

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARA DUT ANTOSİYANİNLERİNİN İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE
ENKAPSÜLASYONU VE ENKAPSÜLASYON PARAMETRELERİNİN TEPKİ
YÜZEYİ METODU İLE OPTİMİZE EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe ÇORUHLI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK

OCAK 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARA DUT ANTOSİYANİNLERİNİN İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE
ENKAPSÜLASYONU VE ENKAPSÜLASYON PARAMETRELERİNİN TEPKİ
YÜZEYİ METODU İLE OPTİMİZE EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tuğçe ÇORUHLI
(506101512)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK

OCAK 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506101512 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Tuğçe ÇORUHLI**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“KARA DUT ANTOSİYANİNLERİNİN İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE ENKAPSÜLASYONU VE ENKAPSÜLASYON PARAMETRELERİNİN TEPKİ YÜZEYİ METODU İLE OPTİMİZE EDİLMESİ”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof.Dr. Beraat ÖZÇELİK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yard. Doç. Esra ÇAPANOĞLU
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **17 Aralık 2012**
Savunma Tarihi : **24 Ocak 2013**

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında desteklerini benden esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Beraat Özçelik'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuarda deneylerimi yaptığım sırada ve sonrasında da her daim yanımda olan, Nalan Demir'e ve Ayşe Karadağ'a yardımlarından dolayı minnet duyarım. Son olarak bana sonsuz derecede güvenen, emek veren aileme hep yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Ocak 2013

Tuğçe Çoruhli
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMALAR	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. DUT MEYVESİ VE ÖZELLİKLERİ.....	3
3. ANTOSİYANİNLERİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ	5
3.1 Antosiyaninlerin Stabilitesini Etkileyen Faktörler	7
3.1.1 Antosiyanin yapısı.....	7
3.1.2 pH etkisi	8
3.1.3 Sıcaklık.....	8
3.1.4 Işık.....	9
3.1.5 Konsantrasyon.....	9
3.1.6 Şeker.....	9
3.1.7 Kopigmentasyon	10
3.1.8 Askorbik asit	10
3.1.9 Metalik İyonlar.....	10
4. ENKAPSÜLASYON TEKNOLOJİSİ VE ÖZELLİKLERİ.....	11
4.1 Enkapsüle Edilen Bileşenler (Aktif Maddeler)	12
4.2 Enkapsülasyon Metotları.....	12
4.2.1 Püskürtmeli kurutma	12
4.2.2 Koaservasyon	14
4.2.3 Emülsiyon oluşturma	15
4.2.4 Dondurarak kurutma	16
4.2.5 Damlatma (iyonik jelasyon) metodu.....	16
4.3 Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri.....	19
4.3.1 Aljinat.....	19
4.3.2 Kitosan	20
4.3.3 Karagenan	21
4.3.4 Pektin	21
4.3.5 Nişasta	22
4.3.6 Gamlar.....	22
5. MATERYAL VE METOTLAR.....	25
5.1 Materyaller & Kimyasallar.....	25
5.2 Ekipmanlar	25
5.3 Kara Dut Numunesinin Hazırlanması	25
5.4 Dut numunesi İçin Renk, pH, Toplam Kuru Ağırlık Ölçümleri	26
5.5 Kara Dut Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu	26
5.5.1 Toplam fenolik madde analizi.....	27
5.5.2 % Radikal yakalama aktivitesi – DPPH metodu.....	27

5.5.3 Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi.....	27
5.5.4 Toplam antosiyanin analizi – pH diferansiyel metodu.....	27
5.6 Tepki Yüzeyi Metodu İçin Deneme Deseninin (Deneysel Tasarımın)	
Oluşturulması	28
5.6.1 Aljinat çözeltisinin hazırlanması	29
5.6.2 Jelleşme ortamının hazırlanması	29
5.6.3 Kitosan kaplı aljinat taneciklerinin üretilmesi	30
5.6.4 Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	30
5.6.5 Kapsüllerin karakterizasyonu	31
5.6.6 <i>In vitro</i> salım çalışmalarının yapılması	32
5.7 İstatiksel analiz	32
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
6.1 Dut Numunesi İçin Renk, pH ve Toplam Kuru Madde Ağırlık Miktarlarının Belirlenmesi.....	33
6.2 Kara Dut Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu	34
6.3 Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....	34
6.4 Antioksidan Kapasitesinin Hesaplanması	35
6.5 Toplam Flavonoid Miktarı	36
6.6 Toplam Antosiyanin Miktarı	36
6.7 İstatiksel Analiz	38
6.7.1 RSM sonuçlarının değerlendirilmesi.....	38
6.7.2 Optimum koşulların belirlenmesi ve validasyonu.....	48
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	53
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	75

KISALTMALAR

A	: Absorbans
ANOVA	: Analysis of Variance
AR	: Aspect ratio (uzunluk oranı)
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
Cy	: Siyanidin
Cy-3-gly	: Siyanidin 3 glikozit
d_{max}	: Maksimum çap (mm)
d_{min}	: d _{max} (mm)'a dik minimum çap
DF	: Seyreltme faktörü
Dp	: Delfinidin
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ε	: Sönüm katsayısı
EE	: Enkapsülasyon etkinliği
GAE	: Gallik asit ekuvalenti
G/M	: Guluronik asit/ mannuronik asit oranı
GRAS	: Generally regarded as safe (genellikle emniyetli kabul edilen)
HPLC	: High performance liquid chromatography (yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
m_{NE}	: toplam antosiyanin miktarı (mg/L)
mt_{op}	: Enkapsüle edilemeyen antosiyanin miktarı (mg/L)
MS	: Mass spectrometry (kütle spektrometresi)
Mv	: Malvinidin
MW	: Moleküler ağırlık (g/mol)
Pg	: Pelargonidin
Pn	: Peonidin
Pt	: Petunidin
RSM	: Response Surface Methodology (Tepki yüzeyi metodu)
SF	: Sphericity factor (küresellik faktörü)
SGF	: Stimulated Gastric Fluid (stimüle mide sıvısı)
Sy-3-gli	: Siyanidin 3 glikozit
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
Trolox	: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TEAC	: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity-Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
UV	: Ultraviolet

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 5.1: RSM deneme deseni değişkenleri.	29
Çizelge 6.1: Dut numunesi ve antosiyanin ekstraktı için toplam fenolik, flavonoid, 37	
Çizelge 6.2: RSM deneme deseni sonuçları.	38
Çizelge B.1: AR için tahminlenen regresyon katsayıları.....	65
Çizelge B.2: AR için ANOVA tablosu.....	66
Çizelge B.3: AR için belirlenen regresyon katsayıları.	66
Çizelge B.4: SF için tahminlenen regresyon katsayıları.....	66
Çizelge B.5: SF için ANOVA tablosu.....	67
Çizelge B.6: SF için belirlenen regresyon katsayıları.*	67
Çizelge B.7: %EE için tahminlenen regresyon katsayıları.....	67
Çizelge B.8: %EE için ANOVA tablosu.....	68
Çizelge B.9: % EE için belirlenen regresyon katsayıları.*	68
Çizelge B.10: % SGF için tahminlenen regresyon katsayıları.	68
Çizelge B.11: %SGF için ANOVA tablosu.....	69
Çizelge B.12: % SGF için belirlenen regresyon katsayıları.*	69
Çizelge C.1: Yanıt optimizasyonu için belirlenen değerler - 1.....	71
Çizelge C.2: Yanıt optimizasyon değerleri -2.....	72

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1: Antosiyaninlerin kimyasal yapısı (Giusti ve Wrolstad, 2003).	6
Şekil 4.1: Püskürtmeli kurutma sistemi (Zuidam ve Shimoni, 2010).	13
Şekil 4.2: Jelasyon/kalsiyum-aljinat çapraz bağlanma mekanizması (Shi ve diğ, 2011).	17
Şekil 4.3: Damlatma sistemi (McClements ve Li, 2010.).	17
Şekil 4.4: Aljinatın yapısı (Vos ve diğ, 2010).	20
Şekil 6.1: Gallik asit standardı kalibrasyon eğrisi.	34
Şekil 6.2: Trolox standardı kalibrasyon eğrisi.	35
Şekil 6.3: Kuersetin standardı kalibrasyon grafiği.	36
Şekil 6.4: Boy/en oranı üzerinde süre-ekstrakt etkisi.	40
Şekil 6.5: Boy/en oranı üzerinde kitosan-ekstrakt etkisi.	41
Şekil 6.6: Boy/en oranı üzerinde süre-kitosan etkisi.	41
Şekil 6.7: Küresellik faktörü üzerinde kitosan-ekstrakt etkisi.	42
Şekil 6.8: Küresellik faktörü üzerinde ekstrakt-süre etkisi.	42
Şekil 6.9: Küresellik faktörü üzerinde kitosan-süre etkisi.	43
Şekil 6.10: Enkapsülasyon etkinliği üzerinde ekstrakt-kitosan miktarları etkisi.	44
Şekil 6.11: Enkapsülasyon etkinliği üzerinde kitosan-süre etkisi.	44
Şekil 6.12: Enkapsülasyon etkinliği üzerinde ekstrakt-süre etkisi.	45
Şekil 6.13: In vitro salım üzerine ekstrakt-kitosan etkisi.	45
Şekil 0.14: In vitro salım üzerinde süre-kitosan etkisi.	46
Şekil 6.15: In vitro salım üzerinde süre-ekstrakt etkisi.	47
Şekil A.1: % 1 ekstrakt kullanılarak üretilen kapsüller (a) %0.3 kitosan ile 30 dk, (b) %0.5 kitosan ile 15 dk, (c) %0.1 kitosan ile 15 dk karıştırıldıktan sonra.	60
Şekil A.2: %1 ekstrakt içeren kurutulmuş kapsüller.	60
Şekil A.3: % 3 ekstrakt kullanılarak üretilen kapsüller (a) %0.3 kitosan ile 15 dk, (b) %0.3 kitosan ile 30 dk, (c) %0.3 kitosan ile 45 dk ve (d) %0.5 kitosan ile 30 dk karıştırıldıktan sonra.	61
Şekil A.4: %3 ekstrakt içeren kurutulmuş kapsüller.	61
Şekil A.5: % 5 ekstrakt kullanılarak üretilen kapsüller (a) %0.1 kitosan ile 15 dk, (b) %0.5 kitosan ile 15 dk, (c) %0.5 kitosan ile 45 dk ve (d) %0.3 kitosan ile 30 dk karıştırıldıktan sonra.	62
Şekil A.6: %5 ekstrakt içeren kurutulmuş kapsüller.	62
Şekil A.7: (a) 564x2µm ve (b) 545x2 µm boyutlu %0.1 kitosanlı CaCl ₂ çözeltisinde 15 dk karıştırılan %1 ekstrakt yüklü kapsüller için mikroskop görüntüleri.	63
Şekil A.8: (a) ve (b) %0.5 kitosanlı CaCl ₂ çözeltisinde 30 dk karıştırılan %3 ekstrakt yüklü kapsüller için mikroskop görüntüleri.	63
Şekil A.9: (a) 555x2µm ve (b) 581x2 µm boyutlu %0.1 kitosanlı CaCl ₂ çözeltisinde 15 dk karıştırılan %5 ekstrakt yüklü kapsüller için mikroskop görüntüleri.	63
Şekil C.1: Yanıt optimizasyon garifği -1.	72
Şekil C.2: Yanıt optimizasyon grafiği -2.	73

KARA DUT ANTOSİYANİNLERİNİN İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE ENKAPSÜLASYONU VE ENKAPSÜLASYON PARAMETRELERİNİN TEPKİ YÜZEYİ METODU İLE OPTİMİZE EDİLMESİ

ÖZET

Dut meyvesi Asya ve Avrupa'ya kadar pek çok bölgede yetiştirilebilen C vitamini, mineraller, fenolik maddeler, antosiyaninler ve antioksidanlarca zengin faydalı bir besin kaynağıdır. Karadut (*Morus nigra*) taze olarak veya pekmez, şurup, reçel ve pestil gibi işlenerek de tüketilebilen bir dut çeşididir. Karadut içeriğinde bulunan zengin antosiyaninler renk pigmentleri olup, bu antosiyaninler gıda sanayinde renklendirici olarak veya ürünlerin zenginleştirilmesinde kullanılabilir. Doğada en çok bulunan antosiyanidinler pelargonidin (Pg), siyanidin (Cy), peonidin (Pn), delfinidin (Dp), petunidin (Pt) ve malvinidin (Mv) olup bunların farklı şekerlerle glikozit oluşturması ile antosiyaninler oluşmaktadır. Kara dutta en fazla bulunan aglikon siyanidin olup siyanidin-3-glikozit ve siyanidin-3-rutinosit açısından zengindir.

Günümüzde sağlıklı beslenmeye verilen önemin artmasıyla tüketiciler antioksidanlarca zengin fonksiyonel ve doğal gıdalara yönelmeye başlamışlardır. Karadut sağlık açısından olumlu etkileri bulunan ve doğal renklendirici olarak kullanılan antosiyaninleri içermesi nedeniyle yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanım potansiyeli bulunan önemli bir meyvedir. Ancak antosiyaninlerin ısı, ışık, metal iyonları, pH, ortamda şeker ve askorbik asit bulunması gibi çeşitli faktörlere duyarlı olmaları sebebiyle antosiyaninlerin özellikle işlenmiş gıda ürünlerinde kullanımı çok kısıtlıdır. Ayrıca fenolik bileşenlerin biyoyararlılıkları ve biyolaşılabilirlikleri vücuttaki düşük absorpsiyonları ve hızlı metabolizasyonu sebebiyle oldukça düşüktür. Antosiyaninlerin büyük kısmı vücuda alındıktan kısa bir süre sonra midede metabolize edilirken, ince bağırsağa ulaşan kısmı yüksek pH koşullarında degrade olmaktadır. Antosiyaninler gibi çeşitli fenolik maddelerin stabilitesinin ve biyolaşılabilirliğinin artırılmasında enkapsülasyon teknolojisinin literatürde başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür.

Enkapsülasyon çeşitli biyoaktif maddelerin kapsüller içine hapsedilerek çevresel etkenlerden korunmasını sağlarken, belirli koşullar altında içeriğindeki maddelerin ortama salınmasını sağlayan teknolojidir. Çapraz bağlanma, iyonik jelasyon gibi isimlerle de anılan damlatma metodu ekonomik ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması sebebiyle enkapsülasyon teknolojisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Aljinat bazık çözümlerde çözünebilen bir polisakkarit olduğundan damlatma yöntemiyle elde edilen kalsiyum-aljinat tanecikleri asidik mide koşullarında bütünlüğünü korumakta ancak ince bağırsak koşullarında tamamen çözünmektedir. Buna karşılık kitosan katyonik bir polimer olup gözenekli yapıdaki kalsiyum-aljinat taneciklerinin dayanıklılığının artırılmasında kullanılabilir. Enkapsülasyonda kullanılan metotlar, kaplamada kullanılan malzemeler ve prosesteki parametreler çok çeşitli olup başarılı bir enkapsülasyon için gerekli koşullar optimize edilmelidir. Tepki yüzey metodu (RSM) proses değişkenlerinin optimize edilmesinde kullanılan

istatistiksel bir metottur. Tepki yüzey metodunda amaç; bir çok değişken tarafından etkilenen tepkinin optimum yapılması ve tepkiyi optimum yapan karar değişkenlerinin değerlerinin belirlenmesidir. RSM kolay ve ekonomik bir yöntem olması sebebiyle optimizasyon çalışmalarında tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın amacı dut antosiyaninlerinin kitosan kaplı kalsiyum-aljinat tanecikler içine hapsedilerek enkapsüle edilmesi ve tepki yüzey metodu kullanılarak enkapsülasyonda kullanılan bazı faktörlerin optimize edilmesidir. Çalışmada kullanılan karadut öğütülerek -80°C 'de depolanmıştır. Karadut antosiyaninlerinin ekstraksiyonu iki sıvı fazlı ekstraksiyon yöntemine göre etanol ve amonyum sülfat kullanılarak pH 4.5'te gerçekleştirilmiştir. Belirtilen hedefler doğrultusunda öncelikle fenolik bileşenlerce zengin karadut numunesinin renk, pH ve nem miktarları belirlenmiş ardından dut antosiyaninleri ekstrakte edilmiştir. Karadutun pH değeri 4,5, nem miktarı %80,83 ve renk değerleri $L^*=14,56\pm0,15$, $a^*=7,87\pm0,29$, $b^*=-11,75\pm0,22$, $C^*=14,24\pm0,25$ olarak bulunmuştur. Hem dut meyvesinin, hem de antosiyanin ekstraktının toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanin miktarları ve antioksidan kapasitesi gibi özellikleri incelenmiştir. Buna göre toplam fenolik madde miktarı dut için $462,85\pm35,35$ mg GAE/100g taze numune ve antosiyanin ekstraktı için $3224,30\pm745,67$ mg GAE/100g ekstrakt; toplam flavonoid miktarı dut için $1349,26\pm34,3$ mg kuersetin/100g numune ve antosiyanin ekstraktı için $10421,30\pm396,8$ mg kuersetin/100g numune; antioksidan kapasitesi dut için $1393,14\pm40,6$ mg trolox/100 g numune ve ekstrakt için $15165,23\pm117,99$ trolox/mg numune ve toplam antosiyanin miktarı ise karadut numunesi için $462,85\pm35,35$ mg Cy-3-gly/100 g numune ve antosiyanin ekstraktı için $3224,30\pm745,67$ mg Cy-3-gly/100 g numune olarak ölçülmüştür. Elde edilen antosiyanin ekstraktları iyonik jelasyon (damlatma) yöntemi ile enkapsüle edilmiştir.

