 2008; Wissing vd., 2004). Her bir yağ damlacığının emülsiyon moleküllerden oluşan ince bir ara-yüz tabakası ile çevrelenmesi ile oluşan nanoemülsiyonlar, sulu bir kesintisiz faz içinde dağıtılmış bir yağ fazından oluşmaktadır. Nanoemülsiyonların makro emülsiyonlardan ayıran en önemli özellikleri parçacık boyutlarının küçük olmasıdır. Literatürde bir emülsiyonun nanoemülsiyon olarak sınıflandırılması kriteri için parçacık boyutunun üst limiti konusunda ortak bir görüş olmadığı, yakın zamanda yayımlanan derleme çalışmalarında belirtilmiştir (McClements, 2012; Solans ve Sole, 2012) . Üst limit için genel eğilim 100 nm olmakla beraber, 200 nm, 500 nm parçacık boyutunda olan emülsiyonların da 'nano' olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (McClements, 2012; Abbas vd., 2014; Bouchemal vd., 2004; Choi vd., 2011a; Donsi vd., 2012a). Nanoemülsiyonlar, nispeten küçük parçacık boyutuna sahip olduklarından dolayı Brownian hareket etkisi yerçekimi kuvvetine karşı baskın geleceğinden yer çekimi etkisi nedeniyle ayrılmaya karşı dayanıklıdır (McClements, 2005). Yine düşük parçacık boyutu daha az ışık saçılımına sebep olduğundan bu emülsiyonlar şeffaf ya da az bulanık bir görünüme sahip olur.

Nanoemülsiyonlar, düşük ve yüksek enerjili metotlar kullanılarak elde edilebilir. Yüksek basınç homojenizasyonu ve ultrasonikasyon nanoemülsiyon üretmek için yaygın olarak kullanılan yüksek enerjili yöntemlerdendir. Düşük enerjili yöntemlerden ise kendiliğinden toplaşma ve ters faz sıcaklığı metotları sıklıkla kullanılır (Tadros vd., 2004;Acosta, 2009; Leong vd., 2009; Piorkwoski ve McClements, 2013). Bu metotlarda emülsiyon oluşturmak

için iyonik olmayan sürfektanlar genellikle yüksek konsantrasyonlarda (>%6) kullanılırlar. Kullanılan sürfektan konsantrasyonu emülsiyonların parçacık boyutunu ciddi bir biçimde etkiler. Kullanılan sürfektan tipi emülsiyon oluşumunda çok kritik olduğundan kendiliğinden toplaşım yöntemiyle oluşturulan emülsiyonların gıdalar için kullanımı sınırlı kalabilir. Bu projede tasarlanan nanoemülsiyon sistemlerinde yüksek konsantrasyonda sentetik sürfektan kullanımı tercih edilmediğinden yüksek basınç homojenizasyon tekniği olan mikroakışkanlaştırma ve ultrasonik homojenizasyon teknikleri kullanılmıştır.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde farklı emülgatörler, aktif maddeler ve taşıyıcı yağlar kullanarak tasarlanan ve karakterize edilen birçok nanoemülsiyon sisteminin olduğu görülür. Salvia-Trajillo vd. (2014) limon otu yağınının antimikrobiyal aktivitesini artırmak için aljinat ve Tween 80 kullanarak mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile nanoemülsiyonlar oluşturmuş ve nanoemülsiyonların *E. coli* içeren sıvı besi yerine eklenip 5., 10., ve 30. dakikada alınan numunelerde sırasıyla 1.37, 5.29 ve 7.07 log azalma gözlemlemiştir. Nanoemülsiyonlar, , 1500 bar basınçta 10 tekrar ile yapılmış ve parçacık boyutu 1410 nm'den 5.8 nm'ye düşürülmüştür. Nanoemülsiyonların parçacık boyutları ayrıca transmisyon elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak da doğrulanmıştır. Limon otu yağının nanoemülsiyon sistemi oluşturarak enkapsüle edildiği diğer bir çalışmada Kim vd. (2014b) tarafından yapılmıştır. Üzüm taneleri limon otu yağı kullanarak hazırlanan nanoemülsiyonlar ile kaplanmış ve kaplamalı üzüm tanelerinin 28 gün boyunca 4 ve 28 ^{o}C'de *S. typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı rezistans gösterdiği görülmüştür. Sugumar vd. (2012), %16.66 Tween 80, %16.66 okaliptüs yağı ve % 68.68 su ile ultrasonikasyon kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların parçacık boyutlarının 17.1 nm olduğunu aynı zamanda*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* 'ye karşı etkili olduğunu göstermiştir. Xue ve Zhong (2014), uçucu bir yağ olan, antimikrobiyal özelliği olduğu bilinen timol (%0.8) , emülgatör olarak lesitin (%1) ve konsantrasyonu %0-0.6 arasında değişen jelatin kullanarak propilen glikol (PG) içerisinde, 15,000 rpm 'de 2 dakika karıştırma ile nanoemülsiyon elde etmiş ve parçacık boyutunun 45-85 nm arasında değiştiğini göstermiştir. Hazırlanan timol nanoemülsiyonlarının 4 haftalık depolama süresince parçacık boyutlarında minimal değişimler olduğu da araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Sari vd. (2014) türmerik bitkisinin en aktif ama en az dayanıklı maddesi olan kurkumin ile nanoemülsiyonlar hazırlamıştır. 100 ml su içerisinde 10-40 mg arası miktarlarda kurkumin, taşıyıcı yağ fazı olarak orta zincirli trigliserit (%0.5-%2), sürfektan olarak (2-10%) Tween 80 ve emülgatör olarak da %70 protein içeren peynir altı suyu tozu proteini (0-1% w/w) ile ultrasonikasyon kullanılarak parçacık boyutu 140-160 nm arasında değişen nanoemülsiyonlar elde edilmiştir. Hazırlanan kurkumin nanoemülsiyonları ile simüle mide sıvısında yapılan denemelerde

kurkuminin salınım hızının kontrol numunelere göre yavaşlamış olduğu gösterilmiş, bu durumun da kurkuminin bioyararlılığını arttırabileceği belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada, Donsi vd. (2011), uçucu yağ özelliği gösteren bir terpen karışımını ve D-limoneni 300 MPa'da yüksek basınç homojenizatörü kullanarak nanoemülsiyon sistemine enkapsüle etmiş ve farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Hazırlanan nanoemülsiyonlar, L. delbrueckii inoküle edilmiş portakal ve armut suyu gibi meyve sularının da içine eklenmiş ve nanoemülsiyonların düşük konsantrasyonlarda (1 g/l), mikrobiyel büyümeyi yavaşlattığını, yüksek konsantrasyonlarda (5 g/l) ise tamamen inaktivasyon sağladığını göstermiştir. Meyve sularında duyusal anlamada ciddi bir değişiklik olmadığı da çalışmada belirtilmiştir. Isıtma işlemi de nanoemülsiyon oluşumunda önemli bir uygulamadır. Mikroakışkanlaştırma işlemi öncesinde, aktif madde ve sürfektan içeren karışımın ısıtılmasının nanoemülsiyonların parçacık boyutunu ciddi oranda etkilediği bulunmuştur (Rao ve McClements, 2011a, 2011b). Isıtmanın yanı sıra kullanılan sürfektan ve yağ oranı da oldukça önemlidir. Belirtilen çalışmalarda (Rao ve McClements, 2011a, 2011b) nanoemülsiyon oluşturmak için gerekli maksimum sürfektan yağ oranının 2:1 olduğu bulunmuştur. Isıtma işleminin nanoemülsiyon üzerindeki etkisi sükroz mono palmitatın sürfektan olarak kullanıldığı emülsiyonlarda incelenmiştir. Emülsiyonlar mikroakışkanlaştırma işlemi öncesinde 23 ºC'den 80 ºC'ye 0.8 C/dakika hızla ısıtılmış ve sonrasında mikroakışkanlaştırma öncesinde oda sıcaklığına geri soğutulmuştur. Bu işlem sonunda parçacık boyutunun ısıl işlem görmemiş nanoemülsiyonlara göre çok daha küçük olduğu bulunmuştur. Sükroz mono palmitatın ısıl işlem sonucunda parçacıklar üzerindeki dağılımının değiştiği bununda parçacık boyutunu etkilediği belirtilmiştir. Sükroz mono palmitat su da çözünebilen, tek bir yağ asidi zinciri içeren, bir şeker esteri olduğu için daha 'yeşil' ve çevre dostu kabul edilen, toksik özellik göstermeyen bir sürfektandır. Bu projede de sükroz mono palmitatın ve ısıtma işleminin hazırlanacak kapsaisin yüklü nanoemülsiyonlar üzerindeki etkisi de incelenecektir. Nanoemülsiyonlarda emülsiyonu oluşturan dağılan faz ile sürekli fazın viskozite oranı da parçacık boyutu üzerinde oldukça etkilidir. Nitekim iki fazın viskozite oranı büyüdükçe parçacık boyutu artar. Bu nedenle nanoemülsiyon oluşturmak için yüksek aktif madde konsantrasyonu gereken durumlarda sürekli fazın viskozitesi ile dağılan fazın viskozitesini birbirine yakınlaştırmak için gliserol , (Qian ve McClements, 2011; Rao ve McClements, 2013; Lee ve Norton 2013; Lee vd., 2014) , propilen glikol (Rao ve McClements, 2011a, 2011b; Rao ve McClements, 2013; Xue ve Zhong, 2014); ya da poli etilen glikol (Wooster vd., 2008) kullanılabilir. Bu projede, nanoemülsiyon hazırlarken bu faktörün etkisi de araştırılmış ve sürekli faza gliserol katılarak da denemeler yapılmıştır.

Acı biberler, ikincil metabolit olarak ürettikleri kimyasal bir grup olan kapsaisinoid olarak bilinen alkaloid grubu içerirler. Bu grup Capsicum türüne ait bitkilere acı ve keskin tat özelliği kazandırır. Bu tür içinde kapsaisin ve dihidrokapsaisin temel bileşenler olup keskin tadın sorumlusudur. Bu bileşenlerin bir başka özelliği olan ve bu çalışmada da hedef alınan antimikrobiyal aktivitesi yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Doğada çok yaygın olarak bulunan, insan ve hayvanlar için patojen mikroorganizma grubuna giren *Bacillus subtilis*'in 48 saat inkübasyonu sonucu kapsaisin bulunan ortamda gelişiminin engellendiği bulunmuştur. (Stephen vd., 2014). Başka bir çalışmada ise, yine doğada sık rastlanan ve gıda kaynaklı zehirlenmelerde önemli rol oynayan indikatör mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ve *E. coli* 'nin inhibisyonu üzerinde kapsaisin aktif olarak görev almıştır (Dima vd., 2013). Alternatif gıda paketleme materyali üretimi için yapılan bir çalışmada 4 farklı çeşit acı biberden (Green Malagueta Salvador, Red Malagueta Salvador, Red Thai Capsicum Frutescens ve Red Cayenne) ekstrakt edilen kapsaisin ve dihidro kapsaisin kullanılarak antimikrobiyal film üretilmiştir. Antimikrobiyal aktivite deneyleri sonucunda sırasıyla 50 g/l, 100 g/l and 150 g/l konsantrasyonları kullanılarak Gram negatif bakteri olan *E. coli* ve Gram pozitif bakteriler olan *Streptococcus* ve *B. subtilis* inhibe edilmiştir (Leng vd., 2013).

Daha önceden de belirtildiği gibi, nanoemülsiyonlar kapsaisin gibi lipofilik maddelerin dayanıklılığını ve biyoyararlılıklarını arttırmak için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir. Farmakokinetik alanda yapılan bir çalışmada kapsaisin yüklü nanoemülsiyon sistemleri kullanılarak fareler üzerinde yapılan deneylerde 10 mg/kg kapsaisin kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda, kontrollere kıyasla 131.7 kat daha fazla biyoyararlılık, uzun yarılanma ömrü görülmüştür (Choi vd., 2013). Kapsaisin deri hastalıklarının tedavisinde terapatik ajan olarak da kullanılmaktadır. Kapsaisin yüklü nanoemülsiyonların deriye difüzyonunun araştırıldığı bir çalışmada konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM) ile alınan görüntülerde, deri katmanlarına difüzyonun nanoemülsiyon sistemleri sayesinde daha etkili olduğu bulunmuş ve bu sistemin transdermal salınım sistemlerinin tasarlanmasında kullanılabileceği belirtilmiştir (Kim vd., 2014a).

Nanoemülsiyon sistemlerinin fonksiyonel bileşenlerin bozunmadan iletiminde etkili olduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur. Yapılan bir çalışmada kendiliğinden toplaşım (self - assembly) metodu ile kapsaisinin taşınımı için aljinat ve kitosan ile stabilize edilen nanoemülsiyon sistemi tasarlanmıştır. Çalışmada, 20 nm ve daha az boyutlara ulaşan çift katmanlı ve üç katmanlı nanoemülsiyon sistemleri üretilmiş ve fonksiyonel gıda tasarımında kullanılmak üzere stabilitesi yüksek bir sistem geliştirilmiştir (Choi vd.,2011a). Ancak yapılan bu çalışmada, hidrofil-lipofil dengeyi sağlamak ve düşük enerjili bir emülsiyon elde etme

yöntemi olan kendiliğinden toplaşım yöntemi ile emülsiyon elde edebilmek için iyonik olmayan ve gıdalarda kullanımı uygun sentetik olan sürfektanlar; Tween 80 ve Span 80 yüksek konsantrasyonlarda (>%14) kullanılmıştır. Soya ya da yumurta lesitini gibi doğal kaynaklı ve sürfektan özelliği gösteren fosfolipitlerin ya da şeker esterlerinin sürfektan olarak kullanıldığı kapsaisin yüklü nanoemülsiyon sistemleri üzerinde literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

NMR Relaksometre düşük alan gücündeki manyetik alan sistemlerinin, uygun fiyata üretilebilmesine paralel olarak daha sık kullanılmaya başlayan bir yöntem olmuştur. Fonksiyonel gıdalar için kullanılan mikrokapsüllerin (Wichchukit vd., 2013), jel sistemlerinin tasarımında (Oztop vd., 2010), kontrollü salınımı gerçekleşecek aktif maddelerin difüzyon katsayısının belirlenmesinde (Oztop vd., 2012), mikrokapsüllerin dayanıklılığının tespitinde (Wichchukit vd., 2013), jel sistemlerinin oluşumunda önemli bir yere sahip olan çapraz bağlaşım mekanizmasının incelenmesinde (Oztop vd., 2012; Williams vd., 2011), NMR Relaksometre kullanımı ciddi bir kolaylık sağlamıştır. NMR Relaksometre T1 ve T2 zamanlarının ölçülmesine dayanan bir tekniktir. T1 ve T2 zamanları NMR için gerekli RF sinyalinin kısa süreli uygulanması sonucunda oluşan sinyalin farklı düzlemlerdeki azalış (T2) ve artışını (T1) karakterize eden zaman sabitleridir. T1: longitudinal salınım T2 ise transverse salınım zamanı olarak bilinir. T1 zamanı eksponansiyel olarak artan bir sinyal ile karakterize edilirken T2 zamanı eksponansiyel olarak azalan bir sinyal eğrisinden elde edilir. NMR Relaksometre deneyinin çıktısı olan NMR Relaksasyon spektrası bu sinyal eğrilerine Ters Laplas yönteminin uygulanmasıyla elde edilir. NMR Relaksasyon spektrası numunelerdeki proton havuzları hakkında bilgi verir (Ersus vd., 2010; Hills, 1998; Oztop vd.,2010, 2012; Wichikut vd., 2013). Bu teknikle, meyve sebze numunelerinde ısı , basınç , vurgulu elektrik alan gibi süreçlerin hücresel yapı üzerindeki etkisinin nasıl ve ne derece olduğu hakkında bilgi elde edilebilir (Gonzalez vd., 2010 ; Ersus vd., 2010). Bu teknik özellikle petrol endüstrisinde taş analizlerinde sıvının rezerve içerisinde nasıl dağıldığını gözlemlemek için de yoğun bir biçimde kullanılır (Hamada vd., 2001). Bu proje kapsamında, belirtilen proton havuzları nanoemülsiyon sistemlerindeki dayanıklılığın değişikliğini tespit etmek için kullanılmıştır. Bu tekniğin nanoemülsiyon tabanlı sistemlerinin karakterizasyonu ve dayanıklılık tespiti için kullanılması tahribatsız ve kolay bir teknik olması yönünden büyük avantaj sağlayacaktır. Literatürde henüz, gıdalar için nanoemülsiyon sistemleri tasarlamak amacıyla düşük rezolüsyonlu NMR relaksometre tekniğinin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu proje, bu tekniğin gıdalarda nanoemülsiyon sistemlerinin tasarlanması için de kullanılabileceğini göstermek açısından literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Bu raporda, desteklenen projede belirtilen iş paketlerinden alınan sonuçlar tartışılacaktır. Yapılan deneylerin takip edilebilirliği açısından proje başvuru metninde verilen deney tasarımı tablosuda eklenmiştir (Tablo 1). Ayrıca, raporun anlaşılabilirliği açısından, İş Paketi Çizelgesi deyeniden verilmiştir (Tablo 2.).

Tablo 1. Nanoemülsiyon formülasyonlarında kullanılacak konsantrasyonlar, etkisi incelenecek parametreler ve kullanılacak karakterizasyon teknikleri

1. Kısım	
Faktörler	**Seviyeler**
Homojenizasyon tekniği	Mikroakışkanlaştırıcı , Ultrason
Mikroakışkanlaştırma basıncı , tekrar sayısı	1000 Mpa , 5 tekrar
Sürfektant tipi	Soya Lesitini , Sükroz Mono Palmitat , Tween 80
pH	3.5 , 7
Sürekli Faz Kompozisyonu : % Gliserol	0 , %50
Kapsaisin konsantrasyonu	2%
Mikroakışkanlaştırma öncesi ısıtma (**Lesitin** ve **Sükroz Mono Palmitat** için denenecektir)	Var , Yok
Toplam Nanoemülsiyon Formülasyonu : 40	
2. Kısım	
Faktörler	**Seviyeler**
Biyopolimer tipi	PASP , Gelatin , Aljinat
Sürfektan tipi	Sükroz Mono Palmitat , Soya Lesitini
pH	3.5 , 7
Mikroakışkanlaştırma öncesi ısıtma	Var , Yok
Toplam Nanoemülsiyon Formülasyonu : **24**	
Yapılacak Analizler	
1. Antimikrobiyel Aktivite	
2. Parçacık boyutu	
3. Zeta Potansiyeli	
4. Bulanıklılık	
5. Renk	
6. Transmisyon Elektron Mikroskobu	
7. Atomik Kuvvet Mikroskobu	
8. NanoEmülsiyon içerisindeki aktif madde miktarınının belirlenmesi için HPLC deneyleri	
9. NMR Relaksometre Deneyleri	
10. MRG Deneyleri	
11. 1 aylık depolama süresince dayanıklılık takibi	
12. Reoloji Deneyleri	
13. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Deneyleri	

Tablo 2. Proje iş paketi çizelgesi

İP No	İş Paketi Adı/Tanımı	Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği	AYLAR											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
01	Malzemelerin alınması	Yürütücü												
02	Nanoemülsiyon oluşturmak için ön denemelerin yapılması kullanılacak sürfektan, kapsaisin konsantrasyonlarının belirlenmesi	Yürütücü, Bursiyer												
03	Spin Vision sisteminde kullanılacak NMR sekanslarının tespiti, veri analizi dosyalarının MATLAB yardımıyla hazırlanması,	Yürütücü,												
04	Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanacak kapsaisin yüklü nanoemülsiyon sistemlerinin hazırlanması ve karakterizasyonu	Yürütücü, Araştırmacı, Bursiyer												
05	Mikroakışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanacak nanoemülsiyonların hazırlanması karakterizasyonu antimikrobiyel aktivitelerin belirlenmesi	Yürütücü, Araştırmacı, Bursiyer												
06	Biyopolimer içeren nanoemülsiyonların dayanıklılıkların tespiti ve antimikrobiyel aktivelerin belirlenmesi	Yürütücü, Araştırmacı, Bursiyer												

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Gereçler

Oleoresin kapsikum (OC) yerel bir firma olan Alfasol (Gaziantep-Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Tedarikçi firma tarafından kapsaisin içeriği %6,6 olduğu ve Scoville skalasına göre 1.000.000 SHU karşılık geldiği rapor edilmiştir. Tween 80, demir (III) klorür, demir sülfat, potasyum fosfat monobazik, dibazik sodyum fosfat dihidrat, sodyum asetat, etanol, metanol, etil asetat, glasiye asetik asit, TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazin), 2, 2 difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Gliserin, Violet Red Bile Agar (VRBA), Potato Dextrose Agar (PDA) Nutrient Broth, Pepton Merck KGaA (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Yumurta sarısı-tellürit emülsiyonu eklenmiş Baird Parker Agar (BPA) besiyeri ve DRBC (Dichloran Rosebengal Chloramphenicol Agar) yerel bir firma olan Nisan Elektronik Ltd., Ankara, Türkiye firmasından hazır besiyeri olarak alınmıştır. Soya lesitini,Smart Kimya (Ankara, Türkiye) tarafından sağlanmıştır. Sükroz monopalmitat Compass Foods Company (Singapur) tarafından temin edilmiştir.Damıtılmış su, solüsyonların hazırlanması için kullanılmıştır.

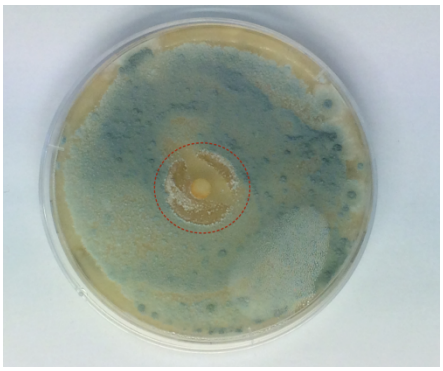
Antimikrobiyel aktivite deneyleri için *Penicillum italicum*, *E. coli* ve *S. Aureus*mikrorganizmaları kullanılmıştır. *Penicillum italicum* küfü, Süleyman Demirel Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden, *E. coli* ve *S. Aureus* O.D.T.Ü Gıda Mühendisliği Gıda Analiz Laboratuvarından temin edilmiştir.
Belirtilen malzemelerin temin edilmesiyle 1. İş paketi tamamlanmıştır.

2.2 Kapsaisin İçeriğinin Belirlenmesi

Nanoemülsiyon hazırlamak için kullanılan, oleoresin kapsikum içerisindeki kapsaisin miktarı HPLC ile ODTÜMoleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezinde hizmet alımıyla belirlenmiştir. Kolon olarak Pursuit C18 Microsorb MV C18 (4,6 x 250 mm, 5 mm), dedektör olarak UV-VIS (ProStar 330 PDA) ve mobil faz olarak metanol: su (70:30 v/v)karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 15 dakika boyunca 0.8 ml/dak olarak ayarlanmış ve 280 nm dalga boyunda oda sıcaklığında ölçüm alınmıştır.

2.3 Nanoemülsiyonlarda Kullanılacak Olan Kapsaisin Oleoresin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Literatürde kapsaisinin emülsiyon kullanılarak enkapsüle edildiği çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar farklılık göstermektedir. Hazırlanan kapsaisin nanoemülsiyonlarının deriye geçiş hızının araştırıldığı bir çalışmada kapsaisin konsantrasyonu % 0.2-0.4 arasında (oleoresin olarak %10-18'e karşılık gelmektedir) (Kim vd., 2014a) ; yüksek sürfektan konsantrasyonu kullanarak kendiliğinden toplaşım yöntemi ile hazırlanan bir çalışmada %2 (Dima vd., 2013) ; aljinat ve kitozanla yine kendiliğinden toplaşım yöntemi ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda ise Tween 80 konsantrasyonun 3'te biri (Choi vd.,2011, 2013) olacak şekilde sistemler tasarlanmıştır. Burada belirtilmesi gereken önemli bir nokta, literatürde yapılan çalışmalarda olduğu gibi bu proje kapsamında da, kapsaisinin oleoresin şeklinde kullanılacak olmasıdır. Oleoresin, kapsaisin içeren kırmızı acı biberin özütüdür. Buna göre yapılan çalışmaları dikkate alarak, bu projede kullanılması planlanan oleoresin kapsikum konsantrasyonu ağırlıkça %2 olarak belirlenmiştir (Dima vd., 2013). Yapılan ön deneylerde, %1'lik kapsaisin oleoresin içeren nanoemülsiyonların limon küfü olarak da bilinen *Penicillum iltalicum*üzerindeki etkisine bakılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla, 30 dakika boyunca nanoemülsiyondan bekletilen kâğıt diskin oluşturduğu inhibisyon zonu aşağıda gösterilmiştir (Resim1) . Görüldüğü üzere bu konsantrasyonda tam bir inaktivasyon sağlanmamasına rağmen küfün büyümesinin geciktiği gözlemlenmektedir.



Resim 1. %1'lik kapsaisin yüklü nanoemülsiyona daldırılmış kâğıt diskin *Penicillum italicum* üzerindeki etkisi

Ayrıca kullanılacak konsantrasyonu doğrulama amacıyla, sürfektan kullanmadan, sadece ön homojenizasyona maruz kalmış *kapsaisin oleoresin (%1-10)+tampon çözeltisi*karışımlarınınantibakteriyal etkisini görmek için *E. coli* üzerinde denemeler yapılmıştır. Tablo 3'de *E.coli* üzerinde yapılan deney sonuçları verilmiştir. Bu deneylerin nasıl yapıldğı ileriki kısımlarda detaylarıyla anlatılacaktır. Tablo 3'e göre %2' lik

konsantrasyondamikroorganizma sayısı üzerinden belirli bir düşüş yaşandığından ve kapsaisin konsantrasyonunun minimumda tutulması hedeflendiğinden %2'nin uygun bir konsantrasyon olduğuna karar verilmiştir. Sonuç olarak, %2 oleoresin kapsikum içeren emülsiyonların kullanılmasına karar verilmiş ve 2. iş paketide tamamlanmıştır.

Tablo 3. Oleoresin kapsikum konsantrasyonlarının (KAP) zamana karşı (dakika, dk)*E. coli* üzerinde etkisi

Örnek		***E.coli* Düşüş (log)**	**Örnek**		***E.coli* Düşüş (log)**
Mikroakışkanlaştırma			**Ultrasonikasyon**		
%2 KAP	**5 dk**	1.92	**%2 KAP**	**10 dk**	0.35
	15 dk	1.94		**30 dk**	0.02
	30 dk	1.75		**60 dk**	0.33
	60 dk	1.99		**120 dk**	0.14
%3 KAP	**5 dk**	1.85	**%3 KAP**	**10 dk**	0.34
	15 dk	1.76		**30 dk**	0.3
	30 dk	1.85		**60 dk**	0.26
	60 dk	1.93		**120 dk**	0.12
%4 KAP	**30 dk**	1.36	**%4 KAP**	**10 dk**	0.69
	60 dk	1.36		**30 dk**	0.19
	2 sa	1.32		**60 dk**	0.41
	4 sa	1.15		**120 dk**	0.04
	6 sa	1.03			
%10 KAP	**15 dk**	0.28			

2.4 Nanoemülsiyonlarda Kullanılacak Su Fazının Hazırlanması

Tablo 1'de belirtildiği üzere nanoemülsiyonlar iki farklı pH'da hazırlanmıştır. Sabit pH'larda çalışabilmek amacıyla tampon çözeltikullanılmıştır. Fosfat tamponu (0.2 M) 4.56 g susuz potasyum fosfat monobazik ve 28.87 g sodyum fosfat dibazikdihidratın distile su içerisinde karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Gerekirse karışımın pH sı 7.4 olana kadar NaOH ve / veya HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Asetat tamponu (0.2 M) distile su içerisinde 12 ml 0.2 M sodyum asetat ve 88 ml 0.2 M asetik asit çözülmesiyle elde edilmiştir. Karışımın pH'sı gerekirse NaOH veya HCl kullanılarak3.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

2.5 Emülsiyonların Hazırlanması

Hazırlananemülsiyonların %2'sini kapsikumoleoresinden oluşan yağ fazı ve %98'ini (%2 sürfektan,%0-50 gliserol, pH 7.4 sodyum fosfat tamponveyapH 3.8 sodyum asetat tampon) sıvı fazı oluşturmaktadır. Ön homojenizasyon işlemi içinODTÜGıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan karıştırıcı (WiseTis Homogenizer Witeg Labortechnik GmbH, Germany) kullanılmıştır. Ön homojenizasyon parametreleri için literatürdeki çalışmalar takip edilmiştir (Salvia-Trujillo vd.,2014;Donsi vd., 2012a). Nanoemülsiyon hazırlamak için Tablo 1'de belirtildiği üzere 3 farklı sürfektan kullanılmıştır. Sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan emülsiyonlar 20.000 rpm'de 2 dakika ve sürfektan lesitin ve sükroz mono palmitat içerenler ise 15.000 rpm'de 3 dakika süresince karıştırılmıştır. Homojenizasyon öncesi ısıtmanın etkilerini incelemek için sürfektan lesitin ve sükroz monopalmitat ön homojenizasyon öncesinde 60°C de 30 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve daha sonra ön homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu aşamada hazırlanan emülsiyonlar birincil emülsiyonlar olarak adlandırılmıştır. Birincil emülsiyonlardan nanoemülsiyon eldesi için daha Tablo 1'de belirtildiği gibi ön homojenizasyon sonrası nanoemülsiyon hazırlamak için mikroakışkanlaştırma ve ultrasonikasyon olmak üzere 2 farklı homojenizasyon tekniği uygulanmıştır.

2.5.1 Mikroakışkanlaştırma

Birincil emülsiyonlar ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan Ilshin AutoClave marka 1.500 bara kadar basınçlayabilen bir mikroakışkanlaştırıcıdan geçirilerek nanoemülsiyonlar eldeedilmiştir. Proje kapsamında nanoemülsiyon üretmek için literatürdeki çalışmalar referans alınarak (Salvia-Trujillo vd., 2014; Lee ve Norton 2013; Lee vd., 2014) 1.000 barda 5 pass sayısında nanoemülsiyon üretimi yapılmıştır. Mikroakışkanlaştırıcıya bağlanan soğutma ünitesi sayesinde emülsiyonlar 25 °C de tutulmuştur. Böylece projede 5. iş paketi olarak belirtilen çalışmalar tamamlanmıştır.

2.5.2 Ultrasonikasyon

Birincil emülsiyonlaraODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan Bandelin Sonoplus marka HD 3100, sonotrode: MS72 problu ultrasonikator ile %75 güçte 5 dakika sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Bu süreçte emülsiyon buz dolu beher içinde tutularak aşırı ısınma engellenmiştir. 4. iş paketi bu aşamada tamamlanmıştır.

2.5.3 Biyopolimer Ekleme

Projenin %15 ini oluşturan bu kısımda, nanoemülsiyon stabilitesinin arttırılması için formülasyona aljinat (%1 w/w), jelatin (%0.5 w/w) ve peynir altı suyu proteini (PASP- %0.5 w/w) eklenmiştir. Homojenizasyon tekniği olarak sadece mikroakışkanlaştırma işlemi uygulanmış ve sürfektan olarak sükroz monopalmitatve soya lesitini kullanılmıştır. Karakterizasyon amacıyla daha sonraki kısımlarda detaylandırılacak teknikler kullanılmıştır.Parçacık boyutu, renk, bulanıklık, NMR T2 zamanı ölçümü ve stabilitedeneyleri yapılmıştır. Bunun yanında stabilitenin gözlemlenmesi için zeta potansiyeline bakılmış ve seçilen numuneler için antimikrobiyal aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. 6. iş paketi bu şekilde tamamlanmıştır.

2.6 Parçacık Boyut Analizi

Nanoemülsiyonların parçacık boyutları hem üretimin hemen sonrasında hem de depolama sırasında Malvern Mastersizer 3000 cihazı ile ölçülmüştür. Lazer ışığın parçacıklar üzerinden geçerek kırılması sonucu parçacık boyutunun ölçüldüğü bu sistemde kapsaisin için kırılma indeksi 1.52 olarak belirlenmiş ve ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Emülsiyonların parçacık boyutu yüzey alanı bazlı ortalama çap olarak (D[3,2]) olarak verilmiştir.

2.7 Nanoemülsiyonlarda Renk ve Bulanıklık Deneyleri

Farklı koşullarda ve içeriklerde hazırlanan emülsiyonların renklerin belirlenmesi için Minolta marka CM-5 model renk ölçer kullanılmıştır. Ölçümlerde L (parlaklık), a (kırmızılık), b (sarılık) değerleri ölçülmüştür. Bulanıklığı ölçmek için 600 nm ‘de Optizen marka Mecasys model UV-VIS spektrofotometre kullanılmıştır.

2.8 NMR Relaksometre Deneyleri

NMR deneyi için ODTÜGıda Mühendisliği bölümündeki Spin Core markalı0.50T gücündeki benç tipi düşük rezolüsyonlu NMR sistemi kullanılmıştır. T2 relaksasyon zamanı, Spin Coresisteminden elde edilen T2 sinyal eğrilerininMATLAB yazılımı kullanarak analizi ile

hesaplanmıştır. NMR Relaksometre deneyleriparçacık boyutu ölçümleri ile paralel olarak belirli aralıklarda ölçülmüştür.

Kullanılacak NMR sekansının belirlenmesi için %2 oleoresin kapsikum emülsiyonu hazırlanarak düzgün bir relaksasyon-zaman grafiği elde edilinceye kadar parametreler denenmiştir. Buna göre Carr, Purcell, Meiboom ve Gill (CPMG) T2 sekansı kullanılarak eko zamanı 1000 µs, 32 tarama, ve 3s tekrarlama gecikmesi, 1000 ile 5000 eko sayısı sistem parametreleri olarak belirlenmiştir. Böylece 3. İş paketi de tamamlanmıştır.

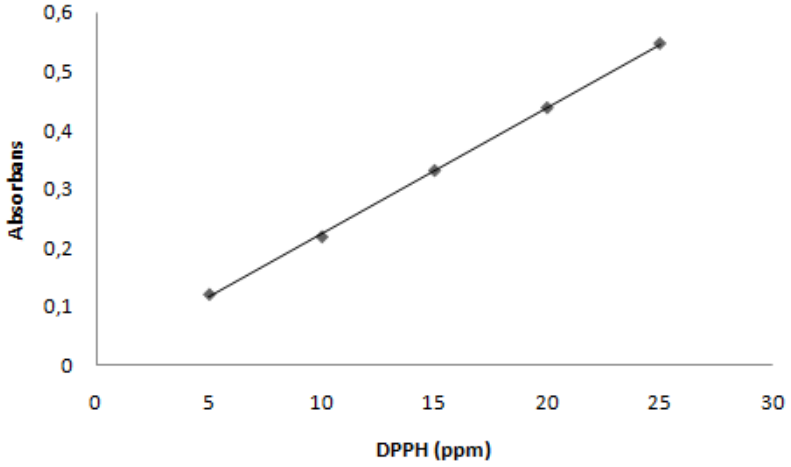
2.9 DPPH Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi

Ticari olarak elde edilen DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali nanoemülsiyonların antioksidatif kapasitelerinin ölçümünde kullanılmıştır. Nanoemülsiyon içerisindeki antioksidanların DPPH serbest radikalini indirgeme güçlerinin spektrofotometre aracılığı ile 517 nm de takibi yöntemin prensibidir (Wang vd., 2008). Her 1 ml kapsaisin yüklü nanoemülsiyon 1 ml etanol: asetik asit: su (50:8:42 v/v) içerisinde 1 dakika boyunca vortekslenerek çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra yine aynı karışım kullanılarak belirli miktarda seyreltilmiştir. 0.1 ml seyreltilmiş örnek 3.9 ml 25 ppm DPPH solüsyonuyla karıştırılarak 1 saat karanlıkta bekletilmiş ve UV-VIS spektrofotometre ile 517 nm de absorbans değerleri okunmuştur(A2). Saf metanol auto-zero için kullanılırken nanoemülsiyon yerine metanolle karıştırılmış 3.9 ml DPPH solüsyonu kör olarak ölçülmüştür (A1).

Ölçümlerden önce sırasıyla 25 ppm, 20 ppm, 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm olacak şekilde DPPH metanol içerisinde çözülerekkalibrasyon eğrisi belirlenmiştir (Şekil 1.).Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak A1 ve A2 değerleri konsantrasyona dönüştürülmüştür (C1 ve C2). Böylece antioksidan aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$AA\left(mL\,DPPH/L\right)=\frac{C1-C2}{Vörnek}\times Vtoplam\times d$$

$V_{örnek}$ alınan nanoemülsiyon miktarı, V_{toplam} karışım (etanol: asetikasit: su) eklendikten sonraki toplam miktarı ve d ise seyreltme oranını temsil etmektedir.