İyonik jelasyon yönteminde duttan elde edilen antosiyanin ekstraktı aljinat çözeltisi ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bir şırınga yardımıyla bu karışım kitosanlı kalsiyum klorür çözeltisine damlatılarak kapsüller elde edilmiştir. Buna göre kalsiyum klorürdeki kalsiyum ve sodyum aljinattaki sodyum molekülleri çapraz bağ oluştururken, zıt yüklü kitosan ve aljinat arasında da iyonik bir bağlanma söz konusudur. RSM için Minitab 13.20 paket programı kullanılmış ve deneme deseni merkezi kompozit tasarımı ile 3 faktör ve 3 seviyeli olarak hazırlanmıştır. Deneyisel tasarım için ekstrakt miktarı (%1, %3 ve %5), karıştırma süresi (15, 30 ve 45 dk) ve kitosan miktarı (%0.1, %0.3 ve %0.5) bağımsız değişkenler olarak belirlenirken, kapsüllerin uzunluk oranı, küresellik faktörü, enkapsülasyon etkinlikleri ve mide sıvısındaki salım miktarları bağımlı değişkenler olarak seçilmiştir. Kapsüllerin boyu ve şeklinin belirlenmesinde kapsüllerin optik mikroskop ile ölçülen minimum ve maksimum çapları kullanılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği, kapsüle yüklenmek istenen toplam antosiyanin ekstraktı miktarından jelleşme ortamına salınan miktar çıkarılarak hesaplanmıştır. Salım çalışmaları sadece mide ortamında gerçekleştirilmiş olup çalkalamalı su banyosunda 37°C 'de pH 1.2'de 2 saat bekletilen kapsül içeriğinin mide ortamını taklit eden sıvıya (SGF) salımı UV spektrofotometre ile absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. Bu deney tasarımının hedefi enkapsülasyon etkinliği yüksek, düzgün şekilli (küresellik faktörü $< 0,05$ ve uzunluk oranı ~ 1 olan) ve asidik mide koşullarına dayanıklı kapsüller elde etmektir. Kapsüllerin boyutları kameralı optik mikroskop ile, enkapsülasyon etkinlikleri ve mide sıvısındaki salım miktarları ise UV-spektrofotometrede absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. RSM sonuçlarına göre kapsüllerin uzunluk oranı 1,043 – 1,118,

küresellik faktörü 0,021 – 0,070, enkapsülasyon etkinlikleri ~%54 – 70 ve mide ortamında salım %10 – 27 aralığında bulunmuştur.

Yapılan istatistiksel analizler ve veri analizleri ile elde edilen veriler ANOVA sonuçları ve regresyon katsayıları incelenerek ikinci derece polinomial modeline uygun bulunmuştur. ANOVA tabloları, kontür grafikleri ve ikinci dereceden polinomial denklemler oluşturulmuştur. Buna göre kapsüllerin uzunluk oranı üzerinde ekstrakt miktarı ve kitosan-süre interaksyonunun, küresellik faktörü üzerinde ise süre, ekstrakt-süre ve kitosan-süre interaksyonlarının önemli olduğu ($p<0.05$) sonucuna varılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği ise ekstrakt-kitosan miktarları, ekstrakt-süre ve kitosan miktarı-süre interaksyonu dışındaki tüm faktörlere bağlı bulunmuştur. Antosiyanin ekstraktının mide sıvısındaki salım oranı süreye, ekstrakt-kitosan miktarlarına, ekstrakt miktarına ve süre interaksyonlarına önemli derecede bağlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Genel olarak karıştırma süresi uzadıkça enkapsülasyon etkinlikleri (%EE) azalırken, aktif maddenin mide ortamına salım miktarı (%SGF) artmaktadır. Sürenin uzaması ile % SGF'nin artması iyonlar arasındaki bağlanmanın daha güçlü olması ve kapsülün daha sert bir yapıda olması ile % EE'nin azalması ise kapsüllerin yoğun jel yapısındaki kalsiyum iyonlarına daha uzun süre maruz kalmasıyla açıklanabilir. Ayrıca jelleşme ortamına eklenen kitosan belirli bir seviyeye kadar kapsülü koruyarak % EE'ni biraz arttırırken, fazla miktarda kullanımı negatif bir etki göstermiştir. Deney parametreleri maksimum enkapsülasyon etkinliği ve minimum mide sıvısına salım olarak optimize edildiğinde koşullar ekstrakt miktarı % 1.96, kitosan miktarı % 0.10 ve süre ~23 dk olarak bulunmuştur. Metot validasyonu yapılarak teorik ve deneysel veriler kıyaslanmıştır.

ENCAPSULATION OF BLACK MULBERRY ANTHOCYANINS BY IONIC GELLATION METHOD AND OPTIMIZATION OF ENCAPSULATION PARAMETERS BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

SUMMARY

Mulberry fruit which can be grown in wide areas from Asia to Europe and also tropic regions is a healthy nutrient due to its anthocyanins, antioxidants and phenolic compound content. Black mulberry (*Morus nigra*) is a type of mulberry which is consumed freshly or mostly processed like jam, syrup, pekmez in Turkey. Pekmez is the most popular mulberry product with 70% of mulberry produced in Turkey consumed as pekmez. Black mulberry is a rich source of anthocyanins which are color pigments and those pigments are used as natural colorants in food and beverage industry and to produce functional or enhanced food products as well. Pelargonidine (Pg), cyanidine (Cy), peonidine (Pn), delphinidine (Dp), petunidine (Pt) and malvinidine (Mv) are the anthocyanidines that are found in nature commonly, can form glycosides with different sugars to form anthocyanins. Cyanidin is the predominant aglycone in black mulberry which has high cyanidine-3-glycosides and cyanidine-3-rutinosite.

Since, awareness about consuming healthy and nutritious foods has been increased recently, people tend to consume functional and natural foods like products rich in antioxidants, omega 3 oils, vitamins and minerals. Black mulberry has a positive effect on health owing to its high anthocyanin content and it is a fruit that can be used as natural colorant in foods as well. However, anthocyanins are sensitive to temperature, light, metal ions, pH, sugar and ascorbic acid content of the environment and easily degraded when the conditions are not suitable so their usage in processed food products are really limited. Also, bioavailability and bioaccessibility of phenolic compounds are limited because their absorption is low and they are metabolized quickly. While a significant amount of anthocyanins are metabolized in a short span of time in stomach, the part reached to intestine is degraded because of high pH conditions.

Recent studies show that some novel technologies such as encapsulation can be useful to increase stability of phenolic compounds like anthocyanins and bioavailability/bioaccessibility also. Encapsulation is a technology that protect bioactive compounds against environmental damage/effect by entrapping them into capsules and release encapsulated compound to the surrounding environment under specific conditions (pH, temperature etc.). There are many different encapsulation methods such as spray drying, emulsification, coacervation and freeze drying while wall materials like alginate, chitosan, maltodextrin, starch, gums and process parameters like temperature, pH, pressure etc. can be adjusted according to used method and the aim of the study.

Ionic gelation that is also called as cross linking and dripping method is a cheap and easy to use method which make this method is preferred in encapsulation technology.

Since alginate is a polysaccharide that is soluble in basic solutions, obtained calcium-alginate beads from ionic gelation method stay uniform and resistant during acidic gastric conditions but can be easily dissolved when faced with basic intestine medium. In contrast, chitosan is a cationic polymer and can be used to increase stability of porous structured calcium-alginate beads. It is important to select optimum parameters and conditions to encapsulate active ingredient successfully. Response surface methodology (RSM) is a useful statistical method to optimize process variables. The aim of the RSM, is to optimize the response that is effected by various variables and decide to optimum independent variables.

The aim of this study is to encapsulate black mulberry anthocyanins by entrapping of the bioactive component into chitosan coated calcium-alginate beads and to optimize some factors used in encapsulation by response surface methodology. First of all, phenolic-rich black mulberry sample evaluated according to its color, pH, and moisture and after that mulberry anthocyanins were extracted by two aqueous phase extraction method. pH and moisture content of the black mulberry sample was found 4.5 and 80.83% respectively and color values were measured as $L^*=14.56\pm0.15$, $a^*=7.87\pm0.29$, $b^*=-11.75\pm0.22$, $C^*=14.24\pm0.25$. Some properties like total phenolic content, total flavonoid content, total anthocyanin content and antioxidant capacity were evaluated both for black mulberry fruit and for anthocyanin extract. Total phenolic content was measured 462.85 ± 35.35 GAE/100g fresh sample for black mulberry and 3224.30 ± 745.67 mg GAE/100g extract for anthocyanin extract, total flavonoid content was found 1349.26 ± 34.3 mg quercetin/100g fresh mulberry sample and 10421.30 ± 396.8 mg quercetin/100g anthocyanin extract, antioxidant capacity was measured as 1393.14 ± 40.6 mg trolox/100g fresh sample for mulberry and 15165.23 ± 117.99 mg trolox/100g sample for anthocyanin extract and finally total anthocyanin content was measured as 462.85 ± 35.35 mg Cy-3-gly/100 g mulberry sample and 3224.30 ± 745.67 mg Cy-3-gly/100 g extract. Obtained anthocyanin extracts were encapsulated by using ionic gelation method. In ionic gelation method, active component (anthocyanin extract obtained from black mulberry) was mixed with alginate solution till the solution homogenized. Then, beads (capsules) were formed by dripping alginate-athocyanin mixture into chitosan-calcium chloride solution by the help of a needle. Calcium ions from calcium chloride molecule were cross-linked with sodium ions from sodium alginate and also, opposite charged cationic chitosan and anionic alginate molecules were attached each other. Minitab 13.20 programme was used for response surface methodology and experimental design was created for 3 factors and 3 level by central composite design for 3 replicates in central points (3% extract, 0.3% chitosan and 30 minutes).

Extract content (1%, 3% and 5%), mixing time (15, 30 and 45 min.) and chitosan content (0.1%, 0.3% and 0.5%) were selected as dependent variables and aspect ratio, sphericity factor, encapsulation efficiency and release of active ingredient into gastric medium were determined as independent variables for experimental design conditions. To determine size and shape of beads, optic microscope was used to measure maximum and minimum diameters. Encapsulation efficiency was calculated by using total anthocyanin extract intended to loaded into capsules and released extract amount in the gelling medium. Release studies carried out only for gastric medium. Samples put into gastric medium (pH 1.2) in a shaking bath at 37°C for 2 hours and released anthocyanin content into simulated gastric medium (SGF) was determined by measuring absorbance with UV spectrophotometer.

The target of this experimental design is to obtain uniform beads (sphericity factor < 0.05 ve aspect ratio ~1) that are and resistant to acidic gastric medium with high encapsulation efficiency. The size of the beads were measured by optic microscope, encapsulation efficiency and release in gastric medium were analyzed with UV-spectrophotometer by measuring their absorbances. RSM results show that aspect ratio is between 1.043 – 1.118, sphericity factor is between 0.021 – 0.070, encapsulation efficiency is between ~54 – 70% and release in gastric medium is between 10 – 27%.

Regression coefficients and ANOVA results that were determined by statistical and data analysis proved that second order polynomial model was fit to the experimental design. ANOVA tables, contour plots and second order polynomial equations were formed. According to obtained data, extract content and chitosan content-mixing time interaction affect aspect ratio while time, extract content-mixing time, chitosan content-mixing time interactions have an important impact on sphericity factor ($p < 0.05$). While encapsulation efficiency was found dependent to all variables except extract-chitosan contents, extract content-mixing time and chitosan content-mixing time interactions, release in gastric medium was affected by time, extract-chitosan contents, extract content and time interactions significantly ($p < 0.05$). In general, when mixing time is increased release in gastric medium (SGF%) is also increased but encapsulation efficiency (EE%) is decreased in contrast. When mixing time is increased cross linking is more strong and bead structure is more rigid so SGF% is high but beads are exposed to calcium ions in dense gel structure for a longer time which result in the decreased EE%. Moreover, chitosan added into gelling medium can protect beads and rise EE% up to a specific level. However if chitosan content in gelling medium is too much has a negative impact on EE%. Experimental parameters were optimized as maximum encapsulation efficiency and minimum release in gastric medium and found like 1.96% extract content, 0.10% chitosan content and ~23 minutes. Method validation was done by comparing experimental and predicted results.

1. GİRİŞ

Tüketicilerin bilinçlenmesi ve eğitim oranının artmasıyla sağlıklı yaşam ve sağlıklı beslenmeye olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Sağlığa olumlu etkileri bilinen antioksidanlar, vitaminler, mineraller ve esansiyel yağlarla zenginleştirilmiş ürünlerin yanı sıra doğal ingrediyeuler içeren ve işlenmemiş ürünlere olan talebin artmasıyla bu tip ürünler markette yer almaya başlamıştır. Renklendiriciler gıda ve içecek endüstrisinde en çok kullanılan katkı maddelerinden olup yasal kullanım miktarları kısıtlı olan yapay renklendiricilere kıyasla doğal antosiyaninler ve beta karoten gibi doğal renklendiriciler gıda üreticileri ve tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Ayrıca antosiyaninler gibi fenolik bileşenler sağlığa olumlu etkileri olduğundan ürünlerin zenginleştirilmesinde de kullanılabilir. Fonksiyonel ürün üretilmesinde zenginleştirme amacıyla kullanılan bileşenin raf ömrü boyunca stabil kalması ve vücutta yararlı etkilerini gösterebilmesi için emiliminin yüksek olması gerekmektedir. Ancak fenolik maddeler gibi antioksidan özellik gösteren bazı bileşenler ısı, ışık, metal iyonları, diğer bileşenlerin varlığı gibi çeşitli çevresel faktörlere duyarlı olduklarından bu etkenler varlığında kolayca bozulabilmektedir. Ayrıca ürünlerin işlenmesi sırasında örneğin pastörizasyon gibi ısı işlem gerektiren koşullarda da kayıplar söz konusu olmaktadır. Antosiyaninler özellikle meyvelerde ve çiçeklerde bulunan kırmızı-mavi renk pigmentleri olup gıda sanayinde doğal renklendirici olarak kullanılan fenolik bileşenlerdir. Üzümsü meyveler olarak bilinen ahududu, böğürtlen, karadut, yaban mersini, kızılıık, vişne ve frenk üzümü yüksek miktarda antosiyanin içermesi sebebiyle tüketilmesi tavsiye edilen meyvelerdir. Bununla birlikte antosiyaninlerin pH, ısı, ışık, kopigmentler, metalik iyonlar ve şekere karşı hassas olmaları bunların yiyecek ve içeceklere eklenmesini kısıtlamaktadır. Enkapsülasyon gibi bazı yeni teknolojilerin biyoaktif maddeleri çeşitli etkenlerden koruyarak stabilitelerini ve biyoyarlılığını arttırdığı son yıllarda çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Enkapsülasyon biyoaktif maddelerin genellikle biyopolimerlerle kaplanarak kapsüller içine hapsedilmesi böylelikle aktif bileşeni koruyarak, belirli koşullarda ve

belirli hızlarda bunların salınmasını sağlayan teknolojidir. Enkapsülasyon uygulamalarında en sık kullanılan biyopolimerler aljinat ve kitosan olup, emülsiyon oluşturma, iyonik jelasyon, püskürtmeli kurutma, koazervasyon gibi çeşitli metotlarla uygulanmaktadır. İyonik jelasyon (damlatma) metodu çapraz bağlanma prensibiyle kalsiyum-aljinat taneciklerinin üretildiği kolay ve ekonomik bir yöntemdir. Enkapsülasyonda elde edilen kapsüllerin enkapsülasyon verimi, aktif maddenin ve kapsülün mide-bağırsak ortamındaki davranışları önemli olduğu gibi kapsüllerin şekli, boyutu ve yapısının düzgünlüğü (gözenekliliği) gibi bazı fiziksel özellikleri de kapsül karakteristiğini belirlemede kullanılır.

Bu tez çalışmasının amacı antosiyanin içeriği yüksek kara dut meyvesinden antosiyaninlerin ekstrakte edilerek damlatma yöntemi ile kalsiyum-aljinat tanecikleri içine hapsedilerek enkapsüle etmek böylelikle özellikle pH ve ısıl stabilitesi düşük olan renk pigmentlerinin stabilitesini arttırmaktır. Çalışmanın ilk kısmında karadut numunesinin toplam fenolik madde miktarı, flavonoid miktarı, antioksidan kapasitesi, toplam antosiyanin miktarı, pH, renk ve toplam kuru madde miktarı gibi bazı özellikleri belirlenmiştir. İkinci kısımda ise tepki yüzey metodu (RSM) kullanılarak enkapsülasyon işlemi için deneme deseni oluşturulmuştur. Deneysel tasarımda antosiyanin ekstraktı miktarı, jelleşme ortamına katılan kitosan miktarı ve kapsülleri karıştırma süresi bağımsız değişkenler olarak belirlenirken enkapsülasyon etkinliği, ekstraktın mide sıvısına salım oranı, kapsüllerin uzunluk oranı ve küresellik faktörleri ise bağımlı değişkenler olarak seçilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu tasarım için optimum koşullar belirlenmiştir.

2. DUT MEYVESİ VE ÖZELLİKLERİ

Dut, kuzey yarımkürenin sıcak ve astropikal (alt tropikal) bölgelerinde, güney yarımkürenin ise tropik bölgelerinde yetiştirilen geniş bir iklim, topografya ve toprak koşullarında yetişebilen bir meyvedir. Çin ve Hindistan gibi bazı ülkelerde, yapraklarının ipekböceği yemi olarak kullanılması amacıyla yetiştirilirken, Türkiye, İtalya ve Yunanistan'ın da içinde bulunduğu bazı ülkelerde ise meyve olarak tüketilmektedir (Ercisli ve Orhan, 2007). Karadut İran orijinli bir meyve olup kuzey Avrupa, güney Asya ve pek çok Akdeniz ülkesinde ekilir (Ercisli ve Orhan, 2008). Karadut yağ ve yağ asitleri, vitamin C, mineraller, fenolikler, flavanoidler, organik asitler, antosiyaninler gibi fitokimyasallar açısından önemli bir besin kaynağıdır. (Ercisli ve Orhan, 2008).

Dut (*Morus* spp.), Urticales takımının *Moraceae* familyasının *Morus* cinsinden olup en çok yetiştirilen türleri *M. alba* L. (beyaz) , *M. nigra* L. (siyah) , ve *M. rubra* L. (kırmızı)'dır. *Morus*'un 24 türü ve bir alt türü ile 100'den fazla çeşidi mevcuttur (Akbulut ve diğ, 2006).