Şekil 1. Antioksidan aktivite DPPH kalibrasyon eğrisi

$$Absorbans(517\,nm) = 0.021(mg\,DPPH/L) + 0.009$$

$$R^2 = 0.999$$

2.10 Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

Düşük pH' da Fe^{+3} 'ün Fe^{+2}'ye indirgenmesi renkli ferrous-tripyridyltriazine [Fe (III) $(TPTZ)_2Cl_3$ (TPTZ= 2,4,5-tripyridyl-*s*-triazine)=Herein] kompleksinin oluşmasını sağlamaktadır. Oluşan bu demir tuzu,oksidan olarak kullanılarak antioksidan aktivite belirlenmektedir (Benzie ve Strain, 1999). Bu yöntemde kullanılan 3 farklı reaktif (A,B,C) bulunmaktadır. Reaktif A 3.1 g sodyum asetatın 16 ml glasielasetit asit içerisinde çözünmesi ve bu karışımın distile su ile 1 L ye tamamlanması ile elde edilir. Son durumda pH'sı3.6 olan 300 mM asetik asit çözeltisi hazırlanmış olur. Reaktif B, TPTZ çözeltisi olarak bilinmektedir. 0.031 g TPTZ'nin 10 ml 40 mM HCl içerisinde çözünmesiyle hazırlanır. Bu karışım 50 °C de 10 dakika karıştırılmıştır. Reaktif C ise 0.054 g demir klorürün 10 ml distile suda çözünmesiyle hazırlanmaktadır. FRAP reaktifinin oluşturulması için 2.5 ml reaktif B ve C, 25 ml reaktif A ile karıştırılıp 37°C de su banyosunda en az 10 dakika beklenmiştir.

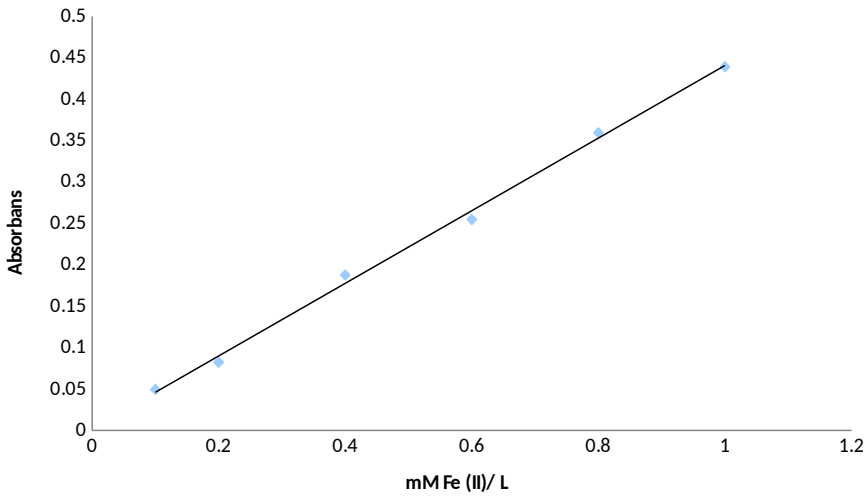
DPPH yönteminde olduğu gibi bu metotta da kapsaisin yüklü nanoemülsiyonlardan 1 ml örnek alınıp 1 ml etanol: asetikasit: su içerisinde çözünmüşve gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Daha sonra 0.5 ml seyreltilmiş örnek 2.5 ml FRAP reaktifi ile karıştırılarak 37°C su

banyosunda 4 dakika bekletilip 593 nm de UV-VIS spektrofotometrede absorbans ölçülmüştür. FRAP reaktifi kör olarak kullanılmıştır.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için 0.139 g $FeSO_4.7H_2O$ 1 L distile suda çözünür. Bu çözeltiden seyreltmeler yapılarak 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8miktarlarda seri hazırlanıp absorbans ölçümleri 593 nm'de yapılmaktadır (Şekil 2.).
Hesaplama yine DPPH metodundaki gibi yapılmaktadır.

$$FRAP\left(mM\ Fe(II)/L\right)=\frac{C1-C2}{Vörnek}\times Vtoplam\times d$$

$V_{örnek}$ alınan nanoemülsiyon miktarı, V_{toplam} karışım (etanol: asetikasit:su) eklendikten sonraki toplam miktarı ve d ise seyreltme oranını temsil etmektedir.



Şekil 2. Antioksidan aktivite FRAP kalibrasyon eğrisi

$$Absorbans\left(593\,nm\right)=0.438\left(mM\ Fe(II)/L\right)+0.002$$
$$R^2=0.997$$

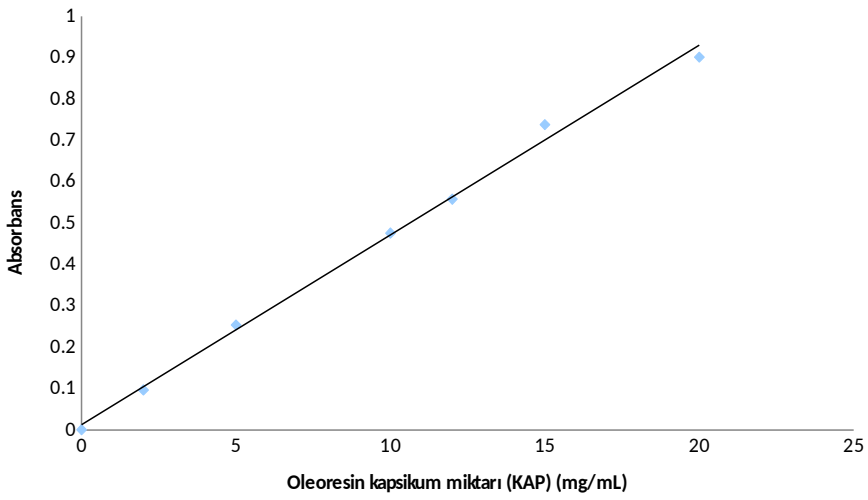
2.11 Enkapsülasyon Verimi

Nanoemülsiyonlarda kapsaisinin ne kadarının su fazında kaldığını tespit etmek için Surassmo vd. (2010) tarafından kullanılan metot birkaç değişiklik yaparak takip edilmiştir. 0.3

ml kapsaisin yüklü emülsiyon 4.2 ml etil asetat içerisinde eklenip 5 dakika boyunca vortekslendikten sonra 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant toplanarak UV-VIS spektrofotometre aracılığıyla 451 nm de ki absorbans değerleri kaydedilmiştir (A1). Etil asetat kör olarak kullanılmıştır. Enkapsülasyon verimi hesaplamak için aşağıdaki hesaplamakullanımıştır:

$$Enkapsülasyonverimi(\,)=\left[\frac{TKAP-C1}{TKAP}\right]\times 100$$

TKAPemülsiyona başlangıçta eklenen toplam oleoresin kapsikum miktarını, C1 ise kalibrasyon eğrisi kullanılarak A1 değerinin konsantrasyona dönüştürülmüş halini temsil etmektedir. Kalibrasyon eğrisi sırasıyla 20 mg/ml, 15 mg/ml, 12 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml oleoresin kapsikumun, etil asetat içerisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır (Şekil 3.). Ölçüm yapılmadan önce, 20 mg / ml kapsaisin- etil asetat çözeltisi kullanılarak 200-500 nm arasında maksimum absorbans UV-VIS spektrofotometre ile ölçülüp ve 451 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Enkapsülasyon verimi kalibrasyon eğrisi

$$Absorbans(451nm)=0.045(mgOK/mL)+0.012$$

$$R^2=0.996$$

2.12 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Mikrobiyal inaktivasyon deneyleri, gıdalarda bozulmalara yol açan, Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 11229) ve limon küfü olarak da bilinen *Penicillum italicum* küfü üzerine uygulanmıştır. Al-Adhamvd. (2000), Salvia-Trujillo vd. (2014) ve Abbaszadeh vd. (2014) tarafından yapılan çalışmalar örnek alınarak analiz metodu belirlenmiştir. Öncelikle, mikroorganizmaların durgun faz evresine gelmesi sağlanmıştır. Bu amaçla 0.2 ml *E.coli* ve *S.aureus* kültürü 20 ml nutrient broth a eklenerek *E.coli* için 24 saat 37°C de, *S.aureus* için 48 saat 35 C de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra *E.coli* için VRBA ve *S.aureus* BPA üzerine inoküle edilerek sayılarının 10^8-10^9kob/ml olduğuna emin olunmuştur. *Penicillium italicum* için PDA üzerine eklenen saf küf kültürü20 ^oC de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Agar üzerinde biriken küfler steril saf su ile yıkanarak Thoma lamı ile sayılmış ve 10^6konidia/ml olduğuna emin olunmuştur. Antimikrobiyal analizin yapılması için kapsaisin yüklü nanoemülsiyonlar (0.5 ml) ve 4.5 ml steril fosfat tamponu ile karıştırılarak %1 (v/v) *E.coli* veya *S.aureus* ile karıştırılmıştır. Daha sonra yüzeye yayma yöntemiyle VRBA ve BPA besiyerine inoküle edilen örnekler *E.coli* için 37°C 24 saat ve *S.aureus*için 35°C 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Başlangıç yoğunluğu fazla olması ve sayımı zorlaştıracağı için mikroorganizmayla karıştırılmış emülsiyonlar steril pepton su kullanılarak gerekli oranlarda seyreltilmiştir. Mikroorganizmalar sayılarak başlangıç sayılarıyla farkı antimikrobiyal etkiyi vermiştir. Küf için disk difüzyon yöntemi uygun bulunmuştur. Öncelikle 0.1 ml konidia süspansiyonu DRBC agar yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra steril2x2 cm boyutundakağıtlar kapsaisin yüklü emülsiyonların içerisine batırılarak 30 dakika boyunca kuruması beklenip inoküle edilen agar yüzeyine bırakılmıştır. 15 ^0C de 6 gün boyunca inkübasyona bırakılıp süre sonunda zon çapı ölçülerek antimikrobiyal analizin sonucu alınmıştır.

Nanoemülsiyon ve mikroorganizmaların etkileşmesi için belirli temas sürelerinde bekletilmesi gerekmektedir. Bu nedenle öncelikle *E.coli* ve *S.aureus* için temas süresi çalışılmıştır. *E.coli*, kapsaisin yüklü nanoemülsiyon ile karıştırılarak 0,15, 30, 60 dakika ve 2, 6, 24 saat sürelerinde temasa bırakılmış ve daha sonra sayım için yüzeye yayma yöntemi uygulanmıştır. Sayım sonucuna göre 15 dakika temas süresi sonunda en yüksek antimkrobiyal etki görülmüş ve *E.coli* için temas süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. *S. aureus*, kapsaisin yüklü nanoemülsiyon ile karıştırılarak 5, 15, 30, 60 dakika ve 2, 24 saat sürelerinde temasa bırakılmış ve daha sonra sayım için yüzeye yayma yöntemi uygulanmıştır. Sayım sonucuna göre 24 saat temas süresi sonunda en yüksek antimkrobiyal etki görülmüştür. Ancak 24 saat inkübasyon süresi analiz süresini uzatacağı için benzer etkinin gözlendiği 2 saat *S. aureus* için temas süresi olarak belirlenmiştir.

2.13 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Oluşturulan nanoemülsiyon sistemlerinin parçacık boyutu ölçümlerini doğrulamak amacıyla Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu analizleri yapılmıştır. TEM görüntüleri Lantan hekzaborür (LaB_6) elektron tabancalı, 20-120 kV aralığında hızlandırıcı voltaj altında çalışan FEI marka Tecnai G2 Spirit Biotwin model Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) ekipmanı kullanarak ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda elde edilmiştir. Yine AKM görüntüleri tarama alanı 125µm x 125µm, AS-130 ("J") tipi tarayıcıya sahip Veeco marka Mult iMode V model Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) ekipmanı kullanılarak ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda elde edilmiştir. Görüntülerde kirliliği önlemek amacıyla belirlenen kapsaisin yüklü emülsiyonlar tampon çözeltiler yerine distile su içerisinde hazırlanmıştır. Numuneler TEM ölçümleri için grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılıp aynı gün içerisinde ölçüm alınmıştır. AFM ölçümleri için numuneler, 1 m^2 lik kuru ve temiz cam yüzeyine damlatılarak 24 saat oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılıp ölçümleri alınmıştır.

2.14 Viskozite Deneyleri

Naoemülsiyonlara gliserol eklenmesi de proje kapsamında incelenen diğer bir parametredir (Tablo 1) . Gliserol içeren nanoemülsiyonlarda viskozitenin değişiminin belirlenebilmesi için viskozite deneyleriyapılmıştır. 35 ml hacimli kaplar kullanılarak oda sıcaklığında SV- 10 viskometre ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Ölçümler O.D.T.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Analiz Laboratuvarı'nda (GAL) yapılmıştır. Iki sensör levha arasında elektik akımı ile aynı frekans ve genlikte kontrol edilen sinus dalga titreşimleri ile ölçüm gerçekleşmiştir.

2.15 Zeta potansiyel (Yüzey Elektrik Yükü) Ölçümü

Nanoemülsiyonların yüzey yükü belirli numuneler için hem üretimin hemen sonrasında hem de depolama sırasında ODTÜ Merkez Laboratuvarı'ndaki **Maxisizer Nano-ZS** aleti aracılığıyla ölçülmüştür.

2.16 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK)

Kapsaisin yüklü nanoemülsiyon sistemlerinin DTK analizi ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümünde bulunan TA-Q20 model diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC - TA Instruments,

New Castle, DE, USA) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. 50 µl nanoemülsiyon, alüminyum numune kaplarına yerleştirilip ve 10°C/dk inceleme hızındaüç ısıtma/soğutma döngüsüne (-10°C ile 60°C) maruz bırakılarak termograf elde edilmiştir.

2.17 İstatistiksel Analiz

İstatiksel analiz projenin her aşamasında yapılmış olup bu amaçla MINITAB ve MATLAB yazılımları kullanılmıştır.

3. BULGULAR

1.1 Nanoemülsiyonlarda Parçacık Boyutu

Küçük molekül içeren sürfektanlar nano boyutta emülsiyon oluşturmada sıkça kullanılmaktadır. Hidrofil-lipofil dengesi yüksek, iyonik olmayan Tween 80, sükroz monopalmitat gibi sürfektanlar bu grubun başında gelerek stabil nanoemülsiyonlar oluştururlar (Rao ve McClements, 2011b). Bir fosfolipit olan lesitin, gliserol iskeletine bağlı bulunan fosfat grubu ve esterleşmiş 2 yağ asitinden oluşmaktadır. Gıda, kozmetik, ilaç gibi birçok endüstri içinde doğal emülgatör olarak kullanılmaktadır (Hoeller vd., 2009). Sükroz yağ asiti esterleri, iyonik olmayan sürfektanlar olarak hidrofilik baş grubu ve 1 veya daha fazla yağ asiti içeren lipofilik kuyruk gruplarındanoluşmaktadır. Şeker monoesterleri 1 yağ asitinin sükroz birimine bağlı olduğusuda çözünebilir, yüksek HLB değeri taşıyan ve misel oluşturup yağ-su emülsiyonlarını stabilize eden özellik göstermeleri nedeniyle gıda uygulamalarında kullanılmaktadırlar (Rao ve McClements, 2011b). Gliserol suda çözünebilme yetisinden dolayıyardımcı bir çözücü olarak emülsiyonlara katılmaktadır. Gliserol eklenmesi emülsiyonun viskozite, refraktif indeks, arayüzey gerilimi gibi fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek emülsiyon stabilitesinin korunmasında önemli rol oynar (Saberivd., 2013). Ayrıca gliserolün dielektrik sabitinin (εr = 42.5) suyun dielektrik sabitinden (εr = 78.5) daha düşük olduğu bilinmektedir (Lide, 2003).Bu nedenle emülsiyona eklenen gliserol elektrostatik etkileşimleri güçlendirici görev yapmaktadır. Bu proje kapsamında farklı homojenizasyon tekniklerinin, farklı sürfektan tiplerinin, pH'nın, sürfektan çözeltilerinin ısıtmanın, emülsiyonlara gliserol eklenmesinin parçacık boyutu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

3.1.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

Parçacık boyutundaki değişimler Şekil 4'te gösterilmiştir.

Sürfektan Tween 80 ve mikroakışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan emülsiyonların nano boyutta oldukları tespit edilmiştir. Parçacık boyutu sonuçları incelendiğinde pH' nın parçacık boyutu üzerine etkisi sürfektan Tween 80 için önemli olduğu görülmüştür. pH' nın azalmasıyla parçacık boyutu da düşmüştür. Sürfektan Tween 80'nin nanoemülsiyon stabilitesini sağlamadaki etkileri birçok makalede belirtilmiştir (Rao ve McClements, 2012). pH'nın düşük olduğu emülsiyonlarda parçacık boyutunun küçük olmasının nedeni sürfektan Tween 80'in

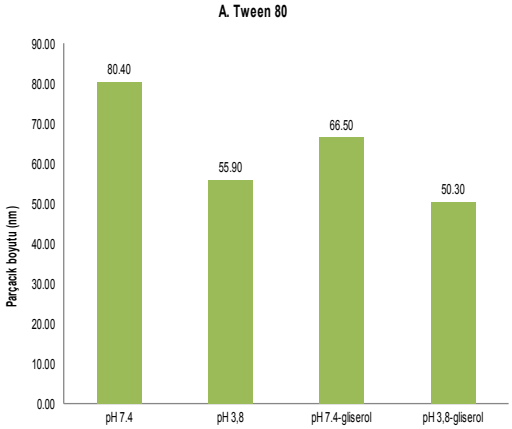
kolloidal parçacıklar arasındaki sterik itme kuvvetlerini arttırması ile açıklanabilir. pH'nın düşürülmesinin ortamın iyon yükünü değiştirerek bu sterik itmeye katkıda bulunduğu söylenebilir. Şekil 4'de görüldüğü üzere, yapıya katılan gliserol etkili bir şekilde yağ damlacıklarının hidrodinamik çaplarında değişime neden olmuştur.

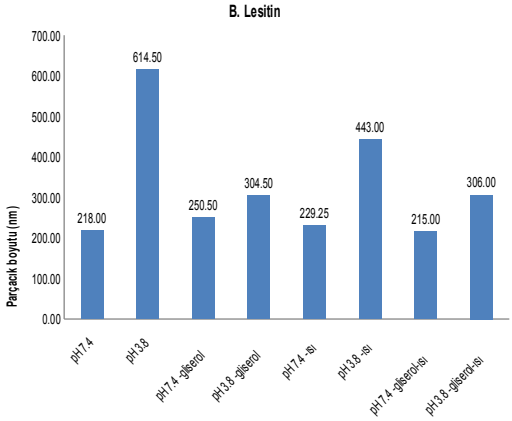
Lesitin ile hazırlanan nanoemülsiyonların parçacık boyutları diğer sürfektanlara göre oldukça büyüktür. Bu emülsiyonların parçacık boyutu 215-615 nmarasında değişmiştir. Lesitin kullanılan emülsiyonlarda pH 7.4 iken daha küçük parçacık boyutlu emülsiyonlar elde edilirken pH'nın 3.8'e inmesiyle birlikte emülsiyonların parçacık boyutu artmıştır. pH 3.8 iken elektrostatik itme kuvveti atraktifinteraksiyonları (van der Waals ve hidrofobik) yenmede etkili olamadığından parçacıkların büyük kalmasına neden olmuştur. Lesitinde bulunan fosfolipit grubu asidik pH'da iyonize olabilen anyonik grup bulundurmaktadır (Surh vd., 2008). pH nın düşmesiyle bu yükünü kaybediyor olması muhtemeldir. Ayrıca, lesitinin yağ damlacığı ile su arayüzeyinde neredeyse gözle görülebilir film oluşturarak emülsiyon stabilitesini sağladığı bilinmektedir (Shchipunov ve Schmiedel, 1996). Bu nedenle mikroakışkanlaştırma yöntemi ile sürfektan Tween 80 ve lesitin kullanılarak hazırlanan emülsiyonlara baktığımızda lesitinli emülsiyonların daha büyük parçacık boyutlu olduklarının görülmesi şaşırtıcı olmamıştır.

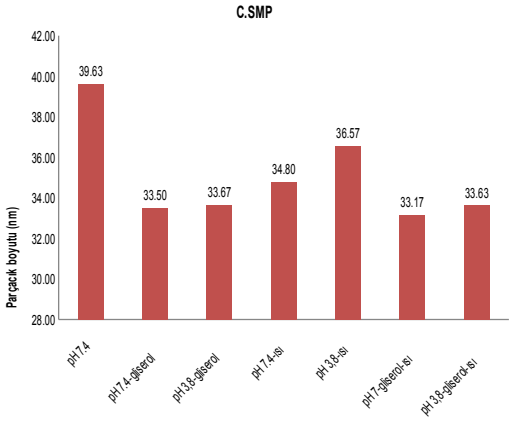
Gliserolün etkisi Tween 80'den farklı olmuş ve farklı pH' larda farklı eğilimler gözlemlenmiştir. Gliserol eklenmesi Tween 80' de her iki pH' da parçacık boyutunu azaltırken lesitinle hazırlanan nanoemülsiyonlarda farklı bir durum gözlemlenmiştir. Düşük pH' da belirgin bir azalma olurken yüksek pH'da az bir artış görülmüştür. Lesitin yapısında bulunan serbest yağ asitlerinin pH' nın düşmesi sonucu yapıdan ayrıldığına daha önce değinilmiştir. Gliserolün hem viskoziteyi hemde elektrostatik etkisi nedeniyle emülsiyona eklenmesi lesitinin parçacık çevresinde daha ince film oluşturmasına ve parçacık boyutunun düşmesine neden olması muhtemeldir. Ancak pH 7.4 nötr bir düzeyde olup lesitinin asitlerine ayrışmasını destekleyici rol oynamayacağından gliserolün eklenmesi viskoziteyi arttırmış ve daha kalın film oluşumunu desteklemiş olabilir.

Bu emülsiyonlarda Tween 80 ile hazırlanan emülsiyonlardan farklı olarak sürfektan çözeltilerini ısıtmanın emülsiyonlar üzerindeki etkisine bakılmıştır. Ön homojenizasyon işleminde sürekli karıştırılarak ısıtma ile çözünmemiş halde bulunan lesitinlerin çözünmesi sağlanmakta ve kolloidal dağılım içinde küçük parçacıklar oluşturmaya başlamaktadır. Bu durum ısının etkisiyle sürfektan üzerindeki gurupların moleküler değişime uğramalarıyla açıklanmıştır (Rao ve McClements, 2013; Shinoda ve Friberg, 1986).Gliserolün parçacık boyutunu azaltmadaki etkisi ısıtma ile aktif olmuş ve her iki pH'da da gliserollü emülsiyonların parçacık boyutunda azalma görülmüştür.

Mikroakışkanlaştırma tekniği uygulanarak hazırlanan emülsiyonlarda sükroz mono palmitatın başarılı nanoemülsiyonlar oluşturduğu görülmüştür. Emülsiyonların parçacık boyutu diğer sürfektanlarla hazırlanandan bir hayli düşük (d< 40 nm) çıkmıştır. Sükroz monopalmitat kullanılan diğer çalışmalarda da bu sonuçlar gözlenmiştir (Choi vd., 2011b; Henry vd., 2009; Rao ve McClements, 2013). Limon yağı ile yapılan bir çalışmada Tween 80 ve sükroz monopalmitat ile hazırlanan emülsiyonlarda Tween 80 ile hazırlanan emülsiyonların parçacık boyutunun daha büyük kaldığı görülmüştür. Bunun nedeni Tween 80 in hidrofilik baş grubunun sükroz monopalmitattan daha büyük olması ve bundan dolayı sürfektanınçözündüğünde daha büyük miseller oluşturmasından olduğu belirtilmiştir (Rao ve McClements, 2012). Gliserolün ve ön homojenizasyonda ısıtmanın parçacık boyutu üzeürndeistatistiksel olarak önemli bir farkasebepolmadığıgözlenmiştir. pH 3.8 ile hazırlanan emülsiyonlar hazırlandıktan 1 saat içinde faz ayrımı gösterdiği için fiziksel özelliklerine bakılmamıştır. Sükroz mono palmitat, asidik pH da hidrolize olarak sükroz vapalmiik asit birimlerine ayrılır. Sükroz su fazında çözünürken palmitik asit yağ-su arayüzeyinde kalır. Sükroz baş grubunun oluşturduğu sterik itme kuvveti bu noktada emülsiyonu stabilize etmeye yardımcı olur. Ancak hidrolizin artması yani ortam asitliğinin düşmesi yapıdan daha fazla sükrozun ayrılmasına neden olupdaha fazla iyonize olmuş palmitik asit oluşturur. Ortam pH'sı palmitik asitin pKa (4.9) değerinden düşük veya bu değere yakın olduğu noktaya geldiğinde palmitik asit yükünü kaybederve çekme kuvvetleri (van der Waals) üstün gelerek parçacıklar birleşmeye başlayacaktır. Bu durumda hidrofilik baş grubuda sterik itmeyi sağlamada yetersiz kalır(Choi vd., 2011b). Emülsiyonun pH'sı 3.8 olduğunda hemen bozulmasının sebebinin bu süreçten kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan emülsiyonlara gliserol eklenmesi veya ısıtma işlemi bu fiziksel ve kimyasal reaksiyonları durdurmuş veya geciktirmiş olduğundan daha stabil emülsiyonlar elde edilmiştir.







Şekil 4. Mikroakışkanlaştırma tekniği A)Tween 80,B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin parçacık boyutu sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve G en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.1.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

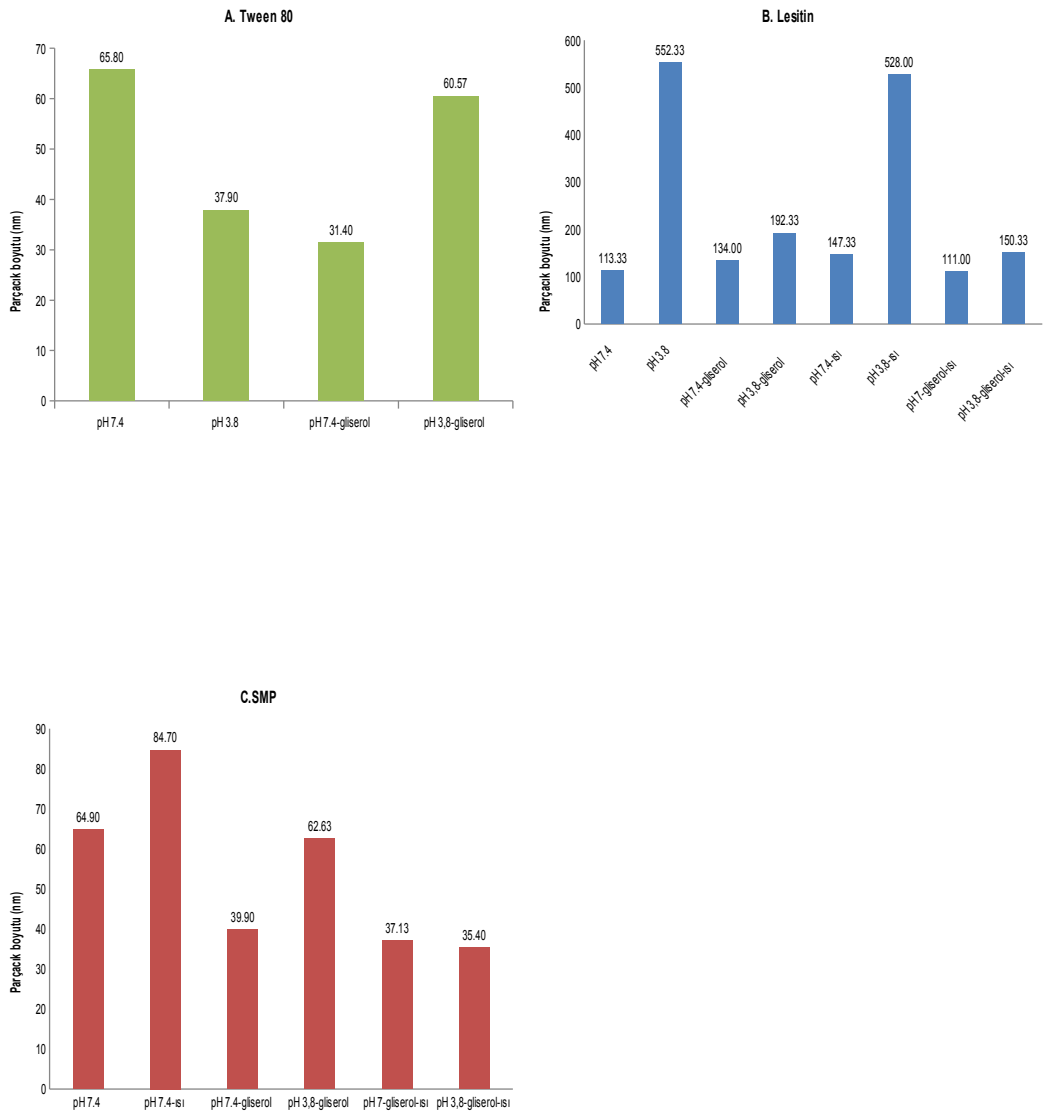
Ultrasonikasyon kullanarak hazırlanan nanoemülsiyonların parçacık boyutlarındaki değişim Şekil 5'te verilmiştir.

Sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda pH etkisi mikroakışkanlaştırıcı kullanılarak hazırlanan emülsiyonlara benzer bulunmuştur. Ancak gliserolün etkisi farklı pH'lardafarklı bir eğilim göstermiştir. Düşük pH'da parçaık boyutunda

ciddi bir artış gözlenmiştir. Buradaki farklılığın öncelikle deneysel hatadan kaynaklı olabileceği düşünülmüş. Bu numunlerde tekrar sayısı arttırılmış ancak benzer sonuçlar elde edilmiştir. pH 3.8' dehazırlanan emülsiyonun parçacık boyutu 37.90 nm ölçülürken gliserol eklenmesi parçacık boyutunu 60 nm'lere arttırmıştır. Diğer taraftan, pH 7.4' de hazırlanan emülsiyona gliserol eklenmesi parçacık boyutunu 65.80 nm'den 31.40 nm'ye düşürmüştür. Benzer şekilde ayçiçeği yağı ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan emülsiyonlarda ultrasonikasyon kullanılmış ve parçacık boyutu 40 nm civarında bulunmuştur (Leong vd., 2009). Ultrasonik homjenizasyon işleminin düşük pH' da gliserolün etkisini azalltığı ve flokülasyona sebep olabileceği tahmin edilmiştir. Ancak buradaki eğilimin tam nedeni hakkında kesin bir yorum yapmak mümkün olamamıştır.

Sürfektan lesitinde ise durum tam tersi olup parçacık boyutu pH azaldıkçaartmıştır. pH azaldıkça gliserolsüz hazırlanan emülsiyonlarda parçacık boyutu neredeyse 5 katına çıkmışgliserollühazırlanan emülsiyonlarda ise 40 ile 50 nm arasında görülmüş ancak 200 nm den küçük bulunmuştur. Isı ise gliserolle birlikte kullanıldığında daha düşük parçacık boyutlu emülsiyonlar elde etmeyi sağlasa da gliserolsüz ortamda büyütmüştür.

Sürfektan sükroz monopalmitat ile hazırlanan emülsiyonlarda pH 3.8 ile hazırlanan emülsiyonlar gliserolsüz olanlar hazırlandıktan hemen sonra faz ayrımı gözlendiği için değerlendirmeye alınmamıştır. Daha önce mikroakışkanlaştırma kısmında da sükroz mono palmitatın düşük pH larda stabil emülsiyonlar oluşturamadığından bahsedilmiştir. Sürfektan sükroz monopalmitat kullanılarak gliserolle hazırlanan pH 3.8 olan emülsiyonlarda ise ısının parçacık boyutunu azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Aynı etki pH 7.4 ile hazırlanan emülsiyonlarda da gözlenmiştir. Ancak gliserolün olmadığı emülsiyonlarda ısı parçacık boyutunu arttırmıştır. Buradan gliserolün emülsiyonlar üzerindeki fiziksel özellikleri iyileştirme özellikleri açıkça görülmektedir.



Şekil 5. Ultrasonikasyon tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin parçacık boyutu sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

Sonuç olarak Şekil 6. te de görüldüğü gibi Tween 80 kullanılan numuneler her iki homojenizasyon tekniği ile parçack boyutu ölçüm sonuçlarına göre karşılaştırıldığında ultrasonikasyonun düşük parçacıklı emülsiyon yapma potansiyeli daha fazla bulunmuştur.

Şekil 6. Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlar üzerinde iki homojenizasyon tekniğinin karşılaştırılması. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve G en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.2 NMR Relaksometre Deneyleri

Kapsaisin yüklü nanoemülsiyonların karakterizasyonundakullanılan diğer bir metod NMR relaksometredir. NMR relaksometre deneyleri ile belirlenen T2 zaman sabiti, bir numunedeki protonların hareketliliği ile ilişkilendirilir. Su oranının yüksek olduğu sistemlerde sudan gelen protonlar bu ilişkiyi daha çok baskılar. Molekül hareketliliği ise suyun diğer makro moleküllerle etkileşimine bağlı olarak değişmektedir. Etkileşmeden kalan su, serbest su olarak adlandırılırveyavaş bir relaksasyon hızı gösterir. Diğer moleküllerle etkileşmiş olan su molekülünün hareketliliği kısıtlanacağı için bu tip su protonları kısıtlı su olarak bilinir ve daha hızlı relaksasyon gösterir (Granizo vd., 2007). Yağ molekülü ise kısıtlı hareketliliğe sahiptir. Yağ-su emülsiyonlarını stabilize eden sürfektanlar ise her iki fazda da kısıtlı çözünürlük göstererek T2 zamanını düşürmektedir. Hareketliliğe etki eden her molekül T2 değerinde azalmaya neden olacaktır (Jenning vd., 2000). Yağ molekülüne eklenen su ve sürfektan sonucu yapısal değişiklikler, yeniden oluşumlar, çevre ve yağ molekülü arasında meydana gelecek ve bu durum relaksasyon zamanına yansıyacaktır (Mariette, 2009). Bütün bileşenlerin aynı konsantrasyonlarda eklenmesi fakat birbirinden farklı sonuçlar alınmasının nedeni her bir emülsiyonun içerisinde farklı etkileşimler görülmesinden dolayı olduğu

düşünülmektedir. Bu nedenle tahribatsız ve kısa sürede sonuç alınabilen NMR tekniği yapısal değişikliklerin tesbitini sağlamada alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Mikroakışkanlaştırma ve ultrasonikasyon kullanarak hazırlanan nanoemülsiyonların T2 zaman sabitlerindeki değişim Şekil 7 ve 8'de verilmiştir.

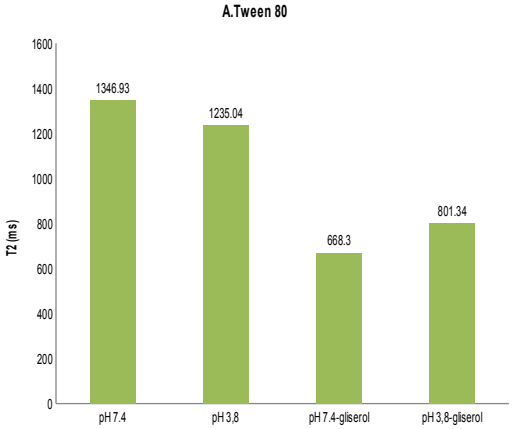
Hazırlanan bütün emülsiyonlarda karşılaşılan ortak bir sonuç yapıya gliserol eklenmesi sonucu T2 zamanının düşmesidir. Bu düşüşün miktarı kimi emülsiyonda diğer etkileşimler sonucu daha fazla gözlense de genel eğilim yapıya gliserol eklenmesi sonucu relaksasyonun hızlı olmasıdır. Gliserol, emülsiyon içerisinde sıvı faza yardımcı etki gösterse de yarı yarıya eklenen gliserol serbest su moleküllerinin yoğunluğunu düşürmektedir. Bu durum manyetik alanda salınımın daha hızlı olmasına neden olur. Yapılan bir çalışmada yüksek rezolüsyonlu proton nükleer manyetik rezonans (^{1}H- NMR) sistemi ile gliserolün bağlı bulunduğu zincirlerin neredeyse hareketsiz olduğu bulunmuştur (Jenning vd., 2000). Literatürde yapılan bir diğer çalışmada gliserol içeriğinin %20 den fazla olmasıyla mekanik özelliklerin dramatik olarak değiştiği belirtilmiştir (Partanen vd., 2004).

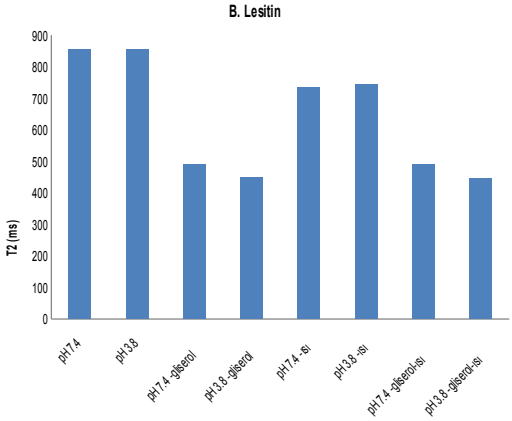
3.2.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

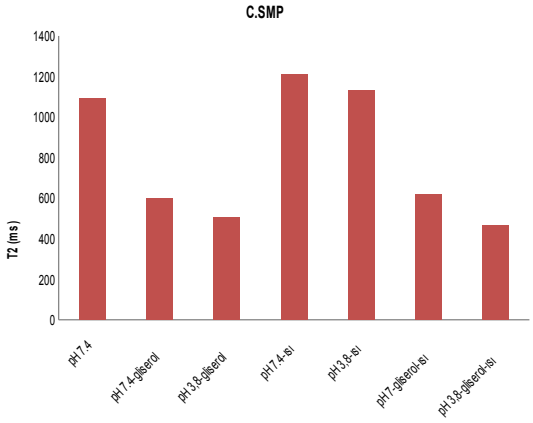
Sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda pH'nın azalmasıyla gliserolsüz sürekli fazda T2 değerleri düşerken ortama gliserolün eklenmesiyle T2 değerlerinde artış görülmüştür. Buradan gliserolsüz ortamda pH'nın düşük olduğu emülsiyonlarda Tween 80 ile yağ/su fazının etkileşiminin daha fazla olduğunu söylemek mümkündür.

Sürfektan lesitin kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda pH'nın değişmesi ve ısıtma relaksasyonu etkilememiştir. Lesitinin polar fosfat grubu, su molekülleriyle ile etkileştiğinde sertleşerek molekül hareketliliğini azaltmaktadır. Bu durum bütün emülsiyonlarda gözlenebildiği için lesitin ile hazırlanan nanoemülsiyonların T2 değerleri genellikle daha düşük bulunmuştur (Capitani vd., 1991).

Sürfektan sükroz monopalmitat kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda ısıtma T2 değerlerinde değişikliklere sebep olmuştur. pH 7.4' de hazırlanan emülsiyonlarda T2 değerlerinde ısıtma ile artış görülürken pH 3.8'de hazırlanan emülsiyonlarda ısıtma ile azalma gözlenmiştir. pH 3.8' de asitliğin artmasıyla yapıdan ayrılan sükroz su ile etkileşime girerek serbest suyu azaltmış ve dolayısıyla T2 değerlerinde azalmaya sebep olmuştur (Fabri vd., 2005).





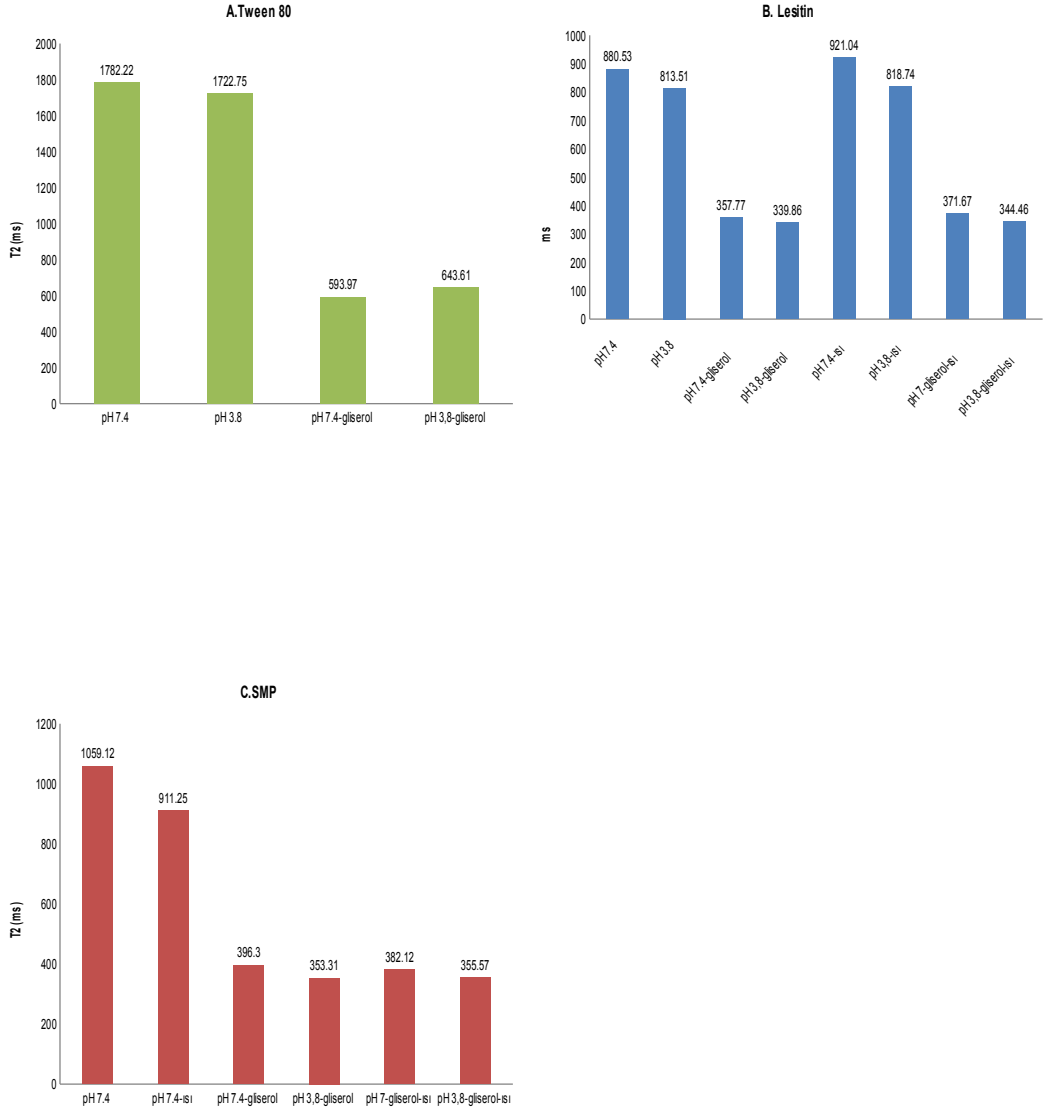


Şekil 7. Mikroakışkanlaştırmatekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin T2 sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.2.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

Mikroakışkanlaştırma işleminde olduğu gibi ultrasonikasyon işlemi ile hazırlanan Tween 80'li nanoemülsiyonlarda gliserolsüz sürekli fazda T2 değerleri düşerken ortama gliserolün eklenmesiyle T2 değerlerinde artış görülmüştür. Alınan sonuçların mikroakışkanlaştırma işleminden farklı olmasının nedeni ultrasonikasyonun daha farklı etkileşimlere sebep olması ile açıklanabilir. Aynı emülsiyonların farklı homojenizasyon tekniğiyle hazırlanmış örneklerine bakıldığında parçacık boyutununda farklı olduğu görülmüştür. Parçacık boyutu ve T2

değerleri arasında korelasyon görülmemesine karşın literatürdeki birçok çalışmada emülsiyon sistemlerinin parçacık dağılımını tesbit etmede NMR‘ ın etkin olarak kullanıldığı görülmektedir (Denkova vd., 2004; Gabriele vd., 2009; Goudappel vd.,2001; Hollingsworth vd.,2004; Marciani vd.,2001; Opedal vd., 2009; Van Duynhoven vd., 2002). Ultrasonikasyon ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan emülsiyonların parçacık boyutu daha düşük ve hareketliliği daha fazla olduğu için T2 değeri de daha fazla ölçülmüştür. Büyük parçacık boyutuna sahip damlacıkların ara yüzey alanı daha küçük olmasıyla hareketlilikleri düşmektedir (Vermeir vd., 2014).



Şekil 8. Ultrasonikasyon tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin T2 sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

Sürfektan lesitin kullanıldığındaysa pH'nın bütün formülasyonlarda düşürücü etkisi gözlenirken ısınında eklenmesiyle T2 değerleri azalmıştır. Yine parçacık boyutunun etkisinden söz edilirse Tween 80 ile hazırlanan emülsiyonların parçacık boyutu lesitin ile hazırlananlardan daha düşüktür. Örneğin; pH 7.4 kullanılan emülsiyonlarda T2 değeri Tween 80 için 1782.22 ms iken lesitin için 880.53 ms olarak ölçülmüş ve parçacık boyutu sırasıyla 65.80 ve 113.33 nm olarak bulunmuştur. Sürfektan sükroz monopalmitat ile hazırlanan emülsiyonlarda ise parçacık boyutu 64.9 nm iken T2 1059.12 ms olarak ölçülmüştür. Aslında Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonun parçacık boyutuyla neredeyse aynı çıkmasına rağmen T2 değerlerinin farklı çıkması yapıda başka farklılıklar olduğunu göstermektedir. Zaten kullanılan sürfektanların kimyasal yapısındaki farklılık sonucu farklı özellik göstermeleri beklenmektedir. Ancak sadece parçacık boyutuna bakılarak bu sav doğrulanamamaktadır. NMR sistemi ise yapısal değişiklikleri gözlemlemeyi sağladığı için alternatif bir sistem olarak kullanılabileceği böylece tekrar gösterilmiştir.

3.3 Bulanıklık

Bir obje ışığın geçmesine izin veriyorsa transparan, ışığı dağıtıyor veya absorpluyorsa opak olarak adlandırılır (Clydesdale, 1975). Birçok emülsiyon bu iki tanım arasında kaldıkları için yarı saydam (translucent) olarak belirtilmiştir. Işık dalgası emülsiyondan geçerken parçacıklar ışığın birçok dalga boyunda saçılımını sağlar ve ışık çok fazla emülsiyona içine nüfuz edemez. Böylece emülsiyon optik olarak opak görünür (Farinato ve Rowell, 1983). Bulanıklık, birçok gıda emülsiyonu için önemli bir kriter olup gıdanın doğal görünüşünü, ilgi çekici görünmesini sağlamaktadır (Hernandez, 1991; Hernandez ve Baker, 1991). Örneğin, düşük konsantrasyonlu bitkisel yağ parçacıkları meyveli içeceklerde bulanık görünümü sağlamada kullanılmaktadır (Tan, 1990; Dickinson, 1994). Yüksek konsantrasyonlu emülsiyonlarda bulanıklık değeri çoklu ışık saçılımı etkisinden dolayı istenilen seviyeden aşağıda bulunmaktadır (Ma vd., 1990). Bu durumda emülsiyonlarda bulanıklık genel olarak parçacık boyutuna, yağ konsantrasyonuna ve parçacıkların refraktif indeksine bağlı olarak değişmektedir.

Mikroakışkanlaştırma ve ultrasonikasyon kullanarak hazırlanan nanoemülsiyonların bulanıklılık değerleri Şekil 9 ve 10'da verilmiştir.

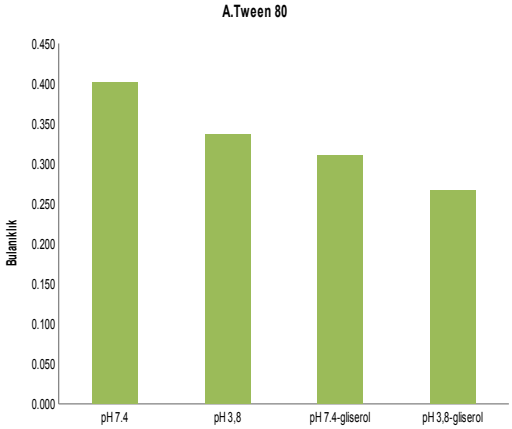
3.3.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

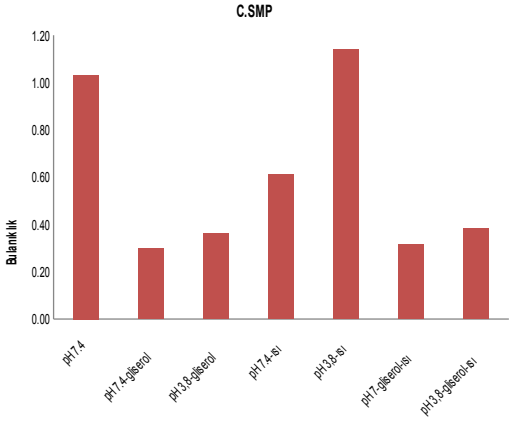
Nanoemülsiyonların bulanıklık değeri pH'nın azalmasıyla azalırken sürekli faza gliserol eklenmesiyle artmıştır. Emülsiyon içerisindeki parçacıkların büyüklükleri değiştikçe ışığı yansıtma kuvvetleri de değişmektedir (McClements, 2002).

Mikroakışkanlaştırma ve sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanmış nanoemülsiyonlar küçük boyutlu parçacıklar olup bulanıklık değerlerine bakıldığında bu etki görülebilmektedir. Yine gliserolün eklenmesiyle emülsiyonun özelliklerinin gliserolsüz haline göre değiştiği gözlenebilmektedir. Yapılan bir çalışmada hiç gliseroliçermeyenemülsiyonların opak olduğu gözlenirken %50 gliserol içeren emülsiyonların daha bulanık olduğu gözlenmiştir. Bu durumun nedeni parçacık boyutunun küçüklüğü veya gliserolün yağ ve su fazı arasında refraktif indeks kontrastını düşürmesi olarak açıklanmıştır (McClements, 2002; Qian ve McClements, 2011).

Mikroakışkanlaştırma ve sürfektan lesitin kullanılarak hazırlanmış nanoemülsiyonların bulanıklık değerleri incelendiğinde gliserol eklenen emülsiyonların daha parlak olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte lesitin hekzan, etanol, aseton, petrol eter, benzen gibi nonpolar çözücülerde tamamen çözünürken sudaki çözünürlüğü azdır. Bu durum hazırlanan emülsiyonların küçük parçacık boyutlu olsa bile opak görünmesine neden olmuştur (Xue ve Zhong, 2014)(Xue ve Zhong, 2014).

Mikroakışkanlaştırma ve sürfektan sükroz monopalmitat kullanılarak hazırlanmış nanoemülsiyonların bulanıklık değerleri incelendiğinde ise gliserolün önemlietkisiolduğu görülmektedir. Bütün emülsiyonlar içerisinde en berrak emülsiyonlar gliserolle hazırlananlar olmuştur. Tek başına gliserol kadar etkili olmasa da ısıtma işlemi berraklık sağlamada çözünmeyi desteklediği için olumlu sonuçlar göstermiştir. Ancak gliserol birlikte kullanıldığında istatistiksel olarak fark gözlenmemektedir ($p>0.05$). Parçacık boyutu sonuçlarıyla da bağlantılı olarak değişen bulanık değerlerine bakıldığındaen yüksek parçacık boyutuna sahip (39.63 nm) pH 7.4 ile hazırlanan emülsiyonun neredeyse en fazla bulanıklık değerine sahip olduğu (1.032) söylenebilir. Bulanıklık ölçümleri, NMR ölçümleri kadar olmasa da yapıdaki değişimleri (flokülasyon, birleşme gibi) belirlemede önemli bir yöntemdir. pH 3.8 ile hazırlanan emülsiyonlarda ısıtma ile yağ damlacıkları kinetik enerji kazanmış ve zamanla birleşmeye başlayarak (Ostwald olgunlaşması) boyutlarında artış gözlenmiştir. Büyük parçacıkların bulunması bulanıklığı desteklemiş ve 1.137 değer ile en bulanık emülsiyon oluşturulmuştur. Rao ve McClements (2011b) yaptığı çalışmada ısıtmanın küçük parçacık boyutlu emülsiyon oluşturmak için kullanılabileceğini göstermiştir.





Şekil 9. Mikroakışkanlaştırma tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP)numunelerin bulanıklık sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

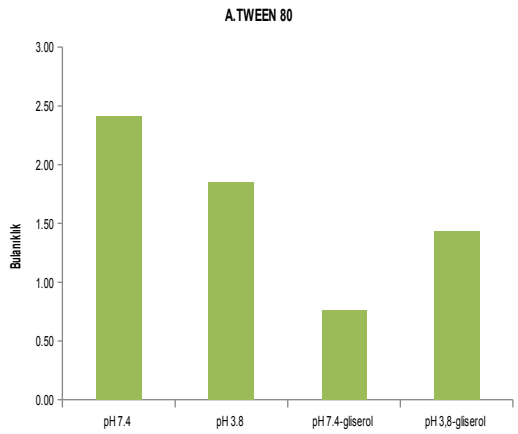
3.3.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

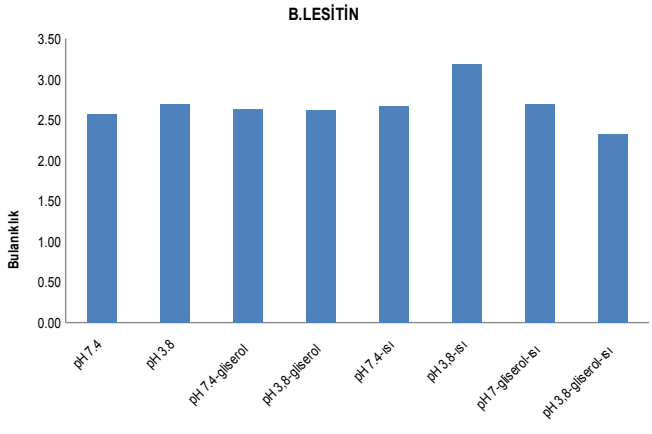
Sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların bulanıklık değerlerinin mikroakışkanlaştırma yöntemiyle bulunanlardan çok daha fazla olduğu görülmüştür. Parçacık boyutu en fazla 65 nm olsada bulanıklık değerlerinin yüksek bulunması emülsiyon içerisinde ultrasonikasyonla parçalanamamış büyük parçacıklarınkalması ya da ölçüm zamanına kadar birleşme olması ile açıklanabilir. Görsel olarak da ultrasonikasyon ve Tween 80 kullanılarak

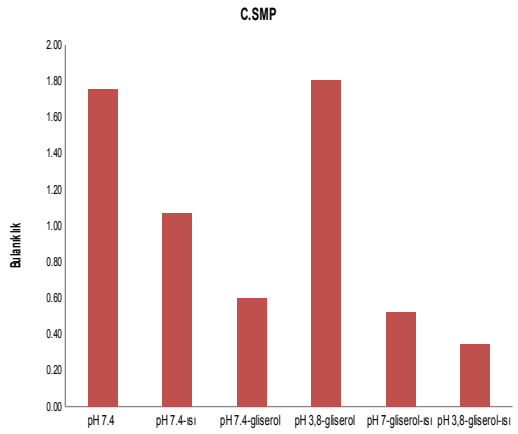
hazırlanmış emülsiyonların daha opak oldukları görülmüştür. Şekil 10.'da da görüldüğü gibi gliserol bulanıklığın azaltılmasında etkilidir. Sürfektan sodyum dodesil sülfat kullanılarak yapılan bir çalışmada ultrasonikasyon sırasında parçacık boyutunun düşmesi iki evreye bağlı olarak açıklanmıştır; (i) parçacıkların üssel düşmesinin gerçekleştiği geçiş aralığı ve (ii) daha fazla küçülmenin görülmediği denge durumu. Denge durumunda, ortalama parçacık boyutuna ulaşılmış ve parçacıkların birleşmesi ve ayrışması karşılaştırılabilir hale gelmiştir (Nazarzadeh ve Sajjadi, 2013). Birleşen parçacıkların yoğunluğuda ışığın kırılmasını değiştireceği için bulanıklık değeri daha büyük olacaktır. Buna ek olarak T2 değerleri ve bulanıklık arasında da pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Pearson Korelasyon Katsayısı : $r=0.778$, $p<0.05$)

Sürfektan lesitin kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonların tersi durum söz konusu olarak bulanıklığın azaldığı gözlenmiştir (Şekil10.). pH' nın düşürülmesi ve ön homojenizasyon sırasındaki ısıtmayla birlikte bulanıklıkta olumlu değişmeler görülerek daha şeffaf bir emülsiyon elde edilmiştir.

Sürfektan sükroz monopalmitat kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda Tween 80'de olduğu gibi daha bulanık emülsiyonlar elde edilmiştir. Görsel olarak emülsiyonların gliserol içerenleri berrak bir görünüme sahipken sadece ısıtmanın etkisi olan emülsiyonlarda opak bir görünüm bulunmuştur.







Şekil 10. Ultrasonikasyon tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP)numunelerin bulanıklık sonuçlarını göstermektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve F en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.4 Renk Ölçümleri

Işık saçılması ve bununla birlikte emülsiyonun rengi büyük ölçüde sürekli ve dağılan fazın refraktif indeksine, yağ konsantrasyonuna ve parçacık boyutuna bağlıdır (McClements, 2002). Büyük parçacıklar küçük olanlardan daha yoğun olarak ışığı dağıtacakları için parlaklık, opaklık gibi değerlerde artışa neden olmaktadır (Rao ve McClements, 2011b). Literatürde nanoemülsiyonların bu nedenle sahip oldukları düşük parçacık boyutlarıyla ışık saçılımını düşürdükleri belirtilmiştir (Chanamai ve McClements, 2001; Meleson vd., 2004; Tadros vd., 2004). Oleoresin kapsikumun çok güçlü koyu bir rengi bulunmaktadır. L, a, b değerleri sırasıyla 0.18, +0.25, - 0.11 olarak ölçülmüştür. Nanoemülsiyonların renk ölçüm verileri Şekil 11 ve 12'de gösterilmiştir.

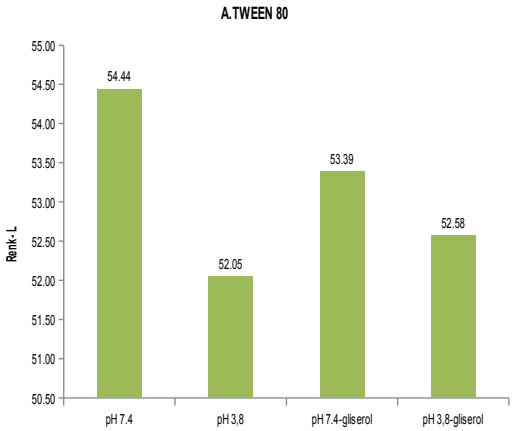
3.4.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

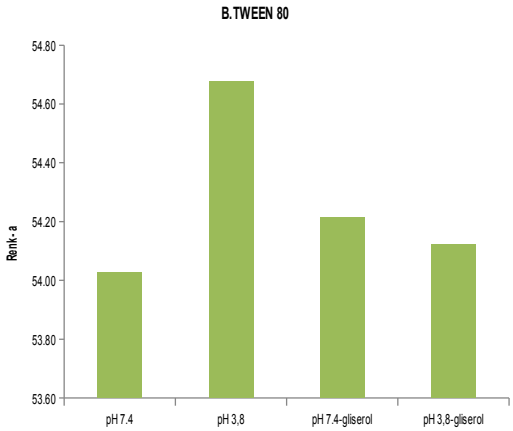
Mikroakışkanlaştırma tekniği ve sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların L, a, b değerleri yükselmiştir. Gözle görülür şekilde şeffaf ve kırmızı emülsiyonlar elde edilmiştir.

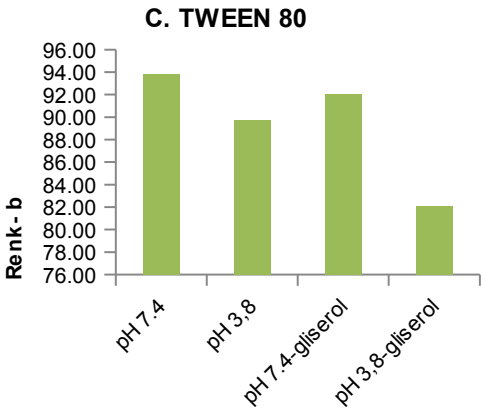
Sürfektan lesitin kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların renk değerleri incelendiğinde de bu durum gözlenmektedir. Opaklığın fazla olması parlaklık, kırmızılık ve sarılık değerlerinde düşüşe neden olmuştur. Parçacık boyutu da renk değerlerinde etkili olmuştur. Parçacık boyutu en yüksek pH 3.8' de hazırlanan emülsiyonun (614.5 nm) parlaklık, kırmızılık ve

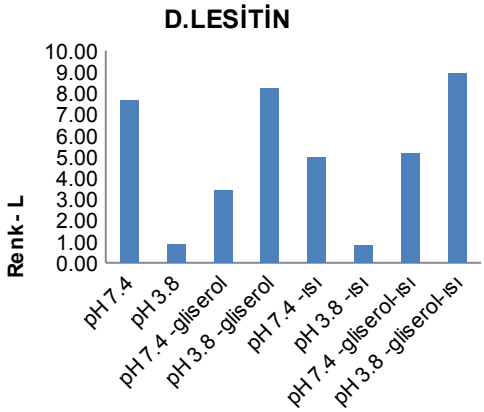
sarılık değerleri sırasıyla 0.86, 4.09,1.42 olarak diğer emülsiyonlardan düşük bulunmuştur. Benzer şekilde bulanıklık değerlerinin düşmesiyle renk değerlerinde artış gözlenmiştir. pH 7.4 – gliserol içeren emülsiyonda bulanıklık değeri 3.49 iken L,a,b sırasıyla 3.43, 15.71, 5.77 bulunmuş ve pH 3.8-gliserol içeren emülsiyonda bulanıklık 3.03 iken L,a,b sırasıyla 8.22, 27.15, 14.15 olarak bulunmuştur.

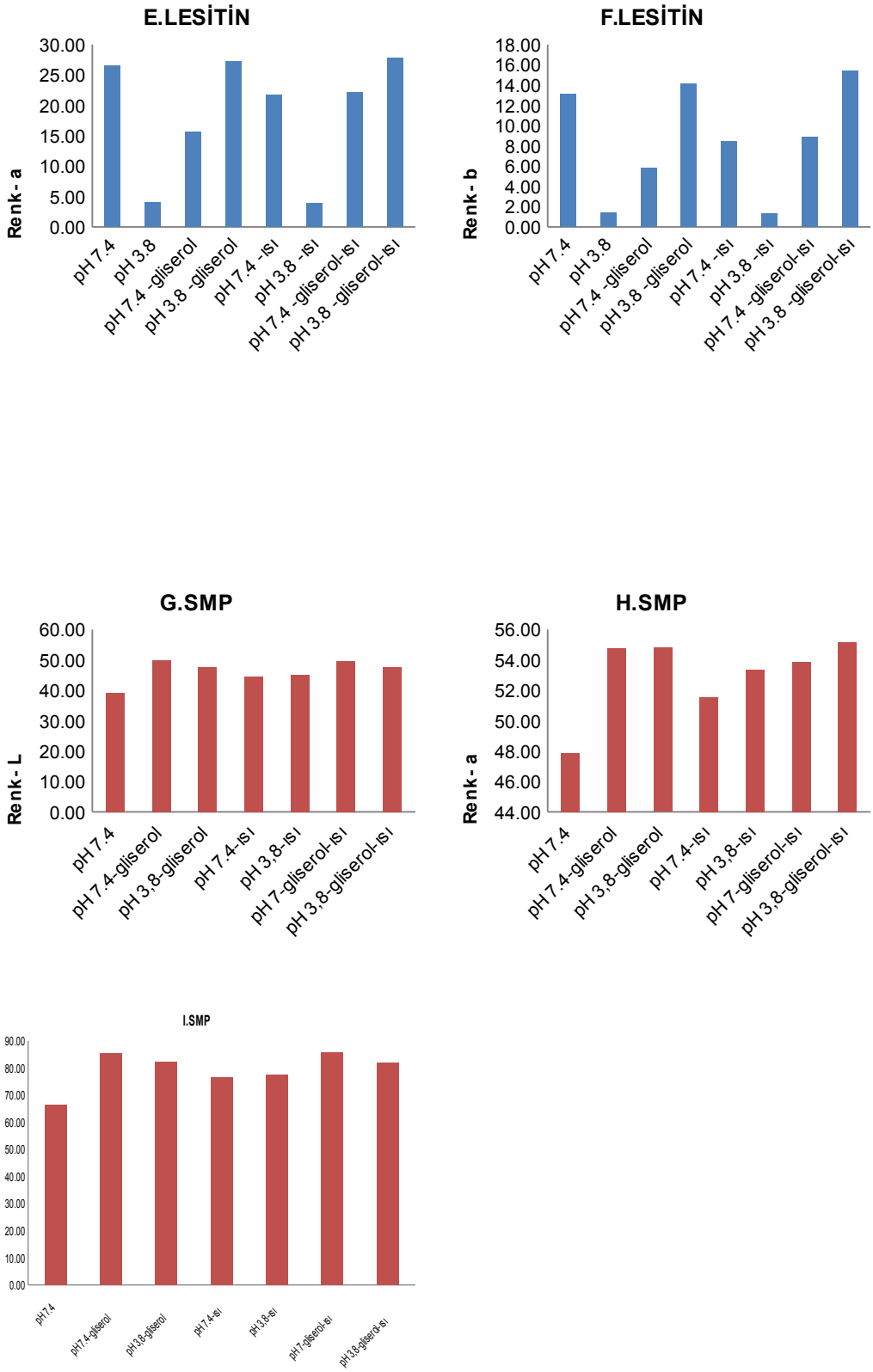
Sürfektan sükroz monopalmitat kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların renk değerlerinde sürekli faza gliserol eklenmesiyle ve ön homojenizasyon öncesi ısıtma ile parlaklık, kırmızılık ve sarılık değerlerinde artış gözlenmiştir. Hem parçacık boyutunun küçük olması hem de bulanıklığın düşük olması parlak, kırmızılığı yüksek emülsiyonların elde edilmesini sağlamıştır.











Şekil 11. Mikroakışkanlaştırma tekniği A,B,C)Tween 80, D,E,F) Lesitin, G,H,I) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin renk sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve H en küçük

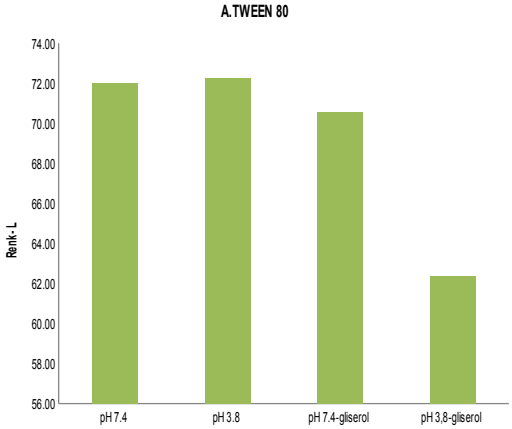
ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

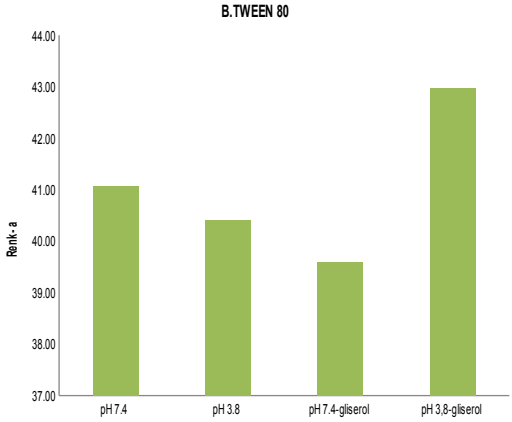
3.4.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

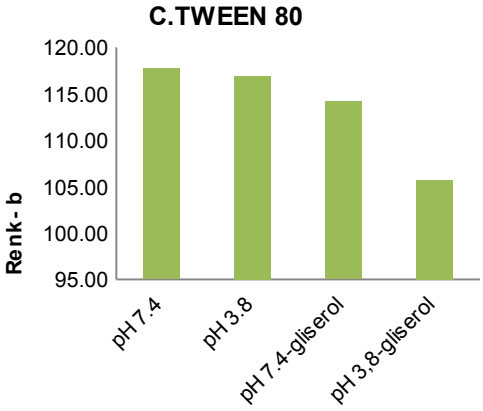
Sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonların parlaklık değeri (L) mikroakışkanlaştırma yöntemine göre yüksek bulunmuştur. Bunun yanında sarılık değeri (b) çok daha yüksek ve kırmızılık değeri (a) daha düşük bulunmuştur.

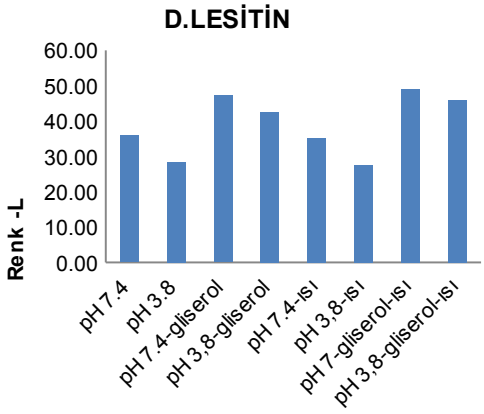
Sürfektan lesitin kullanılan nanoemülsiyonlarda parlaklık değeri(L) mikroakışkanlaştırmaya göre bir hayli artmıştır. Lesitinin film oluşturma özelliği nedeniyle renk değerleri çok düşük bulunmuştur. Ancak ultrasonikasyon ile bu sorunun iyileştirildiği gözlenmiştir. Emülsiyona gliserol eklenmesiyle L,a, b değerlerinde artış gözlenmiştir. Isıtılmanın tek başına belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca parçacık boyutu azaldıkça L,a,b değerlerinin arttığı görülmüştür.

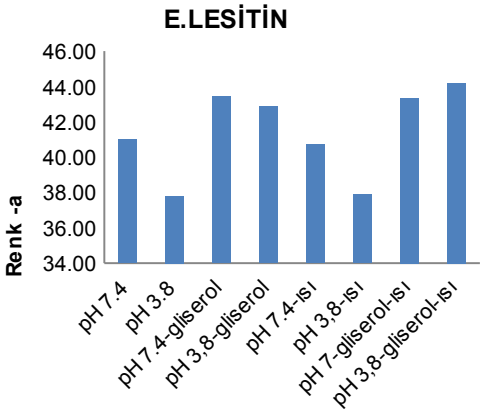
Sürfektan sükroz monopalmitat kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda pH'nın azalmasıyla kırmızılık (a) değerinin azaldığı gözlenirken sürekli faza gliserol eklenmesi L,a, b değerlerini yine arttırmıştır.

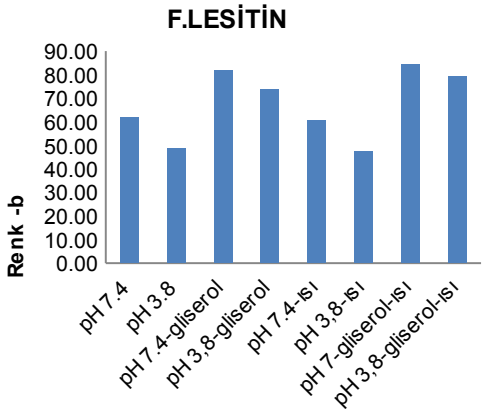

A.TWEEN 80
Renk- L
74.00
72.00
70.00
68.00
66.00
64.00
62.00
60.00
58.00
56.00
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol

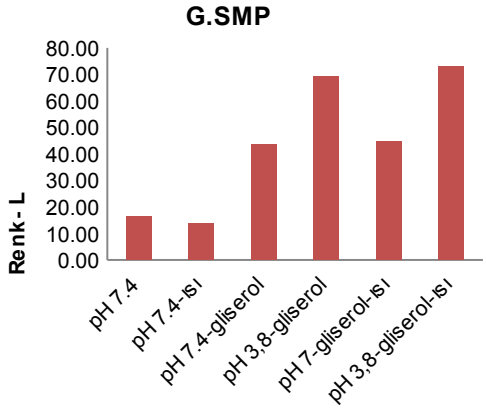

B.TWEEN 80
Renk- a
44.00
43.00
42.00
41.00
40.00
39.00
38.00
37.00
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol

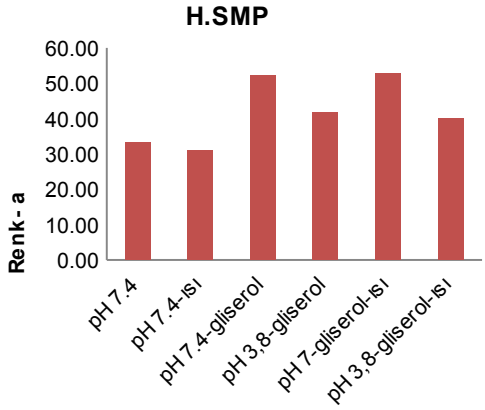

C.TWEEN 80
Renk- b
120.00
115.00
110.00
105.00
100.00
95.00
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol

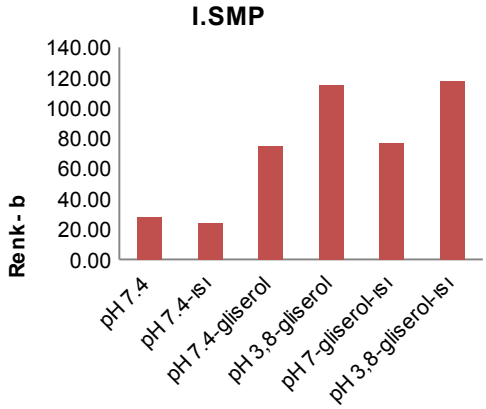

D.LESİTİN
Renk -L
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-ısı
pH 3,8-ısı
pH 7-gliserol-ısı
pH 3,8-gliserol-ısı


E.LESİTİN
Renk -a
46.00
44.00
42.00
40.00
38.00
36.00
34.00
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-ısı
pH 3,8-ısı
pH 7-gliserol-ısı
pH 3,8-gliserol-ısı


F.LESİTİN
Renk -b
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-ısı
pH 3,8-ısı
pH 7-gliserol-ısı
pH 3,8-gliserol-ısı







Şekil 12. Ultrasonikasyon tekniği A,B,C)Tween 80, D,E,F) Lesitin, G,H,I) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin renk sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve H en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.5 Enkapsülasyon verimi

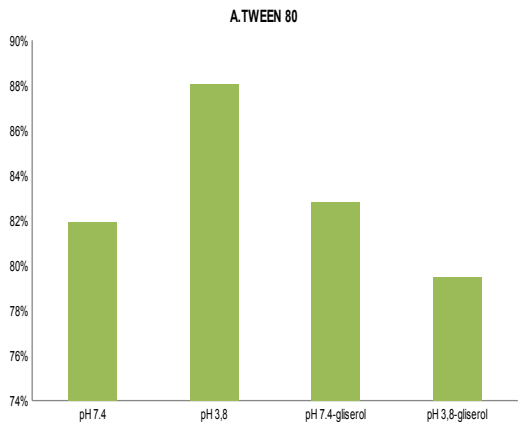
3.5.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

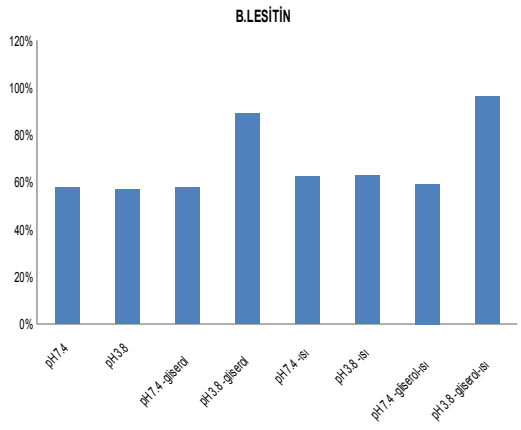
Enkapsülasyon verimi parçacık boyutundan etkilenmeksizin formülasyonlar arasında değişiklik göstermiştir. Literatürde, kullanılan sürfektan miktarının enkapsülasyon verimi üzerinde büyük etkisi olduğu belirtilirken bunun aksine sürfektan türünün çok daha az etkisi olduğu belirtilmiştir (Xing vd., 2005). Nanoemülsiyonların enkapsülasyon verimlerinin nasıl değiştiği Şekil 13' te verilmiştir.