Dut antosiyanin açısından zengin bir meyve olup Çin, Tayland gibi uzak doğu ülkelerinde olduğu kadar ülkemizde de yetiştirilen bir meyvedir. Türkiye'de toprak koşullarının dut yetiştiriciliğine elverişli olması, dutun 400 yılı aşkın bir süredir ülkemizde özellikle Anadolu'da yetiştiriciliğinin yapılmasını sağlamıştır (Ercisli ve Orhan, 2008). Türkiye'de dut üretimi daha çok Doğu Anadolu ve İç Anadolu bölgelerinde olup yaklaşık 80.000 ton/yıl dut hasadı yapılmaktadır. Şehirlere göre dut üretimi yoğunluğu incelendiğinde ilk sırada 7246 ton ile Erzincan gelmekte onu 5154 ton ile Ankara, 4329 ton ile Malatya ve 3950 ton ile Elazığ takip etmektedir (Akbulut ve diğ, 2006). Soğukta saklama süresi kısa olan bir meyve türü olduğu için genellikle işlenmiş şekilde tüketilmektedir. Üretilen dut meyvesi taze olarak, pekmez, pestil, kuru gıda ve reçel, ezme, sirke, meyve suyu üretiminde veya doğal renklendirici olarak değerlendirilmektedir. Ülkemizde yetiştirilen dutun önemli bir kısmı ise pekmez (%70) olarak kullanılmaktadır (Hepsağ ve diğ, 2012).

Dut, nar, üzüm gibi koyu renkli meyveler özellikle antosiyanin, karatenoid ve flavanoidler gibi fenolik maddeler açısından zengin besinlerdir. Dut içeriğinde bol miktarda bulunan antosiyaninlerin antitrombotik, antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik, antikarsinogen, iltihaplanmayı önleyici ve sinir sistemini koruyucu gibi sağlığa olumlu etkileri olup duta renk veren fenolik bileşenlerdir (Aramwit ve diğ, 2010). 100 g karadutta 93 kcal enerji, 0,9 g protein, 19,8 g karbohidrat, 1,1 g yağ, 0,9 g lif ayrıca 60 mg kalsiyum, 1,1 mg demir, 0,05 mg tiamin, 0,07 mg riboflavin, 0,2 g niasin ve 17 mg vitamin C bulunduğu belirtilmiştir (Hepsağ ve diğ, 2012). Gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak farklı uygulamalarda kullanılan dut antosiyaninleri genellikle kırmızı dut pigmentleri olarak adlandırılır (Wu ve diğ, 2011). Antosiyaninler kırmızı renk veren pigmentler oldukları için karadut antosiyanin bakımından en zengin dut çeşidi olurken, beyaz dutta antosiyanin bulunmamaktadır. Yetiştirildikleri yere ve genotiplerine göre farklılık göstermekle birlikte siyanidin bazlı (özellikle siyanidin-3-glikozit ve siyanidin-3-rutinosit) antosiyaninler dutta en fazla bulunan antosiyaninlerdir (Özgen ve diğ, 2009).

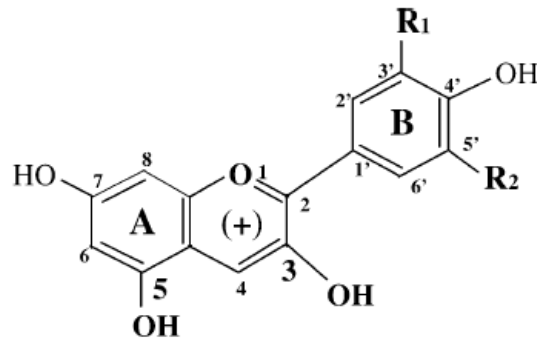
3. ANTOSİYANİNLERİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Antosiyaninler bitkilerde bulunan kırmızı, mor ve mavi renkli bileşenler olup düşük toksisiteye sahip olmaları bakımından gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde sıklıkla kullanılan renklendirici maddelerdir. Antosiyaninler pH, ısı, ışık, kopigmentler, metalik iyonlar, oksijen, askorbik asit, şeker, protein ve sülfür dioksit gibi etkenlere karşı duyarlı olduklarından renkleri ve stabiliteleri bu etkenler varlığında değişmektedir (Ersus ve Yurdagel, 2007). Ayrıca antosiyaninlerin biyoyararlılığı çok düşük olup (genellikle $<0,1\%$), vücutta emilimi çok çabuk gerçekleşmektedir. Bununla birlikte antosiyaninlerin büyük kısmı midede absorbe edilmektedir (McGhie ve Walton, 2007).

Antosiyaninler $C_6-C_3-C_6$ ana iskeleti ile flavanoidlerin en büyük ve yaygın grubuna dahil, doğada bulunan suda çözünebilir en önemli pigmentlerdir. Meyvelerde, sebzelerde, şarap, reçel gibi gıdalarda antosiyaninlerin ve diğer polifenollerin varlığı kronik kalp hastalıklarının azaltılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Günümüzde sağlıklı beslenmeye verilen önemin artmasıyla antosiyaninlerce zengin besinlerle beslenmeye olan ilgide doğru orantılı olarak artmıştır. Bilinen bu sağlık etkilerinin yanında doğal kaynaklardan elde edilen gıda boyaları hem tüketici tercihlerinde hem de yasal düzenlemelerdeki kullanışlılığı açısından sentetik ve yapay renklendiricilere kıyasla daha çok talep görmelerini sağlamaktadır. Ancak düşük ekstraksiyon yüzdesi ve işleme ve depolama sırasında ısı, ışık, oksijen, pH gibi etkenler sebebiyle kolaylıkla bozulmaları nedeniyle ticari olarak kullanımları kısıtlanmaktadır (Cavalcanti ve diğ., 2011). Ayrıca antosiyanin ekstraktlarının gıda ve içecek endüstrisinde kullanımı bu bileşenlerin kimyasal yapısına ve konsantrasyonuna, ayrıca pH, sıcaklık, oksijen, ışık, ortamın kompozisyonu (askorbik asit, kopigmentler ve şekerlerin varlığı v.s.) gibi çevresel faktörlere karşı düşük stabilite göstermesi nedeniyle de kısıtlıdır (Rosso ve diğ, 2007).

Antosiyaninler antosiyanidinlerin veya aglikonların glikozitleri olarak bulunurlar ve alifatik veya aromatik asitler bu glikozidik kısımlara bağlanabilirler. Antosiyaninler 2-fenil benzopirilyum tuzlarının glikosile polihidroksi ve polimetoksi türevleridir. Örneğin konjuge çift bağ içeren flavilyum katyonu (aglikon grubu) bu pigmentlere

özgü renkleri ile 500 nm civarında ışığı absorplama özelliği gösterirler. 31 monomerik antosiyanidinden 20 adedi doğada bulunmakta ve bunlardan pelargonidin (Pg), siyanidin (Cy), peonidin (Pn), delfinidin (Dp), petunidin (Pt) ve malvinidin (Mv) olarak bilinen 6 adet aglikon farklı şekerlerle glikozit oluşturmaktadır (Cavalcanti ve diğ., 2011). Antosiyaninler, flavilyum katyonunun B-halkasındaki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısına ve konumuna, moleküle bağlı şeker sayısına, şekerin türüne ve bağlanış pozisyonuna göre farklılık göstermektedir (Koca ve diğ, 2006). Antosiyaninler şekerlerin bulunduğu pozisyona göre isim alırlar. Şekil 3.1’de doğada en yaygın bulunan antosiyanin çeşitlerinin yapısı gösterilmiştir.



Aglikon	R ₁	R ₂	Renk
Pelargonidin	H	H	Turuncu
Siyanidin	OH	H	Turuncu-kırmızı
Peonidin	OMe	H	Turuncu-kırmızı
Delfinidin	OH	OH	Kırmızı
Petunidin	OMe	OH	Kırmızı
Malvinidin	OMe	OMe	Mavi-kırmızı

Şekil 3.1: Antosiyaninlerin kimyasal yapısı (Giusti ve Wrolstad, 2003).

Antosiyaninlere glikoz, galaktoz, ramnoz, arabinoz, rutinoz, sambubroz ve gentibioz gibi farklı şekerler bağlanabilir. Bu şekerler genellikle 3-hidroksil veya 3,5-hidroksil pozisyonuna bağlanmaktadır. Meyve ve sebzelerde en çok bulunan antosiyaninlerden

biri olan siyanidinin 3. pozisyonuna glikoz molekülünün bağlanması ile siyanidin-3-glikozit antosiyanini oluşmaktadır. Şeker gurupları bazen *p*-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, gallik veya *p*-hidroksibenzoik asit ve/veya alifatik asitler (malonik, asetik, malik, suksinik veya okzalik asitler) gibi aromatik asitlerle açillenmiş halde bulunabilirler. Bu açıl gruplar genellikle C3 şekere bağlanırlar, 6-OH'a esterifiye olurlar veya nadiren şekerlerin 4-OH grubuna bağlanırlar (Giusti ve Wrolstad, 2003).

Antosiyaninler metanol, etanol, aseton ve su gibi pek çok polar çözücünde çözünebilmektedir. Ekstraksiyon çoğunlukla elde edilen ekstrakt çözeltisinde şeker, şeker alkolleri, pektin, organik asitler, amino asit ve proteinle gibi yan ürünleri de içerdiğinden seçici olmayan bir işlemdir. Bu safsızlıklar antosiyanin degradasyonunu (bozulmasını) hızlandırabilmekte ve diğer işlemlerde problemlere yol açabilmektedir (Denev ve diğ, 2010).

Antosiyaninler antioksidan aktivitesi yüksek bileşenler olup, metal iyonlarıyla şelat oluşturma ve protein bağlama özelliği gösterirler. Aglikonlar (antosiyanidinler) ve bunlara bağlı şeker gruplarının yeri ve sayısı antioksidan aktiviteyi etkilemektedir. Genel olarak antosiyanin yapısındaki hidroksil sayısının artması, B halkasındaki o-hidroksi yapı, 3. ve 4. karbona -OH'lerin bağlanması ile antioksidan aktivitenin arttığı görülmüştür (Koca ve diğ, 2006).

3.1 Antosiyaninlerin Stabilitesini Etkileyen Faktörler

Antosiyaninler pH, ışık, ısı, kopigmentler, şeker, asit ve metalik iyonlar gibi pek çok çevresel etkiye karşı duyarlı ve stabiliteyi bu etkenler dolayısıyla kısıtlanmış bileşenler olarak bilinmektedirler.

3.1.1 Antosiyanin yapısı

Aglikona bağlı glikozil birimi ve açıl grupları ile bağlanma bölgeleri antosiyanin molekülünün stabilitesini ve reaktivitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bunların yanında aglikondaki hidroksil ve metoksil grupların sayısı ve yerleşimi ile hidroksilasyon derecesi de bu pigmentlerin kimyasal yapısını ve stabilitesini etkilemektedir (Cavalcanti ve diğ., 2011). Antosiyaninlerin stabilitesi B halkasındaki metoksil sayısı arttıkça yükselirken, hidroksil sayısı arttıkça azalır. Antosiyanidinler arasında en stabil türün malvinidin olduğu belirtilirken, malvidini sırasıyla peonidin, petunidin, siyanidin ve delfinidin izlemektedir. Şekerlerin glikozilasyonu ve

açilasyonu da stabiliteyi arttırdığından diglikozitler monoglikozitlere kıyasla daha kararlıdır (Escribano-Bailon ve diğ., 2004).

3.1.2 pH etkisi

Antosiyaninler pH'a bağılı olarak farklı kimyasal formlarda ve buna bağılı olarak da farklı renklerde bulunurlar. pH 1'de flavilyum katyonu (kırmızı renk) baskın olup kırmızı ve mor renklere katkı sağlar. pH 2-4 aralığında proton kaybı sebebiyle kuinoidal baz mavi tür, pH 5-6'da ise karbinol psödobaz ve kalkon olmak üzere iki renksiz tür gözlenir. Antosiyaninler asidik pH'larda stabilken pH 7'den yüksek olduğunda degrade olmaya başlar (Castañeda-Ovando ve diğ., 2009). Antosiyaninlerin asidik pH'da stabil olmaları bunların daha çok meyve suları gibi asitli gıda ürünlerinde kullanımını mümkün kılmaktadır. Farklı meyve sularının matriks olarak kullanıldığı bir çalışmada pH'ı 2, 3, 4, 5 ve 6 olan sıvı sistemler kullanılmış ve tatlı mor patates antosiyaninlerinin en çok pH 3 ve 4'te ve elma ile armut sularında stabil olduğu belirlenmiştir (Jie ve diğ., 2012).

3.1.3 Sıcaklık

Meyve/ sebze suyu veya püresi gibi antosiyanin içeren gıdalara dayanıklılıklarının arttırılması ve raf ömrünün uzatılması amacıyla pastörizasyon ve haşlama gibi ısı işlemleri uygulanır. Ancak işleme ve depolama sırasındaki sıcaklık artışı antosiyaninlerin stabilitesini düşürmektedir. Isıya bağılı bozulma sonucu özellikle oksijen varlığında ürün rengi kahverengileşmektedir (Cavalcanti ve diğ., 2011). Furfural, karamel ve maillard reaksiyon ürünleri gibi esmerleşmeden sorumlu parçalanma ürünlerinden furfuralın antosiyanin degradasyonundan sorumlu olduğu belirlenmiştir. Isı ile birlikte ısıtma süresi, pH ve reaktanların konsantrasyonları da esmerleşme reaksiyonlarında göz önüne alınmalıdır (Tsai ve diğ., 2005). Siyah havuç antosiyaninleri ile renklendirilen çeşitli meyvele suları ve nektarları üzerinde ısı etkisinin incelendiği bir çalışmada elma ve üzüm gibi meyvelerin suları ile şeftali ve kayısı nektarları, daha yüksek miktarda askorbik asit içeren turunçgiller ile yapılan meyve sularına kıyasla 70 ve 80°C'deki ısıl stabiliteleri daha iyidir (Kırca ve diğ., 2006).

3.1.4 Işıık

Işıık antosiyaninlerin biyosentezi için gerekli olmakla birlikte antosiyaninlerin bozulmasını da hızlandırmaktadır. Antsiyaninler karanlık ortamda renklerini çok daha iyi korurken, özellikle şeker varlığında fenolik ve antosiyanin içerikleri ışığa bağılı olarak azalmaktadır (Cavalcanti ve diğ, 2011). Ayrıca açillenmiş diglikozitlerin diğelerine göre daha kararlı olduğı belirtilmiştir. Işığın renk stabilitesine etkisinin incelendiğı bir çalışmada, floresan ışığın antosiyanin bozulmasını hızlandırdığı, sinapik asit, kafeik asit ve biberiye polifenol ekstraktı ile kopigmente antosiyaninlerin doğal ve ferulik asit ile kopigmente antosiyaninlere kıyasla daha yavaş bozulduğı gösterilmiştir (Sari ve diğ, 2012).

3.1.5 Konsantrasyon

Artan antosiyanin konsantrasyonu daha yüksek renk stabilitesi sağlar. Renk stabilizasyonunda belirli antosiyaninlerin farklı türlerinden ziyade toplam antosiyanin konsantrasyonunun daha önemli olduğı belirtilmiştir (Cavalcanti ve diğ., 2011).

3.1.6 Şeker

Antosiyanin stabilitesini genellikle şeker ilavesi ile azalmaktadır ancak bunun aksini kanıtlayan çalışmalarda literatürde mevcuttur. Örneğın, sukroz konsantrasyonunun %20 arttırılması ile çilek antosiyaninlerinin stabilitesinin arttırıldığı belirtilmişken, üzüm, mürver ve siyah frenk üzümü ekstraktlarının antosiyanin stabilitesi farklı pH'lardaki sukroz eklenmiş sistemlerde kontrol numunesine kıyasla daha düşüktür. (Rosso ve diğ, 2007). Buna karşılık şeker ilavesinin bazı meyve ekstraktlarında antosiyanin stabilitesini olumsuz etkilediğini veya içecek model sistemlerinde termal veya ışık stabilitesini değıştirmedini belirten çalışmalar da mevcuttur (Rosso ve diğ, 2007). Şeker ilavesinin dışında ısı etkisiyle oluşan HMF (5-hidroksimetilfurfural) gibi furfural türevleri renk pigmentlerinde kayıplara ve stabilite azalmaya neden olabilmektedir (Sadilova ve diğ, 2009).

3.1.7 Kopigmentasyon

Flavonoidler, alkaloidler, organik asitler gibi kopigment davranışı gösteren moleküller renksiz moleküller olup, antosiyanin çözeltisine eklendiklerinde bu çözeltinin rengini arttırma ve stabilize etme özelliği gösterirler (Gradinaru ve diğ, 2003). Kopigmentlerin esas rolü renkli flavilium (flavylium) katyonunu su molekülünün nükleofilik saldırısına karşı korumaktır (Bordignon-Luiz ve diğ, 2007).

Antosiyaninlerin renkleri kopigmentasyon reaksiyonları ile stabilize edilebilir. Antosiyanin kopigmentasyonu doğal antosiyanine göre daha mavi, parlak, güçlü ve stabil renkler sağlayabilir. Kopigmentasyon bir organik asit, aromatik açıl grup veya bir flavonoidin (veya bunların kombinasyonunun) antosiyanin kromoforuna (renk yapıcı) kovalent bağlanmasıyla molekül içi interaksyonlar, renksiz flavonoidlerin veya diğer fenolik bileşenlerin zayıf hidrofobik güçlerle antosiyaninlere interaksyonu ile moleküler arası interaksyon kaybı, metal kompleks oluşturma ve kendiliğinden birleşme (self-association) gibi çeşitli yollarla görülebilir. Elde edilen kopigmentler flavonoidler, organik asitler, metaller ve diğer antosiyaninler olabilir (Sari ve diğ, 2012).

3.1.8 Askorbik asit

Askorbik asit ile antosiyanin bozulmasına ilişkin çok sayıda çalışma mevcut olmakla birlikte farklı görüşler söz konusudur. Askorbik asitin oksidasyon yoluyla H_2O_2 oluşumu sebebiyle pirilyum halkasında kırılması ile pigment degradasyonunu arttırdığına ilişkin çalışmalar mevcut olduğu gibi askorbik asidin koruyucu etkisini kanıtlayan bilgiler de elde edilmiştir (Sadilova ve diğ, 2009).