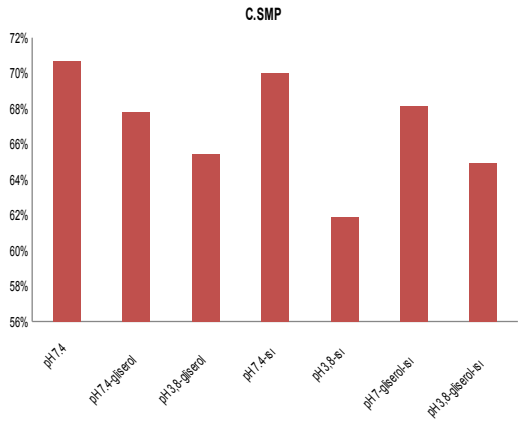
Sürfektan Tween 80 ile hazırlanannanoemülsiyonlardaki ortalama enkapsülasyon verimi %83 olup en fazla enkapsülasyon veriminin görüldüğü emülsiyon pH 3.8 ile hazırlanan olmuştur. Oleoresin kapsikumun pH 3.8' de daha fazla emülsifiye olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuçlar göstermiştir ki Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlar faz ayırımı kremleşme olmadan stabil kalabilmiştir.

Sürfektan lesitin kullanılan nanoemülsiyonlarda enkapsülasyon verimi ile pH düşüşü ve gliserol eklenmesi arasında benzer eğilimler görülmüştür. Buna göre tabloda da görüldüğü gibi pH 3.8' de gliserol içeren lesitinli emülsiyonun enkapsülasyon verimi %89 bulunmuş ve ön homojenizasyonda ısıtma uygulandığında bu değer %96 olarak en yüksek seviyeye ulaşılmıştır. Böylece fiziksel özelliklerin iyileştirilmesinde gliserolün etkisi burada da görülmektedir.

Sürfektan sükroz monopalmitat kullanılan nanoemülsiyonlarda enkapsülasyon verimi değerleri açısından istatistiksel olarak fark görülmemiştir. Lesitin ile hazırlanan nanoemülsiyonlardan daha yüksek, Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlardan biraz daha az verim göstererek sükroz monopalmitat stabilite sağlamada ve enkapsüle etmede iyi bir sürfektan olduğunu göstermiştir.







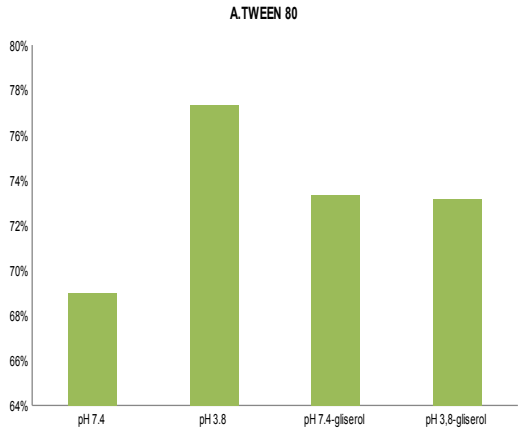
Şekil 13. Mikroakışkanlaştırma tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin enkapsülasyon verimi sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

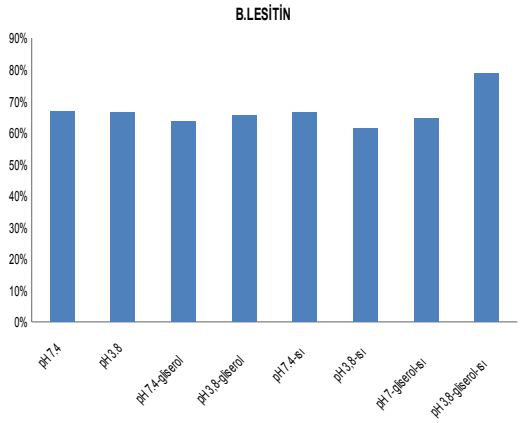
3.5.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

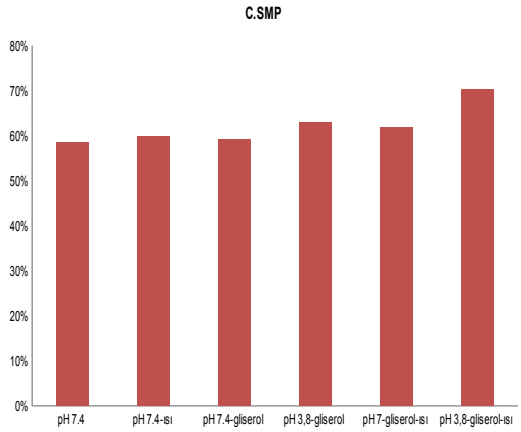
Enkapsülasyon verimin de mikroakışkanlaştırma tekniğine yakın fakat daha düşük değerler elde edilmiştir. Nanoemülsiyonların enkapsülasyon verimlerinin nasıl değiştiği Şekil 14' te gösterilmiştir.

Enkapsülasyon verimi, Tween 80 kullanıldığında ortalama %73, lesitin kullanıldığında ortalama %66 ve sükroz monopalmitat kullanıldığında ortalama %62 olarak bulunmuştur.

Sükroz monopalmitat için nanoemülsiyonlar arasında gliserolün veya ısıtmanın belirgin farkı görülmemesine rağmen pH nın düşürülmesiyle en yüksek verim elde edilmiştir. Lesitin ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda da aynı durum geçerli olup en yüksek verim pH 3.8' de gliserol ve ısıtılmanın kullanıldığı emülsiyonda gözlenmiştir. Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda yine en yüksek verim pH 3.8' de hazırlananlarda elde edilmiştir. Benzer sonuç mikroakışkanlaştırma yöntemiyle üretilen nanoemülsiyonlarda da gözlenmiştir. Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda parçacık boyutu azaldıkça enkapsülasyon veriminin arttığı gözlenmiştir. Sükroz mono palmitat ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda parçacık boyutu bulanıklık ve enkapsülasyon verimi arasında ilişkiliendirme yapılmasına olanak sağlamıştır.







Şekil 14. Ultrasonikasyon tekniği A)Tween 80, B) Lesitin, C) Sükroz monopalmitat (SMP)numunelerin enkapsülasyon verimi sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük

ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

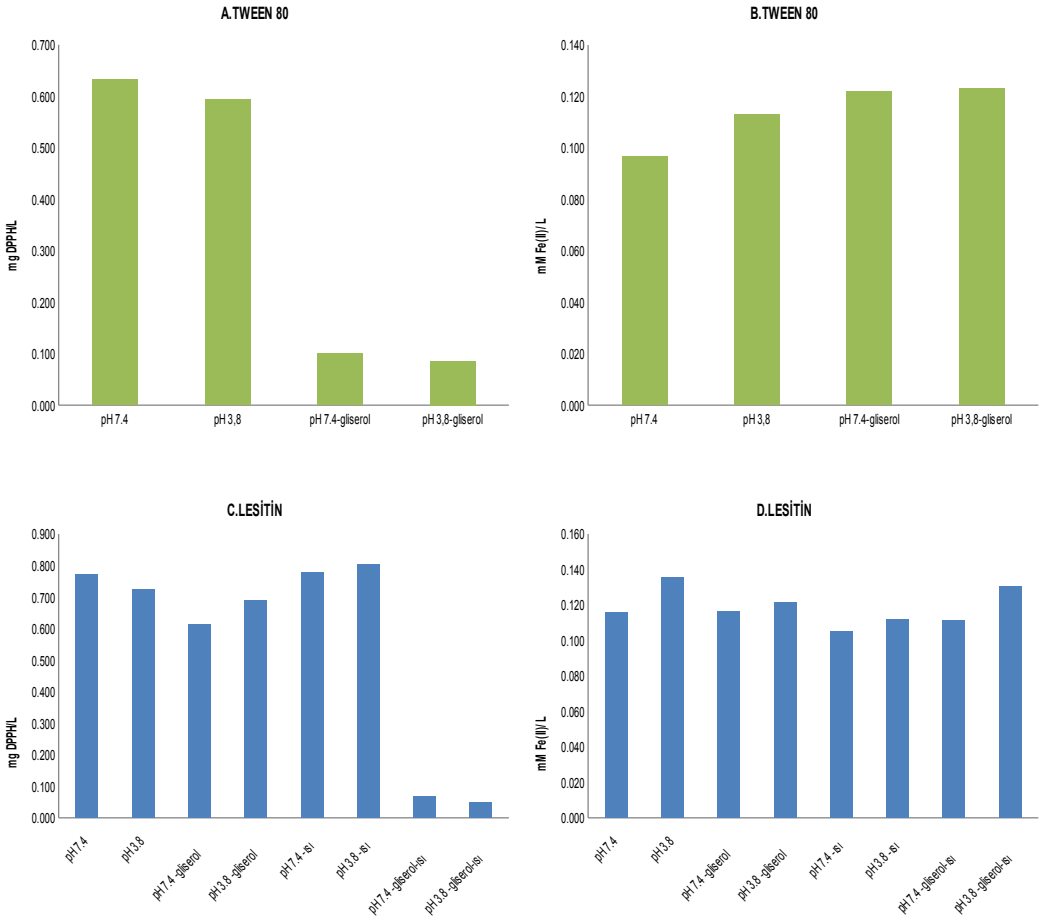
3.6 Antioksidan Aktivite Sonuçları

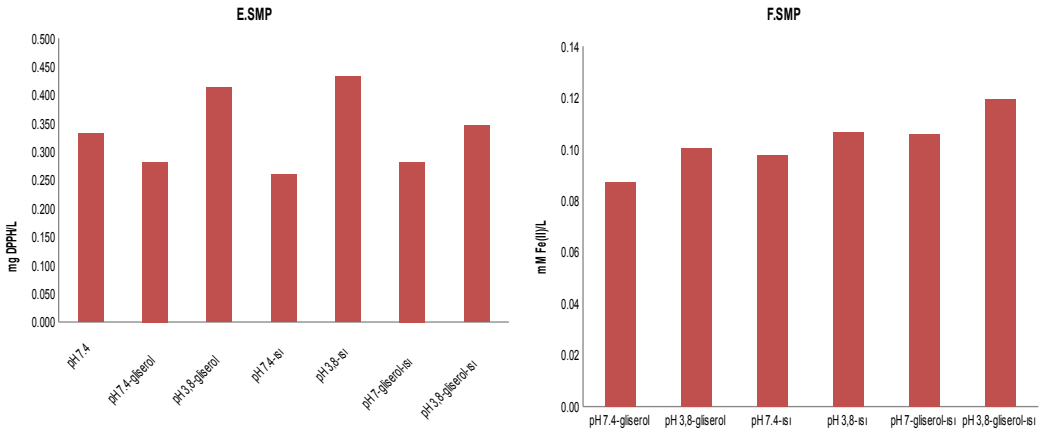
Literatürde, indirgenme potansiyeli antioksidan aktviteyle ilişkilendirilerek antioksidan aktivitenin ölçülmesinde sıkça kullanılmaktadır. Demir (III) fenoliklerin antioksidan aktivitesini göstermede etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır (Nithiyanantham vd., 2013). Stabil organik radikal DPPH, antioksidan aktivite testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sora vd., 2015). Genel olarak antioksidan aktivitenin OH, O_2^- ve ROO^- gibi serbest radikalleri inaktive etme, oluşumunu engelleme kapasitesinden kaynaklandığı bilinmektedir. Radikal yakalama aktivitesi antioksidan ajanın reaktivitesine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Emülsiyon gibi çok fazlı bir ortamda antioksidan ajanın arayüzdeki lokalizasyonu ve etki gösterecek şekilde mobilitesi antioksidan aktivite üzerinde önem taşımaktadır (Apak vd., 2007). Hazırlanan emülsiyonlar içerisindeki farklılıklar kullanılan sürfektanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Sessa vd., 2011). Çünkü sürfektanlar yağ su arayüzündekiabsorpsiyon kinetiğini etkilediği ve arayüzdeki molekülleri tekrar organize ettiği için antioksidan aktivite üzerinde etkili olmaktadır (Donsì vd., 2012b). Antioksidan aktivite sonuçları FRAP ve DPPH metodları için Şekil 15 ve 16'da verilmiştir.

3.6.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

FRAP sonuçlarında görüldüğü gibi mikroakışkanlaştırma tekniği ve sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda optimum indirgenme potansiyeli görülmüştür (ortalama 0.114 mM Fe(II)/L). Gliserol eklendiğinde daha iyi emülsifiye olmadan dolayı FRAP aktivitesinin arttığı düşünülse de aynı sonuç diğer bir antioksidan testi olan DPPH metodunda tam tersi olarak gözlenmiştir. Küçük hidrofilik moleküllerin DPPH ile daha kolay tepkimeye girmelerinden dolayı daha fazla antioksidan değerlerine sahip olduğu bilinmektedir (Apak vd., 2007). Gliserolün etkisiyle yapıda daha kolay çözünebilen hidrofobik kapsaisin, nanoemülsiyonun hidrofilik özelliğini gliserolsüz hazırlanan emülsiyonlara göre düşürmüştür. Böylece pH'dan etkilenmeksizin yapıda daha fazla su bulunan kapsaisin yüklü nanoemülsiyonların DPPH aktivitesi daha fazla bulunmuştur. Antioksidan testleri değerlendirildiğinde FRAP sonuçları arasında büyük farklar olmadığı mikroakışkanlaştırma tekniği ve sürfektan lesitin ile hazırlanan kapsaisin yüklü nanoemülsiyonlar içinde ortalama

FRAP değerinin 0.119 mM Fe(II)/L olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar arasında pH 3.8 ile hazırlanan emülsiyonların FRAP sonuçlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Ön homojenizasyonda ısıtma işleminin antioksidan aktivite üzerinde olumsuz bir etkisi görülmemiştir. Esansiyel yağlar üzerine yapılan bir çalışmada sıcaklığın 180°Ckadar çıkarılmasıyla antioksidan aktivitenin etkilenmediği gösterilmiştir (Tomaino vd., 2005). Emülsiyon formülasyonuna gliserol eklenmesi ise sıcaklığın aksine DPPH sonuçları üzerinde değişime sebep olmuştur. Bu düşüş sürfektan Tween 80 ile hazırlanan emülsiyonlarda görülmüştür ve iki emülsiyon tipi içinde aynı durumun söz konusu olduğu düşünülmektedir. Sürfektan sükroz monopalmitat ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda antioksidan aktivite üzerinde pH' nın düşürülmesi DPPH ve FRAP sonuçlarında artışa neden olmuştur. Parçacık boyutu düştükçe FRAP değerlerinin arttığı gözlenmiştir.





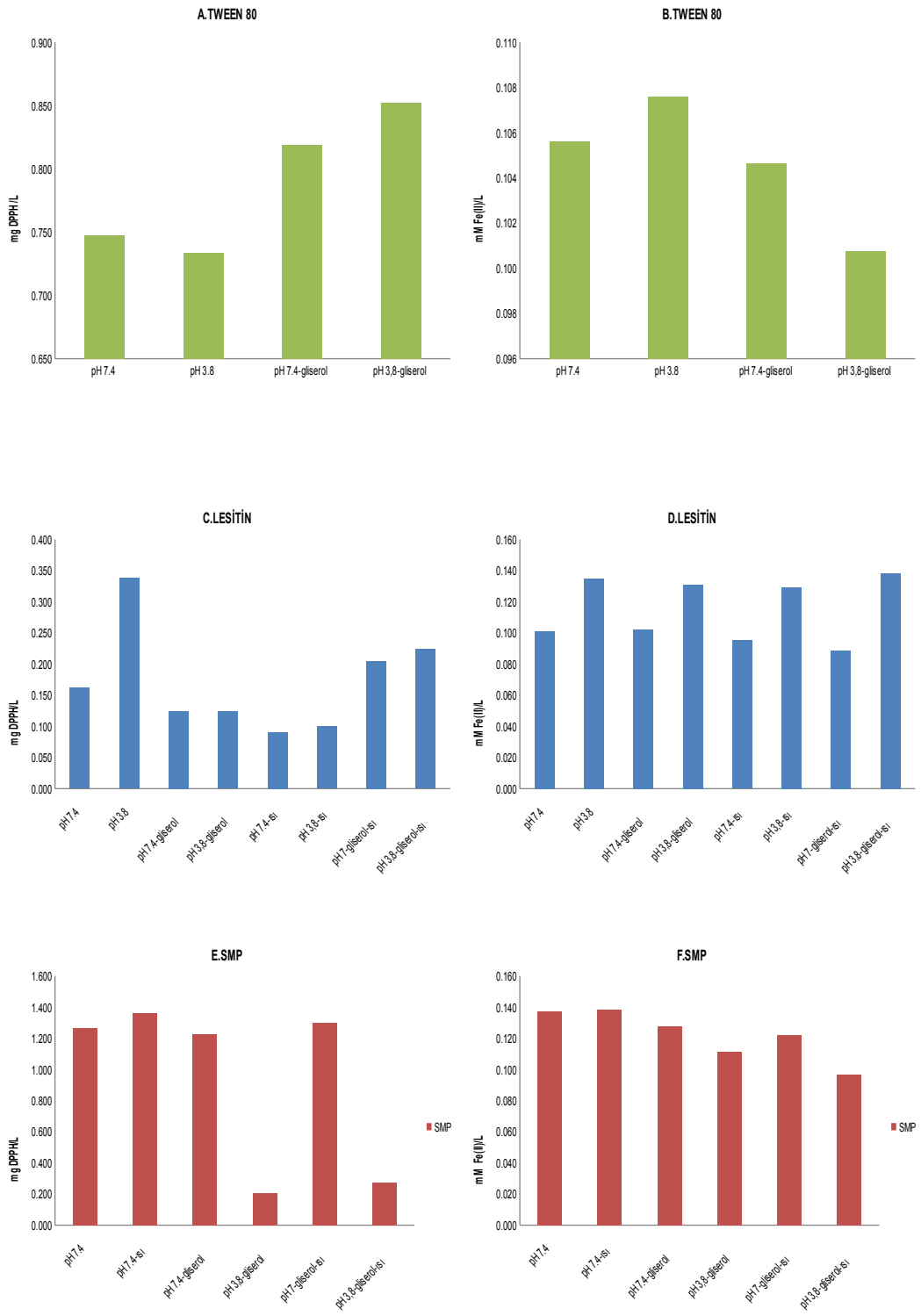
Şekil 15. Mikroakışkanlaştırma tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antioksidan aktivite DPPH vee FRAP sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.6.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

FRAP sonuçları incelendiğinde Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda ortalama değerin 0.105 mM Fe(II)/L olduğu belirlenmiştir. DPPH aktivitesi ise pH nın azalmasıyla istatistiksel olarak belirgin fark yaratmamıştır.

Lesitin ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda aynı pH daki emülsiyonlar neredeyse aynı FRAP sonucu vermiş gliserol antioksidan aktiviteyi etkilemezken ısıtma işlemi düşürmüştür. pH düşürülmesiyle FRAP aktivitesinde %38 artış görülmüştür. DPPH sonuçları incelendiğinde emülsiyonlar arasında farklılıklar olmadığı gözlenmiştir.

Sükroz monopalmitatlı nanoemülsiyonlarda ise durum tam tersi olarak gözlenmiş; pH'nın düşürülmesi FRAP sonuçlarını düşürmüştür. DPPH sonuçları hazırlanan bütün emülsiyonlar içerisinde en yüksek sükroz monopalmitatla oluşturulan nanoemülsiyonlarda görülmüştür. Görüldüğü gibi aynı madde farklı ortamlarda emülsifiye olduğunda farklı davranışlar sergilemektedir.



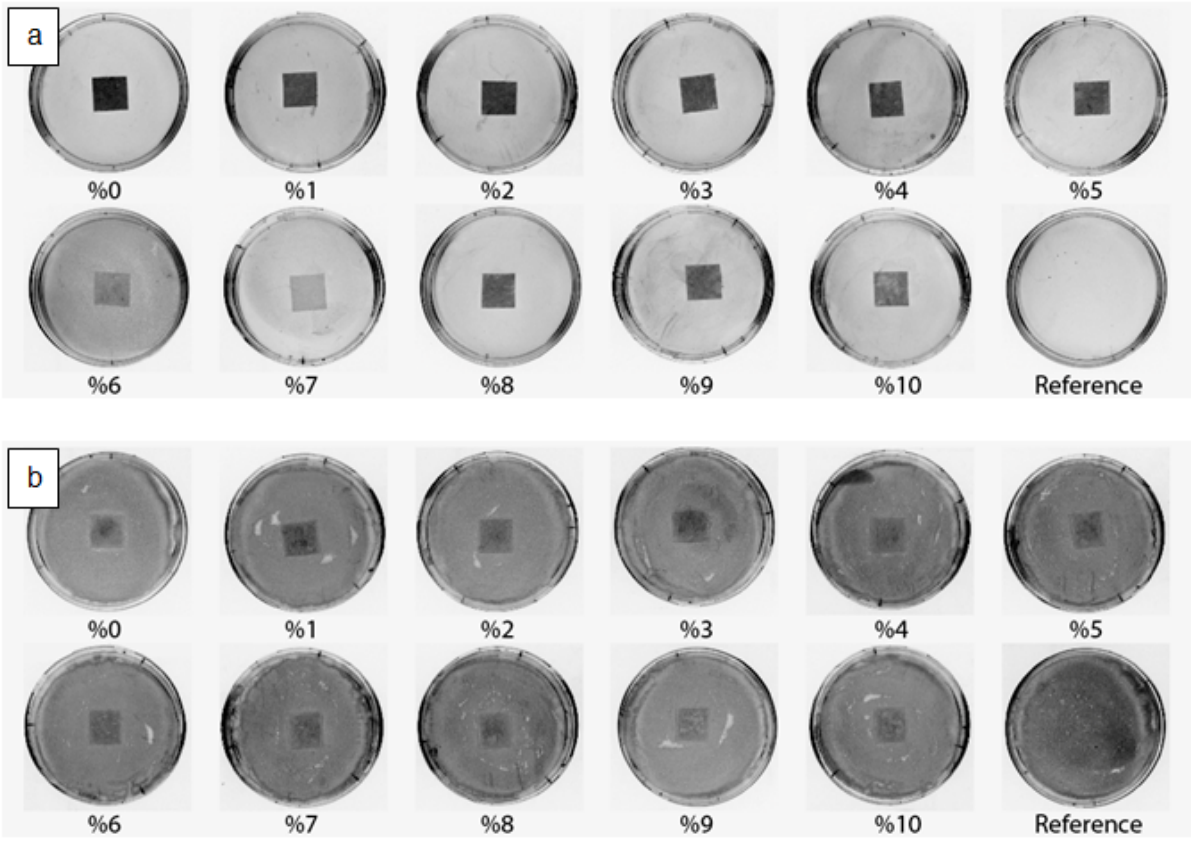
Şekil 16. Ultrasonikasyon tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antioksidan aktivite DPPH vee FRAP sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.7 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Nanoemülsiyon parçacıkları termodinamik olarak lipit içeren organizmalara nüfuz etme eğilimindedir. Elektrostatik çekme kuvvetlerinin etkili olduğu bu durumda yeterli miktarda nanoemülsiyon parçacığı nüfuz ettiğinde emülsiyonun içerisine sıkışan enerji serbest kalır. Böylece hem emülsiyon içerisindeki aktif ajan hem de açığa çıkan enerji lipit membranın stabilitesini bozar ve hücrenin lizizine ve sonuçta ölümüne sebep olur.

E.coli gibi Gram negatif bakterilerin dış membranlarında bulunan proteinlerin (porinler) porlar oluşturarak hidrofilik maddeleri geçirip lipofilik maddelere bariyer oluşturması ve beraberindeparçacıkların boyutsal olarak geçişlerini sınırlaması; esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesin düşürmektedir (Donsì vd., 2012b; Salvia-trujillo vd., 2014). Ancak işin kilit noktası bu olumsuzluklara karşın antimikrobiyal ajanın yine de hücre içinde dağılım gösterebilme potansiyelidir.

Limon küfü olarak bilinen *Penicillium italicum* narenciye ürünleri için hasat sonrası zarar veren önemli bir patojen olup meyvenin flavedo tabakasında meydana gelen mikro çatlaklarda üreyerek hasat ve işleme sırasında meyve kaybına neden olmaktadır (Caccioni vd., 1998). Kapsaisin yüklü nanoemülsiyon sistemlerinin bakteriler üzerinde etkisi yanında küfler üzerinde de etkilerini gözleyebilmek için çeşitli konstantrasyonlarda emülsiyonlar hazırlanarak *Peniciliium italicum* üzerinde denenmiştir. Buna göre alınan sonuçlar Resim 2'de verilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle denenen emülsiyonlarda 15^0C de 6 gün inkübe edilen küfler üzerinde antifungal aktiviteye rastlanmamıştır. Literatürde *Aspergillus oryzae* üzerinde yapılan bir çalışmada kapsaisinin inkübasyon periyodunda ω-hidroksilasyon, alkol oksidasyonu, hidrojenasyon, izomerizasyon ve α- ve / veya β-oksidasyonu aracılığyla hidrolize edilip başka metabolitlerin oluştuğu belirtilmiştir. Kapsaisinin küflerin mikroflorasıylavanililamin ve trans-8-metil-6-nonenoik asite hidrolizinin gerçekleştiği diğer çalışmalarda gösterilmiştir (Romano vd., 2011; Cho vd., 2014; Lee vd., 2015;).Projede alınan sonuçlarda bu durumu destekleyici nitelikte olmuştur. Kapsaisin yüklü nanoemülsiyonların *E.coli* ve *S.aureus* üzerine etkileri Şekil 17 ve 18'de gösterilmiştir.



Resim 2. Çeşitli kapsaisin konsantrasyonlarının Penicillium italicum üzerine etkisi; a-)1.gün b-) 6.gün

3.7.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

Sürfektan Tween 80 kullanılarak mikroakışkanlaştırma tekniği ile üretilen nanoemülsiyonlardan pH nın düşürülmesiyle antimikrobiyal etki *E.coli* üzerinde azalmıştır. *E.coli* birçok koşula dayanıklı bir mikroorganizma olmasından dolayı pH' daki azalma öldürücü etkiyi arttırmada etkili olmamıştır. Andrell vd. (2004) esansiyel yağlar üzerine yaptığı çalışmada esansiyel yağlara eklenen elma suyunun asitliğinin *E.coli* inhibisyonunda bir fark yaratmadığını göstermiştir. Asetatın *E.coli* büyümesinde üzerinde etkili olduğu literatürde belirtilmiştir. Bununla ilgili Shimizu vd. (1992) yaptığı bir çalışmada propiyonat, süksinat ve formatın *E.coli* büyümesi üzerinde fark edilebilir etkilerinin olmadığı bunun yanında asetatın etkisi olduğunu belirtmiştir. Yine aynı çalışmada asetat konsantrasyonunun logaritmik olarak büyüme hızını düşürdüğü raporlanmıştır. Bir başka çalışmada asetatın inhibitör olarak etkili olduğu konsantrasyon 1.25 g/l den düşük olmasıyla gerçekleştiği belirtilmiş ve *E.coli* nin asetat içerisinde büyüyebildiği glioksilat döngüsü ile açıklanmıştır

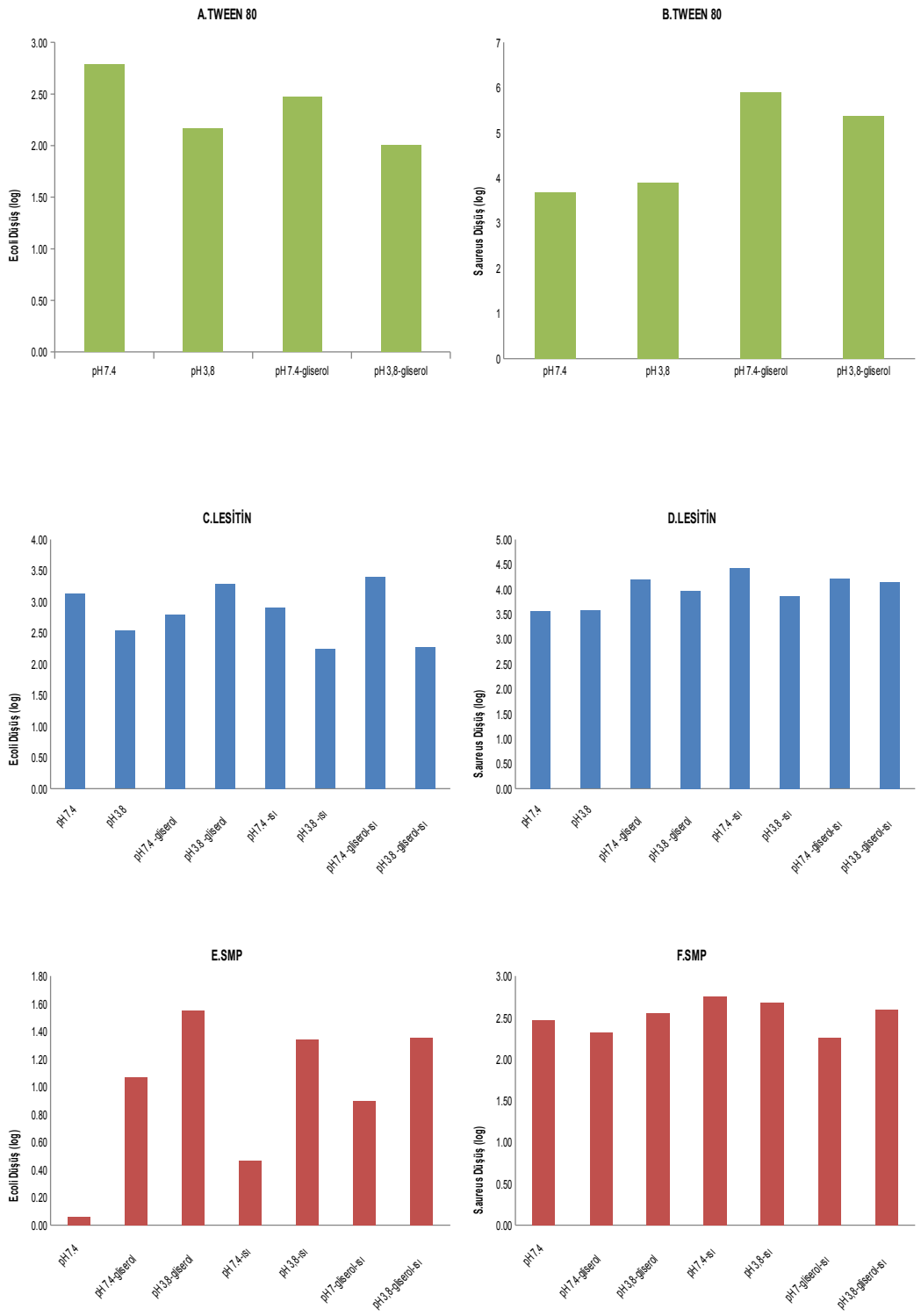
(O'Beirne ve Hamer, 2000). Buna göre %96 ile %48 asetat tamponu içeren emülsiyon içerisinde kapsaisinin inhibitör etkisi *E.coli* nin asetat tamponunda büyüyebilme yeteneği dolayısıyla azalmıştır. İstatiksel olarak gliserolun eklenen antimikrobiyal aktivite üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür.

S. aureus inhibisyonu ortam pH sının değişimindense gliserolün sürekli faza eklenmesiyle artmıştır. Gliserol yardımcı çözücü görevi görerek oleoresin kapsikumun çözünmesini sağlayıp *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etkiyi arttırmıştır.

Lesitin ile hazırlanan emülsiyonlarda *E.coli* inhibisyonu üzerinde ciddi farklar görülmemektedir. Ancak Tween 80 ile hazırlanan emülsiyonlar ile karşılaştırıldığında lesitinin hücre zarından kolaylıkla geçtiğini ve daha çok inhibisyon sağlayarak daha önceki araştırmaları desteklediği söylenebilir. Yapılan bir başka çalışmada lesitin ve bezelye proteininin *E.coli* için besin kaynağı olarak kullanıldığı ve büyümeyi desteklediği belirtilmiştir (Donsì vd., 2012). Bu nedenle lesitin ile hazırlanan emülsiyonların *E.coli* için sınırlı bakterisit etki gösterdiği söylenebilmektedir.

S.aureus değerlerinde parametrelerin değişimi belirgin etkilere sebep olmasa da gliserol içeren emülsiyonların diğer emülsiyonlara göre daha antimikrobiyal etki gösterdiği söylenebilmektedir. Ayrıca emülsiyonların ısıtılmasıyla *S.aureus* üzerinde antimikrobiyal etki ısıtılmamışa göre artış göstermiştir.

Düşük konsantrasyonda sükroz genellikle mikroorganizmalar için inhibitör özellik göstermemekle birlikte karbonhidrat kaynağı olarak büyümeyi destekleyici niteliktedir. Bunun aksine yüksek konsantrasyonda sükroz su bağlayıcı özellik göstererek ortamda mikroorganizma gelişmesi için elverişli suyu azaltarak inhibitör özellik göstermektedir (Artz ve Hansen, 1994).Asitliğin artmasıyla ortamdaki sürfektan (sükroz monopalmitat) hidrolize olarak sükroz birimlerine daha çok ayrılacak ve elverişli suyu azaltacaktır. Bu nedenle pH' nın düşük olduğu emülsiyonlarda inhibisyonun etkisi pH 7.4' e göre daha fazla çıkmıştır. pH' nın 7.4 olduğu emülsiyonlarda ise bakteri inkübasyon periyodu içinde üremeyi destekleyici ortam bularak kapsaisinin etkisini elimine edecek şekilde gelişme göstermiş olabilir. Daha önce yapılan bir çalışmada nisin ve sükroz yağ asiti esterlerinin sinerjistik etkisi kullanılarak bakteriler inhibe edilmeye çalışılmıştır. Ancak burada da Gram pozitifler üzerinde inhibisyon gözlense de Gram negatif bakteriler üzerine bir inhibisyon gözlenememiştir (Thomas vd., 1998). Sükroz monopalmitat, kapsaisinin antimikrobiyal özelliğini gölgeleyerek daha az log düşüş görülmesine sebep olmuştur.



Şekil 17. Mikroakışkanlaştırma tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antimikrobiyal aktivite E.coli ve S.aureus sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve E en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.7.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

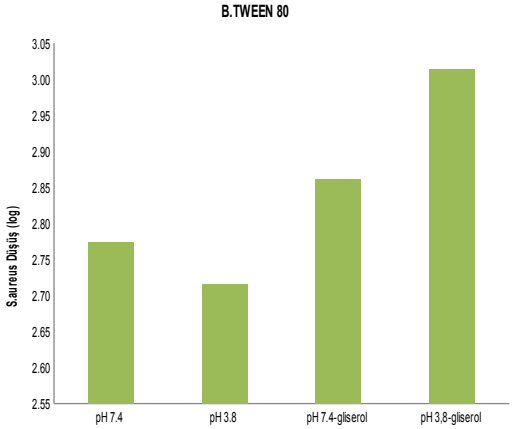
Ultrasonikasyon işleminden sonra antimikrobiyal aktivite sonuçları genel olarak düşüş göstermiştir. Ultrasonikasyon sırasında kavitasyonla birlikte lokal olarak hava kabarcığı çöküşü meydana gelmektedir. Bu da ani basınç ve sıcaklık yükselmesine sebep olmaktadır. Hidrofobik uçucu esansiyel yağlar, aromatik hidrokarbon yapıları nedeniyle sıcaklığa hassas olup bu ani değişimler sonucu özelliklerini kaybedebilmektedir. Böylece ortaya çıkan hidroksi radikaller, hidrojen atomlar hatta hidrojen peroksitler esansiyel yağın özelliğinin değişmesine neden olmaktadır (Jiangvd., 2002a, 2002b; Kidak ve Ince, 2006; Nanzaivd., 2008). Literatürde (Salvia-Trujillo vd., 2014) yaptığı çalışmada benzer sonuca rastlanmıştır. Ayrıca ayçiçeği yağının ultrasonikasyon sonucunda bozulması bir başka çalışmada işlem sırasında açığa çıkan ısının lipit oksidasyonuna sebep olması sonucu olarak açıklanmıştır. Aromatik yapıda meydana gelen bu istenmeyen değişiklikler esansiyel yağın antimikrobiyal etkisinde düşüşe neden olmuştur (F. Chemat vd., 2004, 2011).

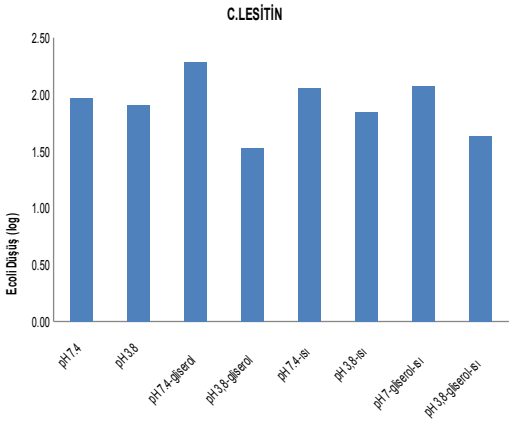
Sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanoemulsiyonlarda *E.coli* düşüşü pH 7.4' de 1.70, pH 3.8' de 1.51 iken gliserol eklendiğinde sırasıyla 2.25 ve 1.77 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde pH 7.4' de de 2.77, pH 3.8' de 2.72 ve gliserol eklendiğinde 2.86 ve 3.01 log *S.aureus* düşüşü gözlenmiştir.

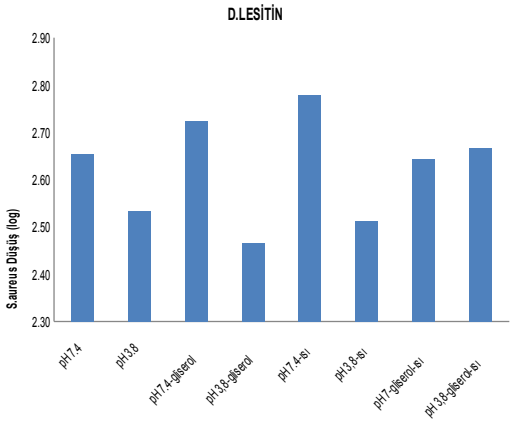
Sürfektan lesitin kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda pH 3.8' de düşük inhibisyon görülürken pH 7.4' te maksimum inhibisyon (2.28 log) gliserol kullanılan emülsiyonda görülmüştür. *S. aureus* için de benzer bir durum gözlenirken pH 3.8' de en düşük 2.47 log gözlenmiş ve pH 7.4 te en yüksek 2.78 log gözlenmiştir.

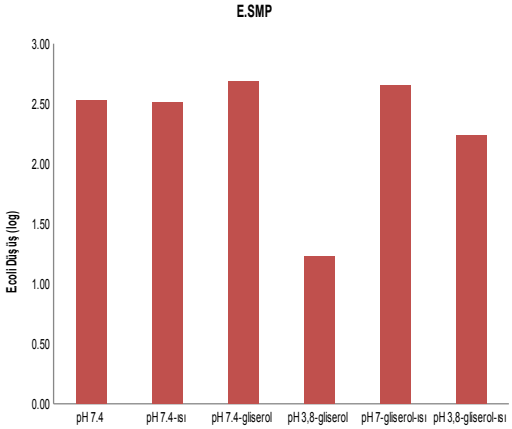
Sürfektan sükroz monopalmitat ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda pH 7.4' te antimikrobiyal aktivite mikroakışkanlaştırma işlemine göre artmış olup en yüksek aktivite gösteren 2.69 log ile gliserol içeren emülsiyon olmuştur. Mikroakışkanlaştırma işleminde aynı emülsiyonda 1.07 log düşüş görülmüştü. Burada ultasonikasyonun aktiviteyi neredeyse 2 katına çıkardığı söylenebilir. *S. aureus* içinde sonuçlar her iki homojenizasyon tekniğiyle hemen hemen aynı çıkmıştır. Maksimum inhibisyon pH 3.8 gliserol ve ısıtmanın olduğu emülsiyon iken (2.92 log) minimum inhibisyon (2.68) pH 7.4 ile hazırlananda görülmüştür.

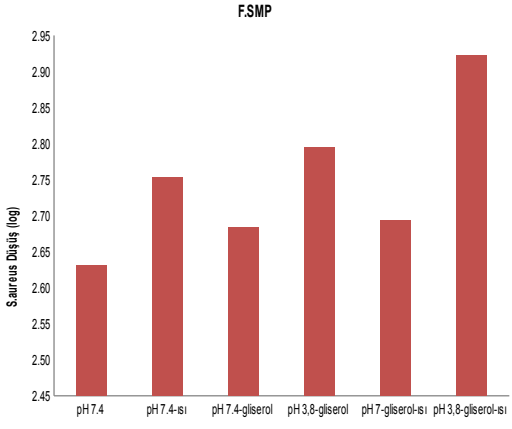
A.TWEEN 80
E.coli Düşüş (log)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol


B.TWEEN 80
S.aureus Düşüş (log)
3.05
3.00
2.95
2.90
2.85
2.80
2.75
2.70
2.65
2.60
2.55
pH 7.4
pH 3.8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol


C.LESİTİN
E.coli Düşüş (log)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
pH7.4
pH3.8
pH7.4-gliserol
pH3,8-gliserol
pH7.4-ısı
pH3,8-ısı
pH7-gliserol-ısı
pH3,8-gliserol-ısı


D.LESİTİN
S.aureus Düşüş (log)
2.90
2.80
2.70
2.60
2.50
2.40
2.30
pH7.4
pH3.8
pH7.4-gliserol
pH3,8-gliserol
pH7.4-ısı
pH3,8-ısı
pH7-gliserol-ısı
pH3,8-gliserol-ısı


E.SMP
E.coli Düşüş (log)
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
pH 7.4
pH 7.4-ısı
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7-gliserol-ısı
pH 3,8-gliserol-ısı


F.SMP
S.aureus Düşüş (log)
2.95
2.90
2.85
2.80
2.75
2.70
2.65
2.60
2.55
2.50
2.45
pH 7.4
pH 7.4-ısı
pH 7.4-gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7-gliserol-ısı
pH 3,8-gliserol-ısı

Şekil 18. Ultrasonikasyon tekniği A,B)Tween 80, C,D) Lesitin, E,F) Sükroz monopalmitat (SMP) numunelerin antimikrobiyal aktivite *E.coli* ve *S.aureus* sonuçları. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.8 Nanoemülsiyonların Stabilitelerinin İncelenmesi

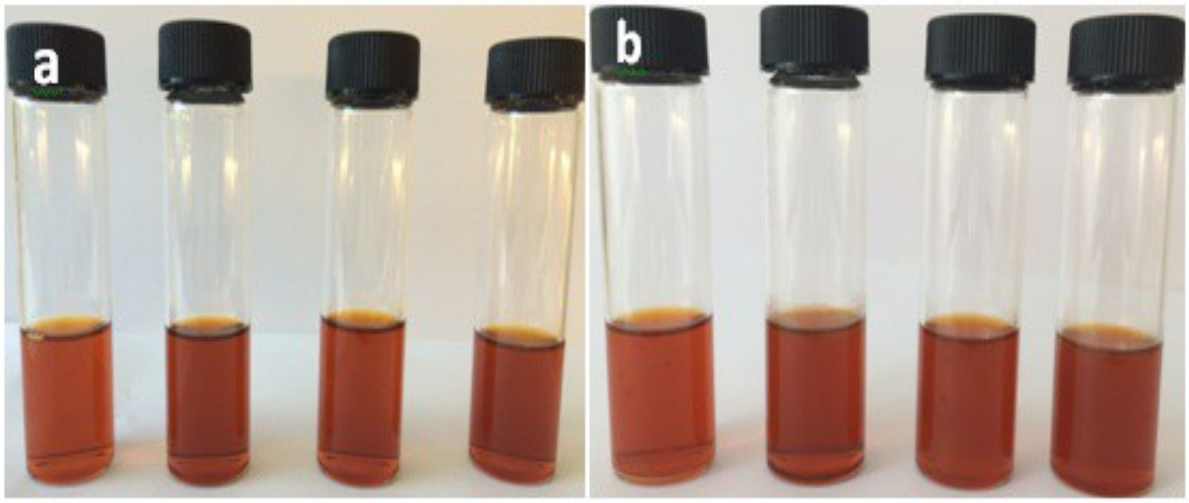
Doğal olarak ayrışma eğiliminde olan emülsiyonların stabilitesi sıcaklık, pH, iyonik yük gibi birçok durumdan etkilenmektedir. Nanoemülsiyonlar, mikroemülsiyonların aksine termodinamik olarak stabil değildir. Ancak yağ fazının özelliklerine uygun şekilde bir sürfektan seçilirse parçacık boyutu hem küçülecek hem de tekdüze dağılım gözlenerek kinetik stabilite arttırılacaktır. Böylece yer çekimi nedeniyle ayrılmaya (kremleşme/sedimantasyon), parçacıkların birleşmesine, büyümesine, Ostwald olgunlaşmasına karşı dirençli olunacaktır. Çünkü bu fizikokimyasal değişimlerin gerçekleşmesini sağlayan enerji bariyeri arttırılmış olacaktır (McClements, 2012). Örneğin, yüksek hidrofilik özelliğe sahip sürfektanların parçacıkları stabilize etmede önemli görevleri bulunmaktadır. Bunun yanında yüksek sürfektan konsantrasyonu da emülsiyonların uzun ömürlü olması için kullanılabilmektedir (Yuan vd., 2008). Tween 80 ve lesitin ile hazırlanan nanoemülsiyonlar 4^0C de 28 gün boyunca bekletilmiştir. Sürfektan sükroz monopalmitat ile hazırlanan nanoemülsiyonların buzdolabı sıcaklığına dayanıklı olmadığı ve 1 gün içerisinde faz ayrımı gözlendiği görülmüştür. Son yapılan çalışmalarda sükroz monopalmitat kullanılan sistemlerin düşük sıcaklıklarda birbirine geçmiş halde miseller oluşturarak jelleşmeye sebep oldukları belirtilmiştir (Yamamoto vd., 2009). Bu durumda buzdolabı sıcaklığında meydana gelen bu değişim emülsiyon stabilitesini bozmuş olabilir. Bu nedenle depolama için 20^0C sıcaklık seçilmiştir.

3.8.1 Mikroakışkanlaştırmanın Etkisinin İncelenmesi

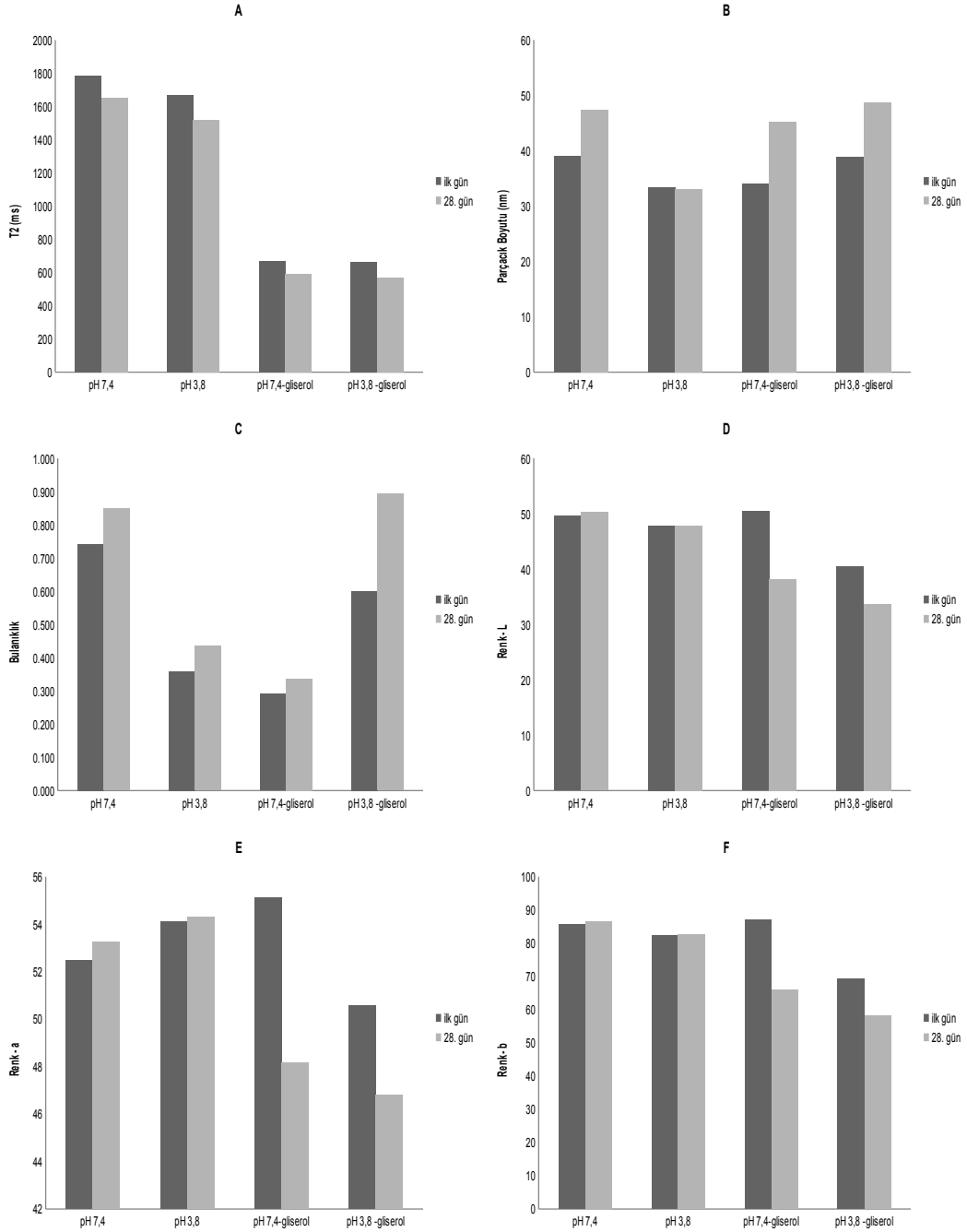
i. Tween 80

Şekil 19' daki verilerde de görüldüğü gibi Tween 80 ile hazırlanan kapsaisin yüklü nanoemülsiyonların 28 gün boyunca stabilitesini korumuştur. Görsel olarak

nanoemülsiyonlarda kremleşme, faz ayrımı gibi fiziksel bozulmalar gözlenmemiş şeffaf özellikli görünümüyle kalmıştır (Resim 3.).



Resim 3. Sürfektan “Tween 80” ile hazırlanan nanoemülsiyonlar a-) ilk gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH3.8-pH3.8, gliserol; b-) 28.gün,pH7.4-pH7.4,gliserol-pH3.8-pH3.8,gliserol



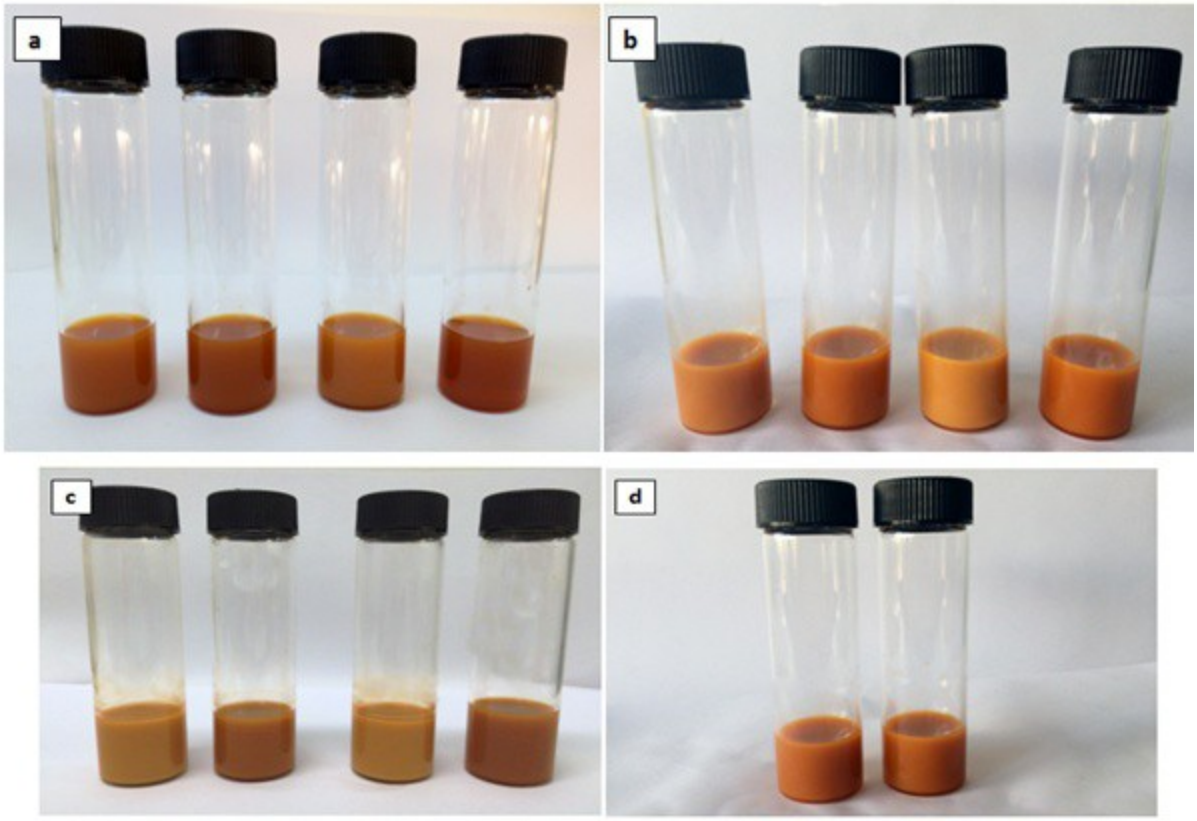
Şekil 19. Mikroakışkanlaştırma-Sürfektan "Tween 80" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk ve 28.gün sonunda

Stabilitede nanoemülsiyonlar için en önemli parametre parçacık boyutudur. Parçacık boyutu yaklaşık %20 büyümüştür. Buna rağmen yine parçacıklar yine nano boyutta kalmıştır (<49 nm). Bununla birlikte parçacık büyümesiyle birlikte emülsiyonda bulanıklıkta artmıştır. Gliserol içeren emülsiyonların parlaklık, kırmızılık, sarılık değerleri azalırken diğer nanoemülsiyonlar için bu değerlerde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Parçacık boyutunun büyümesi sonucu moleküler hareketlilik azalacağından hızlı bir relaksasyon görülecek ve T2

değeri düşecektir (Takegami & Kitamura, 2008). Bu durum Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda gözlenmiştir.

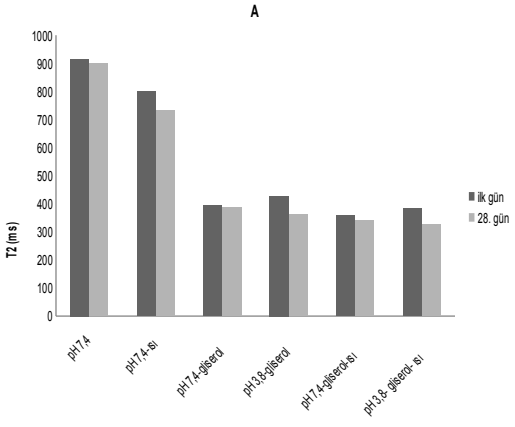
ii. Lesitin

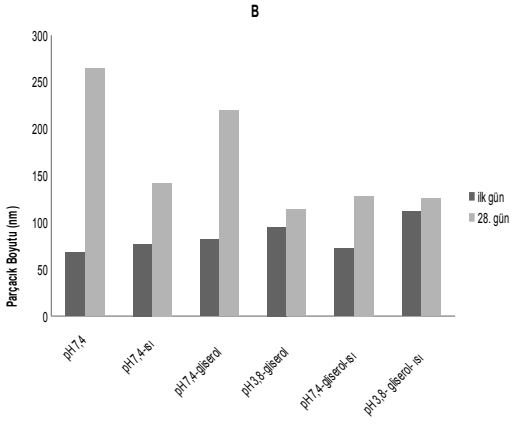
Lesitin ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda Tween 80' e göre daha az stabilite gözlenmiştir. pH 3.8 ve pH 3.8-ısıtma ile hazırlanan nanoemülsiyonlar 7.gün sonunda bozulduğu için stabilolmamaktadır. Asitliğin düşmesi sonucu sterik itme kuvveti düşmüş ve bu durumda parçacıkların birleşmesini arttırarak yağ parçacıklarının yüzeyde toplanmasına sebep olmuştur. Daha öncede lesitinin suda az çözünürlüğü nedeniyle emülsiyonların opak görünmesinden söz edilmişti. 28 gün sonunda da benzer şekilde emülsiyonlarda Resim 4' te de görüldüğü gibi görsel olarak bir değişim gözlenmemiştir.

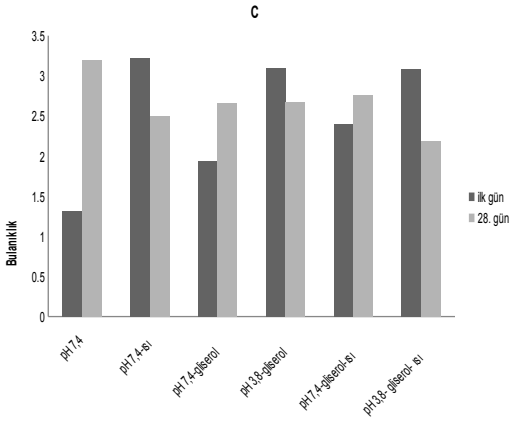


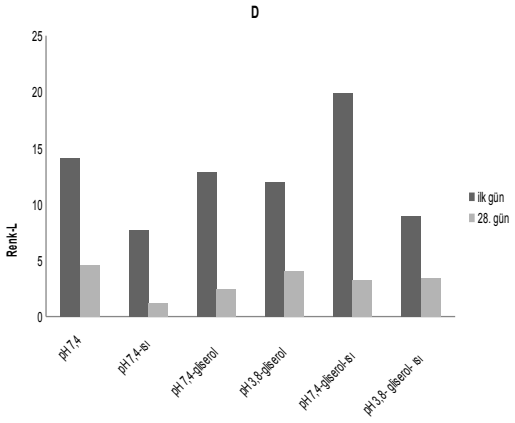
Resim 4. Sürfektan "Lesitin" a-) ilk gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün, pH3.8-pH3.8, gliserol-pH3.8,ısıtma-pH3.8,gliserol,ısıtma; d-) 28.gün, pH3.8, gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma

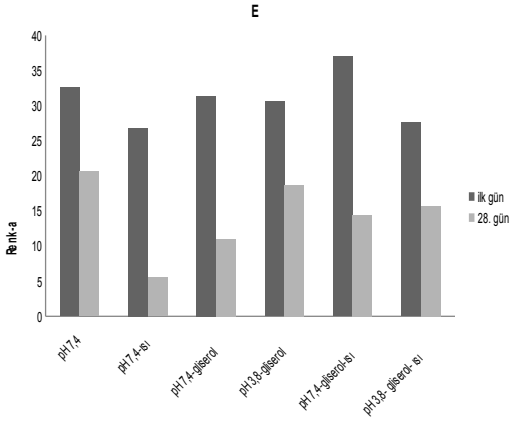
Şekil 20. de nanoemülsiyonlarda 28 gün sonunda görülen değişimlerin sonuçları gösterilmiştir. Büyük parçacıklar flokülasyon sonucu deforme olurken küçük parçacıklar yüksek Laplace basıncı nedeniyle deforme olmaya yatkın değildir. Parçacıklar arasındaki hidrodinamik ilişkiler, kolloidal kuvvetler ve yüzey yükleri bu aşamada önem kazanmaktadır (Rahn-Chique vd., 2012). Lesitinle hazırlanan nanoemülsiyonlarda bu durum gözlenmektedir. Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda parçacıklar zamanla çok az büyüme gösterirken lesitin içerenlerde boyut daha dramatik olarak artmıştır. Parlaklık, kırmızılık ve sarılık değerleri giderek azalmıştır. Relaksasyon sonuçlarına bakıldığında değerlerde çok büyük bir değişim gözlenmemiştir. Bulanıklık sonuçlarında da parçacıkların zamanla artmasıyla bulanıklığı artması beklenirken tersi durum gerçekleşmiştir. Daha önceki kısımlarda moleküler değişimin bulanıklık ve T2 değerleriyle daha iyi temsil edilebileceği belirtilmişti. Nanoemülsiyonların hazırlanması sırasında küçük, düzgün parçacıkların yanı sıra homojenizasyon sonrası Ostwald olgunlaşması veya birleşme ile birlikte parçacık büyümesi meydana gelmiş olabilir. Bu durumda parçacık boyutu büyük damlacıkların olmasıyla zaten büyük olacaktır. Önceki sonuçlarda da bu durum gözlenmiştir. Bununla birlikte depolama süresince sıcaklığın etkisiyle enerjisini azaltmaya yönelten küçük parçacıklar birleşme sürecine katılarak büyümüş olabilir. Nanoemülsiyonun içerisinde hala bulunan küçük ve büyük parçacıklar ışığın kırılmasını ya da manyetik alanda salınımı etkileyerek bu sonuçları açığa çıkarmış olabilir. Burada dikkat edilmesi gereken durum; birleşmenin lokal olduğu düşünülüp bütün yüzeye yayılmadığı için kremleşme veya sedimantasyon görülmemesidir. Ancak en başta belirtildiği gibi faz ayrımının ya da yüzeyde yağ moleküllerinin toplandığı emülsiyonlarda görülmüş ve nanoemülsiyon özelliğini kaybettiği için değerlendirilmeye alınmamıştır.

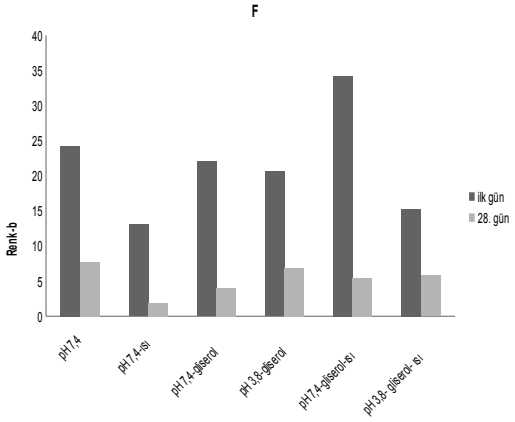

A
T2 (ms)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
pH7.4
pH7.4-si
pH7.4-gliserol
pH3.8-gliserol
pH7.4-gliserol-si
pH3.8- gliserol- si
ilk gün
28. gün


B
Parçacık Boyutu (nm)
300
250
200
150
100
50
0
pH7.4
pH7.4-si
pH7.4-gliserol
pH3.8-gliserol
pH7.4-gliserol-si
pH3.8- gliserol- si
ilk gün
28. gün


C
Bulanıklık
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
pH7.4
pH7.4-si
pH7.4-gliserol
pH3.8-gliserol
pH7.4-gliserol-si
pH3.8- gliserol- si
ilk gün
28. gün

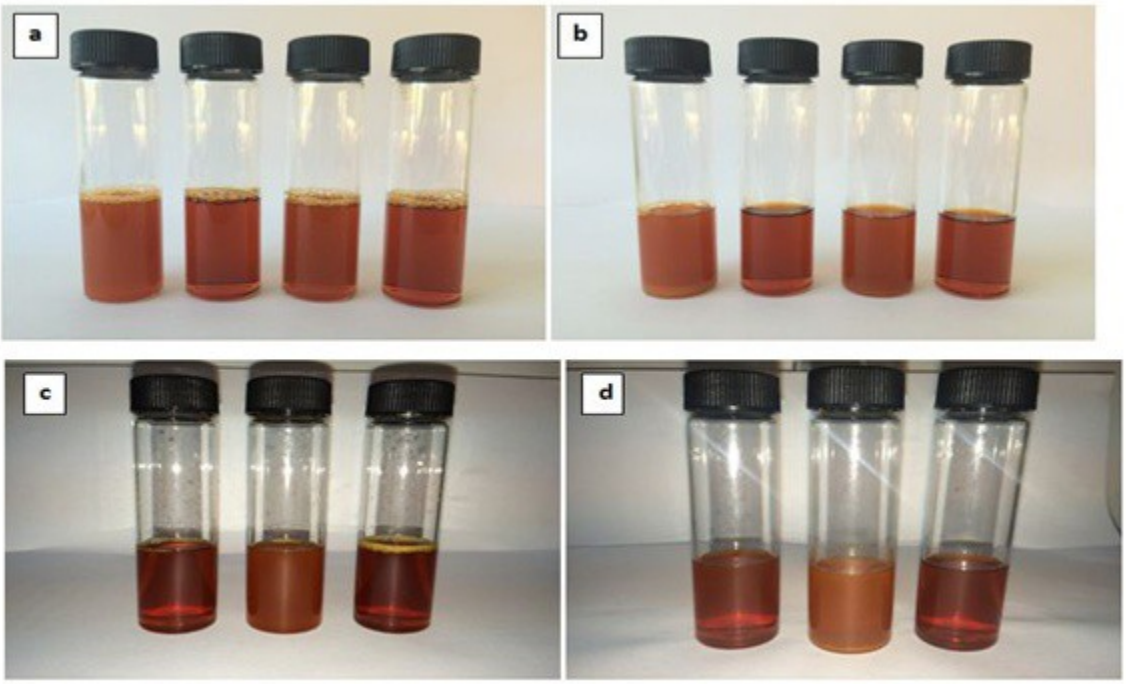

D
Renk-L
25
20
15
10
5
0
pH7.4
pH7.4-si
pH7.4-gliserol
pH3.8-gliserol
pH7.4-gliserol-si
pH3.8- gliserol- si
ilk gün
28. gün


E
Renk-a
40
35
30
25
20
15
10
5
0
pH7.4
pH7.4-si
pH7.4-gliserol
pH3.8-gliserol
pH7.4-gliserol-si
pH3.8- gliserol- si
ilk gün
28. gün


F
Renk-b
40
35
30
25
20
15
10
5
0
pH7.4
pH7.4-si
pH7.4-gliserol
pH3.8-gliserol
pH7.4-gliserol-si
pH3.8- gliserol- si
ilk gün
28. gün

Şekil 20. Mikroakışkanlaştırma-Sürfektan "Lesitin" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk ve 28.gün sonunda

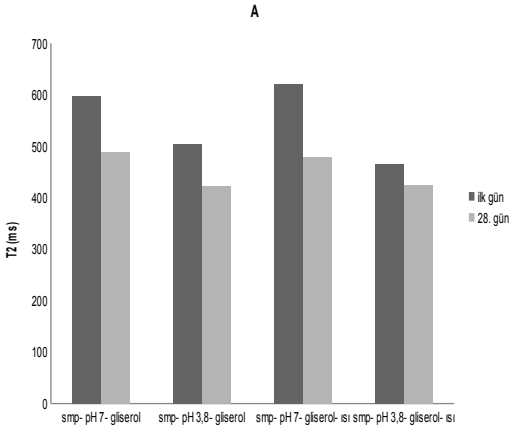
iii. Sükroz monopalmitat

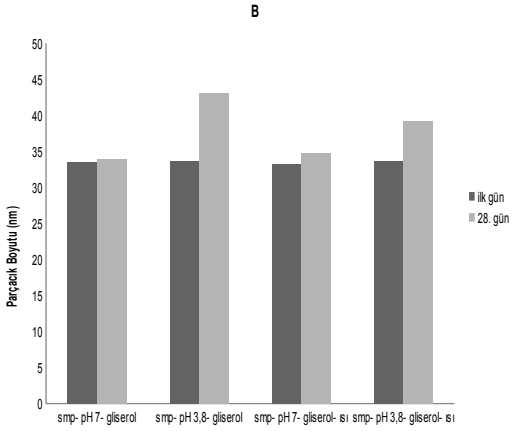


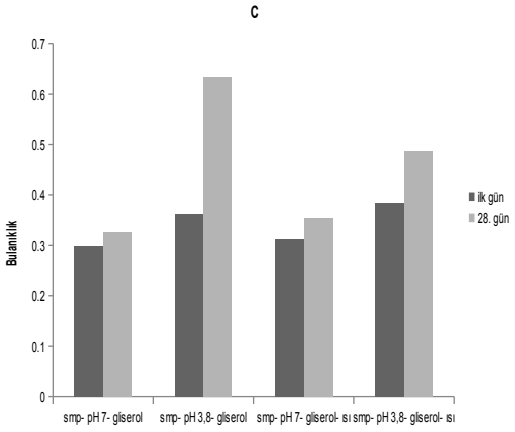
Resim 5. Sürfektan "Sükroz monopalmitat"; a-)ilk gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün, pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün, pH3,8, gliserol-pH3,8,ısıtma-pH3,8,gliserol,ısıtma; d-) 28.gün, pH3,8, gliserol-pH 3.8,ısıtma- pH3.8, gliserol,ısıtma

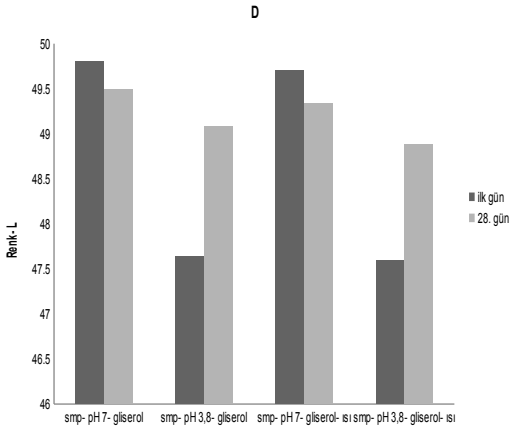
Resim 5.A-B de de görüldüğü gibi pH 7.4 ve pH 7.4-ısıtma ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda depolama süresince dibe çökme meydana gelmiştir. Benzer şekilde pH 3.8 yapıldıktan 1 saat içinde ve pH 3.8-ısıtma ile hazırlanan nanoemülsiyonda 7 gün sonunda stabilitesi bozulmuştur. Ancak gliserol içeren emülsiyonlar 28 gün boyunca stabil olarak kalmıştır. Nanoemülsiyonlarda meydana gelen değişimler Şekil 21.' de gösterilmiştir. Parçacık boyutundaki en fazla büyüme pH 3.8-gliserol-ısıtma ile hazırlanan

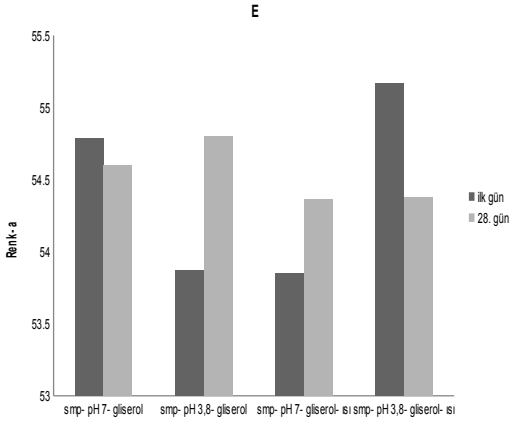
nanoemülsiyonda görülürken (33.6 nm - 43.13 nm) diğerlerinde önemsenmeyecek kadar az büyüme meydana gelmiştir. pH nın düşük olmasıyla sükroz monopalmitatın özelliğini kaybetmesi ve emülsiyon özellikleri üzerine olumsuz etkileri daha önceki kısımlarda tartışılmıştır. Bu durumda 28 gün sonunda bile hala nano düzeylerde kalınması gliserolün emülsiyonun fiziksel özellikleri üzerine iyileştirici etkileri sayesinde olmuştur. Parçacık boyutundaki büyümeye pararlel olarak bulanıklık değeri yine en fazla belirtilen nanoemülsiyonda artmış relaksasyon değerleri beklenildiği gibi azalmıştır. Renk değerleri incelendiğinde parlaklığın pH 7.4 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda azaldığı gözlenirken pH 3.8 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda arttığı gözlenmiştir. Sarılık ve kırmızılık değeri ise her formülasyon için ayrı davranış sergilemiştir. Nanoemülsiyonların her biri kendi içerisinde birbirinden farklı birleşme oranları sergilemiş ve bunun sonucuda belirtilen değerlere yansımış olabilir.