3.1.9 Metalik İyonlar

Flavylium tuzu ve metal arasındaki şelat oluşumu renk stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Antosiyaninlerin B halkasındaki (siyanidin, delfinidin v.s.) o-di-hidroksil grubu metal-antosiyanin kompleksi yapabilme özelliği gösterir. Bazı bitkilerdeki mavi renk antosiyaninlerin alüminyum, demir ve bakır gibi metallerle kompleks oluşumu ile kararlılık sağlamaktadır (Castaneda-Ovando, 2009)

4. ENKAPSÜLASYON TEKNOLOJİSİ VE ÖZELLİKLERİ

Enkapsülasyon katı, sıvı ve gaz malzemelerin kaplanarak kapsüller içinde tutulması ile çok küçük bir maddeyi veya tüm ingrediyei koruyarak, belirli koşullarda ve belirli hızlarda bunların salınmasını sağlayan teknolojidir (Wang ve diğ, 2009). Kaplanan malzeme “aktif” veya “öz” mazleme, kaplamada kullanılan malzeme ise “kabuk”, “taşıyıcı” veya “enkapsülant” olarak adlandırılır (Wang ve diğ, 2009).

Enkapsülasyon teknolojilerinin temel prensipleri ikiye ayrılır:

- Aktif ingrediyei bir polimer çözeltisi içinde karıştırılır ve ince damlacıklar halinde dağılır, damlalar jelasyon, kurutma, soğutma, koaservasyon gibi tekniklerle katılaştırılır.
- Katı toz parçacıklar akışkan yatakta karıştırılır, kaplama çözeltisi püskürtülerek uygulanır, kurutma veya soğutma ile katılaştırılır

Enkapsülasyonda aktif bileşenin kaplanmasında çeşitli teknikler kullanılabilmektedir. Bu teknikler üç başlık altında incelenebilir:

- 1- Fiziksel prosesler: püskürtmeli kurutma, ekstrüzyon, akışkan yataklı kaplama ve püskürtmeli soğutma
- 2- Fizikokimyasal prosesler: basit veya karmaşık koaservasyon ve lipozom içine hapsedme
- 3- Kimyasal prosesler: Arayüz polimerizasyonu ve moleküler inklüzyon (Carvajal ve diğ, 2010)

Enkapsülasyon ile depolama veya proses sırasında meydana gelen fonksiyonellik kaybı, aktif bileşen ve kabuk arasındaki uyumsuzluk, kötü aroma, koku oluşumu, yapı bozulması, enzim aktivitesi kaybı azaltılabilir veya engellenebilirken, nem kontrolü, oksidasyona karşı koruma, çoklu aktif ingrediyei ardışık dağıtımı sağlanır ve biyoyararlılık artırılır (Carvajal ve diğ, 2010)

4.1 Enkapsüle Edilen Bileşenler (Aktif Maddeler)

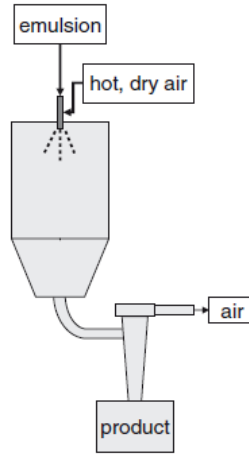
Enkapsülasyon teknolojisinde belirlenen amaç doğrultusunda pek çok aktif madde enkapsüle edilerek korunabilir. Enkapsülasyon uygulamalarında en çok kullanılan aktif bileşenler şöyledir:

- Vitaminler ve mineraller
- Enzimler ve proteinler
- Organik asitler
- Probiyotikler ve prebiyotikler
- Esansiyel yağlar
- Tatlandırıcılar, koruyucular, renklendiriciler, aromalar
- Yağ asitleri (ω -3, konjuge linoleik asit)
- Karotenoidler (β -karoten, likopen)
- Antioksidanlar (tokoferol, flavonoidler, polifenoller)

4.2 Enkapsülasyon Metotları

4.2.1 Püskürtmeli kurutma

Püskürtmeli kurutma enkapsülasyon teknolojisinde kullanılan en eski ve en yaygın metottur. Bu yöntemin ekonomik, kullanışlı ve sürekli olması, işlem sonucunda iyi kalitede partiküller elde edilmesi nedeniyle gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Nişasta, maltodekstrin ve gıdalar taşıyıcı malzeme olarak kullanılır (Fang ve Bhandar, 2010). Aljinat, CMC, guar gum ve kitosan gibi polisakkaritler sodyum kazeinat, peynir altı suyu protein, soya protein gibi proteinler de püskürtmeli kurutma yönteminde kaplama materyali olarak kullanılabilir ancak suda çözünürlüklerinin düşük olması ve pahalı olmaları bu yöntem için dezavantajdır (Gouin, 2004). Kaplanacak material taşıyıcı sistem ile homojenize edildikten sonra püskürtmeli kurutucuya verilir ve atomize döner başlığı sıcak hava ile temas eden su buharlaşırken, kapsüller kurutulur. Şekil 4.1.'de püskürtmeli kurutucu sistemi gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Püskürtmeli kurutma sistemi (Zuidam ve Shimoni, 2010).

Elde edilen kapsüllerin boyutu 10 -100 mikrometre aralığındadır. Bu yöntemin dezavantajları ise kullanılan suda çözünebilir kaplama malzemesi çeşitliliğinin kısıtlı olması, ayrıca ısıya duyarlı biyoaktif maddelerin yüksek sıcaklıkta kolaylıkla bozulmasına sebep olmasıdır (Fang ve Bhandar, 2010).

Püskürtmeli kurutma kaplanacak aktif maddeyi içeren çözelti veya dispersiyonun atomizasyon prosesi ile sıcak-soğuk hava akışı ile temas eden damlacıkların kurutulması temeline dayanır. Elde edilen parçacıklar genellikle küresel olup topolojisi kullanılan polimere bağlıdır. Molekülün tutulması ve salım profilleri polimerin uzunluğu ve tipi modifiye edilerek optimize edilebilir (Gonnet ve diğ, 2010).

Her ne kadar püskürtmeli kurutma yönteminin ısıya duyarlı biyoaktif maddeler için (yağlar v.s.) uygun olmadığını belirten çalışmalar olsa da kurutucudaki temas süresinin kısa olması bu etkiyi minimuma indirmektedir (Vidhyalashmi ve diğ, 2009).

Atomize edilen damlacıkların boyutu sıvının yüzey gerilimine ve viskozitesine, enjektördeki basınç düşmesine ve püskürtmenin hızına bağlıdır. Taşıyıcı olarak kullanılan malzeme, aktif materyali koruyabilmeli, suda çözünürlüğü yüksek olmalı, moleküler ağırlık, camsı geçiş, kristalinite, difüzyon gücü, iyi film oluşturma kapasitesi, iyi emülsiyon oluşturma özelliği, düşük maliyetli olmalıdır (Zuidam ve Shimoni, 2010).

4.2.2 Koaservasyon

Koaservasyon metodu bir veya daha fazla hidrokolloidin başlangıç çözeltisinden faz ayrımı ve yeni oluşan koazervat fazın aktif ingrediye etrafında aynı reaksiyon ortamında süspanse veya emülsifiye olmasıdır. Bu yöntemde basitçe sadece bir kolloid (jelatin gibi) madde kullanılabileceği gibi daha kompleks proseslerde jelatin ve gam akasya (arabik) kombinasyonu da kullanılabilir (Fang ve Bhandar, 2010). Gam arabik yerine karboksimetil selüloz, pektin, karagenan, aljinat veya polifospat gibi negatif yüklü moleküller, jelatin yerine ise süt proteinleri kullanılabilir (Zuidam ve Shimoni, 2010). Koaservasyon pahalı bir enkapsülasyon yöntemi olsa da polifenoller gibi dayanıksız fakat yüksek değerli biyoaktif maddelerin enkapsülasyonunda kullanılabilmektedir (Fang ve Bhandar, 2011). Koaservasyon genellikle aroma yağlarının enkapsülasyonunda kullanılırken, balık yağı, vitaminler, koruyucular ve enzimler için de kullanışlı bir metottur. Bu yöntemin diğer enkapsülasyon metotlarına göre avantajlı yönlerinin olmasının yanında ticarileştirilmesinin pahalı olması, karmaşık bir proses olması ve ikincil kabuki materyali olarak pek çok ülkenin yasal düzenlemesinde kullanımı kısıtlı olan gluteralehit kullanımı gerektirmesi gibi bazı problemler vardır (Gouin, 2004).

Basit koaservasyonda sadece tek tip polimer kullanılırken kompleks koaservasyonda iki veya zıt yüklü birden fazla polimer kullanılır. Koaservasyon polimerlerin çözünürlüğünü etkileyen ısı, tuz ilavesi veya zıt yüklü polimerler kullanımı gibi çevresel faktörler aracılığıyla başlatılmaktadır (Gonnet ve diğ., 2010). Kompleks koaservasyon çeşitli oranda jelatin ve gam arabik içeren yağ/su emülsiyonu ve herbir polimerin % 2-4'ü karışır durumdaki kapta $> 35^{\circ}\text{C}$ 'de pH'ın 7'den 4'e ayarlanması ile su fazında çözünür duruma gelmesi ile elde edilir. Böylece birbiriyle karışmayan üç fazlı (yağlı faz, polimerce zengin faz ve polimerce fakir faz) bir sistem elde edilir. Kompleks koaservasyon pH ayarlanmasına alternatif olarak yağın jelatin çözeltisinde emülsifiye edilmesi ve karışıma gam arabik eklenmesinin ardından suyla seyreltme şeklinde dilüsyon (seyreltme) yöntemiyle de yapılabilir. Sıcaklığın düşürülmesiyle jelatin katılaşıp kabuk oluşturur. Polimer konsantrasyonu, pH, sistemin türbülansı, emülsiyon büyüklüğü, iyonik güç ve sıcaklık koaservasyon hazırlık prosesini etkileyen faktörlerdir. (Zuidam ve Shimoni, 2010). Bu yöntemin enkapsülasyon etkinliği % 60 ve kaplanan kapsüllerin boyutu 30 – 100 nm aralığındadır (Acosta, 2009).

4.2.3 Emülsiyon oluşturma

Emülsiyon kinetik olarak stabil ve birbiriyle karışmayan iki fazın (yağ ve su), sıvılardan birinin diğeri içinde çok küçük damlacıklar halinde dağıtılması ile elde edilir.

Yüksek hızlı karıştırıcı ve homojenizatör emülsiyon oluşturmada kullanılan cihazlardır. Suda çözünür ingrediye nler su/yağ emülsiyonları veya su/yağ/su gibi çift emülsiyonlar ile enkapsüle edilebilir. Yağ/su emülsiyonları sulu fazın hacmini ve böylece sudaki tat moleküllerinin konsantrasyonunu de ğiştirerek tadı etkilemektedir. Likopen, beta karoten, steroller ve yağda çözünen vitaminler yağ/su emülsiyonları oluşturularak veya püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma yöntemleri ile kurutulularak toz formda gıdalara katılabilmektedir. Ayrıca emülsiyon oluşturma ekstrüzyon ve koazervasyon gibi diğ er enkapsülasyon yöntemlerinin bir parçası olarak da karşımıza çıkmaktadır (Zuidam ve Shimoni, 2010).

Elde edilen damlacıkların çapı genellikle 0,1 - 100µm aralığındadır. Yağ damlacıklarının sulu fazda dağıtıldığı sistemler suda yağ (yağ/su) emülsiyon, su damlacıklarının yağ fazında dağıtıldığı sistemler ise yağda su (su/yağ) emülsiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bunların yanı sıra çok katmanlı emülsiyonlarda elde etmek mümkündür. Ayrıca emülsiyonların stabilitesini arttırmak için bazı emülgatörler de kullanılabilir. (Fang ve Bhandar, 2010).

Başlangıç damlacık konsantrasyonu ve büyüklük dağılımı damlacıkları stabilize etmede kullanılan emülgatöre ba ğlıdır. Emülgatör seçimi, yük, kalınlık, reoloji ve çevresel tepkiler (pH, iyonik güç, sıcaklık, enzim aktivitesi v.s.) arayüz özelliklerini kontrol etmek açısından önemlidir. Klasik emülsiyonların damlacık çapı 100 nm – 100µm aralığındayken, nanoemülsiyonlar 10 nm – 100 nm aralığında de ğişmektedir. Nanoemülsiyonlar klasik olanlara göre daha stabil ve görünüş olarak transparan-berrak ve aktif maddeyi salım hızları daha yüksekken yüzey alanları daha geniş oldu ğu için kimyasal reaksiyonlara girme hızı yüksektir. Bu nedenle nanoemülsiyonların biyoyararlılıklarının daha yüksek oldu ğu belirtilmiştir (McClements ve Li, 2010).

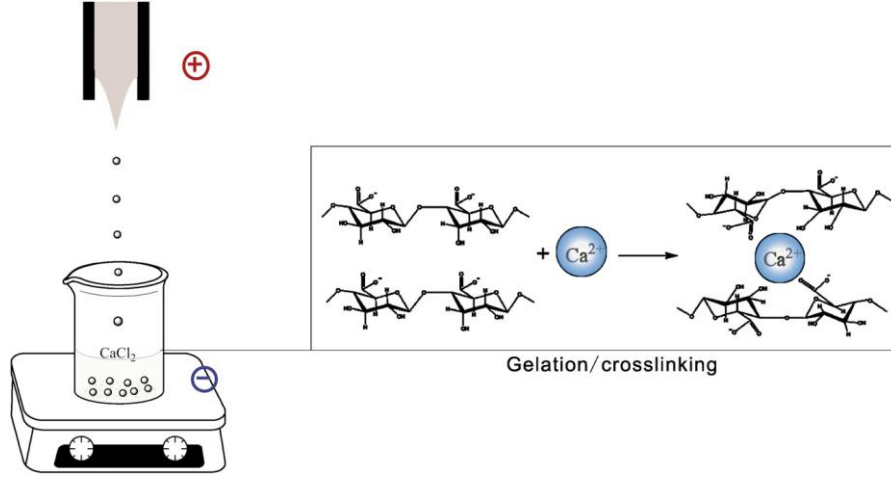
4.2.4 Dondurarak kurutma

Dondurarak kurutma aynı zamanda liyofilizasyon olarak da bilinen ısıya duyarlı bileşenlerin ve aromaların dehidrasyonunda kullanılan bir metottur. Numune -90 ile -40°C'ye dondurulur ve düşük basınç ile düşük sıcaklık altından süblimleşme yoluyla kurutulur. Bu yöntemde aktif bileşen ve taşıyıcı malzeme suda çözünür ve porlu yapıda dondurarak kurutulmuş ürünler elde edilir. Dondurarak kurutmanın dezavantajları yüksek enerji kullanımı ve uzun işlem süresi gerektirmesi, göreceli olarak pahalı bir yöntem olması (püskürtmeli kurutmadan 30-50 kat pahalı) ve açık delikli yapıda kapsüller elde edilmesi sebebiyle iyi bariyer özellikleri taşınamamasıdır (Zuidam ve Shimon, 2010). Ancak suda çözünen bileşenler, doğal aromalar ve ilaçların enkapsülasyonu için basit bir teknik olması ve ısıya duyarlı biyoaktif maddeler için avantajlı olması nedeniyle tercih edilmektedir (Fang ve Bhandar, 2010).

4.2.5 Damlatma (iyonik jelasyon) metodu

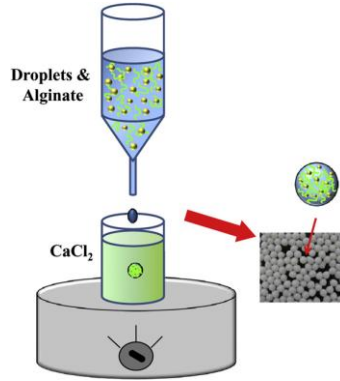
Damlatma veya iyonik jelasyon metodu pratik ve ekonomik bir yöntem olup çok miktarda ürün üretimine elverişli olmadığı için daha çok laboratuvar uygulamalarında tercih edilmektedir. Bu metotta, polimer çözeltisi ile aktif madde homojenize edilerek şırınga vasıtasıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl_2 gibi) damlatılır.

Damlatma metodu kalsiyum - aljinat taneciklerinin elde edilmesinde kullanılan metot olup, çapraz bağlanma CaCl_2 molekülündeki kalsiyum ile sodyum aljinat molekülündeki sodyumun bağlanması prensibine dayanır. Şekil 4.2.'te kalsiyum ve sodyum iyonları arasındaki çapraz bağlanma mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 4.2: Jelasyon/kalsiyum-aljinat çapraz bağlanma mekanizması (Shi ve diğ, 2011).

Biyopolimer çözeltisinin başka bir çözeltiye damlatılarak jelasyon oluşumu gözlenir. Aljinatın yanı sıra pektin çözeltisinin kalsiyum çözeltisine damlatılması (iyonik jelasyon), kitosan çözeltisinin tripolifosfat çözeltisine damlatılması (iyonik jelasyon), peynir altı suyu proteininin sıcak sıvıya damlatılması (sıcak jelasyon) veya jelatin çözeltisinin soğuk sıvıya damlatılması (soğuk jelasyon) ile de mikrotanecikler elde edilebilmektedir (Matalanis ve diğ, 2011). Damlatma sistemine ait görsel Şekil 4.3'te belirtilmiştir.



Şekil 4.3: Damlatma sistemi (McClements ve Li, 2010.).

Bu yöntem lab ölçekte üretiminin çok kolay olması, hidrofilik veya hidrofobik, ısıya duyarlı, akışkan veya viskoz, katı veya sıvı hemen hemen tüm ingrediyenlerin bu metotla enkapsüle edilebilmesi gibi olumlu özelliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Bu avantajlarının yanında küçük miktarda kapsül elde edilmesi ne kadar kolay olsa da prosesin büyütülmesi çok zor ve maliyetlidir. Ayrıca elde edilen kapsüller çok gözenekli olduğundan aljinat matriksinden suyun veya başka bir

sıvının giriş çıkışı yoluyla difüzyonuna çok müsaittir (Gouin, 2004). Negatif yüklü aljinat ile zıt yüklü kitosan yarı geçirgen bir membran oluşturarak kapsül yüzeyinin daha düzgün ve suda çözünür molekülleri daha az geçiren bir yapı oluşturmaktadır (Nualkaekul ve diğ, 2012). Son yıllarda geliştirilen şırınga – ekstrüzyon sistemi (hava jeti, elektriksel, potansiyel ve titreşimli üniteler ile aljinat akışını sağlayan) gibi bazı teknolojiler sayesinde yüksek miktarda aljinat tanecikleri üretilerek enkapsüle gıda ingrediyei içeren aljinat taneciklerin ticarileştirilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir (Gouin, 2004).