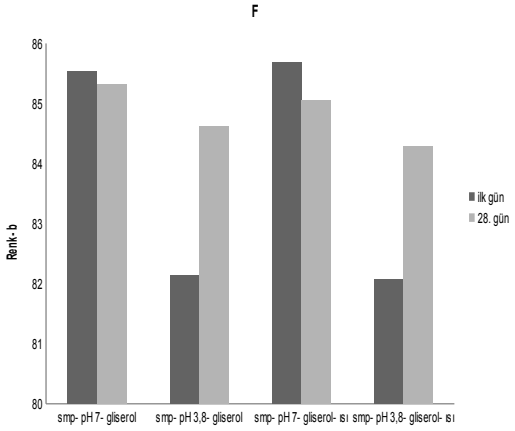

A
T2 (ms)
700
600
500
400
300
200
100
0
smp- pH 7- gliserol
smp- pH 3,8- gliserol
smp- pH 7- gliserol- ısı
smp- pH 3,8- gliserol- ısı
ilk gün
28. gün


B
Parçacık Boyutu (nm)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
smp- pH 7- gliserol
smp- pH 3,8- gliserol
smp- pH 7- gliserol- ısı
smp- pH 3,8- gliserol- ısı
ilk gün
28. gün


C
Bulanıklık
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
smp- pH 7- gliserol
smp- pH 3,8- gliserol
smp- pH 7- gliserol- ısı
smp- pH 3,8- gliserol- ısı
ilk gün
28. gün


D
Renk- L
50
49.5
49
48.5
48
47.5
47
46.5
46
smp- pH 7- gliserol
smp- pH 3,8- gliserol
smp- pH 7- gliserol- ısı
smp- pH 3,8- gliserol- ısı
ilk gün
28. gün

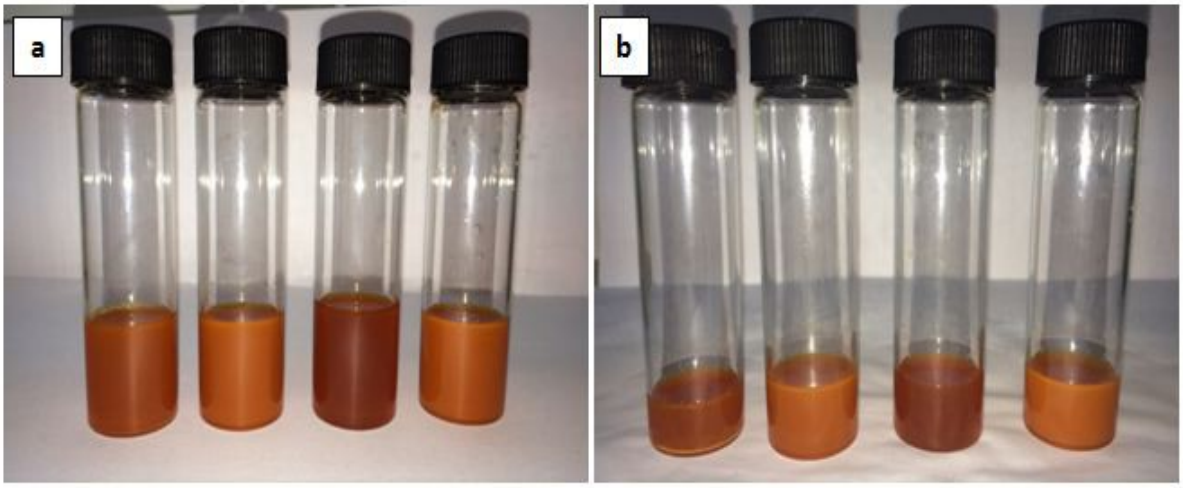

E
Renk- a
55.5
55
54.5
54
53.5
53
smp- pH 7- gliserol
smp- pH 3,8- gliserol
smp- pH 7- gliserol- ısı
smp- pH 3,8- gliserol- ısı
ilk gün
28. gün


F
Renk- b
86
85
84
83
82
81
80
smp- pH 7- gliserol
smp- pH 3,8- gliserol
smp- pH 7- gliserol- ısı
smp- pH 3,8- gliserol- ısı
ilk gün
28. gün

Şekil 21. Mikroakışkanlaştırma-Sürfektan "Sükroz monopalmitat" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F) Renk sonuçlarını ilk ve 28.gün sonu

3.8.2 Ultrasonikasyonun Etkisinin İncelenmesi

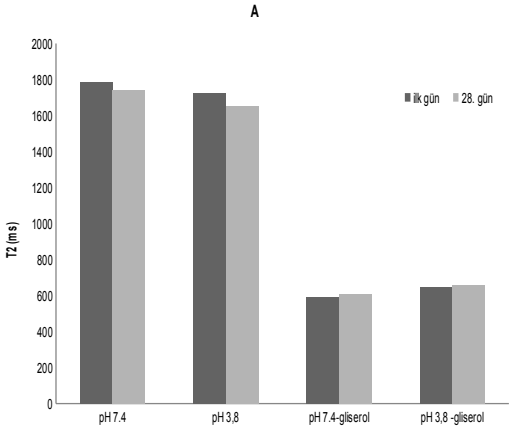
i. Tween 80

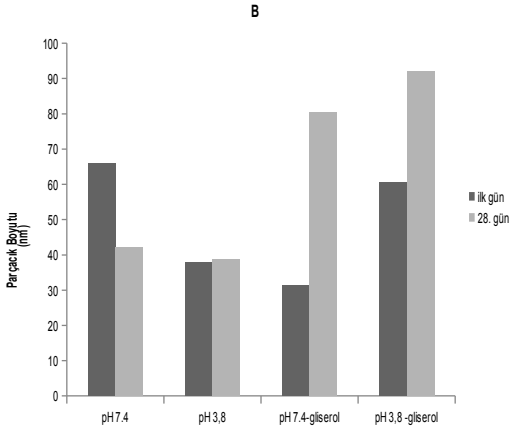


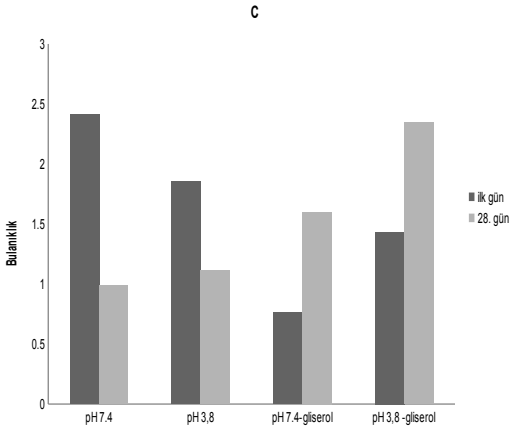
Resim 6.Sürfektan "Tween 80" ; a-)ilk gün. pH7.4-pH7.4.gliserol-pH3.8-pH3.8. gliserol; b-) 28.gün.pH7.4-pH7.4.gliserol-pH3.8-pH3.8,gliserol

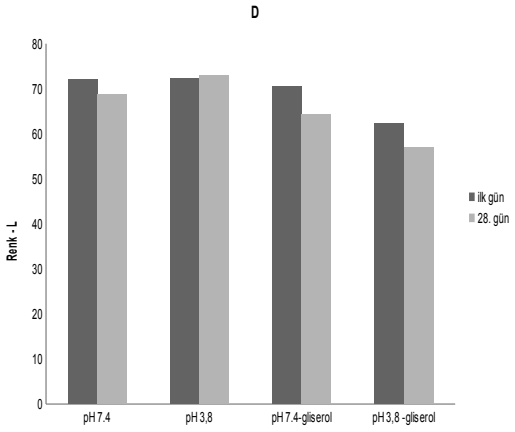
Resim 6. ta nanoemülsiyonlarda ilk gün ve 28 gün sonunda görsek olarak bir değişiklik gözlenmemiştir. 28 gün sonunda meydana gelen değişimler Şekil 22. de verilmiştir. Ultrasonikasyon yağ damlacıkları üzerine elektriksel yük uygulaması sayesinde koloidal stabiliteyi sağladığı bilinmektedir (Salvia-Trujillo vd., 2013). 28 gün sonunda parçacık büyümesi gliserol içeren nanoemülsiyonlarda daha fazla görülmüştür. pH 3.8 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda parçacıklar çok değişmese de pH 7.4 ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda zamanla büyüyen parçacıklar dibe çökmeye başlaması nedeniyle küçük parçacıklar emülsiyonda askıda kalıp parçacık boyutunu yanıltıcı sonuç vermesine neden olmuş olabilir. Bulanıklık değerleride parçacık boyutu sonuçlarını destekleyici olarak gliserol içeren nanoemülsiyonlarda artış göstermiş diğer nanoemülsiyonlarda ise azalış göstermiştir. T2 değerlerinde önemli değişiklikler meydana gelmemiştir. Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonlar ultrasonikasyon işleminde çoklu parçacık dağılımı göstermiştir. Bu nedenle

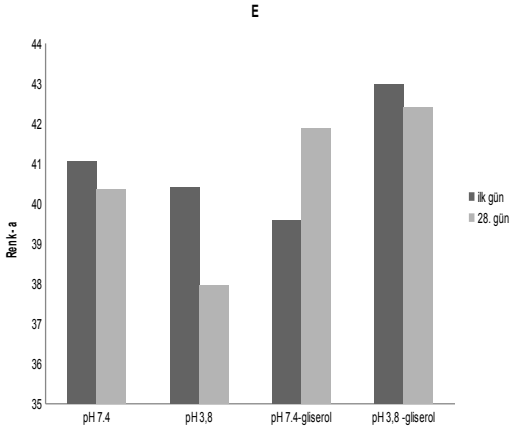
mikroakışkanlaştırma işlemiyle hazırlanan nanoemülsiyonlardan daha opak parçacık boyutu daha büyük emülsiyonlar elde edilmiş ve bu durumda stabiliteye yansımıştır. Parlaklık, sarılık değerleri değişiklik göstermemiştir. Ancak kırmızılık değerleri pH 7.4 ve gliserolle hazırlanan nanoemülsiyonda artarken diğerlerinde düşüş göstermiştir.

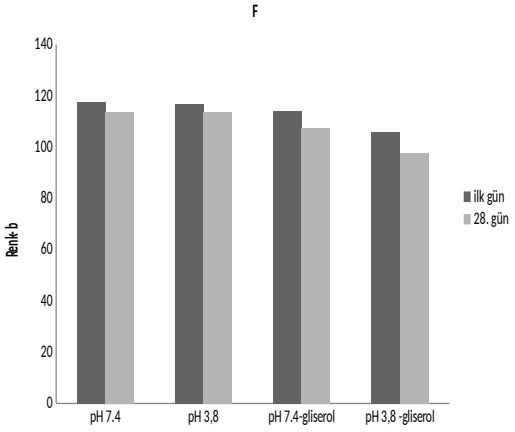

A
T2 (ms)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
ilk gün
28. gün
pH 7.4
pH 3,8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8 -gliserol


B
Parçacık Boyutu (nm)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ilk gün
28. gün
pH 7.4
pH 3,8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8 -gliserol


C
Bulanıklık
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
ilk gün
28. gün
pH 7.4
pH 3,8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8 -gliserol

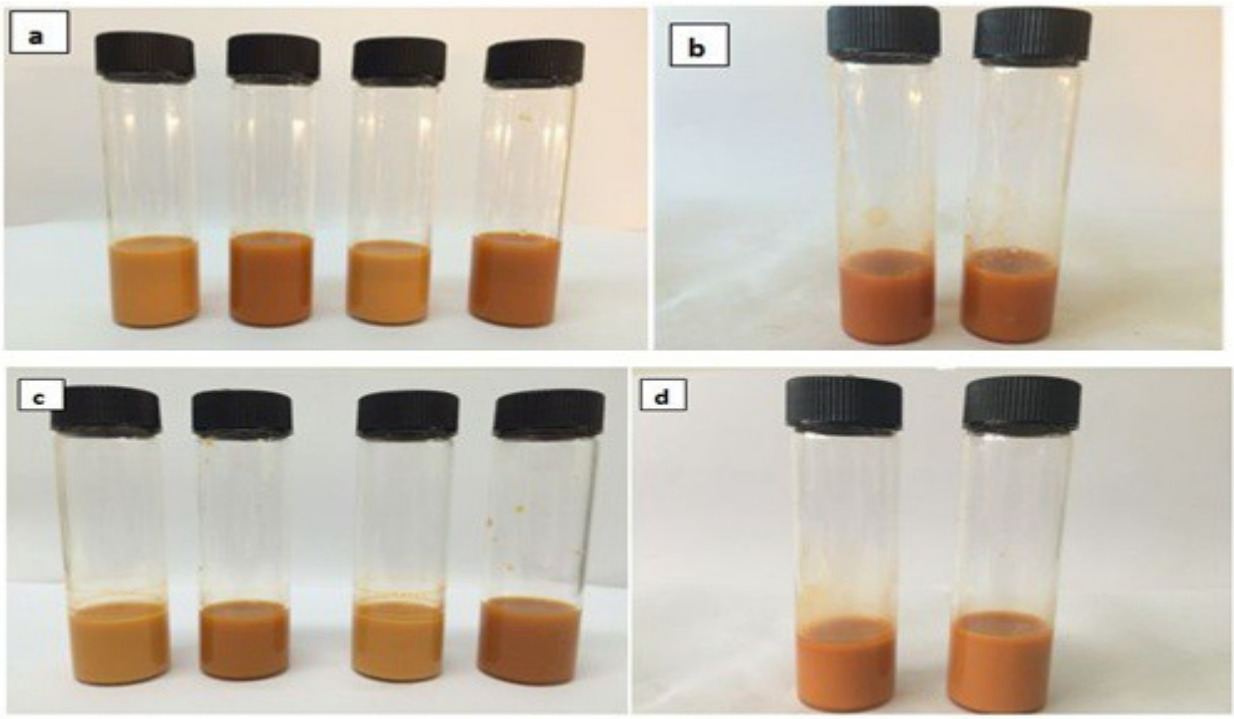

D
Renk - L
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ilk gün
28. gün
pH 7.4
pH 3,8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8 -gliserol


E
Renk - a
44
43
42
41
40
39
38
37
36
35
ilk gün
28. gün
pH 7.4
pH 3,8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8 -gliserol


F
Renk b
140
120
100
80
60
40
20
0
ilk gün
28. gün
pH 7.4
pH 3,8
pH 7.4-gliserol
pH 3,8 -gliserol

Şekil 22. Ultrasonikasyon-Sürfektan "Tween 80" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk ve 28.gün sonu

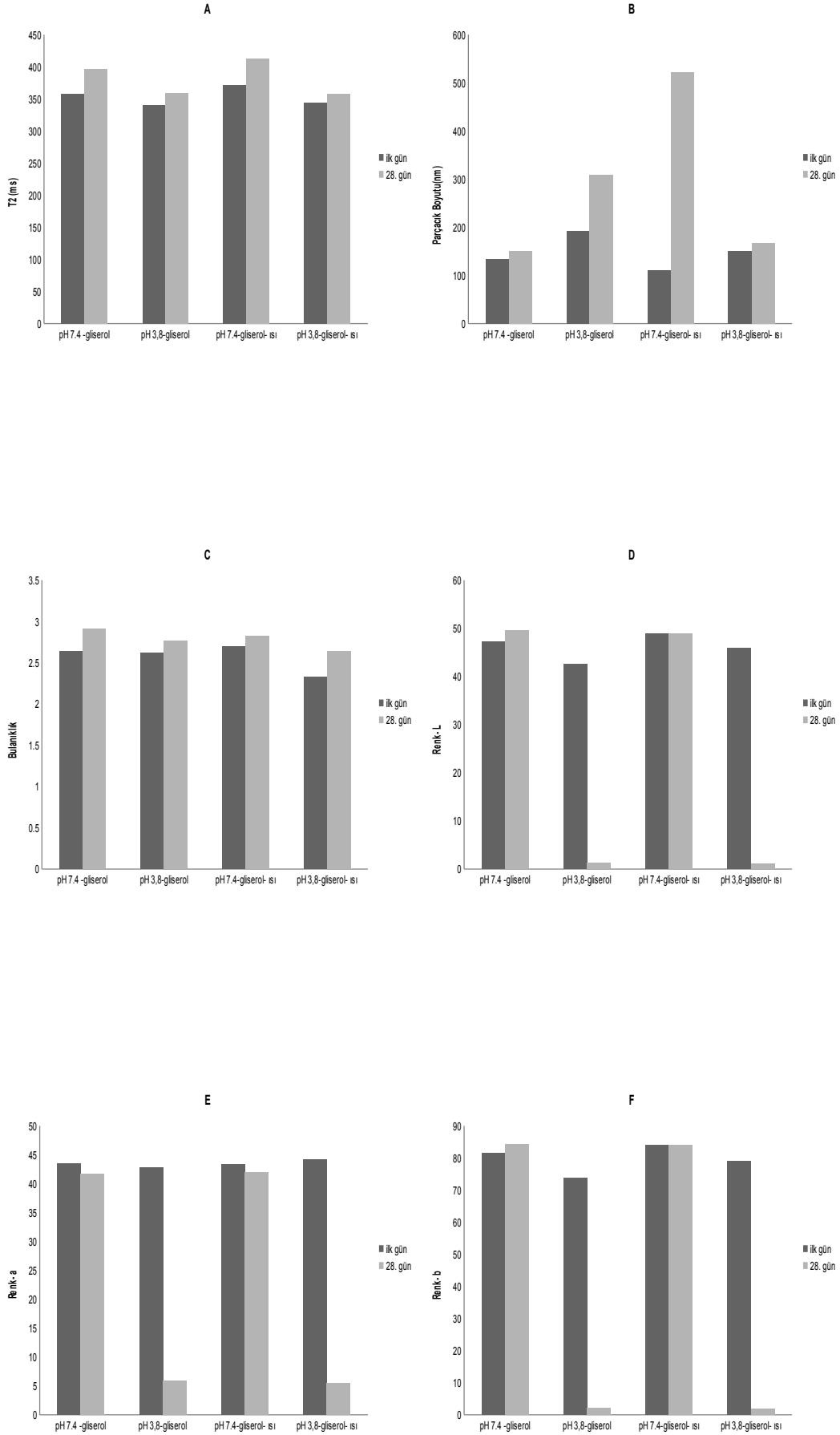
ii. Lesitin



Resim 7. Sürfektan "Lesitin"; a-) ilk gün. pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4,ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün. pH7.4,gliserol-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,ısıtma-pH3.8.gliserol,ısıtma; d-) 28.gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma

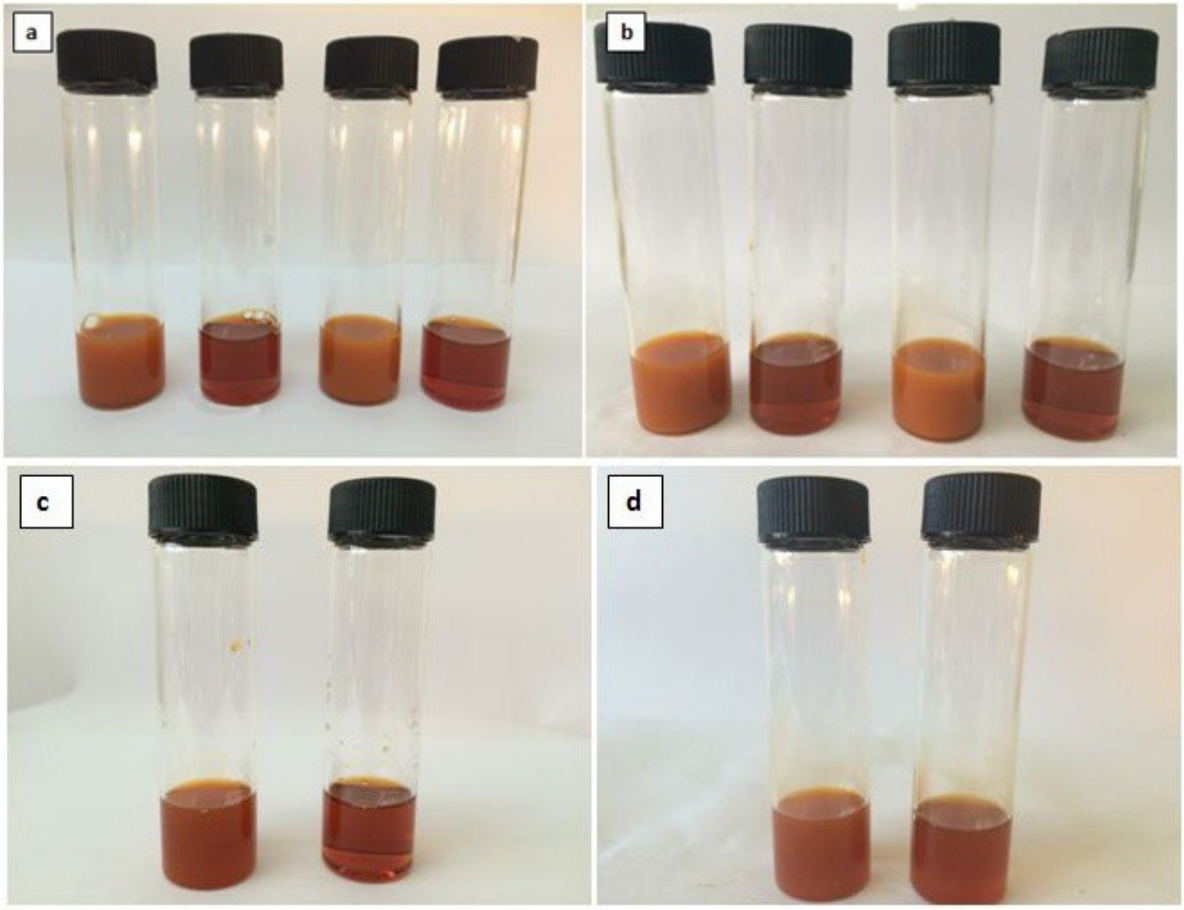
Nanoemülsiyonların stabilite görsel verileri Resim 7' de ve ölçüm verileri Şekil 23' de gösterilmiştir. pH 7.4, pH 7.4-ısıtma, pH 3.8 ve pH 3.8- ısıtma ile hazırlanan nanoemülsiyonlar 14gün sonunda stabilitesi bozulmuştur. Parçacıklar zamanla birleşerek yüzeyde yağ tabakası oluşturmuştur. En büyük parçacık boyutunda büyüme Şekil 5' te de görüldüğü gibi pH 7.4 gliserol-ısıtma ile hazırlanan nanoemülsiyon olmuştur. T2 ve bulanıklık değerlerinde de 28 gün sonunda artış görülmüştür. Şekil 10 ve 12'dede görüldüğü gibi hazırlanan nanoemülsiyonlar oldukça opak görünümlü turuncuya daha yakın renkte

emülsiyonlardır. 28 gün sonundada bu özelliklerini korudukları gözlenmektedir. Yapıda meydana gelen değişimler opaklığın fazla olmasından dolayı fark edilmemektedir. Renk sonuçları incelendiğinde pH nın düşük olduğu nanoemülsiyonlarda 28 günün sonunda parlaklığın, kırmızılığın ve sarılığın dramadik şekilde düştüğü görülmüştür.


A
T2 (ms)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pH 7.4 -gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-gliserol- ısı
pH 3,8-gliserol- ısı
ilk gün
28. gün
B
Parçacık Boyutu(nm)
600
500
400
300
200
100
0
pH 7.4 -gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-gliserol- ısı
pH 3,8-gliserol- ısı
ilk gün
28. gün
C
Bulanıklık
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
pH 7.4 -gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-gliserol- ısı
pH 3,8-gliserol- ısı
ilk gün
28. gün
D
Renk- L
60
50
40
30
20
10
0
pH 7.4 -gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-gliserol- ısı
pH 3,8-gliserol- ısı
ilk gün
28. gün
E
Renk- a
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
pH 7.4 -gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-gliserol- ısı
pH 3,8-gliserol- ısı
ilk gün
28. gün
F
Renk- b
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
pH 7.4 -gliserol
pH 3,8-gliserol
pH 7.4-gliserol- ısı
pH 3,8-gliserol- ısı
ilk gün
28. gün

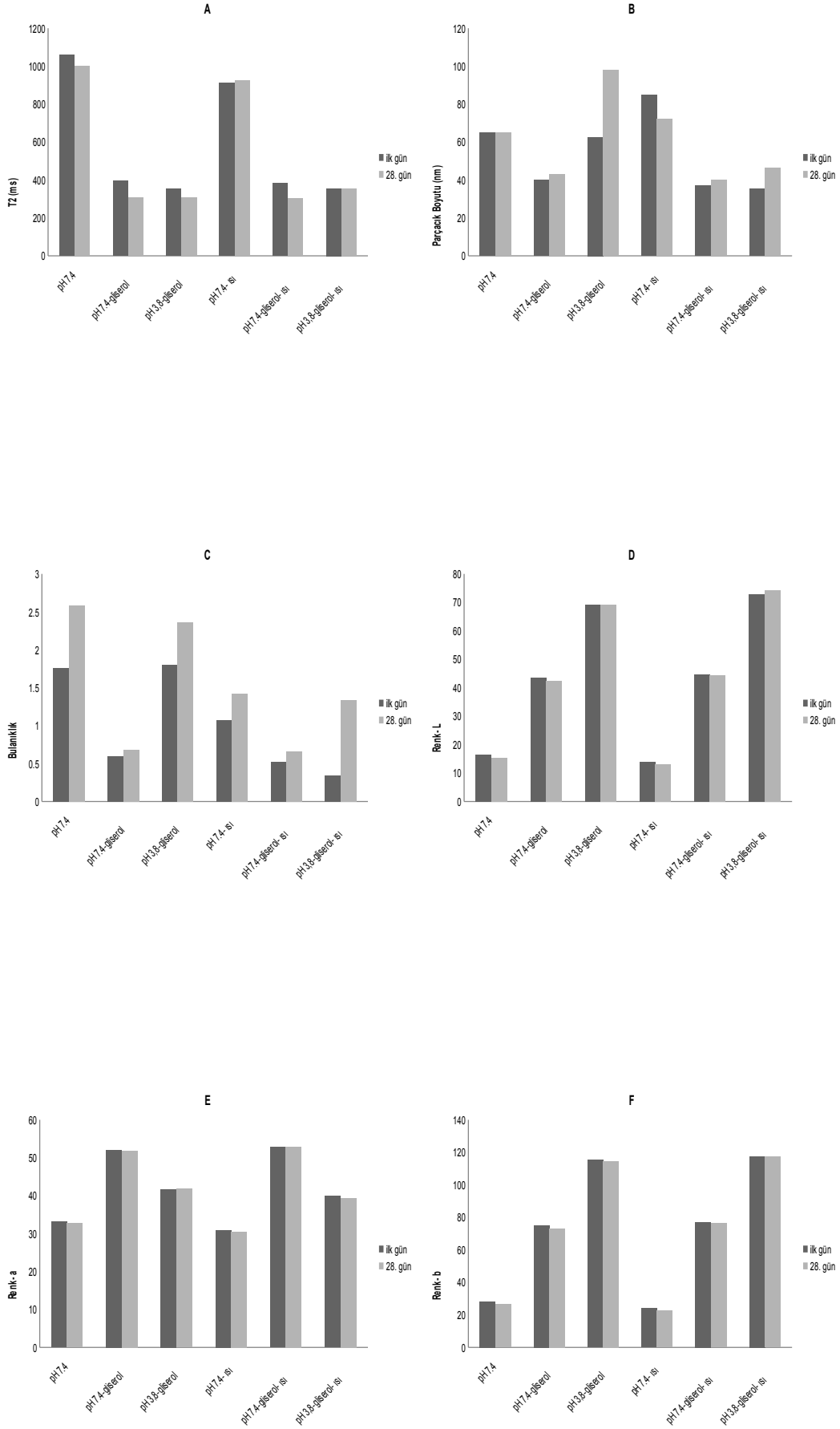
Şekil 23. Ultrasonikasyon-Sürfektan "Lesitin" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F)Renk sonuçlarını ilk ve 28.gün sonu

iii. Sükroz monopalmitat



Resim 8. Sürfektan "Sükroz monopalmitat"; a-) ilk gün. pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4,ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; b-) 28.gün. pH7.4-pH7.4,gliserol-pH7.4, ısıtma-pH7.4,gliserol,ısıtma; c-) ilk gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma; d-) 28.gün. pH3.8,gliserol-pH3.8,gliserol,ısıtma

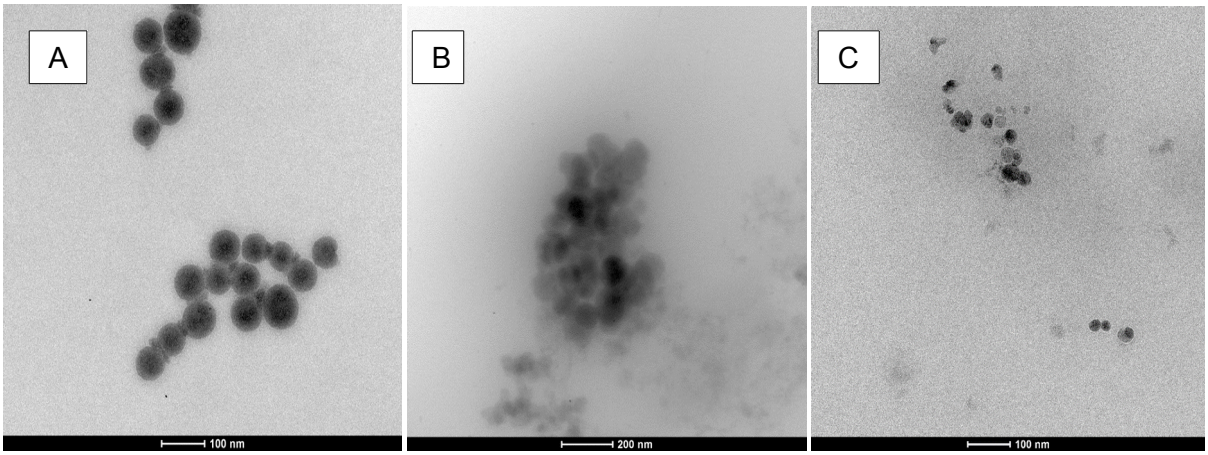
Sükroz monopalmitatın düşük pHlarda stabiliteyi sağlamadaki yetersizliği daha önceki kısımlarda belirtilmiştir. Bu nedenle hazırlandıktan 1 saat sonra bozulan emülsiyonlara (pH 3.8 ve pH3.-ısıtma) stabilite testi yapılmamıştır. Ancak diğer nanoemülsiyonlara bakıldığında 28 gün boyunca oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Nanoemülsiyonların stabilite görsel verileri Resim 8' de ve ölçüm verileri Şekil 24' de gösterilmiştir. Parçacık boyutlarında en fazla 35 nmlik artış görülürken (pH 3.8-gliserol) bazı nanoemülsiyonlarda neredeyse hiç parçacık boyutu büyümesi görülmemiştir. Benzer şekilde T2 değerlerinde de çok az bir azalma görülmüştür. Bulanıklık değerlerinde pH değeri düşük olan emülsiyonların zamanla daha fazla arttığı gözlenmiştir. Renk değerlerinde ise 28 gün sonunda neredeyse hiç değişim gözlenmemiştir.


A
T2 (ms)
1200
1000
800
600
400
200
0
pH7.4
pH7.4-gliserol
pH3.8-gliserol
pH7.4- ısı
pH7.4-gliserol- ısı
pH3.8-gliserol- ısı
ilk gün
28. gün
B
Parçacık Boyutu (nm)
120
100
80
60
40
20
0
C
Bulanıklık
3
2.5
2
1.5
1
0.5
D
Renk- L
80
70
60
50
40
30
20
10
E
Renk- a
F
Renk- b
140

Şekil 24. Ultrasonikasyon-Sürfektan "Sükroz monopalmitat" için A)T2, B)Parçacık boyutu, C)Bulanıklık, D,E,F) Renk sonuçlarını ilk ve 28.gün sonunda

3.9 Transmisyon Elektron Mikroskobu ve Atomik Kuvvet Mikroskobu Deneyleri

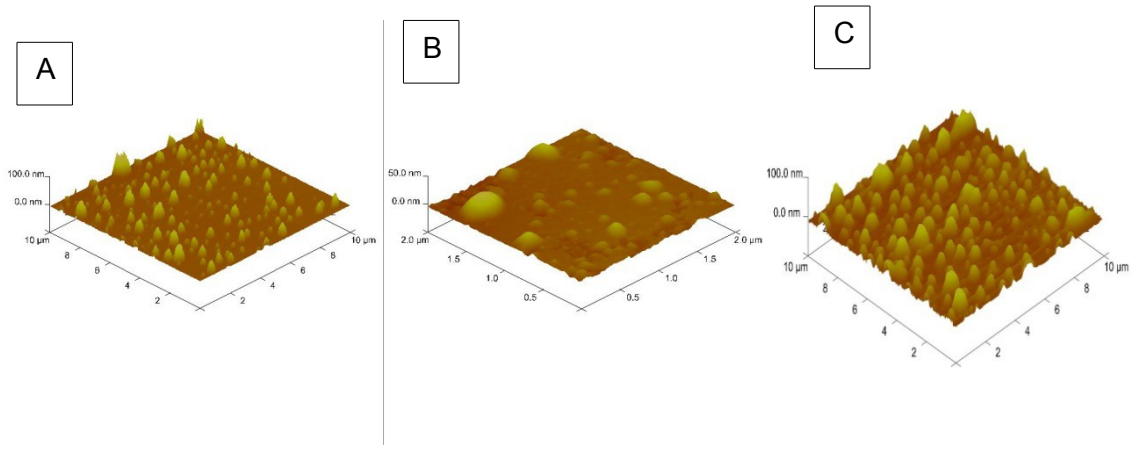
TEM ve AKM görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre küresel morfolojiye sahip nano boyutta yağ damlacıkları oluşturulduğu doğrulanmıştır. Sürfektan çeşidine bağlı olarak emülsiyon içerisindeki yağ damlacıkları farklı dağılım göstermiştir. TEM ölçümleri sonucu sürfektan Tween 80 ile hazırlanan numunede parçacık boyutu 50 nm den civarında, sürfektan lesitin ile hazırlanan numunede parçacık boyutu 200 nm civarında ve sürfektan sükroz monopalmitat kullanılarak hazırlanan numunede parçacık boyutu yine 100 nm den çok daha düşük olarak bulunmuştur (Resim 9.). Bu da dinamik ışık saçılımı ile alınan sonuçlarla örtüşmektedir. Lesitinin film oluşturma özelliği burada da gözlenmiştir. Ayrıca lesitinli numunelerin daha sık bir düzende sıralandıkları gözlenmiştir.



Resim 9. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A)Tween 80. B)Lesitin. C)Sükroz monopalmitat TEM sonucu

AKM ölçümleri sonucu sürfektan Tween 80 ile hazırlanan numunenin parçacık boyutu 118 ile 189 nm arasında, sürfektan lesitin ile hazırlanan numunenin parçacık boyutu değişkenlik göstermekle birlikte 96 nm ile 1.07 µm arasında, sürfektan sükroz mono palmitat ile hazırlanan numunenin parçacık boyutu 20 nm ile 1 µm arasında değişen boyutlarda bulunmuştur (Resim 10.). Dinamik ışık saçılımı metoduna göre ölçülen parçacık boyutları sırasıyla (D[3,2]) 70 nm, 257.5 nm, 40.5 nm bulunmuştur. Bu ölçümler arasındaki farkların AKM ölçümü sırasında kullanılan tip yüzeyle kontak haldeyken yapışıp parçacıkların dağılmasına hatta birleşmesine sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yüzeyde kurutma

sırasında emülsiyonun homojenliği kaybolmuş ve bu sonuç elde edilmiş olabilir. Bunun yanında ışık saçılımı daha geniş bir alanı tarayıp ortalama bir sonuç verdiği için AKM ölçümünden daha doğru bir tespitte bulunulmaktadır. Salvia-Trujillo vd. (2013) yaptığı çalışmada da AKM sonuçlarının dinamik ışık saçımılı sonuçlarından daha yüksek çıktığını belirtmiştir. Bunun aksine Surassmo vd. (2010) yaptığı çalışmada benzer sonuçlar elde etmiştir.



Resim 10. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Tween 80. B)Lesitin. C)Sükroz monopalmitat AKM sonuçlarını göstermektedir.

3.10 Viskozite Sonuçları

Gliserol içeren nanoemülsiyon kompozisyonların viskozitesinin nasıl değiştiğini göstermek amacıyla belirli numuneler için projede belirtilen reolojik ölçümler yerine viskozite ölçümü yapılmıştır. Dağılan fazın hacimsel yüzdesi, birleşik haldeki fazların reolojisi, parçacık boyutu, kolloidal etkileşimler, parçacık yükü gibi birçok etkenin emülsiyon viskozitesini etkilemekte olduğu bildirilmiştir (Pal, 2011; Tadros vd., 2004). Yapılan bir çalışmada vizkozitenin, sürekli fazın nanoemülsiyon karakterinde ve proses sırasındaki davranışlarında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Meleson vd., 2004; Rodríguez-Abreu ve Lazzari, 2008). Yürütülen çalışmada da bu durum gözlenmiştir. Örnek olarak sadece sükroz monopalmitat ve mikroakışkanlaştırma tekniği ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda pH7.4 için hem gliserollühemdegliserolsüz viskozite ölçümleri alınarak gliserolün viskozite üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buna göre gliserolsüz emülsiyonların viskozitesi 1.62 ± 0.009 cP iken gliserol eklenen emülsiyonların viskozitesi 5.71 ± 0.128 cP ve 6.01 ± 0.051 cP olarak ölçülmüştür. Gliserolün diğer formülasyonlar üzerindeki etkileri Tablo 4. de gösterilmiştir.

Tween 80 kullanılan numunelerde pH' nın değişimi viskoziteyi istatistiksel olarak etkilemezken ısıtma işlemi uygulanan lesitinlinumulerde viskozite pH 7.4' te artmış ve pH 3.8' de azalmıştır. Benzer şekilde sükroz monopalmitat kullanılan numulerde ısıtma uygulanan nanoemülsiyonların viskozitesinde ısı uygulanmayanlara göre arttığı gözlenmiştir. Genel olarak viskozitelerde gözlenen değişimin nedeninisu miktarının azalması ve daha viskoz gliserol kullanılmasıyla su molekülleri arasında çekme kuvvetlerinin artması sürfektan reorganizasyonu ve yardımcı çözücü görevi gören ajanın arayüzdeki etkileşimleri ile açıklamak mümkündür (Dima vd., 2013).

Tablo 4. Mikroakışkanlaştırma- Sürfektan "Tween 80", "Lesitin", "Sükroz monopalmitat (SMP)" viskozite sonuçları.