Kalsiyum-aljinat taneciklerinin üretilmesinde tercih edilen aljinat konsantrasyonu % 0,6 – 3 aralığındayken kalsiyum klorür çözeltisi 0,05 – 1,5 M olarak kullanılmaktadır. Üretilen kapsüllerin büyüklüğü şırınga çapına, titreşim sistemine, aljinat çözeltisinin viskozitesine ve kalsiyum klorür çözeltisi ile şırınga arasındaki mesafeye bağlıdır. (Nualkaekul ve diğ, 2012).

Sistemde bulunan kalsiyum miktarına bağlı olarak zincirler (bağlar) arasındaki ilişki kalıcı veya geçici olabilir. Kalsiyum miktarı düşük olduğunda bağlanma geçici olurken yüksek viskozitede tiksotropik (akışkanlığı hıza bağlı artan) çözeltiler elde edilmektedir. Daha yüksek kalsiyum seviyelerinde ağların kalıcı olması nedeniyle çökelme veya jelasyon oluşumu gözlenmektedir. Kimyasal yapı, moleküler büyüklük, jel oluşturma kinetiği ve katyon gözeneklilik, şişme davranışı, stabilite, biyobozunurluk, jel oluşturma kapasitesi ve biyouyumluluk gibi fonksiyonel özellikler üzerinde önemli derecede etkilidir (George ve Abraham, 2006).

Aljinatın iyonik jelasyonda tek başına kullanımı ile gözenekli, açık kafes yapısında tanecikler elde edildiğinden, düşük moleköl ağırlıklı ve suda çözünebilen ilaçların enkapsülasyonunda düşük tutulma kapasitesine sebep olmaktadır (Wong ve diğ, 2002). Bu taneciklerin kitosan gibi başka polimerlerle kaplanması raf ömrü boyunca stabilitelerinin ve biyolojik sıvılarda yarı ömürlerinin iyileştirilmesinde rol oynamıştır. Katyonik kitosan molekölündeki amin grupları ile anyonik aljinat molekölündeki karboksil grupları arasındaki etkileşim ile iyonik jelasyon aracılığıyla aljinat-kitosan kompleksleri oluşturulabilmektedir (Gazori ve diğ, 2009). Bu kompleks kapsül içindeki aktif maddeyi koruyup salımını kısıtlayarak aljinat veya kitosanın tek başına kullanıldığı sistemlere kıyasla çok daha etkili olmaktadır.

Aljinat-kitosan kaplı tanecikler ilaçların, oligonükleotidlerin, proteinlerin ve hücrelerin enkapsülasyonunda kullanılmıştır (Gazori ve diğ, 2009).

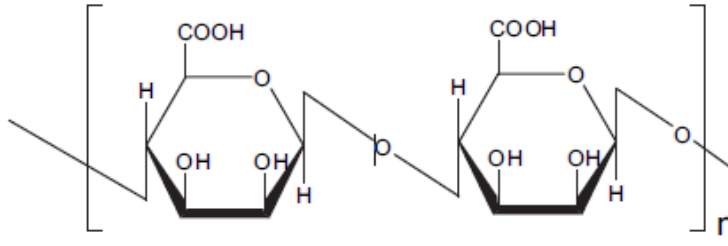
4.3 Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri

Taşıyıcı sistemin sahip olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir;

- İstenilen miktardaki fonksiyonel ajanı etkili bir şekilde enkapsüle edebilmeli ve onu hapsedebilmelidir.
- Fonksiyonel ajanı aktif halde kalabilmesi için kimyasal bozulmalardan korumalıdır.
- Fonksiyonel ajanın salınımını kontrol edebilmelidir.
- Onu çevreleyen gıda veya içecek matriksi ile uyumlu olmalı, ürünün görünüşünde, reolojisinde, tadında ve raf ömründe olumsuz bir etkiye neden olmamalıdır.
- Üretim, depolama, taşıma ve işleme boyunca meydana gelebilecek çevresel etkilere karşı dirençli olabilmelidir.
- Genel olarak güvenli olarak kabul edilen (GRAS) statüsündeki ingrediyenler ile düşük maliyetli proses uygulamaları kullanılarak hazırlanmalıdır.
- Enkapsüle materyalin biyoyararlılığına ters bir etki göstermemelidir (McClements, 2009).

4.3.1 Aljinat

Aljinat enkapsülasyon uygulamalarında en çok kullanılan polisakkaritlerden biri olup *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera* gibi kahverengi yosunlardan elde edilir. Ticari aljinatlar çoğunlukla Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ve Na^+ katyonlarının tuzları şeklinde bulunmaktadır (George and Abraham, 2006). Sodyum aljinat, α -L-guluronik asit ve β -D-mannuronik asit içeren lineer doğal bir polisakkarit olan ve suda çözünebilen aljinik asit tuzudur (Wong ve diğ, 2002). Sodyum aljinatın sulu ortamda Ca, Zn, Sr^{2+} ve Ba^{2+} gibi iki iyonlu katyonların varlığında jel ve jel kürecikleri oluşturduğu bilinmektedir (George ve Abraham, 2006; Gong ve diğ, 2011; Wong ve diğ, 2002). Şekil 4.4'te aljinat molekülünün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Aljinatın yapısı (Vos ve diğ, 2010).

Aljinatın fiziksel özellikleri kompozisyonuna, moleküler ağırlığına ve zincir uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (George ve Abraham, 2006). Aljinat gıda sanayinde jel oluşturma kapasitesinin yanında kıvam verici, emülgatör ve stabilizatör olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca FDA tarafından GRAS (generally regarded as safe) grubunda gösterilmiştir. Gluronik asit ve mannuronik asit oranı (G/M) türden türe değişkenlik göstermekte olup farklı mekanik stabilite sağlamaktadır (Vos ve diğ, 2010). G blokları buruşuk şekilde M-blokları ise geniş şerit gibi bir şekle sahiptir. İki G- blok bölgesi yan yana sıralandığında kalsiyum iyonlarının bağlanabileceği boyutlarda ve yapıda kristal şekilde bir delik meydana gelmektedir (George ve Abraham, 2006).

Kalsiyum aljinat tanecikleri biyoaktif bilşenlerin, ilaçların, proteinler, enzimleri v.s. kontrollü salınımlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aljinattaki gluronik asidin sodyum iyonları ile kalsiyum gibi çift iyonlu bir katyonun yer değiştirmesi sonucu çapraz bağlanma ile “yumurta kutusu” yapısındaki kalsiyum aljinat kürecikleri elde edilmektedir. Bu aljinat matriksi düşük pH’da stabil olup gastrik koşullara kısmen dayanıklıyken ince bağırsak gibi yüksek pH’lı bir ortamda şişip dağılmaktadır (Sang-Ho Yoo, 2006).

4.3.2 Kitosan

Kitosan doğal lineer katyonik bir polisakkarit olup kabuklu deniz canlılarının kabuğundan, böceklerin kütiküllerinden ve belirli fungusların hücre duvarında bolca bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. N-acetyl-D-glucosamine ve β -(1,4)-linked D-glucosamine birimlerinin rastgele dağılmasıyla oluşur (Luo ve diğ, 2011).

Kitosan, aljinatla birlikte biyouyumluluk, düşük toksisite/toksik olmaması ve biyobozunurluk gibi özellikleri dolayısıyla gıda uygulamalarında ve ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan en iyi kaplama malzemelerinden biridir (Abreu ve diğ, 2008; Lee ve diğ, 2012). N-asetil-D-glikozamin ve D-glikozamin oranları kitosanın özelliklerinin, biyobozunurluğunun ve biyolojik rolünün belirlenmesinde kullanılır (George ve Abraham, 2006). Kitosan katyonik yapısı sayesinde kolesterol düşürücü ve zayıflatıcı formülasyonlarda yağ bağlayıcı olarak da kullanılmaktadır (George ve Abraham, 2006).

Kitosan asidik pH'larda çözünebilirken yüksek pH'larda stabildir. pH'a duyarlı olarak şişme/büyüme mekanizması kitosanın düşük pH koşullarında amin gruplarının protonasyonunu içermektedir. Bu protonasyon zincir itme, proton difüzyonu ve karşıt yükün su ile birlikte jelin içine nüfuz etmesi ve ikincil yapının bozulmasına neden olmaktadır (George ve Abraham, 2006).

4.3.3 Karagenan

κ -karagenanlar α -(1,3) ve β -(1,4) glikozidik bağlarıyla bağlı tekrarlı D-galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktoz (3,6 AG) birimlerinden oluşan hem sülfatlanmış hemde sülfatlanmamış α -(1,3) ve β -(1,4) polisakkaritlerdir. Jelleşme özelliğinden dolayı sıcaklığa, iyonik güce ve biyopolimer konsantrasyonuna bağlı olarak koil formdan heliks forma geçebilir. Ayrıca kazein miselleri ile kompleks oluşturması gibi bazı süt proteinleri ile interaksiyon yapma özelliği taşımaktadır (Perrechil ve diğ, 2011). Probiyotik hücrelerin enkapsüle edilmesi için 40 - 50°C'de hücreler polimer çözeltisine eklenir ve karışım oda sıcaklığına soğutularak jelasyon sağlanır (Burgain ve diğ, 2011).

4.3.4 Pektin

Pektin bitki orijinli lineer polimerler olup α -(1-4)-bağlı D-galakturonik asit ve 1,2-bağlı L-ramnoz birimlerinden oluşmaktadır. Karboksil gruplarının (esterifiye) yüzdesi pektinin esterifikasyon derecesini belirtir. Düşük metoksilli pektinin esterifikasyon derecesi %50'den az olup kalsiyum ile jel oluşturabilmektedir (Sriamornsak, 1999). Mide ve ince bağırsakta bozulmadığından hedef taşıma sistemlerinde kullanımı uygundur. Suda çözünürlüğü yüksek olduğu için modifiye olmadan uygulanması

kısıtlıdır. Bu nedenle çoğunlukla katyonlarla veya kitosan gibi polimerlerle kombine edilerek daha yavaş degrade olması sağlanır (Vos ve diğ, 2010).

4.3.5 Nişasta

Nişasta düşük maliyeti, kullanım kolaylığı, biyobozunur ve biyouyumlu bir malzeme oluşu ve geniş uygulama alanı ile pek çok biyoaktif maddenin taşınması için kullanılan çok sayıda glikoz molekülünün glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşan bir polisakkarittir. Amiloz ve amilopektinden oluşur. Amiloz α -(1-4) bağlarıyla bağlı D-glikopiranozdan oluşan lineer bir molekül olup pankreatik amilaz enzimine dirençli fakat kolondaki enzimler ile parçalanabilmektedir (Vos ve diğ, 2010). Amilopektin ise 1-4 glikozidik bağ ve 1-6 glikozidik bağlarla bağlanan dallı glikoz molekülüdür. Doğal nişasta biyoaktif bileşenlerin çok hızlı salımına yol açtığından dolayı kontrollü salımı için uygun bir taşıyıcı olmasa da modifiye nişasta bu amaç için kullanılabilir (Wang ve diğ, 2011). Nişasta eterifikasyon, esterifikasyon veya asidifikasyon gibi işlemlerle modifiye edilerek dirençli hale getirilebilmektedir (Vos ve diğ, 2010).

Dirençli nişasta pankreatik enzimler ile ince bağırsakta parçalanamayan dolayısıyla sindirilemeyen nişastadır. Dirençli nişasta kolona ulaşarak burada fermente olur. (Burgain ve diğ, 2011). Probiyotiklerin kolona ulaşmasını hedefleyen taşıyıcı sistemlerde kullanıldığı belirtilmiştir (Vos ve diğ, 2010). Ayrıca uygun modifikasyon ile kolon kanserinin önlenmesinde, kolesterolü düşürmede ve kalp-damar hastalıklarını azaltmada etkili olabilmektedir (Wang ve diğ, 2011). Nişasta türevleri biyoaktif bileşenlerin kontrollü salımı amacıyla kullanılıyorsa, üst sindirim yolunda sindirilmeyen (asit ve enzim degradasyonuna dirençli) fakat kolonda fermente olacak şekilde tasarlanmalıdır (Wang ve diğ, 2011).

4.3.6 Gamlar

Enkapsülasyonda kullanılan kaplama materyalleri guar gam, gellan gam, akasya gamı, jelatin gibi gam çeşitleri de olabilir. Jelatin amfoterik yapıda bir protein gamı olup gellan gam gibi anyonik polisakkaritler ile birlikte çalışmaktadır. pH izoelektrik noktanın altında olduğunda jelatinin net yükü pozitif olarak negatif yüklü gellan gam ile güçlü interaksiyon oluşturur (Burgain ve diğ, 2011). Jelatin hem asidik hem de

bazik peptitlerin enkapsülasyonunda, koazervasyon veya emülsiyon metotlarında kullanılabilmektedir (Yadav ve diğ, 2010).

5. MATERYAL VE METOTLAR

5.1 Materyaller & Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan sodyum aljinat tozu (ALGOGEL 3001) Cargill'den, sodyum klorür (NaCl), sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), sodyum nitrat ($NaNO_2$), asetik asit glacial %100 (CH_3COOH), metanol (CH_3OH) ve Folin Ciocalteu's phenol reagent Merck KGa'dan, kalsiyum klorür ($CaCl_2$), sodyum hidroksit (NaOH), $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ve hidroklorik asit %37 (HCl) Riedel-de Haen AG'den, potasyum klorür (KCl) Carlo Erba Reagenti SPA'dan, sodyum karbonat (Na_2CO_3), etanol absolut (C_2H_6O), kitosan (50494-100G-F), gallik asit, trolox ve DPPH standartları ise Sigma-Aldrich & Fluka'dan temin edilmiştir.

5.2 Ekipmanlar

Bu çalışmada manyetik karıştırıcı (IKA GmbH D-794), hassas terazi (Denver Instruments), derin dondurucu (Nuaire Glacier -86C Ultralow temperature freezer NU-9483E), soğutmalı santrifüj (Sigma 2-16PK), çalkalamalı su banyosu (New Brunswick Scientific Co, Inc Classic Series, Edison, NJ, USA), UV-Spektrofotometre (UV-1700 PharmaSpec UV-visible spectrophotometer Shimadzu), optik mikroskop (Zeiss, West Germany), mikroskop kamerası (Leica dfc320), renk ölçer (Chroma meter CR-400, Konica Minolta Sensing, INC, Japan), pH metre (Hanna Instruments, pH211 Microprocessor pH Meter), etüv (Mettler), blender (IKA), döner buharlaştırıcı (Buchi Rotavapor RII, Switzerland) kullanılmıştır.

5.3 Kara Dut Numunesinin Hazırlanması

Lokal marketten temin edilen 10 kilo kara dut sıvı azot yardımıyla donuk haldeyken öğütülmüştür. Öğütülen numuneler 50ml'lik falkon tüplere alınarak ekstraksiyon işlemine kadar $-80^{\circ}C$ 'de depolanmıştır.

5.4 Dut numunesi İçin Renk, pH, Toplam Kuru Ağırlık Ölçümleri

Öğütülmüş taze karadutun pH'ı pH metre ile, toplam kuru ağırlığı ise 70°C'lik etüvde 5 saatin ardından ağırlıkça değişime bakılarak belirlenmiştir.

Dut meyvesi için renk ölçümü beyaz porselen referans levhası ile kalibre edilmiş renk ölçümü cihazı kullanılarak L^* , a^* , b^* değerlerinin belirlenmesi için yapılmıştır. L^* değeri parlaklık (siyah için $L^* = 0$ ve beyaz için $L^* = 100$), a^* değeri -60 (yeşil)'tan 60 (kırmızı)'a ve b^* değeri -60 (mavi)'tan 60 (sarı)'ya değişen renk skalasını temsil etmektedir. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

5.5 Kara Dut Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu

Dut antosiyaninlerinin ekstraksiyonu için Wu ve ark. (2011)'nin kullandığı iki sıvı fazlı ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Bu amaçla bir beher içinde 20g amonyum sülfat tartılarak 40g saf suda çözöldü. Amonyum sülfat çözeltisine 10g öğütölmüş karadut eklenerek karıştırıldı. Elde edilen bu karışımın üzerine 30g etanol damla damla ilave edilerek 15 dakika karıştırıldı. Ekstraksiyonun maksimum verimle gerçekleştirilmesi için sistemin pH'ı 1N sitrik asit ile 4.5'e ayarlanarak 35°C'de su banyosunda 100 rpm'de 30 dk bekletildi. Su banyosundan alınan ekstraktlar falkon tüplere konularak 4000rpm'de 5dk santrifüjlendi. Santrifüjlenmiş karışım 3 faza ayrılmış olarak gözlenir: üstteki faz antosiyanin ekstraktını içeren etanollü fazı, alttaki faz şeker içeren sulu fazı ve aradaki faz ise dut kalıntıların bulunduğı katı fazı oluşturmaktadır. Fazların hacimsel oranları denklem 5.1'de kullanılarak hesaplanmıştır.

$$R = V_T / V_B \quad (5.1)$$

V_T ve V_B sırasıyla üst ve alt fazın hacimleridir.

Etanollü faz bir behere alınarak 1 gece boyunca +4°C'de bekletildi. Ertesi gün 2 hacim daha etanol eklenip santrifüjlenerek tuzların tamamen çökmesi sağlanmıştır. Etanollü ekstrakt darası alınmış balon içine aktararak döner buharlaştırıcıda 50°C'de etanol tamamen uçuncaya kadar bekletilmiştir.

5.5.1 Toplam fenolik madde analizi

Dut antosiyaninlerinin toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin-Ciocalteu spektrofotometrik yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla, 100 µL örneğe sırasıyla 750 µL 0,2 N Folin reaktifi ve 750 µL % 6'lık Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Numuneler karanlık ortamda 1,5 saatlik inkübasyonun ardından 725 nm'de UV-spektrofotometre ile absorbansları ölçülmüştür (Velioğlu, 1998). Gallik asit standart olarak kullanılmış olup on noktalı (0,001 – 0,1 mg/mL) kalibrasyon eğrisi kullanılarak numunenin toplam fenolik madde miktarı üç tekrarlı olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar miligram gallik asit ekuvalenti (GAE)/100 g numune olarak ifade edilmiştir.

5.5.2 % Radikal yakalama aktivitesi – DPPH metodu

100 µl antosiyanin ekstraktı 2 ml 0.1 mM DPPH (metanol içinde) çözeltisine ilave edilmiştir. Numuneler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika bekletilerek 517 nm'deki absorbans, sıfırlama için metanol kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar mg TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity-Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / 100 g numune olarak ifade edilmiştir (Rai ve diğ., 2006).

5.5.3 Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi

1 ml örnek 0,3 ml %5'lik NaNO₂ ile karıştırılmıştır. 5 dakika sonra 0,3 ml %10'luk AlCl₃ eklenir ve homojenize edilmiştir. Karışımı nötralize etmek amacıyla 6 dakika sonra 2 ml 1M NaOH ilave edilir ve 510 nm'de absorbansları okundu. Sonuçlar mg kuersetin / 100 g numune cinsinden ifade edilmiştir (Martos ve diğ., 2011).

5.5.4 Toplam antosiyanin analizi – pH diferansiyel metodu

Dut antosiyaninlerinin toplam antosiyanin miktarı pH diferansiyel metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla 0,025 M potasyum klorür ve 0,4M sodyum asetat tampon çözeltileri hazırlanarak numuneler bu tamponlar ile seyreltilmiştir. KCl tamponu pH 1 ve CH₃COONa *3 H₂O tamponu pH 4,5 olarak %37'lik HCl ile ayarlanmıştır (Kar ve diğ., 2011). Seyreltilen numuneler karanlık ortamda 15 dk bekletildikten sonra absorbansları 520 nm ve 700 nm'de UV spektrofotometre ile belirlenir. Sonuçlar mg

siyanidin-3-glukozit eş değeri /100 g numune cinsinden denklem 5.2’de kullanılarak ifade edilmiştir.

(5.2)

A absorbans ($A_{pH1.0}-A_{pH4.5}$), MW moleküler ağırlık (449,2 g/mol Cy-3-gly), DF seyreltme faktörü ve ϵ sönüm katsayısı ($\epsilon = 29.900$)’nı belirtmektedir.

5.6 Tepki Yüzeyi Metodu İçin Deneme Deseninin (Deneysel Tasarımın) Oluşturulması

Bu çalışmada dut antosiyaninlerinin kitosan kaplı aljinat taneciklerinde enkapsüle edileceği optimum koşulların belirlenmesi amacıyla Tepki Yüzey Metodu (RSM) kullanılmıştır. Bu amaçla, 3 faktör ve 3 seviyeli yüzey merkezli (face centered) deneme deseni Minitab 13.20 programı kullanılarak hazırlanmıştır. Literatürdeki RSM değişkenleri göz önüne alındığında $CaCl_2$ konsantrasyonu, emülgatör konsantrasyonu, kaplama malzemesi/aktif bileşen oranı, kapsül sertleşmesi için gerekli süre, kaplama malzemesinin konsantrasyonu ve karıştırma hızı gibi pek çok değişkenin enkapsülasyon verimi, mide ve bağırsak ortamındaki *in vitro* salımları, zeta potansiyelleri, parçacık büyüklükleri gibi bağımlı değişkenlere göre dizayn edildiği tespit edilmiştir (Lee ve diğ, 2008; Motwani ve diğ, 2008; Potumarthi ve diğ, 2008; Yoo ve diğ, 2006).

Enkapsülasyon yönteminin en önemli faktörleri, enkapsüle edilmek istenen bileşenin ne kadarının kapsül içine hapsedildiği ve mide-bağırsak koşullarında ne kadarının salındığıdır. Eğer enkapsülasyon verimi düşükse hem aktif madde kaybı (ekonomik kayıplar) hem de zaman kaybı söz konusu olacağından seçilen yöntemin veya parametrelerin başarılı olmadığı kararına varılabilir. Bunun yanında, aktif maddenin mide ortamının zorlu asidik koşullarından etkilenmeden ince bağırsağa ulaşması ve buradan emilerek biyolaşabilirliği/ biyoyararlılığı yüksek ürünler elde edilmesi istenmektedir. Belirtilen koşullar göz önüne alınarak antosiyanin ekstraktının yüzdesi, jelleşme ortamındaki kitosan miktarı ve karıştırma (sertleşme) süresi bağımsız değişkenler olarak seçilirken; enkapsülasyon etkinliği, kapsüllerin uzunluk oranı, küreselliği ve mide ortamındaki *in vitro* salımı bağımlı değişkenler olarak belirlenmiştir. *In vitro* salım sadece mide ortamı için denenmiş olup, bağırsak ortamındaki yüksek pH antosiyaninlerin bozulmasına neden olduğu için bağımlı

değişken olarak seçilmemiştir. Deneme deseni bağımsız değişkenler için belirlenen aralıklar açık ve kapalı olarak Çizelge 5.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1: RSM deneme deseni değişkenleri.

Faktör	Faktör seviyeleri		
	-1	0	1
% Ekstrakt (x_1)	1	3	5
% Kitosan (x_2)	0,1	0,3	0,5
Süre dk (x_3)	15	30	45

İkinci dereceden polinom eşitliği belirtilen faktörlerin (bağımlı değişkenlerin) tahminlenmesi (AR, SF, %EE ve %SGF) amacıyla bağımsız değişkenlerin fonksiyonu olarak denklem 5.3. ile hesaplanmıştır

(5.3)

Bu eşitlikte x_1 ekstrakt konsantrasyonunu, x_2 kitosan konsantrasyonunu ve x_3 süreyi temsil etmektedir. Ayrıca a_0 sabit bir sayı, a_i , a_{ii} ve a_{ij} sırasıyla lineer, kuadratik ve interaktif katsayıları göstermektedir.

5.6.1 Aljinat çözeltisinin hazırlanması

Aljinat çözeltisi son çözeltideki aljinat oranı 20 g/L olacak şekilde gerekli miktarda toz aljinat distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Aljinat tamamen çözündükten sonra 1N sitrik asit çözeltisi ile aljinat çözeltisinin pH’ı 4,5 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti karıştırma esnasında oluşan hava baloncuklarının giderilmesi amacıyla kullanımından 24 saat önce +4°C’de bekletilmiştir.

5.6.2 Jelleşme ortamının hazırlanması

Jelleşme ortamı farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren 20 g/L CaCl_2 çözeltisi içermektedir. Jelleşme çözeltisinin asitliği 1 N NaOH kullanılarak pH 4.5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

5.6.2.1 Kitosan çözeltisinin hazırlanması

Kitosan yüzdesi RSM yapılarak 1 g/L, 3 g/L ve 5 g/L olarak belirlendi. Kitosan asidik ortamda çözünebilen bir biyopolimer olduğundan kitosan çözeltisi sulu 10 g/L asetik asit (glasiyal) içinde hazırlandı.

5.6.2.2 CaCl₂ çözeltisinin hazırlanması

Jelleşme ortamında kullanılan CaCl₂ çözeltisi belirli miktarda kalsiyum klorür 2-hidrat (CaCl₂.2H₂O)'ın kitosan çözeltisi içinde çözünmesi sonucu CaCl₂ konsantrasyonu 20 g/L olacak şekilde hazırlandı.

5.6.3 Kitosan kaplı aljinat taneciklerinin üretilmesi

Karaduttan elde edilen antosiyanin ekstraktı Tepki Yüzeyi Metodu'nda belirlenen konsantrasyonlarda alınarak sodyum aljinat çözeltisine ilave edilmiştir. Ekstrakt/aljinat oranı 1/9 olacak şekilde alınarak 30 dk karıştırıldı. Antosiyanin ekstraktlı aljinatlı karışım bir şırınga yardımıyla alınarak kitosanlı CaCl₂ çözeltisine damlatıldı. Damlatma çözeltisinin jelleşme ortamına oranı 1/10 olarak belirlenmiştir. Belirli süre jelleşme ortamında sertleştirilen kapsüller saf su ile yıkanarak oda koşullarında kurumaya bırakıldı.

5.6.4 Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde Santos ve ark. (2011)'de Jabuticaba meyvesi antosiyaninleri enkapsülasyonu için kullanılan yöntem kullanılmıştır. Buna göre jelleşme ortamında enkapsüle edilmeden kalan antosiyaninlerin miktarı UV-spektrofotometre dut antosiyaninlerinin verdiği maksimum absorbansta (520nm) okuma yapılarak belirlenmiştir. CaCl₂ ortamındaki absorban değeri, bilinen miktarlarda antosiyanin ekstraktı çözeltilerinin 520nm'de verdikleri absorban değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği aracılığıyla hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği denklem 5.4 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\frac{\text{---}}{\text{---}} \quad \frac{\text{---}}{\text{---}} \quad (5.4)$$

Denklemden EE enkapsülasyon etkinliğini, mt_{op} toplam antosiyanin miktarını (mg/L) ve m_{NE} enkapsüle edilemeyen antosiyanin miktarını (mg/L) göstermektedir.

5.6.5 Kapsüllerin karakterizasyonu

Kapsüller oda koşullarında kurutulduktan sonra boyut ve şekil analizleri için hazırlanmıştır.

5.6.5.1 Kapsüllerin boyut analizleri

Kapsüllerin boyutlarını belirlemek için optik mikroskop (Zeiss, West Germany) ve mikroskoba bağlı dijital kamera (Leica dfc320) kullanılmıştır. Tüm grubu temsilen her gruptan en az 15 adet kapsül rastgele seçilerek minimum ve maksimum çapları ölçülmüştür.

5.6.5.2 Kapsüllerin şekil analizleri

Küresellik faktörü

Küresellik elde edilen kapsüllerin yuvarlak şekile ne kadar yakın olduğunun bir göstergesi olup, ısı ve kütle transferinde önemli bir etken olarak gösterildiği için deneme deseninin değişkenlerinden biri olarak seçilmiştir (Nussinovitch, 2010). Kapsüllerin küresellik faktörü (sphericity factor - SF) için kullanılan denklem denklem 5.5'te gösterilmiştir.

(5.5)

d_{max} maksimum çapı (mm), d_{min} ise d_{max} (mm)'a dik minimum çapı ifade etmektedir.

Uzunluk oranı – Boy/En oranı

Uzunluk veya boy/en oranı (B/E), kapsüllerin maksimum çapı (boyu) ile minimum çapının (genişlik) oranı olarak ifade edilir. Düzgün kapsüller (partiküller) elde etmek için B/E oranı 1'e yakın olmalıdır (Chan ve diğ., 2009). Denklem 5.6'da boy/en oranı için kullanılan denklem gösterilmiştir

Denklem 5.6’da $d_{\max}$ maksimum çapı (mm) ve $d_{\min}$: $d_{\max}$ (mm)’a dik minimum çapı ifade etmektedir.

5.6.6 *In vitro* salım çalışmalarının yapılması

Bu çalışmada *in vitro* salım sadece mide koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enzim içermeyen mide ortamı taklit edilmek üzere 1g NaCl ve 3,5ml %37’lik HCl 500mL’ye saf su ile tamamlanmıştır (Zhang ve Kosaraju, 2007). Kapsüller mide sıvısına alınarak (pH 1.2) 37°C’de 50 rpm’de su banyosunda 2 saat bekletilmiştir. Mide ortamına salınan antosiyanin ekstraktının miktarı SGF sıvısının 520nm’de UV spektrofotometre ile absorbansı ölçülerek hesaplanmıştır. Belirli konsantrasyonlarda antosiyanin ekstraktı içeren SGF sıvıları hazırlanarak, kara dut antosiyaninlerinin maksimum dalga boyunda (520nm) kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Santos ve diğ., 2011).

5.7 İstatiksel analiz

Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkisini belirlemede Varyans Analizi (ANOVA) için Tepki Yüzey Yönteminin 3 seviye ve 3 faktörlü merkezi kompozit deseni kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon denklemleri belirlenmiştir. Deneysel tasarım için bağımsız değişkenler enkapsüle edilecek ekstrakt miktarı (%), jelleşme ortamındaki kitosan miktarı (%) ve karıştırma süresi (dk) olarak belirlenmiştir. Deneysel tasarımın kurulması ve değerlendirilmesinde Minitab 13.20 paket programı kullanılmıştır.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1 Dut Numunesi İçin Renk, pH ve Toplam Kuru Madde Ağırlık Miktarlarının Belirlenmesi

Dut örneğinin pH metre ile ölçülen pH'ı 4,5 – 4,6 olarak belirlenmiştir. Farklı iklim koşullarına sahip bölgeler göz önüne alınığında Türkiye’de yetiştirilen kara dut meyvesinin pH aralığı 3,31 – 3,80 olarak belirtilmiştir (Ercisli ve Orhan, 2008). Syanidin-3-O-glukozit ve siyanidin-3-O-rutinosit dutta en çok bulunan antosiyaninler olup, bu antosiyaninlerin pH 5’ten daha düşük asitlikte kırmızı renklerini ve stabiliteilerini korudukları belirtilmektedir (Wu ve diğ., 2011). Antosiyaninler asidik pH’ta stabil olduklarından ve farklı pH’larda farklı formlarda ve renklerde bulunduklarından ölçülen değerin literatüre uygun olduğu söylenebilir. 70°C’de etüvde ~5 saat kurutulan dut meyvesindeki nemin uzaklaştırılmasının ardından elde edilen toplam kuru ağırlık % 19,17 ve nem oranı %80,83 olarak belirlenmiştir. Meyve ve sebzeler yüksek oranda su içeren sahip besinler olup, nem oranları % 80 – 95 arasındadır. Bu çalışmada analizlenen kara dut numunesindeki ~%80’lik nem oranı da bu verileri destekler niteliktedir.

Taze dut numunesinin renk değerleri $L^* = 14,56 \pm 0,15$, $a^* = 7,87 \pm 0,29$, $b^* = -11,75 \pm 0,22$ ve $C^* = 14,24 \pm 0,25$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre numunenin koyu renkli, kırmızı-mavi veya mor bir renge sahip olduğu gözlemlenebilir.

Literatürde karadut renk değerlerinin belirlendiği bir çalışmada L^* değeri 14,4 – 27,9 aralığında, a^* değeri 10,2 – 25,1 ve b^* değeri 3,2 – 11,6 aralığında bulunmuştur (Özgen ve diğ., 2009). Başka bir çalışmada dut suyu için $L^* = 3,5 \pm 0,086$, $a^* = 22,22 \pm 0,52$, $b^* = 5,89 \pm 0,082$, $C^* = 22,98 \pm 0,52$ ve $H = 14,85 \pm 0,136$ olarak belirlenmiştir (Özen ve Akbulut, 2008). Dut ekstraktı için renk ölçütlerinin bakıldığı diğer bir çalışmada ise *M.alba* cinsine ait dutlardan mor renkli olanlar için $L^* = 3,92 \pm 1,21$, $a^* = 7,37 \pm 1,12$ ve $b^* = 2,12 \pm 0,65$ iken mor-kırmızı renkliler için $L^* = 11,94 \pm 4,12$, $a^* = 13,09 \pm 2,13$, $b^* = 3,09 \pm 0,79$ olup kırmızı dutlar için ise $L^* = 27,75 \pm 5,32$, $a^* = 20,62 \pm 3,56$, $b^* = 9,28 \pm 2,87$ olarak ölçülmüştür. Ercisli ve Orhan (2007) ise $L = 78,4$,

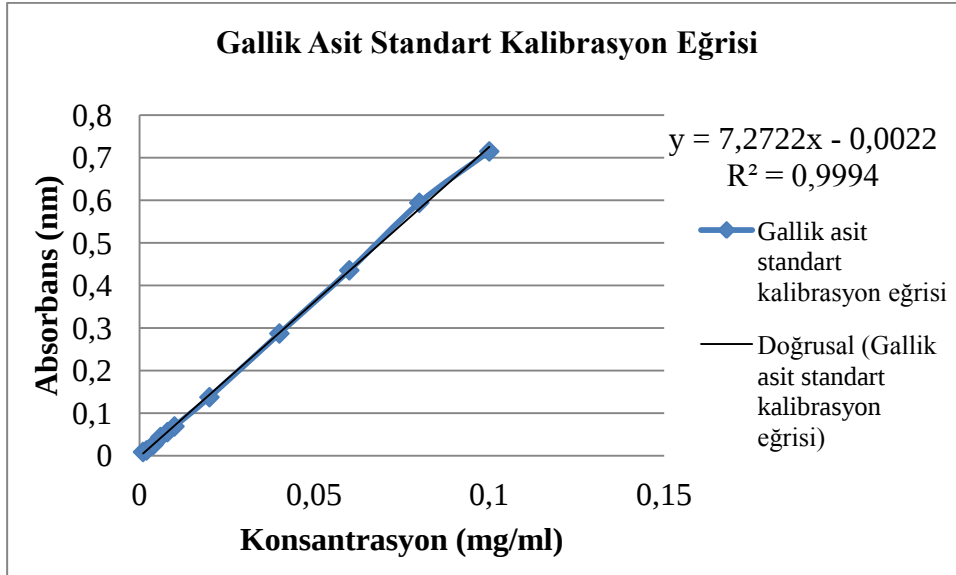
a=-13,6 ve b=16,2 olarak belirtmişlerdir. Bu veriler dut meyvesi için renk ölçütlerinin oldukça değişken olduğunu göstermektedir.

6.2 Kara Dut Antosiyaninlerinin Ekstraksiyonu

Ekstrakte edilen dut numuneleri 4000rpm’de 5 dakika santrifüjlenerek 2 sıvı faza ayrılması sağlanmıştır. Hacimce üst fazın alt faza oranı $R=1,266\pm0,11$ olarak belirlenmiştir. Dut antosiyaninlerinde iki sıvı fazlı ekstraksiyon yönteminin seçilme nedeni belirtilen yöntemin etkili, yüksek verimli olması ve dut ekstraktındaki serbest şekerleri ayırarak kısa sürede ve düşük maliyetle yüksek saflıkta ürünler elde edilmesidir (Wu ve diğ., 2011).