Numuneler	Sürfektan tipi	Viskozite (cP)
pH 7.4 - gliserol	TWEEN 80	6.45 ± 0.107 b
pH 3.8 - gliserol	TWEEN 80	6.44 ± 0.053 b
pH 7.4 - gliserol	LESİTİN	6.54 ± 0.061 b
pH 3.8 - gliserol	LESİTİN	6.44 ± 0.043 b
pH 7.4 - gliserol- ısı	LESİTİN	7.08 ± 0.044 a
pH 3.8 - gliserol- ısı	LESİTİN	5.75 ± 0.035 cd
pH 7.4 - gliserol	SMP	5.71 ± 0.128 d
pH 3.8 - gliserol	SMP	5.69 ± 0.021 d
pH 7.4 - gliserol- ısı	SMP	6.01 ± 0.051 c
pH 3.8 - gliserol- ısı	SMP	6.49 ± 0.006 b

Grup bilgisi önem derecesine göre a en büyük ve d en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$). Ortalama değerler '±' standart hata ile bildirilmektedir.

3.11 Zeta Potansiyel Sonuçları

Emülsiyon damlacıklarının elektriksel karakterini temsil eden zeta potansiyeli, yüzey yükü, dayanıklılık, arayüzeydeki etkileşimleri belirlemede kullanılmaktadır (McClements vd., 2007). Zeta potansiyelin -30 ile 30 mV değerlerine yakın olması emülsiyonun stabilitesini yüksek olduğunu bir göstergesi olduğu literatürde belirtilmektedir (Hoeller vd., 2009). Negatif zeta potansiyeli parçacıklar arasında enerji bariyeri oluşturarak iyi bir stabilite sağlar (Mora-Huertas vd., 2010). Tablo 5. de nanoemülsiyonların zeta potansiyeli sonuçları gösterilmiştir.

Sürfektan sükroz monopalmitat ve mikroakışkanlaştırma sistemi kullanıldığında nanoemülsiyonların negatif yükle yüklendiği görülmüştür. Ultrasonikasyon işleminde ise sürfektan Tween 80 kullanıldığında zeta potansiyelinin sıfıra yaklaştığı görülmektedir. Zeta potansiyelinin sıfır olması parçacıkların elektrik alan altında hareketsiz kalması, minimum stabilite, maksimum koagülasyon/flokülasyon hızını temsil ettiği belirtilmiştir (Hunter,1981). Zeta potansiyeli sonuçları stabilite kısmında elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Buna ek olarak parçacık boyutu ve zeta potansiyel sonuçları arasında da istatistiksel olarak anlamlıbirkorelasyonbulunamamıştır. (Pearson Korelasyon Katsayısı: $r=0.360$, $p>0.05$). Bu beklenen bir sonuç olmuştur. Çünkü zeta potansiyeli yüzey büyüklüğü değil yüzeyin yüküyle ilişkili fizikokimyasal özelliktir.

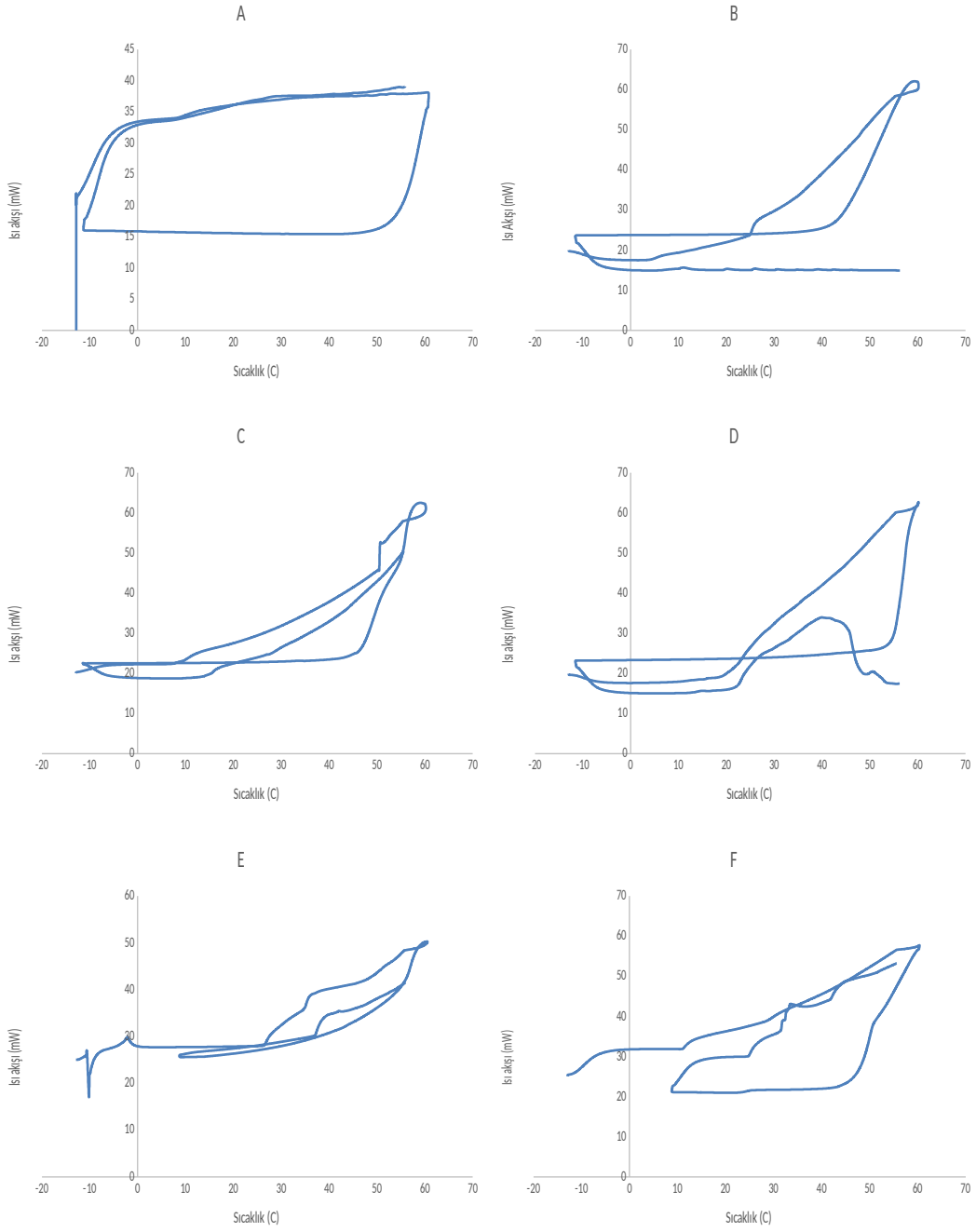
Tablo 5. Belirli emülsiyonlar için ölçülen zeta potansiyeli sonuçları: TWE, Tween 80; SMP, sükroz monopalmitat; ULT, ultrasonikasyon; MFL, mikroakışkanlaştırmayı temsil etmektedir.

Numuneler			Zeta potansiyeli (mV)
pH 7.4	**TWE**	**ULT**	0.203
pH 3.8	**TWE**	**ULT**	-0.835
pH 7.4-gliserol	**TWE**	**ULT**	0.102
pH 3.8-gliserol	**TWE**	**ULT**	0.0524
pH 7.4	**SMP**	**MFL**	-11.2
pH 7.4-gliserol	**SMP**	**MFL**	-12.5
pH 3.8-gliserol	**SMP**	**MFL**	-0.321

3.12 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK)

Nanoemülsiyonların depolama süresince sıcaklığın etkisi ile faz değişiminin incelenmesi için DTK analizi yapılmıştır. Nanoemülsiyonlar -10^{0}C ye soğutulup daha sonra 60^{0}C ye ısıtılmıştır. DTK analizi, emülsiyonların donma/ çözünme stabilitesi hakkında bilgi vermektedir. Donma/ çözünme stabilitesi yağ molekülünün zincir uzunluğuna, doymuş/doymamış yağ oranına, parçacık büyüklüğüne, yağ kristallerinin miktarına ve şekline (polimorfizm), yağ ve su arasındaki ilişkiye bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Literatürde sürfektanların donma/ çözünme stabilitesine katkısı olduğu belirtilmiştir (Ariyaprakai ve Tananuwong, 2015).

Projede yer alan (Tween 80, lesitin, sükroz monopalmitat) nanoemülsiyonların sıcaklık etkisiyle faz değişimleri incelendiğinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 25).



Şekil 25. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) pH7.4-Tween 80, B)pH3.8-Tween 80, C)pH7.4-Lesitin, D)pH3.8-Lesitin, E)pH7.4-Sükroz monopalmitat, F)pH3.8-Sükroz monopalmitat numuneleri için diferansiyel taramalı kalorimetrisonuçları

3.13 Biyopolimer eklenmiş nanoemülsiyonların tasarlanması ve karakterizasyonu

Aljinat, kitozan, pektin, arabik gam gibi polisakkaritler ve kazein, jelatin, peynir altı suyu gibi proteinler biyopolimer olarak adlandırılmakta ve gıda formülasyonlarında yapıyı geliştirici ajan olarak kullanılmaktadır (Weiss vd., 2011). Biyopolimerler ya doğrudan yağ damlacığın yüzeyine adsorbe olarak yada sürfektanla birlikte yağ-su arayüzeyinde çok katmanlı tabaka oluşturarak emülsiyonların stabilitesini arttırdığı belirtilmiştir (Piorkowski ve McClements, 2013). Bu kısımda biyopolimerlerin emülsiyon stabilitesini arttırmadaki etkileri incelenmiştir.

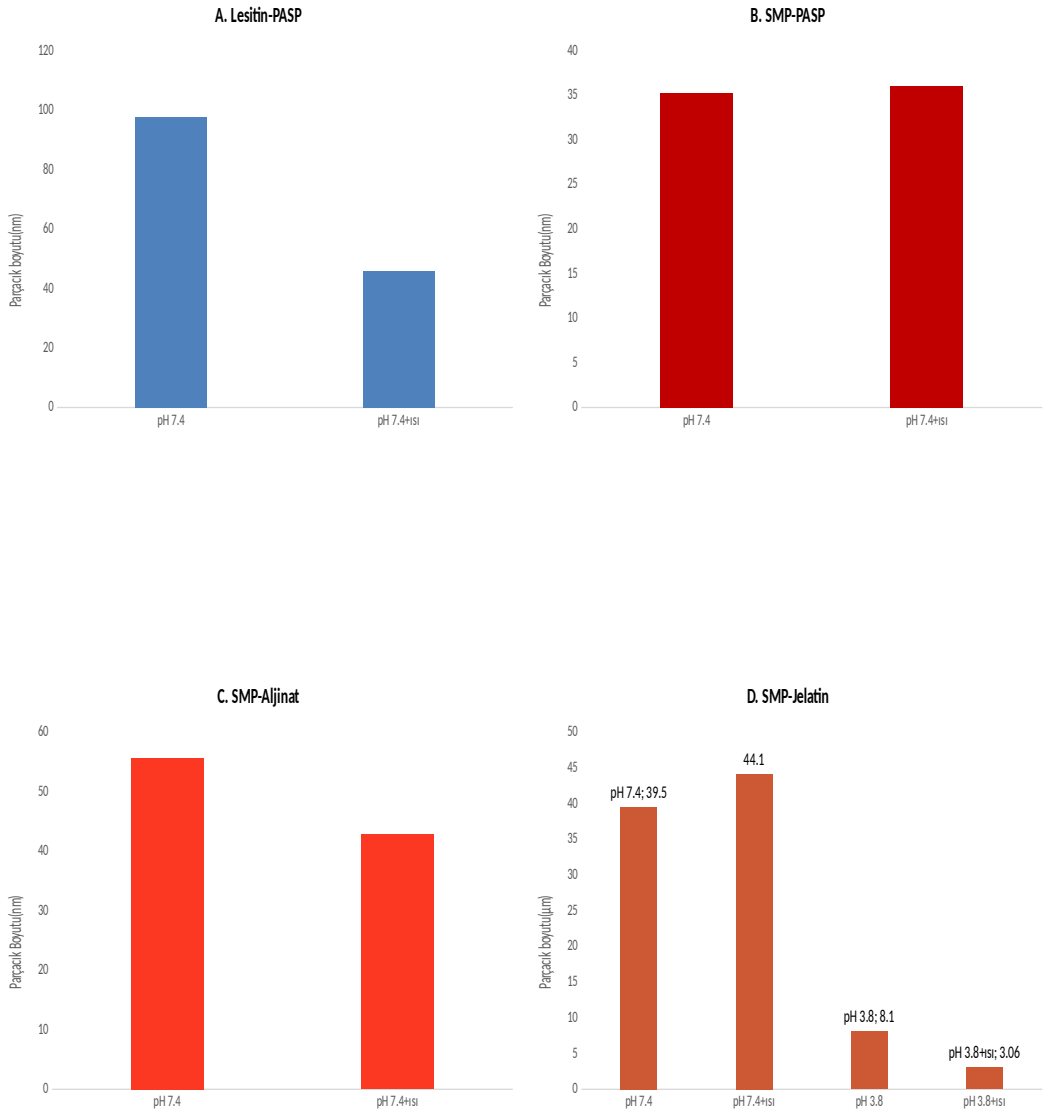
3.13.1 Parçacık boyutu

Sürfektan olarak lesitinin kullanıldığı aljinat ve jelatin içeren emülsiyonlar hazırlandıktan sonra 1 saat içinde faz ayrımına uğradıkları için değerlendirmeye alınmamıştır. Aynı şekilde pH 3.8değerine sahip biyopolimer olarak peynir altı suyu proteini ve aljinat, sürfektan olarak ise lesitin ve sükroz monopalmitat (SMP) içeren emülsiyonların da hazırlandıktan kısa bir süre sonra faz ayrımına uğradığı gözlenmiştir. Bu yüzden bu emülsiyonlar için fiziksel analizler yapılmamıştır. β-lactolglobulin ve α-lactglobulin gibi temel peynir altı suyu proteinlerinin izoelektrik noktalarının 4.5-5.35 arasında olduğu rapor edilmiştir (Lecoeur vd., 2010). pH 3.8, peynir altı suyu proteinlerinin izoelektrik noktasına yakın olduğundan dolayı muhtemelen bu pH değerinde proteinler tüm yük değerini kaybetmiş ve emülsiyonlarda çökelme gözlenmiştir.

Biyopolimer olarak peynir altı suyu proteini (PASP) kullanılarak hazırlanan pH7.4 değerine sahip emülsiyonların parçacık boyutunun nano boyutlarda olduğu tespit edilmiştir. Sürfektan olarak SMP'nin kullanıldığı PASP içeren emülsiyonların sürfektan olarak lesitin içeren emülsiyonlara göre daha küçük parçacık boyutuna sahip gözlenmiştir (35 nm). Homojenizasyon öncesi ısıtmanın etkisiyle lesitin ve PASP içeren emülsiyonların parçacık boyutunun 97 nm'den 45 nm' ye düştüğü görülmüştür (Şekil 26)

Aljinat ve SMP içeren pH 7.4' deki emülsiyonların da parçacık boyutu 55 nm iken ısıtma etkisiyle 43 nm' ye düşmüştür. Biyopolimer olarak jelatin içeren pH7.4 ve pH 3.8' deki emülsiyonlarda faz ayrımı görülmemiştir ancak parçacık boyutları nano boyuta ulaşamadan

mikro boyutta kalmıştır. Stabil bir yapıya sahip olmamalarından ötürü hazırlandıktan sonra 1 gün içinde bozuldukları gözlenmiştir.



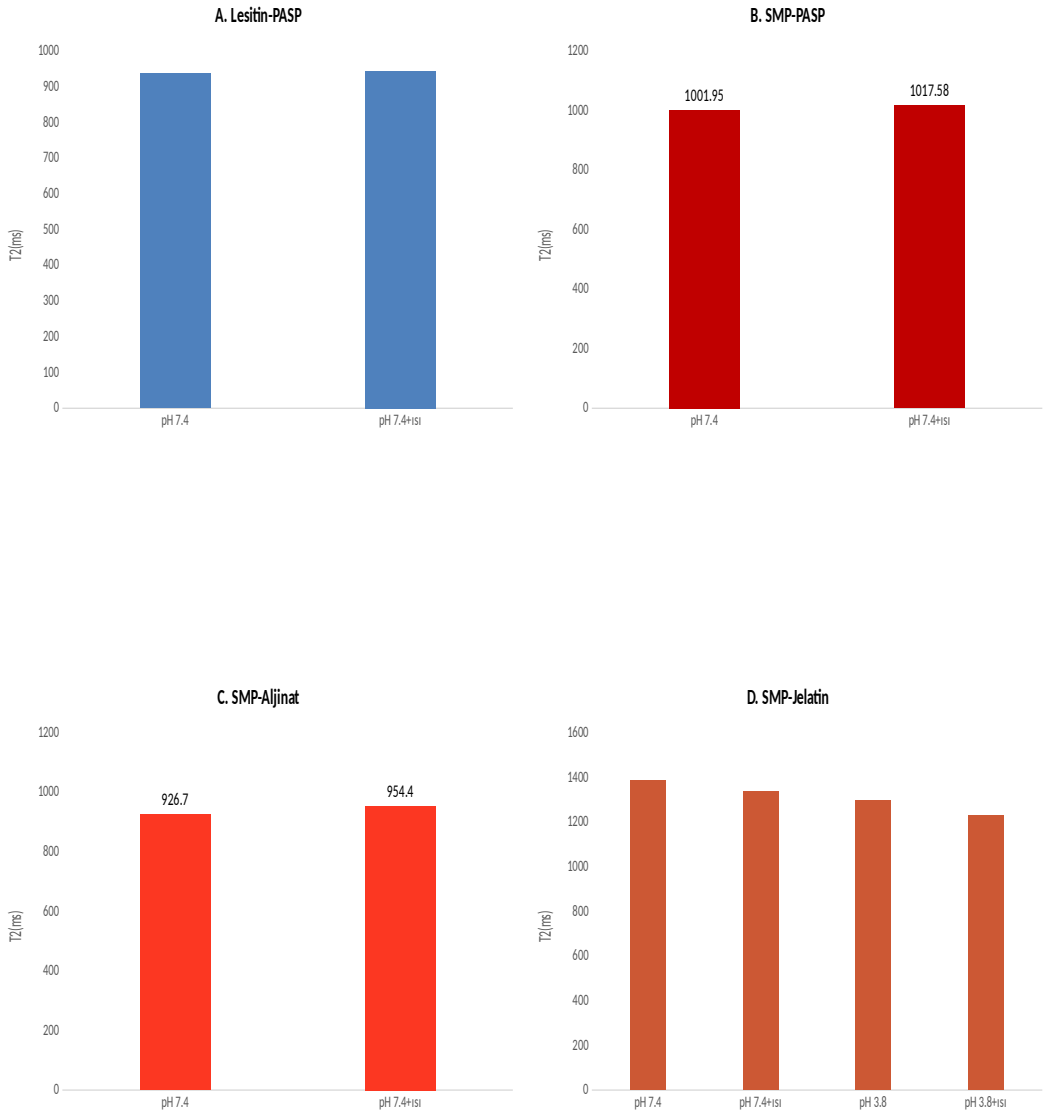
Şekil 26. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat ,D)SMP-jelatin numuneleri için parçacık boyutu sonuçları: PASP,peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir.Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.13.2 NMR Relaksometre Deneyleri

Nanoemülisyonların NMR relaksometre ölçüm verileri Şekil 27' de gösterilmiştir. Lesitin ve PASP içeren pH 7.4' deki emülsiyonların T2 değerlerinin SMP ve PASP içeren örneklere göre daha düşük olduğu bulunmuştur. SMP ile hazırlanan örneklerin daha düşük parçacık

boyutuna sahip olduğu için daha fazla serbest su içerdiği düşünülmektedir. Bu da T2 değerinde artışasbebp olmuştur. pH3.8 değerine sahip jelatin içeren emülsiyon hariç diğer emülsiyonlarda ısıtmanın relaksayon üzerinde kayda değer bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Jelatin içeren ve SMP ile hazırlanan emülsiyonların parçacık boyutu oldukça yüksek olmasına rağmen en yüksek T2 değeri de bu örnekler için bulunmuştur. Parçacık boyutundan başka bazı yapısal değişimlerin ve jelatin ile olan kimyasal etkileşimlerin burada etkili olabilleceği düşünülmektedir.



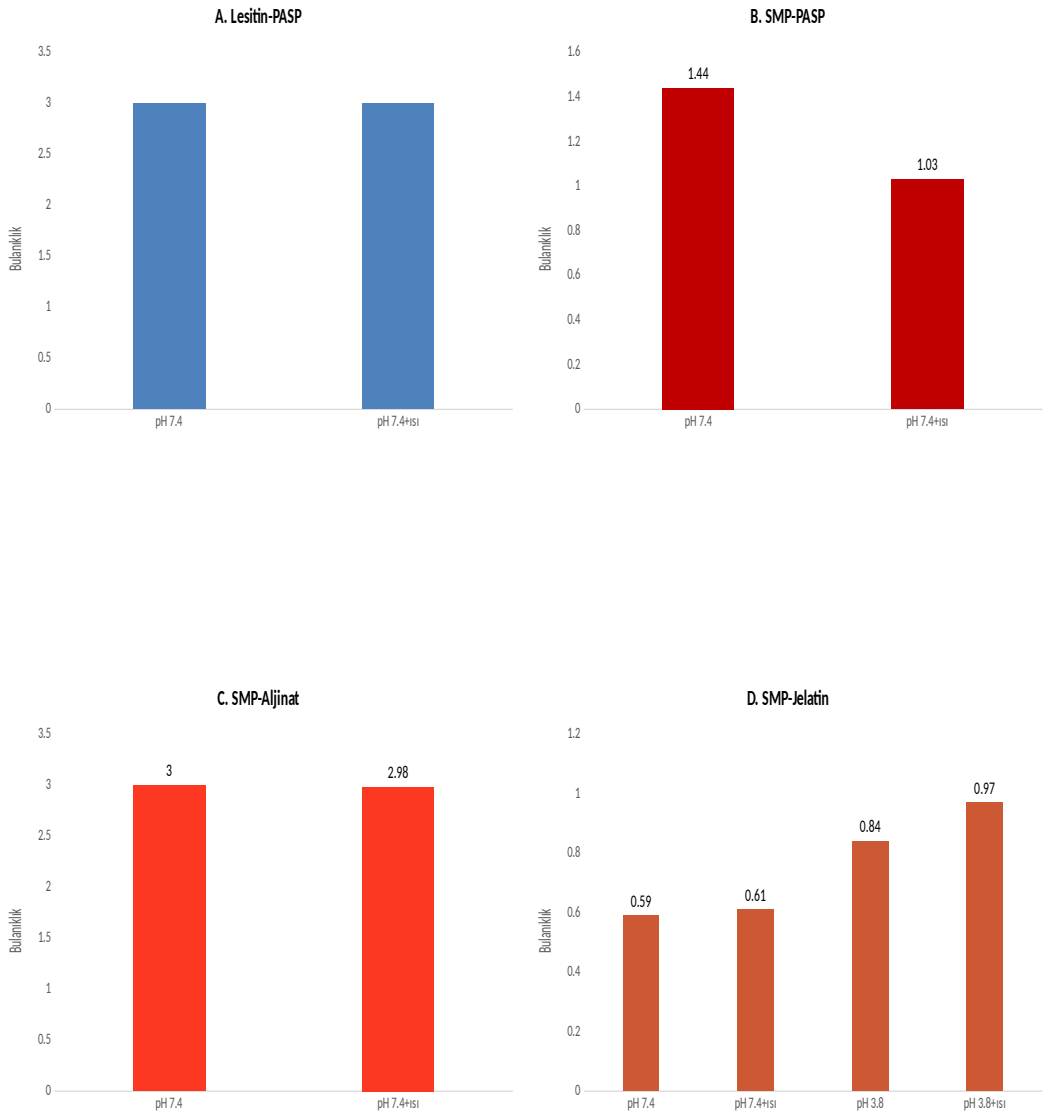
Şekil 27. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat ,D)SMP-jelatin numuneleri için T2 sonuçları: PASP,peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil

etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve C en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.13.3 Bulanıklık

Nanoemülisyonların bulanıklık ölçüm verileri Şekil 28' de gösterilmiştir. Bulanıklık değeri en yüksek lesitin-PASP ve SMP-aljinat ile pH 7.4' de hazırlanan emülsiyonlarda görülürken SMP-PASP içeren emülsiyonlarda parçacık boyutuna da bağlı olarak bulanıklık değerleri azalmış daha berrak emülsiyonlar elde edilmiştir. Sıcaklık etkisi diğer emülsiyonların bulanıklık değerlerini etkilemezken SMP-PASP içeren pH 7.4' deki emülsiyonlarda homojenizasyon öncesi ısıtma bulanıklığı kayda değer bir şekilde düşürmüştür.

En berrak emülsiyonlar büyük parçacık boyutuna rağmen jelatin–SMP içeren pH 7.4' deki emülsiyonlardır. Jelatinin bilinen en önemli protein kökenli berraklaştırıcı ajanlardan biri olduğu rapor edilmiştir (Erkan-koç, Türkyılmaz, ve Yemis, 2015). Bu berraklaştırma etkisinden dolayı jelatin içeren emülsyonların bulanıklıklarının düşük değerde olduğu düşünülmektedir.

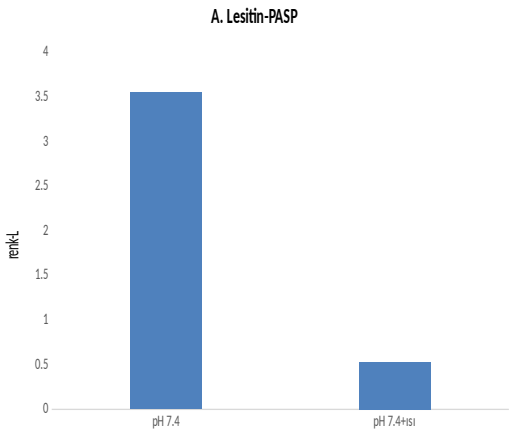


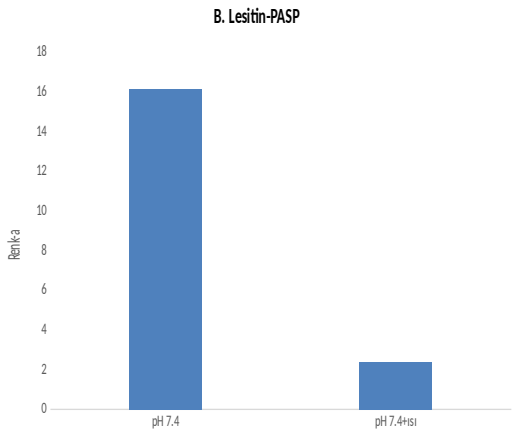
Şekil 28. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat ,D)SMP-jelatin numuneleri için bulanıklıksonuçları: PASP,peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve C en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

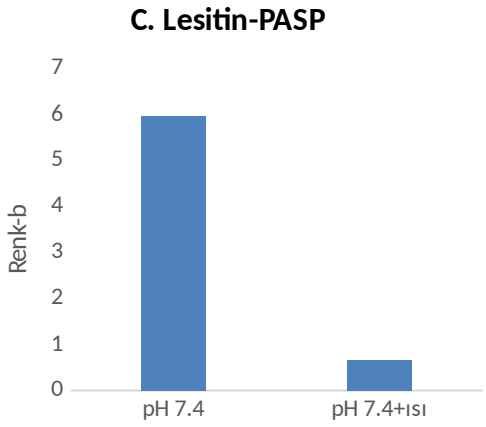
3.13.4 Renk Ölçümleri

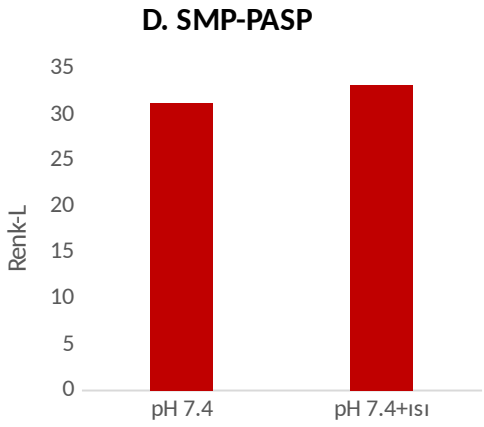
En yüksek parlaklık, kırmızılık ve sarılık değerleri jelatin-SMP ile hazırlanan emülsiyonlar olup burada yine jelatinin berrakllaştırma etkisinden dolayı bu sonuçlara ulaşıldığı düşünülmektedir. Şekil 29' da da görüldüğü gibi Lesitin-PASP ile pH 7.4' de hazırlanan emülsiyonlar en düşük L,a,b değerlerine sahip olup oldukça opak bir görünüme sahiptir. Isıtma etkisiyle bu emülsiyonlarda renk değerleri önemli ölçüde azalmıştır. SMP-PASP ile pH

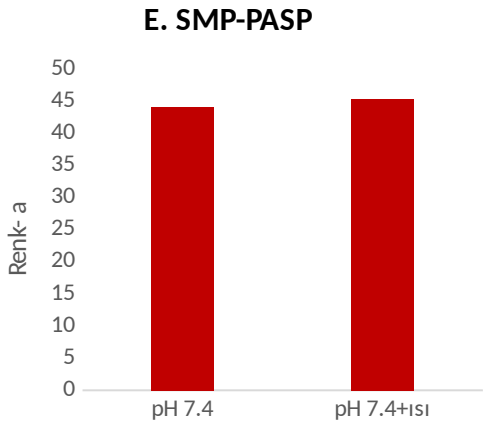
7.4’ de hazırlanan emülsiyonlar da oldukça transparan ve kırmızı bir görünüme sahip olup L, a,b değerleri sırasıyla 31.2, 44.1 ve 53.8 bulunmuştur. Isıtma etkisiyle birlikte bu değerler kayda değer bir şekilde yükselmiştir. Bu görünümlerinde düşük olan parçacık boyutlarının da etkisi olduğu düşünülmektedir.

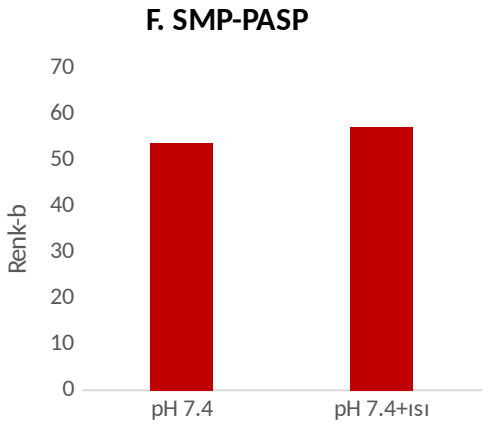

A. Lesitin-PASP
renk-L
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
pH 7.4
pH 7.4+ısı

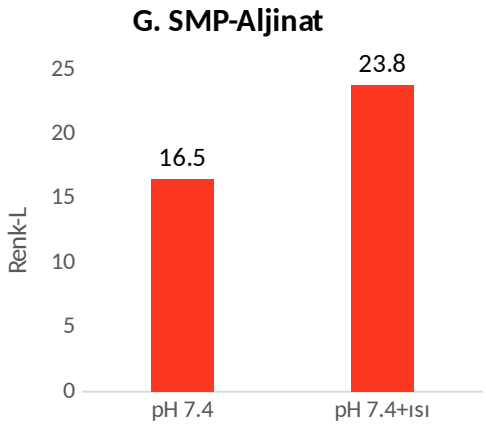

B. Lesitin-PASP
Renk-a
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
pH 7.4
pH 7.4+ısı

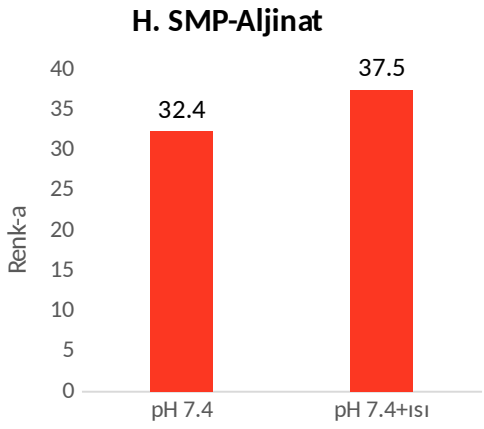

C. Lesitin-PASP
Renk-b
7
6
5
4
3
2
1
0
pH 7.4
pH 7.4+ısı

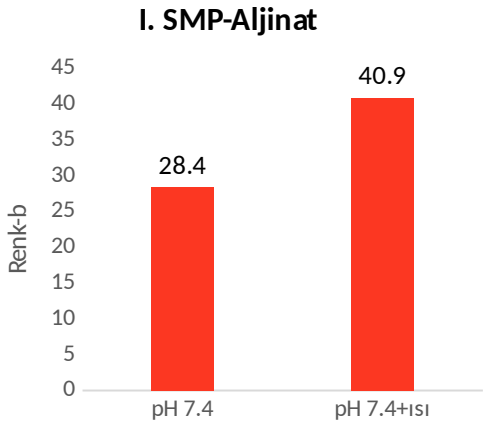

D. SMP-PASP
Renk-L
35
30
25
20
15
10
5
0
pH 7.4
pH 7.4+ısı

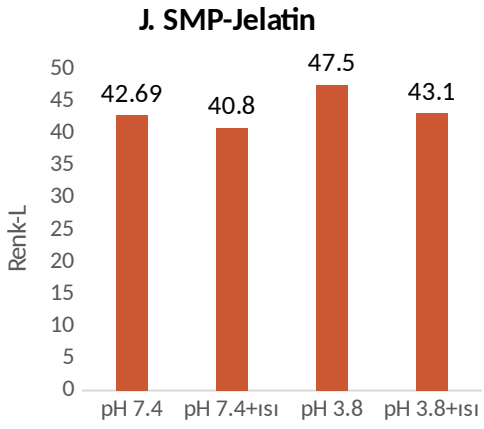

E. SMP-PASP
Renk- a
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
pH 7.4
pH 7.4+ısı

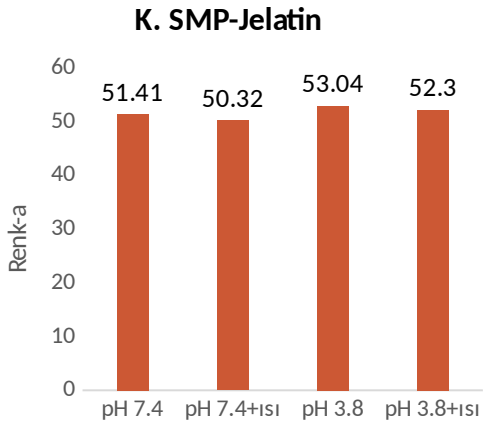

F. SMP-PASP
Renk-b
70
60
50
40
30
20
10
0
pH 7.4
pH 7.4+ısı

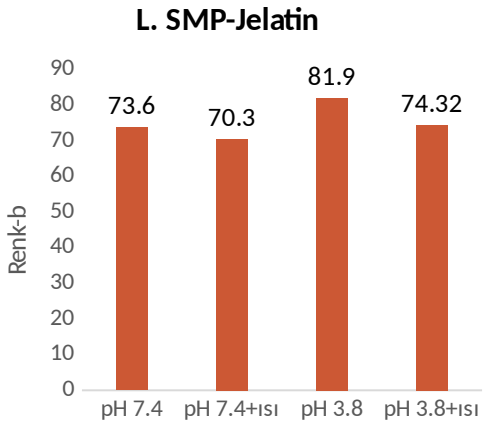

G. SMP-Aljinat
Renk-L
25
20
15
10
5
0
16.5
23.8
pH 7.4
pH 7.4+ısı


H. SMP-Aljinat
Renk-a
40
35
30
25
20
15
10
5
0
32.4
37.5
pH 7.4
pH 7.4+ısı


I. SMP-Aljinat
Renk-b
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
28.4
40.9
pH 7.4
pH 7.4+ısı


J. SMP-Jelatin
Renk-L
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
42.69
40.8
47.5
43.1
pH 7.4
pH 7.4+ısı
pH 3.8
pH 3.8+ısı

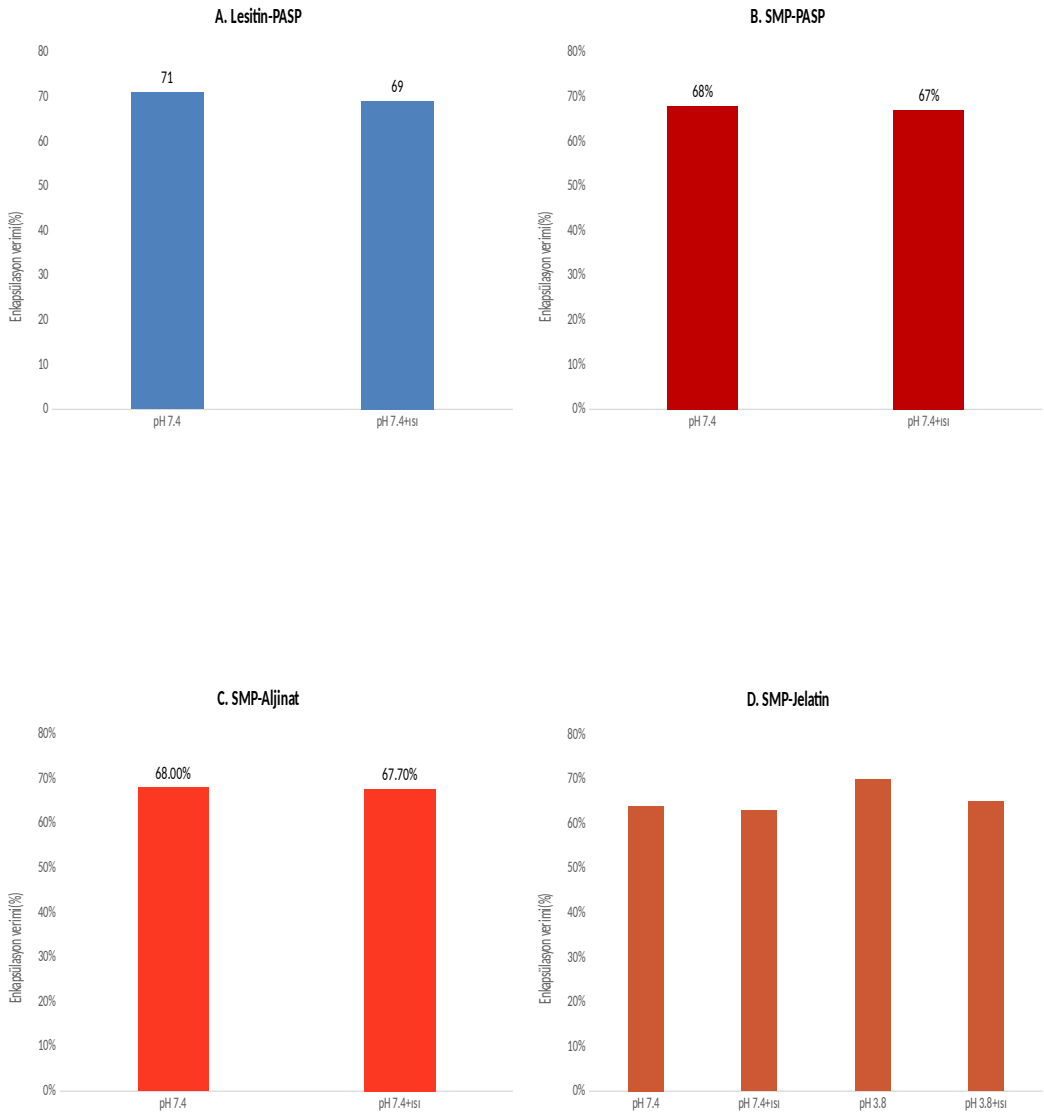

K. SMP-Jelatin
Renk-a
60
50
40
30
20
10
0
51.41
50.32
53.04
52.3
pH 7.4
pH 7.4+ısı
pH 3.8
pH 3.8+ısı


L. SMP-Jelatin
Renk-b
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
73.6
70.3
81.9
74.32
pH 7.4
pH 7.4+ısı
pH 3.8
pH 3.8+ısı

Şekil 29. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A,B,C) Lesitin-PASP D,E,F)SMP-PASP, G,H,I)SMP-aljinat J,K,L)SMP-jelatin numuneleri için renk sonuçları: PASP,peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve D en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.13.5 Enkapsülasyon verimi

Enkapsülasyon verimi hazırlanan tüm emülsiyonlar için yaklaşık %70 çıkmış olup büyük farklılıklar gözlenmemiştir. Jelatinle hazırlanan emülsiyonlarda bu oran biraz daha düşük olup yaklaşık %65' e düşmüştür. Isıtma işleminin ise emülsiyonların enkapsülasyon verimi üzerinde kayda değer bir değişime sebep olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).Nanoemülisyonların enkapsülasyon verimi ölçüm değerleri Şekil 30' da gösterilmiştir.