6.3 Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Dut numunesi ve antosiyanin ekstraktının toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (GAE/100 g numune) cinsinden ifade edilmiş olup sırasıyla $462,85\pm35,35$ mg GAE/100g taze numune ve $3224,30\pm745,67$ mg GAE/100g ekstrakt olarak bulunmuştur. Numunelerin toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesinde Şekil 6.1’deki gallik asit standart kalibrasyon eğrisi (0,001 – 0,1 mg/mL) kullanılmıştır.



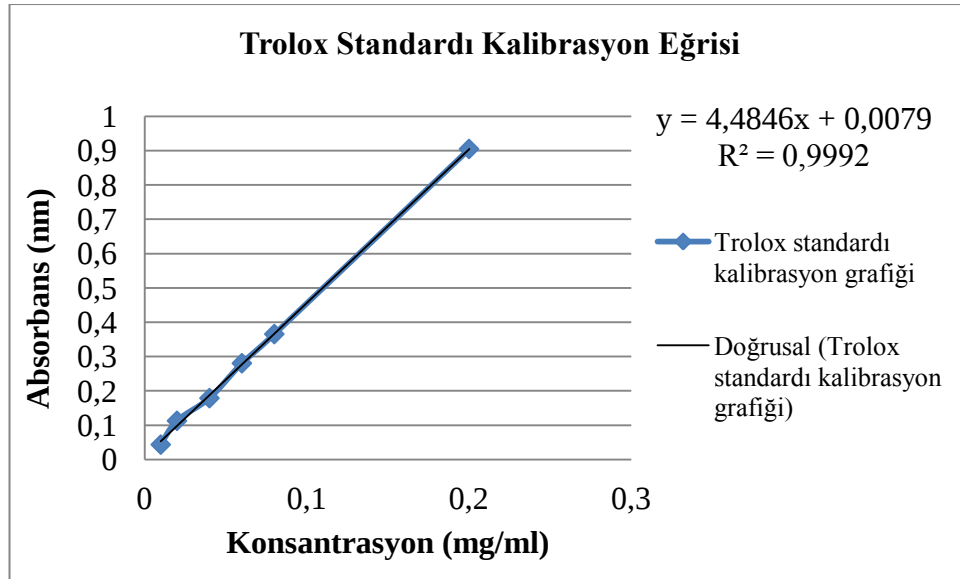
Şekil 6.1: Gallik asit standardı kalibrasyon eğrisi.

Lou ve diğ. (2012)’nin yaptıkları çalışmada dut meyvesi için toplam fenolik madde miktarı 185 – 344 mg GAE/100 taze ağırlık olarak belirtilmiştir. Farklı zamanlarda

hasat edilen karadut meyvesi için en yüksek 452 mg GAE/100g meyve ve en düşük 95 mg GAE/100g olarak belirtilmiştir (Pliszka ve diğ, 2007). Başka bir çalışmada toplam fenolik miktarı *M.alba* için 181 mg GAE/100g taze meyve, *M.nigra* için 1422 mg GAE/100g taze meyve ve *M.rubra* için 1035 mg GAE/100g taze meyve olarak ölçülmüştür (Lou ve diğ, 2012). Toplam fenolik madde miktarındaki bu farklılıkların; meyvenin hasat sırasındaki olgunluk derecesine, genetik farklılıklara, meyve gelişimi sırasındaki çevresel koşullara bağlı olduğu belirtilmiştir (Lou ve diğ, 2012). Bu çalışmada bulunan değerler belirtilen faktörler göz önüne alındığında literatürle uygunluk göstermektedir.

6.4 Antioksidan Kapasitesinin Hesaplanması

Numunelerin antioksidan kapasiteleri DPPH metodu ile Trolox eşdeğerliği cinsinden ifade edilmiş olup, Trolox standard kalibrasyon grafiği (0,01-0,2 mg/ml) Şekil 6.2’de gösterilmiştir.



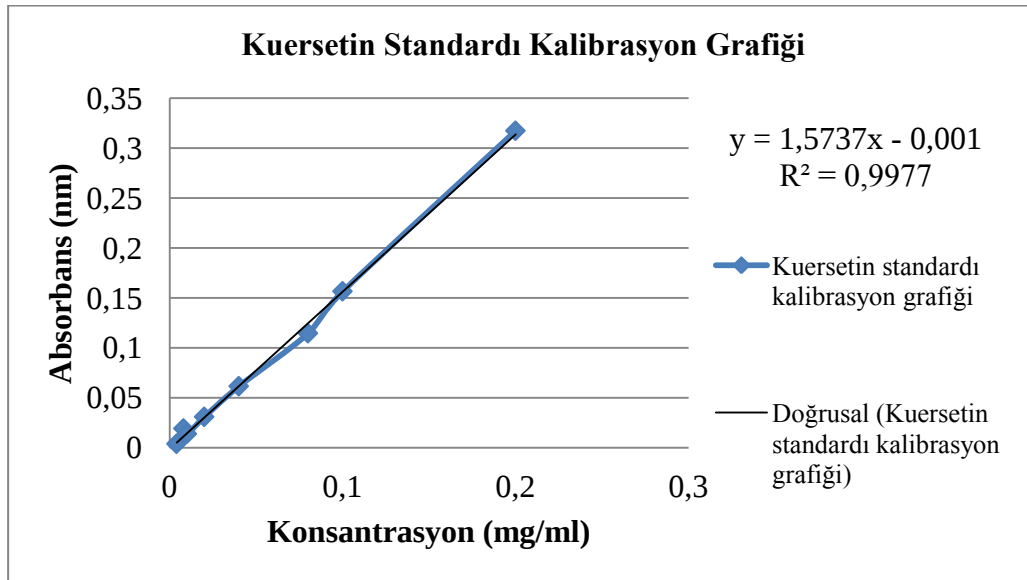
Şekil 6.2: Trolox standardı kalibrasyon eğrisi.

Dut numunesi için elde edilen toplam antioksidan kapasitesi $1393,14 \pm 40,6$ mg Trolox/100g numune ve duttan elde edilen antosiyanin ekstraktı için ise $15165,23 \pm 117,99$ mg Trolox/100g numune olarak bulunmuştur. Lou ve diğ. (2012)'nin dut meyvesinin farklı gelişim süreçleri için yaptıkları çalışmada DPPH analizi sonucu radikal yakalama kapasitesi 950-1800 μ mol Trolox/100g numune olarak bulunmuştur. Farklı iklim ve çevre koşulları, meyvenin olgunlaşma derecesi

ve genetik farklılıklar fenolik madde miktarını etkilediği gibi antioksidan kapasiteyi de etkilemektedir (Ercisli ve Orhan, 2007).

6.5 Toplam Flavonoid Miktarı

Dutta en fazla bulunan flavonoid rutin olmasına karşılık kuersetin de dutta bulunan flavanoidlerdendir. Bu çalışmada kuersetin standardı kullanılmış olup kuersetin standard kalibrasyon grafiği (0,004-0,2 mg/ml) Şekil 6.3'te gösterilmiştir.



Şekil 6.3: Kueretin standardı kalibrasyon grafiği.

Kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplanan toplam flavonoid miktarları dut numunesi için 1349,26±34,9 mg kuersetin/ 100g taze numune, antosiyanin ekstraktı için ise 10421,30±396,8 mg kuersetin/100g ekstrakt olarak bulunmuştur. Ercisli ve Orhan (2007) farklı dut çeşitlerinin kimyasal özelliklerini belirledikleri çalışmada *Morus nigra* cinsi için toplam flavonoid miktarını 276 mg kuersetin/100 g taze ürün olarak belirtmişlerdir. Ancak toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarının farklı koşullarda yetiştirilen, farklı genotipteki ve olgunluk derecesindeki dut örnekleri için değişken olması literatürdeki bilgilere göre beklenen bir sonuçtur.

6.6 Toplam Antosiyanin Miktarı

Kırmızı – mor renkli meyve ve sebzelerin (üzüm, nar, ahududu, vişne v.b) antosiyaninlerce zengin olduğu bilinmekte olup içerdikleri antosiyaninlerin cinsi ve

miktarları farklılık göstermektedir. Siyanidin kırmızı renkli meyvelerde en çok bulunan antosiyanin çeşidi olup toplam antosiyanin miktarının belirlendiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen değerler karadut numunesi için $286,7 \pm 0,131$ mg Cy-3-gly/100 g numune ve antosiyanin ekstraktı için $1768,9 \pm 0,081$ mg Cy-3-gly/100 g numune olarak belirlenmiştir. Karadut suyundaki antosiyanin miktarının belirlendiği bir çalışmada toplam antosiyanin miktarı 16,4 mg Cy-3-gly/100ml olarak belirtilmiştir (Fazaeli ve diğ., 2011). Başka bir çalışmada *Morus atropurpurea* Roxb. türünden elde edilen dut suyu için toplam antosiyanin miktarı 203.3 ± 25.5 µg Cy-3-gly/ml olarak bulunmuştur (Wu ve diğ., 2011). Aynı çalışmada HPLC/MS-MS analizi ile dut suyunda belirlenen antosiyanin türleri siyanidin-3-O-glukozit, siyanidin-3-O-rutinosit, delfinidin-3-rutinosit, delfinidin-3-(6'malonoil)-glukozit ve peonidin-3-ksilosilramnosit olarak belirtilmiştir.

Dutun kimyasal özellikleri bir tabloda toplandığında elde edilen Çizelge 6.1'de dut numunesi ve antosiyanin ekstraktına ait bazı özellikler verilmiştir.

Çizelge 6.1: Dut numunesi ve antosiyanin ekstraktı için toplam fenolik, flavonoid, antosiyanin ve antioksidan aktivite değerleri.

	Dut numunesi	Antosiyanin ekstraktı
Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/100 g numune)	$462,85 \pm 35,35$	$3224,30 \pm 745,67$
Toplam flavonoid madde miktarı (mg kuersetin/100 g numune)	$1349,26 \pm 34,9$	$10421,30 \pm 396,8$
Toplam antosiyanin miktarı (mg Cy-3-gly/100g numune)	$286,7 \pm 0,131$	$1768,9 \pm 0,081$
Toplam antioksidan aktivite (mg TEAC/ 100 g numune)	$1393,14 \pm 40,6$	$15165,23 \pm 117,99$

6.7 İstatiksel Analiz

6.7.1 RSM sonuçlarının değerlendirilmesi

Bağımsız değişkenleri ekstrakt miktarı (% 1-5), kitosan miktarı (% 0,1-0,5) ve süre (15-45 dk) olarak belirlenen deneme deseninin RSM sonuçları Çizelge 6.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 6.2: RSM deneme deseni sonuçları.

Deney No	Sıra	Faktörler			Yanıtlar			
		x ₁	x ₂	x ₃	AR	SF	% EE	% SGF
1		0	-1	0	1,106	0,050	62,620	13,064
2		-1	-1	-1	1,103	0,049	67,609	18,056
3		1	-1	1	1,043	0,021	55,535	18,746
4		0	0	0	1,081	0,038	58,980	11,945
5		1	1	-1	1,075	0,035	68,138	13,107
6		-1	-1	1	1,085	0,039	58,017	10,206
7		0	0	-1	1,096	0,046	64,330	17,445
8		-1	1	1	1,118	0,052	59,802	11,518
9		0	0	1	1,080	0,037	55,810	10,233
10		-1	0	0	1,106	0,050	58,24	13,062
11		0	0	0	1,081	0,038	58,980	12,891
12		0	0	0	1,081	0,038	57,980	11,286
13		1	0	0	1,091	0,044	53,974	16,532
14		0	1	0	1,106	0,050	64,330	15,005
15		1	1	1	1,076	0,036	58,467	14,857
16		-1	1	-1	1,068	0,032	70,509	27,363
17		1	-1	-1	1,077	0,070	65,092	14,132

Minitab 13.20 programı yardımıyla elde edilen veriler sonucunda her bir bağımlı değişken için eşitlikler, bağımlı - bağımsız değişken ilişkisini gösteren grafikler elde edilmiştir.

AR değeri için elde edilen ANOVA tablosundan çıkan sonuç kapsüllerin boy/en oranları üzerinde ekstrakt miktarının (x_1) ve kitosan-süre interaksiyonunun (x_2, x_3) önemli derecede etkili olduğu yönündedir ($p < 0.05$). Bu ilişkiyi gösteren eşitlik denklem **6.1.**'de verilmiştir.

(6.1)

Genel olarak ekstrakt ve kitosan miktarlarının ve sürenin artması ile AR değeri de artmaktadır. Ayrıca kitosan miktarı ve süre interaksiyon etkisi önemli olup pozitif bir etki göstermektedir.

Küresellik faktörü süreye, ekstrakt-süre ve kitosan-süre interaksiyonlarına önemli derecede bağlıdır ($p < 0,05$). Elde edilen denklem **6.2.**'de verilmiş olup R^2 değeri 0,88499 olarak bulunmuştur.

(6.2)

EE yüzdesi ekstrakt ve kitosan miktarları ile süreye bağlıdır. Interaksiyon etkisi hiçbir faktör için gözlenmemiştir (denklem **6.3**). Denklemin R^2 'si 0,99 olarak bulunmuştur.

(6.3)

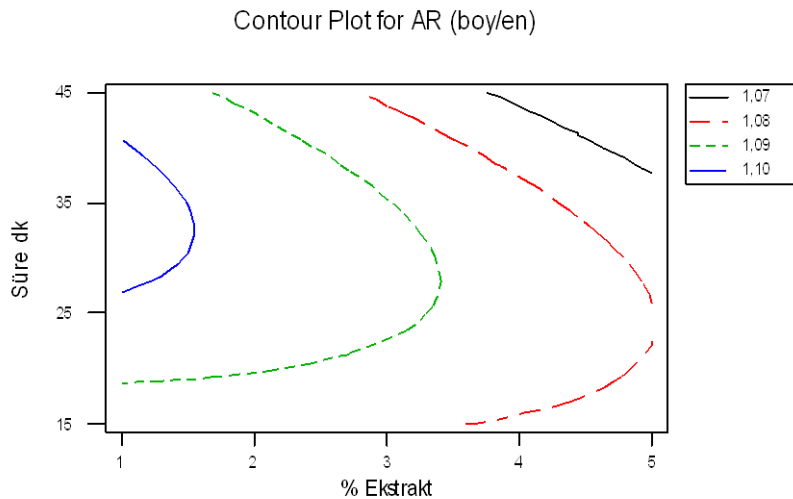
Kapsüllerin mide ortamındaki davranışlarını modellemek için belirlenen denklemde süre, ekstrakt ve kitosan miktarları interaksiyonları ile ekstrakt miktarı – süre interaksiyonunun önemli olduğu görülmektedir. Kapsül içindeki ekstraktın mide ortamına salımı jelleşme ortamındaki karıştırma süresi arttıkça azalmaktadır.

(6.4)

Uzunluk oranı (boy/en) ve küresellik faktörü kapsüllerin şekil düzgünlüğünü belirlemek için kullanılan faktörlerdir. Küresellik faktörü $< 0,05$ olduğunda elde edilen kapsüller küresel olarak kabul edilir. Diğer bir ifadeyle küresellik faktörü 0'a yaklaştıkça kapsüllerin şekli daha düzgün ve küresel kabul edilmektedir (Chan ve diğ., 2009; Chan ve diğ., 2012).

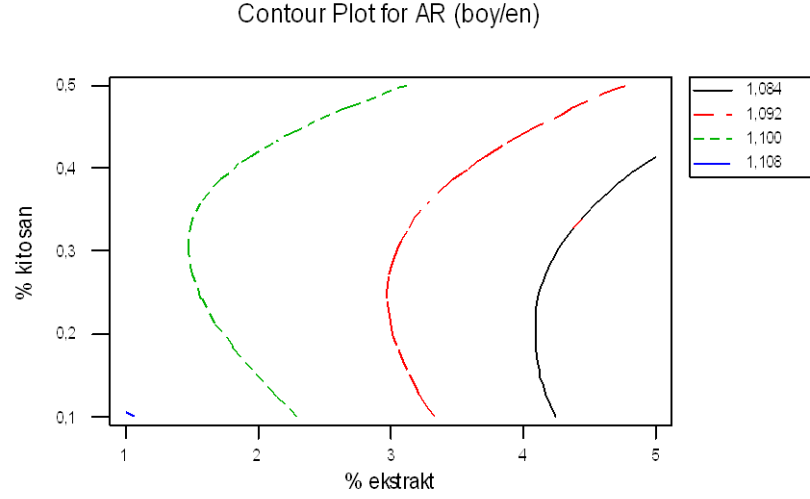
Uzunluk oranı deformasyonun çok fazla olduğu durumlarda iyi sonuçlar verebilirken, ufak tefek şekil bozuklukları için yeterli değildir. Küresellik faktörü ise şekil ile ilgili daha doğru yaklaşımlar yapılabilmesine olanak sağladığı belirtilmiştir (Chan ve diğ, 2009).

Ekstrakt miktarı ve sürenin kapsüllerin boy/en oranına etkisini inceleyen Şekil 6.4.'e göre kitosan miktarı sabitken (% 0,3) merkez noktadan uzaklaşıldıkça boy/en oranı küçülmekte dolayısıyla daha düzgün şekilli kapsüller elde edilebilmektedir. Ekstrakt miktarından bağımsız olarak, artan karıştırma süresi daha düzgün şekilli kapsüller (daha küçük AR) elde edilmesini sağlamıştır. Sürenin sabit olduğu durumlarda ise daha düzgün şekilli kapsüller daha düşük ekstrakt miktarına sahip olan sistemlerde gerçekleşmiştir. Herhangi bir ekstrakt miktarı için sürenin artırılması AR'nin küçülmesini sağlarken, sabit bir süre için ekstrakt miktarının artırılması durumunda da AR azalmaktadır.