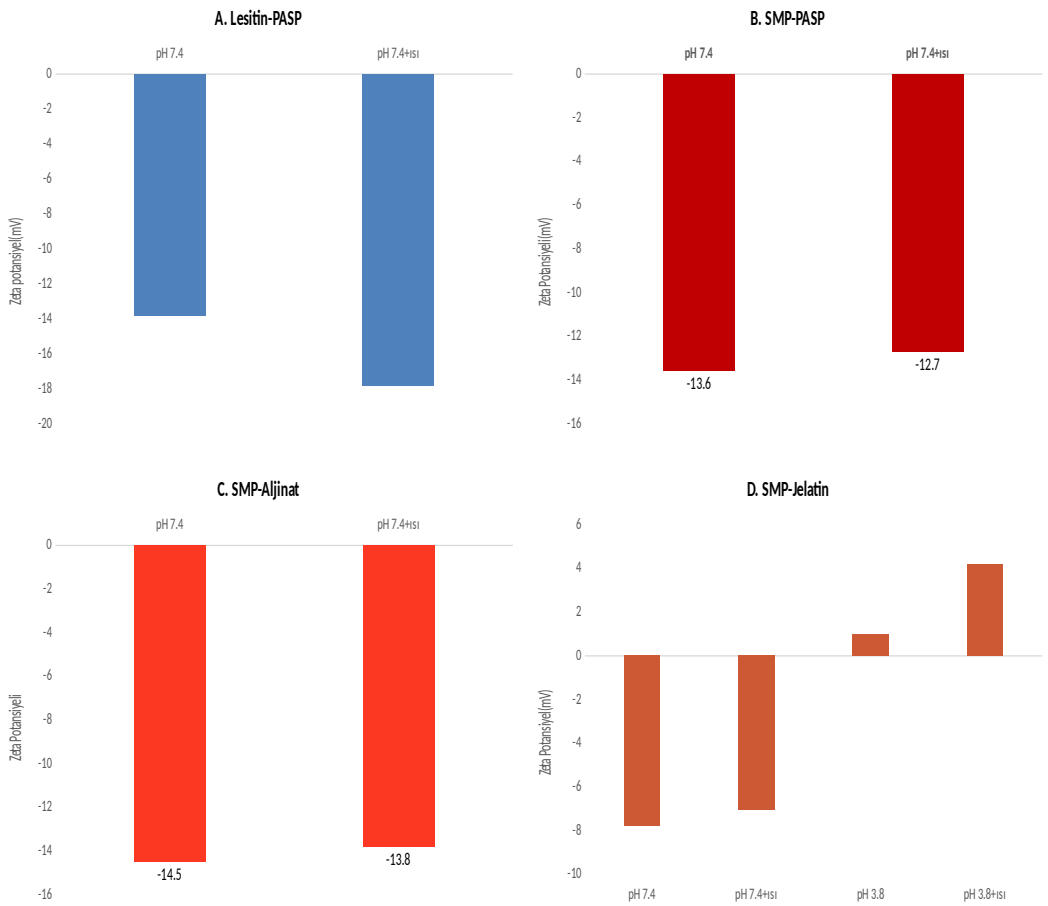
Şekil 30. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat ,D)SMP-jelatin numuneleri için enkapsülasyon verimi sonuçları: PASP,peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve B en küçük ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

3.13.6 Zeta Potansiyel

Nanoemülisyonların zeta potansiyel ölçüm verileri Şekil 31'de gösterilmiştir. Jelatinle pH 3.8'de hazırlanan emülsiyonlar hariç diğer emülsiyonların zeta potansiyeli negatif olup -12 ve -18 arasında değişmektedir. Negatif zeta potansiyeli parçacıklar arasında enerji bariyeri oluşturarak iyi bir stabilite sağlayacağından (Mora-Huertas vd., 2010) bu emülsiyonların dayanıklılıklarının daha yüksek olduğu söylenebilir. Lesitin-PASP ile pH 7.4' de hazırlanan

emülsiyon -17.8 ile en yüksek değere sahiptir. Bu emülsiyonlarda sıcaklık etkisiyle parçacık boyutunun kayda değer bir şekilde düştüğü daha önce belirtimişti. Zeta potansiyel değeri de parçacık boyutuyla ilşkilendirilebilecek şekilde kayda değer bir artış göstermiştir ($p<0.05$). Diğer emülsiyonlarda ısı etkisinin zeta potansiyel üzerinde fark yaratmadığı görülmüştür.

Jelatin-SMP ile hazırlanan emülsiyonların zeta potansiyel değerlerinin pH 7.4' de negatif pH 3.8'de ise pozitif olduğu gözlenmiştir. Sığır jelatinin izoelektrik noktasının yaklaşık 5 civarında olduğu belirtilmiştir (Martin vd., 2016). Bu yüzden jelatin bu pH değerinin üstünde negatif yüklenirken bu pH değerinin altında pozitif yüke sahip olacaktır. Bu yüzden zeta potansiyeller arasındaki yük farklılığı izoelektik noktası ile açıklanabilir. Ayrıca jelatinle hazırlanan emülsiyonların zeta potansiyel değerlerinin 0'a oldukça yakın olduğu görülmüştür. Bu örneklerin parçacık boyutlarının büyüklüğü de dikkate alınırsa bunun beklenen bir sonuç olduğu çıkarılabilir. Bu yüzden stabilitelerinin de düşük olduğu söylenebilir.



Şekil 31. Mikroakışkanlaştırma tekniği için A) Lesitin-PASP B)SMP-PASP, C)SMP-aljinat ,D)SMP-jelatin numuneleri için zeta potansiyeli sonuçları: PASP,peynir altı suyu proteini; SMP, sükroz monopalmitatı temsil etmektedir. Grup bilgisi önem derecesine göre A en büyük ve B en küçük

ortalama değeri ifade etmekle birlikte farklı harfler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olma durumunu temsil etmektedir ($p<0.05$).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu proje kapsamında gıda koruması için alternatif olarak düşünülen antimikrobiyal özellikli kapsaisin oleoresinin nanoemülsiyon sistemleri ile etkinliği incelenmiştir. Farklı homojenizasyon süreçlerinin (mikroakışkanlaştırma, ultrasonikasyon) ve parametrelerinin (sürfektan tipi, pH, sıcaklık) antimikrobiyal ve antioksidatif aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Her iki teknikte de emülsiyonların nano düzeye düşüşünün sağlandığı görülmüştür. Bunun yanında mikroakışkanlaştırma tekniği, parçacık boyutu, renk, bulanıklık gibi fiziksel özellikleri iyileştirmekle kalmamış, antimikrobiyal aktiviteyi de arttırmıştır. Proje sonunda elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- %2 Kapsaisin yüklü nanoemülsiyonlarla en yüksekmikroakışkanlaştırma tekniği ile *E.coli* üzerinde 3.40 log ve *S. aureus* üzerinde 5.89 log, ultrasonikasyon tekniği ile *E.coli* üzerinde 2.69 log ve *S.aureus* üzerinde 3.01 log düşüş olarak görülmüştür. Mikroakışkanlaştırma işleminin antimikrobiyal aktivite üzerinde olumlu etkileri gözlenmiştir.

- Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre en başarılı nanoemülsiyon parçacık boyutu 215 nm olan *E.coli* için pH 7.4' te mikroakışkanlaştırma ve sürfektan lesitin kullanılılarak hazırlanan sürekli fazda gliserol ve ön homojenizasyonda ısıtma kullanılan nanoemülsiyon olurken *S.aureus* için parçacık boyutu 63.77 nm olan pH 7.4' te mikroakışkanlaştırma ve sürfektan Tween 80 kullanılılarak hazırlanan sürekli fazda gliserol içeren nanoemülsiyon olmuştur. Ultrasonikasyon tekniği ile en başarılı nanoemülsiyon parçacık boyutu 39.90 nm olan pH 7.4' te sürfektan sükroz monopalmitat kullanılılarak hazırlanan sürekli fazda gliserol kullanılan nanoemülsiyon olurken *S.aureus* için parçacık boyutu 60.57 nm olan pH 3.8' te sürfektan Tween 80 kullanılarak hazırlanan sürekli fazda gliserol içeren nanoemülsiyon olmuştur.

- En yüksek antioksidan aktivite ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanan nanoemülsiyonlarda elde edilmiştir. Kapsaisin yüklü nanoemülsiyonların antioksidan aktivitesi DPPH metoduna göre en yüksek 1.36 mg DPPH/ L bulunurken FRAP metoduna göre 0.14 mM Fe(II)/L olarak sürfektan sükroz mono palmitat kullanılarak elde edilmiştir. İki sonucunda en yüksek olduğu nanoemülsiyon pH 7.4' te sürfektan

sükroz monopalmitat kullanılılarak hazırlanan sürekli fazda gliserol kullanılan nanoemülsiyon olmuştur.

- Hem renk, bulanıklık gibi fiziksel özellikler hem de antimikrobiyal, antioksidan aktivitesi sonuçları dikkate alındığında en iyi sonuçların sürekli fazda gliserol içeren emülsiyonlar olduğu gözlenmiştir.

- Ayrıca tahribatsız ve kolay bir ölçme tekniği olan NMR relaksometre karakterizasyon amacıyla kullanılmış ve elde edilen sonuçlar parçacık boyutu, bulanıklık gibi literatürde daha fazla kullanılan sonuçlarla ilişkilendirilebilmiştir.

- Biyopolimer eklenmiş nanoemülsiyonlar içerisinde en düşük parçacık boyutuna sahip olan emülsiyonlar SMP-PASP (sükroz monopalmitat-peynir altı suyu proteini) ile hazırlanan emülsiyonlar olup 35 nm parçacık boyutuna sahiptir. En berrak emülsiyonlar büyük parçacık boyutuna rağmen jelatin–SMP (sükroz monopalmitat) içeren pH 7.4' deki emülsiyonlardır. Hazırlanan emülsiyonlarda homojenizasyon öncesi ısıtmanın parçacık boyutunu düşürdüğü gözlenmiştir.

Sonuç olarak kapsaisin içeren nanoemülsiyon sistemleri ile gıda maddelerinin işlevselliğinin geliştirilebileceği gösterilmiştir. Bundan sonra yapılabilecek çalışmalarda projeden elde edilen verilerden yola çıkılarak endüstriye uyarlanabilir paketleme materyalleri, biyofilmler, dezenfektanlar yapılabilir veya antimikrobiyal aktivite deneyleri daha derinleştirilerek gıdada sorun olan başka patojenler üzerine araştırmalar genişletilebilir. Buna ek olarak projenin tamalanmasıyla elde edilen veriler kullanılarak yüksek etkili dergilerde yayınlanabilecek 2 bilimsel çalışmanın basılması mümkün olacaktır. Bu durumunda hazırlanacak yayınların içerikleri aşağıda belirtilmiştir:

1. Kapsaisin yüklü çeşitli emülgatörler tarafından stabilize edilmiş nanoemülsiyonların ultrasonik homojenizasyon ve mikroakışkanlaştırma teknikleri ile üretilmesi ve antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesi
2. Düşük rezolüsyonlu NMR relaksometre tekniğinin kapsaisin yüklü nanoemülsiyon karakterizasyonunda kullanılması

KAYNAKLAR

1. Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Li, W. W., Zhang, X. 2014.”Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch”, Ultrasonics Sonochemistry, 21, 1265–1274.

2. Abbaszadeha,S.,Sharifzadeh, A.,Shokri, H.,Khosravi, A. R.,Abbaszadeh, A. 2014.” Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi”, Journal de Mycologie Medicale, 24,2,e51-e56.

3. Acosta, E. 2009.” Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery”, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 14(1), 3–15.

4. Al-Adham, I.S.I., Khalil, E., Al-Hmoud, N.D., Kierans, M., Collier, P.J. 2000. “Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems”, Journal of Applied Microbiology, 89, 32–39.

5. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., … Özyurt, D. 2007. "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay", Molecules, 12(7), 1496–1547.

6. Ariyaprakai, S., & Tananuwong, K. 2015."Freeze-thaw stability of edible oil-in-water emulsions stabilized by sucrose esters and Tweens", Journal of Food Engineering, 152, 57–64.

7. Artz, W.E. ve Hansen, S.L. 1994. Sayfa 197. Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes, Editör: Akoh,C.C.,Swanson, B.G. New York:Marcel Dekker.

8. Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. 1999."Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay", Methods Enzymol, 299, 15–36.

9. Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H. 2004."Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation", International Journal of Pharmaceutics, 280, 241-251.

10. Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A., & Ruberto, G. 1998. "Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on Penicillium digitatum and Penicillium italicum", International Journal of Food Microbiology, 43(1-2), 73–79.

11. Capitani, D., Segre, A. L., & Sparapani, R. 1991. "Lecithin microemulsion gels: a nmr study of molecular mobility based on line widths", Langmuir, (7), 250–253.

12. Chanamai, R., & McClements, D. J. 2001."Prediction of emulsion color from droplet characteristics: Dilute monodisperse oil-in-water emulsions", Food Hydrocolloids, 15, 83–91.

13. Chang, Y., Mclandsborough, L., & Mcclements, D. J. 2013."Physicochemical Properties and Antimicrobial E ffi cacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsi fication", Journal of Agricultural and Food Chemistry,61, 8906-8913.

14. Chemat, F., Grondin, I., Sing, A. S. C., & Smadja, J. 2004."Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound", Ultrasonics Sonochemistry, 11(1), 13–15.

15. Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. 2011. "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction", Ultrasonics Sonochemistry, 18(4), 813–35.

16. Cho, S., Moon, H. I., Hong, G. E., Lee, C. H., Kim, J. M., Kim,S. K.2014. "Biodegradation of capsaicin by Bacillus licheniformis SK1230", Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji, 57, 335−339.

17. Choi, A.,J.,Kim, C. J.,Cho Y. J.,Hwang, J.K., Kim, C. T. 2011a."Characterization of Capsaicin-Loaded Nanoemulsions Stabilized with Alginate and Chitosan by Self-assembly", Food Bioprocess Technol., 4:1119–1126.

18. Choi, S. J., Decker, E. A., Henson, L., Popplewell, L. M., Xiao, H., & McClements, D. J. 2011b." Formulation and properties of model beverage emulsions stabilized by sucrose monopalmitate: Influence of pH and lyso-lecithin addition", Food Research International, 44(9), 3006–3012.

19. Choi, A.Y., Kim, C.T., Park, H. Y., Kim, H. O., Lee, N.R., Lee, K.E., Gwak, H.S. 2013. "Pharmacokinetic characteristics of capsaicin-loaded nanoemulsions fabricated with alginate and chitosan", Journal of Agricultural, Food Chemistry, 61, 2096−2102.

20. Clydesdale, F.M.1975. "Methods and measurements of food color, in Theory, Determination and Control of Physical Properties of Food Materials", Rha, C., Ed., D. Reidel Publishing, Boston,chap.14.

21. Denkova, P. S., Tcholakova, S., Denkov, N. D., Danov, K. D., Campbell, B., Shawl, C., & Kim, D. 2004. "Evaluation of the precision of drop-size determination in oil/water emulsions by low-resolution NMR spectroscopy", Langmuir, 20(26), 11402–11413.

22. Dickinson, E. 1994." Colloidal aspects of beverages", Food Chemistry, 51, 343.

23. Dima, C., Coman, G., & Alexe, P. 2013. "Antioxidant and antibacterial properties of capsaicine microemulsions", 37(1), 39–49.

24. Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. 2011."Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods", Food Science and Technology, 44, 1908-1914.

25. Donsì, F., Annunziata, M., Vincensi, M., & Ferrari, G. 2012a. "Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier", Journal of Biotechnology, 159(4), 342–350.

26. Donsì, F., Sessa, M., & Ferrari, G. 2012b."Effect of emulsifier type and disruption chamber geometry on the fabrication of food nanoemulsions by high pressure homogenization", Industrial and Engineering Chemistry Research, 51(22), 7606–7618.

27. Erkan-koç, B., Türkyılmaz, M., & Yemis, O. 2015. "Effects of various protein- and polysaccharide-based clarification agents on antioxidative compounds and colour of pomegranate juice",Food Chem., 184, 37–45.

28. Ersus S, Oztop M.H., McCarthy M.J., Barrett, D.B. 2010."Disintegration efficiency of pulsed electric field (PEF) induced effects on onion (allium cepa l.) tissues as a function of pulse protocol and determination of cell membrane integrity by 1HNMR relaxation measurements", Journal of Food Science 75, 7, E444-E452.

29. Fabri, D., Williams, M. A. K., & Halstead, T. K. 2005."Water T2 relaxation in sugar solutions", Carbohydrate Research, 340(5), 889–905.

30. Farinato, R.S. and Rowell, R.L.1983. "Optical properties of emulsions", in Encyclopedia of Emulsion Technology,Vol. 1, Becher, P., Marcel Dekker, New York,chap. 8.

31. Gabriele, D., Migliori, M., Di Sanzo, R., Rossi, C. O., Ruffolo, S. A., & de Cindio, B. 2009."Characterisation of dairy emulsions by NMR and rheological techniques", Food Hydrocolloids, 23(3), 619–628.

32. Gonzalez, M.E.; Barrett, D.M.; McCarthy, M.J. ; Vergeldt, F.J., Gerkema, E.; Matser, A.M.; Van As, H. 2010. "1H-NMR Study of the Impact of High Pressure and Thermal Processing on Cell Membrane Integrity of Onions", Journal of food science, 75, 7, E417-E425.

33. Goudappel, G. J. W., van Duynhoven, J. P. M., & Mooren, M. M. W. 2001. "Measurement of Oil Droplet Size Distributions in Food Oil/Water Emulsions by Time Domain Pulsed Field Gradient NMR", Journal of Colloid and Interface Science, 239(2), 535–542.

34. Granizo, D. P., Reuhs, B. L., Stroshine, R., & Mauer, L. J. 2007. "Evaluating the solubility of powdered food ingredients using dynamic nuclear magnetic resonance (NMR) relaxometry", LWT - Food Science and Technology, 40(1), 36–42.

35. Hamada G.M., Al-Blehed M.S., Al-Awad M.N., Al-Saddique M.A. 2001." Petrophysical evaluation of low-resistivity sandstone reservoirs with nuclear magnetic resonance log", Journal of Petroleum Science and Engineering, 29, 2, 129-138.

36. Henry, J. V. L., Fryer, P. J., Frith, W. J., & Norton, I. T. 2009."Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters", Journal of Colloid and Interface Science, 338(1), 201–206.

37. Hernandez, E. and Baker, R.A.1991." Turbidity of beverages with citrus oil clouding agent", Journal of Food Science, 56, 1024.

38. Hernandez, E., Baker, R.A., and Crandall, P.G.1991. "Model for evaluating the turbidity in cloudy beverages",Journal of Food Science, 56, 747.

39. Hills B. 1998. "Magnetic resonance imaging in food science", New York: Wiley-Interscience.

40. Hoeller, S., Sperger, A., & Valenta, C. 2009."Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation", International Journal of Pharmaceutics, 370(1-2), 181–6.

41. Hollingsworth, K. G., Sederman, A. J., Buckley, C., Gladden, L. F., & Johns, M. L. 2004. "Fast emulsion droplet sizing using NMR self-diffusion measurements", Journal of Colloid and Interface Science, 274(1), 244–250.

42. Huang, Q., Yu, H., Ru, Q. 2010. "Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology", Journal of Food Science, 75(1), R50–R57.

43. Hunter R.J. 1981. Zeta Potential in Colloid Science (3.Basım). London, England: Academic Press

44. Jenning, V., Ma, K., & Gohla, S. H. 2000. "Solid lipid nanoparticles (SLN TM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids : a 1 H-NMR study", International journal of pharmaceutics, 205, 15–21.

45. Jiahui, H., Johnston, K. P., & Williams Iii, R. O.2004. "Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs", Drug Development and Industrial Pharmacy, 30(3), 233–245.

46. Jiang, Y., Pétrier, C., & Waite, T. D. 2002a. "Effect of pH on the ultrasonic degradation of ionic aromatic compounds in aqueous solution", Ultrasonics Sonochemistry, 9(3), 163–168.

47. Jiang, Y., Pétrier, C., & David Waite, T. 2002b. "Kinetics and mechanisms of ultrasonic degradation of volatile chlorinated aromatics in aqueous solutions". Ultrasonics Sonochemistry, 9(6), 317–323.

48. Kesisoglou, F., Panmai, S., & Wu, Y. H. 2007." Application of nanoparticles in oral delivery of immediate release formulations", Current Nanoscience, 3, 183–190.

49. Kidak, R., & Ince, N. H. 2006. "Ultrasonic destruction of phenol and substituted phenols: A review of current research", Ultrasonics Sonochemistry, 13(3), 195–199.

50. Kim, J.H.,Ko, J.A.,Kim, J.T., Cha,D.S.,Cho, J.H., Park, H.J., Shin, G.H. 2014a. "Preparation of a Capsaicin-Loaded Nanoemulsion for Improving Skin Penetration", Journal of Agricultural, Food Chemistry, 62, 725−732.

51. Kim, I. H.,Oh, Y. A., Lee, H., Song, K. B., Min, S. C. 2014b."Grape berry coatings of lemongrass oil-incorporating nanoemulsion", Food Science and Technology, 58, 1-10.

52. Lecoeur, M., Gareil, P., & Varenne, A. 2010. "Separation and quantitation of milk whey proteins of close isoelectric points by on-line capillary isoelectric focusing — Electrospray ionization mass spectrometry in glycerol – water media", Journal of Chromatography A, 1217(46), 7293–7301.

53. Lee, L. & Norton, I. T. 2013. "Comparing droplet breakup for a high-pressure valve homogeniser and a Microfluidizer for the potential production of food-grade nanoemulsions", Journal of Food Engineering, 114,158–163.

54. Lee, L., Hancocks, R., Noble, I., Norton, I. T. 2014. "Production of water-in-oil nanoemulsions using high pressure homogenisation: A study on droplet break-up", Journal of Food Engineering, 131, 33–37.

55. Lee, M.,Cho, J.Y.,Lee, Y. G.,Lee, H.J.,Lim, S.I.,Park, S.L.,Moon, J.H. 2015."Bioconversion of Capsaicin by Aspergillus oryzae", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63 (26), 6102-6108.

56. Leng, T.W., Muhammad, I. I., Zaidela, D.N.A., Khairuddina, N. 2013." Evaluation of Capsaicinoids Extracts as Bioactive Substance for Antimicrobial Films", Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering), 64:2, 69–74.

57. Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. 2009. "Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification", Ultrasonics Sonochemistry, 16(6), 721–7.

58. Lide, D. R. 2003. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 3485.

59. Luykx, D. M.A.M., Peters, R. J. B., Van Ruth, S.M., Bouwmeester, H. 2008." A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(18), 8231–8247.

60. Ma, Y., Varadan, V.K., and Varadan, V.V.1990. "Comments on ultrasonic propagation in suspensions",Journal of the Acoustical Society of America, 87, 2779.

61. Marciani, L., Tyler, D. J., & Spiller, R. C. 2001. "Fat Emulsi cation Measured Using NMR Transverse Relaxation". Journal of Magnetic Resonance, 6, 1–6.

62. Mariette, F. 2009. "Investigations of food colloids by NMR and MRI", Current Opinion in Colloid and Interface Science, 14(3), 203–211.

63. Martin, A. H., Bakhuizen, E., Ersch, C., Urbonaite, V., Jongh, H. H. J. De, & Pouvreau, L. 2016. "Food Hydrocolloids Gelatin increases the coarseness of whey protein gels and impairs water exudation from the mixed gel at low temperatures", Food Hydrocolloids, 56, 236–244.

64. McClements, D. J. 2002. "Theoretical prediction of emulsion color", Advances in Colloid and Interface Science, 97(1-3), 63–89.

65. McClements, D. 2005. Food emulsions: Principles, practice, and techniques (2nd ed.). Boca Raton: CRC.

66. McClements, D. J., Decker, E. a., & Weiss, J. 2007. "Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components", Journal of Food Science, 72(8), 109–124.

67. 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 in Food Science and Nutrition, 49(6), 577–606.

68. McClements, D. J. 2012. "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities". Soft Matter, 8(6).

69. Meleson, K., Graves, S., & Mason, T. G. 2004. "Formation of Concentrated Nanoemulsions by Extreme Shear". Soft Materials, 2(2-3), 109–123.

70. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. 2010. "Polymer-based nanocapsules for drug delivery", International Journal of Pharmaceutics, 385(1-2), 113–142.

71. Nanzai, B., Okitsu, K., Takenaka, N., Bandow, H., & Maeda, Y. 2008. "Sonochemical degradation of various monocyclic aromatic compounds: Relation between hydrophobicities of organic compounds and the decomposition rates", Ultrasonics Sonochemistry, 15(4), 478–483.

72. Nazarzadeh, E., & Sajjadi, S. 2013. "Thermal Effects in Nanoemulsification by Ultrasound", Industrial and Engineering Chemistry Research,52, 9683-9689.

73. Nithiyanantham, S., Siddhuraju, P., & Francis, G. 2013."A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed Jatropha curcas L. kernel meal extracts", Industrial Crops and Products, 43, 261–269.

74. O'Beirne, D., ve Hamer, G. 2000."The utilisation of glucose/acetate mixtures by Escherichia coli W3110 under aerobic growth conditions", Bioprocess Engineering, 23(4), 375–380.

75. Opedal, N. V. D. T., Sørland, G., & Sjöblom, J. 2009. "Methods for Droplet Size Distribution Determination of Water-in-oil Emulsions using Low-Field NMR", Diffusion-Fundamentals.org, 9(7), 1–29.

76. Oztop M.H., Rosenberg M., Rosenberg, Y., McCarthy, K.L.M., McCarthy, M.J. 2010. "Magnetic resonance imaging (MRI) and relaxation spectrum analysis as methods to investigate swelling in whey protein gels", Journal of Food Science, 75, 7, E508-E515.

77. Oztop, M.H., McCarthy, M.J., McCarthy, K.L., Rosenberg, M. 2012. "Uptake of divalent ions (Mn+2 and Ca+2) by heat-set whey protein gels", Journal of Food Science, 77, 2, E68-73.

78. Pal, R. 2011." Rheology of simple and multiple emulsions". Current Opinion in Colloid and Interface Science, 16(1), 41–60.

79. Partanen, R., Marie, V., MacNaughtan, W., Forssell, P., & Farhat, I. 2004. "1H NMR study of amylose films plasticised by glycerol and water", Carbohydrate Polymers, 56(2), 147–155.

80. Piorkowski, D. T., McClements, D. J. 2013. "Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications", Food Hydrocolloids, 1-37.

81. Qian, C., & McClements, D. J. 2011." Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size", Food Hydrocolloids, 25(5), 1000–1008.

82. Quintanilla-Carvajal, M., Camacho-Díaz, B., Meraz-Torres, L., Chanona-Pérez, J., Alamilla-Beltrán, L., Jimenéz-Aparicio, A. 2010. "Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing", Food Engineering Reviews, 2(1), 39–50.

83. Rahn-Chique, K., Puertas, A. M., Romero-Cano, M. S., Rojas, C., & Urbina-Villalba, G. 2012." Nanoemulsion stability: Experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements", Advances in Colloid and Interface Science, 178, 1–20.

84. Rao, J. & McClements, D. J. 2011a. "Formation of of Flavor Oil Microemulsions, Nanoemulsions and Emulsions: Influence of Composition and Preparation Method", J. Agric. Food Chem., 59, 5026–5035.

85. Rao, J., & McClements, D. J. 2011b. "Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil", Food Hydrocolloids, 25(6), 1413–1423.

86. Rao, J., & McClements, D. J. 2012. "Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation", Food Hydrocolloids, 26(1), 268–276.

87. Rao, J., & McClements, D. J. 2013." Optimization of lipid nanoparticle formation for beverage applications: Influence of oil type, cosolvents, and cosurfactants on nanoemulsion properties", Journal of Food Engineering, 118(2), 198–204.

88. Rodríguez-Abreu, C., & Lazzari, M. 2008. "Emulsions with structured continuous phases", Current Opinion in Colloid and Interface Science, 13(4), 198–205.

89. Romano, D., Gandolfi, R., Guglielmetti, S., Molinari, F. 2011. "Enzymatic hydrolysis of capsaicins for the production of vanillylamine using ECB deacylase from Actinoplanes utahensis", Food Chem., 124, 1096−1098.

90. Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. 2013." Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification", Journal of Colloid and Interface Science,391, 95-102.

91. Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graue, A., Soliva-Fortuny, R., & Martin-Belloso, O. 2013. "Physicochemical Characterization of Lemongrass Essential Oil-Alginate Nanoemulsions: Effect of Ultrasound Processing Parameters", Food and Bioprocess Technology, 6(9), 2439–2446.

92. Salvia-trujillo, L., Rojas-graü, A., Soliva-fortuny, R., & Martín-belloso, O. 2014." Food Hydrocolloids Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food- grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils", Food Hydrocolloids, 43, 1–10.

93. Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. 2013." Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions", Food Hydrocolloids, 30(1), 401–407.

94. Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. 2014." Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against Escherichia coli of lemongrass oil-loaded nanoemulsions", Food Control, 37, 292–297.

95. Sanguansri, P., & Augustin, M. A. 2006. "Nanoscale materials development—a food industry perspective", Trends in Food Science & Technology, 17(10), 547–556.

96. Sari, T.P., Mann, B., Kumar, R., Singh, R. R. B., Sharma, R., Bhardwaj, M., Athira, S. 2014." Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin", Food Hydrocolloids,1-7.

97. Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G., & Donsì, F. 2011." Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(23), 12352–60.

98. Shchipunov, Y. a, & Schmiedel, P. 1996." Phase behavior of lecithin at the oil/water interface", Langmuir, 7463(13), 6443–6445.

99. Shinoda, K., ve Friberg, S. 1986. Emulsions and solubilization. Wiley-Interscience; Israelachvili, J., 2011. Intermolecular and Surface Forces, third ed. Academic Press, London, UK

100. Sora, G. T. S., Haminiuk, C. W. I., da Silva, M. V., Zielinski, A. A. F., Gonçalves, G. A., Bracht, A., & Peralta, R. M. 2015. "A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and in vitro antioxidant activities of the peppers of the genus Capsicum: an application of chemometrics", Journal of Food Science and Technology, 52(12), 8086–8094.

101. Solans, C. & Sole, I. 2012. "Nano-emulsions: Formation by low-energy methods", Current Opinion in Colloid and Interface Science, 17,246-254.

102. Stephen, B. J., Kumar, V. 2014. "Evaluation of antimicrobial activity of capsaicin extract against B.subtilis species", International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis, Vol: 2 Issue:2 Page:111-116.

103. Surassmo, S., Min, S.-G., Bejrapha, P., & Choi, M.-J. 2010. "Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion–diffusion method", Food Research International, 43(1), 8–17.

104. Surh, J., Jeong, Y. G., & Vladisavljević, G. T. 2008. "On the preparation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions by multi-stage premix membrane emulsification", Journal of Food Engineering, 89(2), 164–170.

105. Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. 2004." Formation and stability of nano-emulsions". Advances in Colloid and Interface Science, 108-109, 303–318.

106. Takegami, S., & Kitamura, K. 2008. "Preparation and characterization of a new lipid nano-emulsion containing two cosurfactants, sodium palmitate for droplet size reduction and sucrose palmitate for stability enhancement", Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 56(8), 1097–1102.

107. Tan, C.-T.1990. "Beverage emulsions", in Food Emulsions, 2nd ed., Larsson, K. and Friberg, S.E., Eds.,Marcel Dekker, New York, chap. 10.

108. Terjung, N., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. 2012." Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials", Food & Function, 3(3), 290–301.

109. Thomas, L. V, Davies, E. a, Delves-Broughton, J., & Wimpenny, J. W. 1998." Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of gram-positive bacteria", Journal of Applied Microbiology, 85, 1013–1022.

110. Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., & Saija, A. 2005."Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils", Food Chemistry, 89(4), 549–554.

111. Van Duynhoven, J. P. M., Goudappel, G. J. W., Van Dalen, G., Van Bruggen, P. C., Blonk, J. C. G., & Eijkelenboom, A. P. A. M. 2002." Scope of droplet size measurements in food emulsions by pulsed field gradient NMR at low field", Magnetic Resonance in Chemistry, 40(SPEC. ISS.), 51–59.

112. Vermeir, L., Sabatino, P., Balcaen, M., Van Ranst, G., & Van der Meeren, P. 2014." Evaluation of the effect of homogenization energy input on the enclosed water volume of

concentrated W/O/W emulsions by low-resolution T2-relaxometry", Food Hydrocolloids, 34, 34–38.

113. Wang, H., Gao, X. D., Zhou, G. C., Cai, L., & Yao, W. B. 2008." In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit", Food Chemistry, 106(3), 888–895.

114. Weıss, J., Takhistov, P., Mcclements, D. 2006." Functional materials in food nanotechnology", Journal of Food Science,71(9), 107–116.

115. Weıss, J., Decker, E., Mcclements, D., Krıstbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T. 2008. "Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components", Food Biophysics, 3(2), 146–154.

116. Wichchukit S., Oztop, M.H., McCarthy, M.J., McCarthy, K.L.M. 2013. "Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component", Food Hydrocolloids.

117. Williams P., Oztop, M.H., McCarthy, M.J., McCarthy, K.L., Lo, Y.M. 2011. "Characterization of water distribution in xanthan-curdlan hydrogel complex using magnetic resonance imaging, nuclear magnetic resonance relaxometry, rheology, and scanning electron microscopy", Journal of Food Science 76, 6, E472-478.

118. Wissing, S. A., Kayser, O., & Muller, R. H. 2004. "Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery", Advanced Drug Delivery Reviews, 56(9), 1257–1272.

119. Wooster, T., Golding, M., and Sanguansri, P. 2008. "Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability", Langmuir, 24(22):12758–12765.

120. Xing, F., Cheng, G., Yi, K., & Ma, L. 2005." Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins". Journal of Applied Polymer Science, 96(6), 2225–2229.

121. Xue, J., & Zhong, Q. 2014." Blending lecithin and gelatin improves the formation of thymol nanodispersions", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(13), 2956–62.

122. Yamamoto, M., Ando, H., Arima, S., & Aramaki, K. 2009. "Rheological properties of wormlike micellar solutions being available in wide temperature range in sucrose palmitate systems", Journal of Oleo Science, 58(6), 303–11.

123. Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. 2008. "Characterization and stability evaluation of β-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions", Food Research International, 41(1), 61–68.