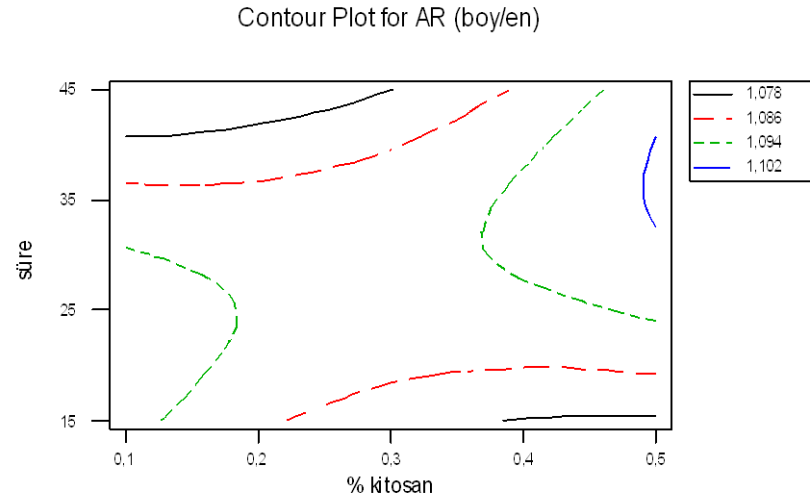
Şekil 6.4: Boy/en oranı üzerinde süre-ekstrakt etkisi.

Boy/en oranı üzerinde kitosan ve ekstrakt miktarlarının etkisi Şekil 6.5.'te gösterilmiştir. Kontur grafiğine göre merkez noktadan uzaklaşıldıkça boy/en oranı büyümektedir. Süre sabitken tüm kitosan oranlarında ekstrakt miktarının artması AR oranını azaltmıştır ayrıca AR oranının kitosan oranından etkilenmediği söylenebilir. Karıştırma süresi 30 dk ile sabitken herhangi bir kitosan miktarı için ekstrakt miktarı arttıkça AR değerinin küçüldüğü görülmektedir.



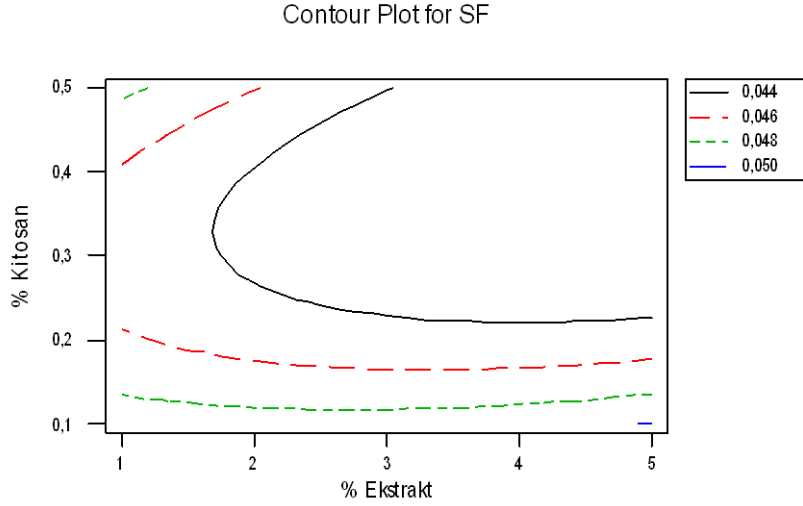
Şekil 6.5: Boy/en oranı üzerinde kitosan-ekstrakt etkisi.

Şekil 6.6’da AR üzerine kitosan-süre interaksiyonunun etkisi elde incelenmiştir. Buna göre süre 30 dk ve üzerindeyken kullanılan kitosan miktarı arttıkça AR değeri de artar. Daha düşük karıştırma sürelerinde ise (< 20 dk) kitosan miktarının artması ile AR değeri azalmaktadır. Genel olarak uzun süre ve düşük kitosan oranlarında AR düşükken orta nokta çevresinde AR pek değişmemektedir.



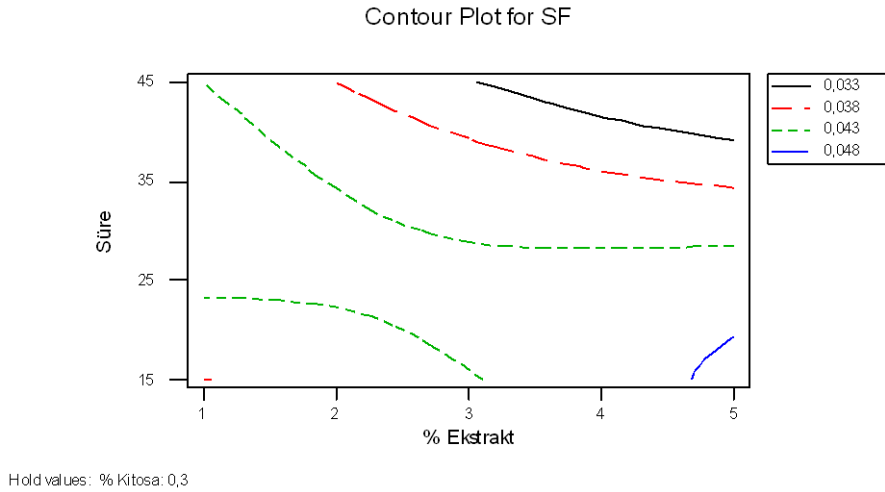
Şekil 6.6: Boy/en oranı üzerinde süre-kitosan etkisi.

Şekil 6.7’deki kontur grafiğine göre süre sabitken merkez noktadan uzaklaşıldıkça kapsüllerin küresellik faktörü büyümektedir. Ekstrakt miktarı % 2,5 ve kitosan miktarı %0,25’in üzerindeyken küresellik faktörünün sabit bir değere yaklaştığı ve değişmediği görülmektedir. Ayrıca kitosan miktarı düşükken (<%0,2) SF değerindeki değişim ekstrakt miktarından bağımsız olmuştur.



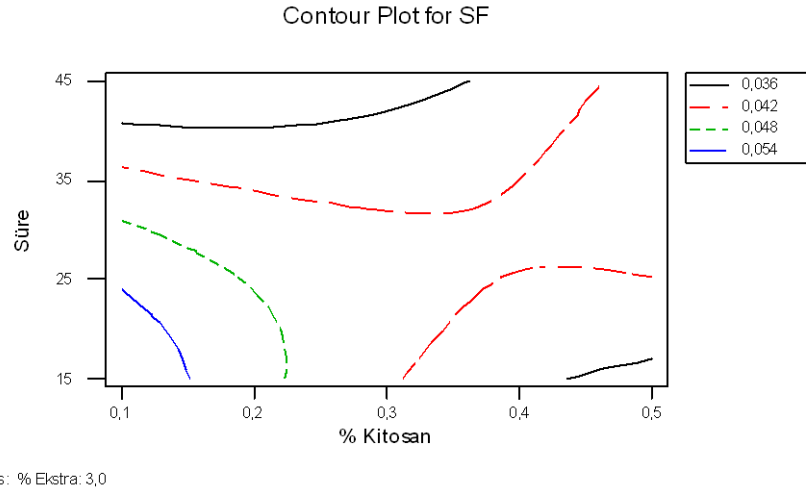
Şekil 6.7: Küresellik faktörü üzerinde kitosan-ekstrakt etkisi

Kapsüllerin küreselliği üzerinde süre – ekstrakt miktarı ilişkisini inceleyen Şekil 6.8.'e göre daha küresel kapsüller elde etmek için kullanılan ekstrakt miktarı fazla (> %3) ve karıştırma süresi uzun (>35dk) olmalıdır. Bu koşullarda SF değeri azalmakta (0'a yaklaşmakta) yani kapsüllerin küreselliği artmaktadır. Daha kısa karıştırma sürelerinde ise ekstrakt miktarı küresellik faktörünü etkilememektedir.



Şekil 6.8: Küresellik faktörü üzerinde ekstrakt-süre etkisi.

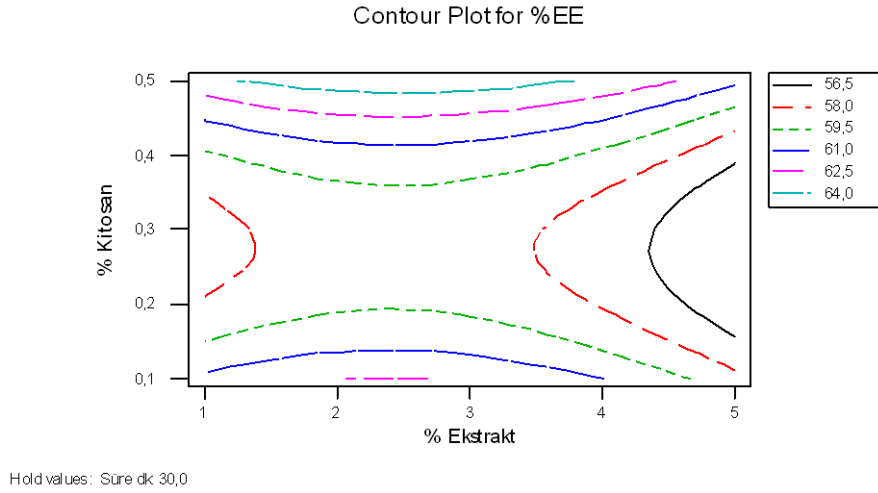
Şekil 6.9'a göre süre 25 dk'nın altında olduğunda kullanılan kitosan miktarı arttıkça SF değeri azalmaktadır. Kitosan miktarının < % 0,2 olduğu durumlarda ise süre uzadıkça küresellik faktörü küçülmektedir. Kitosan miktarının belirli bir konsantrasyonun (<0.2%) altında olduğu koşullarda daha küresel yapılar elde edebilmek için sürenin artırılması gerekmektedir.



Şekil 6.9: Küresellik faktörü üzerinde kitosan-süre etkisi.

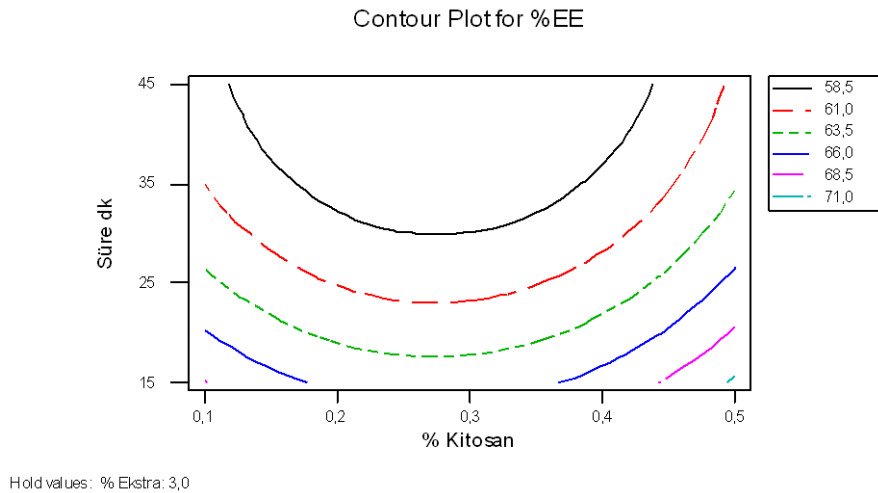
Şekil 6.10’da ekstrakt ve kitosan konsantrasyonlarının enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisi incelendiğinde enkapsülasyon verimi (% EE), ekstrakt miktarı $\sim < \% 1,5$ olduğunda kitosan $< \% 0,3$ iken azalan kitosan miktarı ile artmakta, kitosan $> \% 0,3$ iken artan kitosan miktarı ile artmaktadır. Benzer bir durum ekstrakt miktarı $> \% 4,5$ olduğu durumda da geçerli olmaktadır. Enkapsülasyon veriminin yüksek olması için ortamdaki ekstrakt miktarı önemli olup ve $4,5\%$ ve üzeri ekstrakt oranlarında yüksek verimli kapsüller ($<60\%$) elde edilememektedir. 65 ve üzerindeki EE değerlerine ise ancak kitosan oranının $0,5\%$ olduğu koşullarda yaklaşılabilmektedir.

Jelleşme ortamında bulunan kitosan aljinat taneciğindeki boşluklu yapıyı doldurarak daha sağlam bir yapı oluşturmakta ve böylelikle enkapsülasyon veriminin de daha yüksek olmasına neden olmaktadır. Ortamdaki kitosan miktarı yetersiz olduğunda aljiat-kitosan arasındaki bağlanma az ve kapsül morfolojisi gözenekli olabileceğinden enkapsülasyon etkinliği de düşük olmaktadır.



Şekil 6.10: Enkapsülasyon etkinliği üzerinde ekstrakt-kitosan miktarları etkisi.

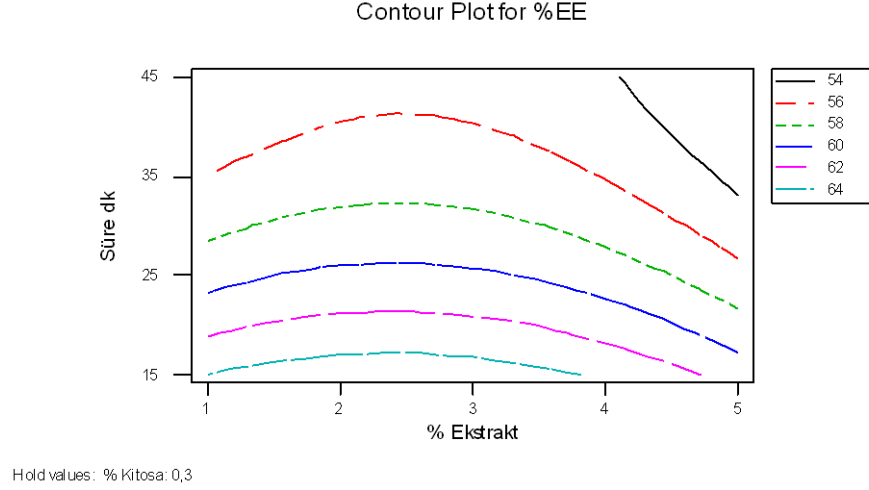
Kitosan miktarı ve sürenin % EE'ye etkisini gösteren Şekil 6.11'deki kontür grafiğine göre merkez noktadan uzaklaştıkça verim artmış, merkez noktaya yaklaştıkça ise verim azalmıştır. Bir diğer ifade ile karıştırma süresi kısa olduğunda genellikle enkapsülasyon etkinliği yüksekken, süre uzatıldığında % EE azalmaktadır. Bu da karıştırma süresi ile enkapsülasyon veriminin ters orantılı olarak değiştiğini göstermektedir. Yüksek EE verimine (~70%) ulaşmak için, ya ortamdaki kitosan miktarı fazla ve karıştırma süresi az olmalı; yada kitosan miktarı az ve süre kısa olmalıdır.



Şekil 6.11: Enkapsülasyon etkinliği üzerinde kitosan-süre etkisi.

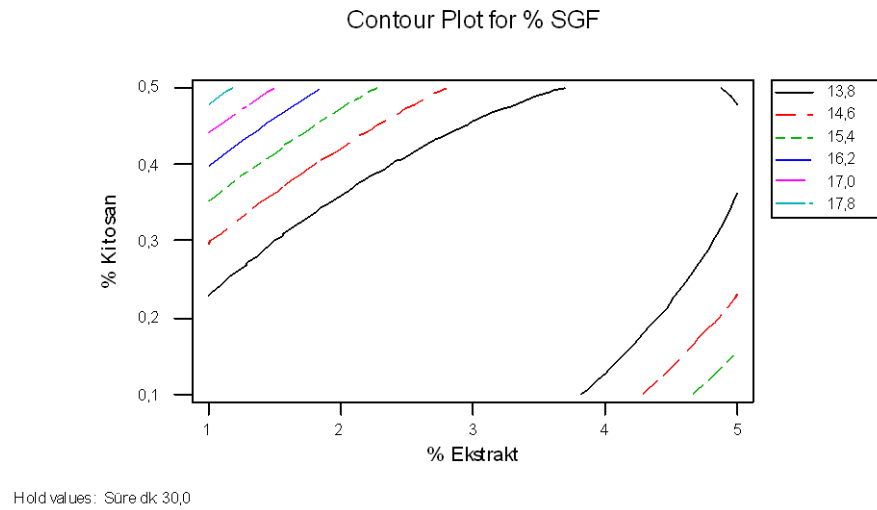
Şekil 6.12'de merkez noktadan uzaklaşıldıkça enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı görülmektedir. Karıştırma süresinin uzaması ile enkapsülasyon etkinliğinin negatif

yönde değişerek azaldığı gözlenmektedir. Bunun nedeni zaman içinde kapsül içine hapsedilen antosiyanin ekstraktının kapsüllerden dışarı sızarak jelleşme ortamına salınmasıdır. Genel olarak karıştırma süresinin düşük tutulması (~ 15 dk) ile kapsüllerden dışarı olacak salım azaltılmış olur.



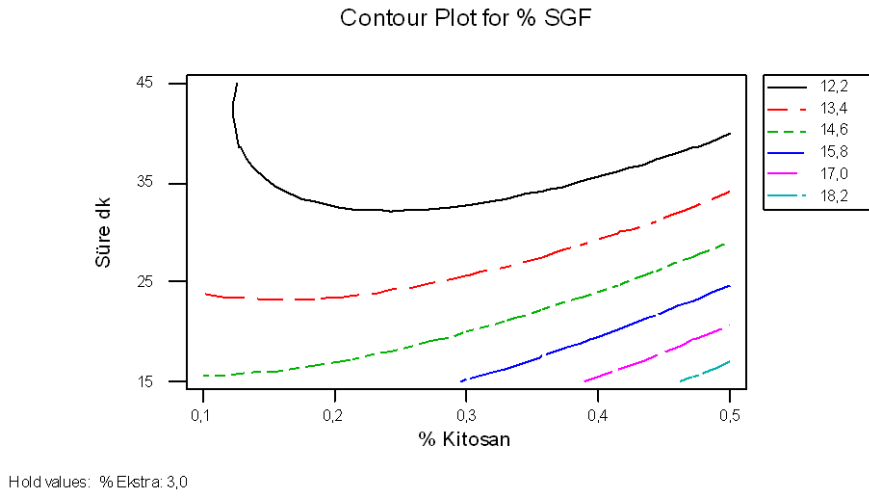
Şekil 6.12: Enkapsülasyon etkinliği üzerinde ekstrakt-süre etkisi.

Şekil 6.13'te merkez noktadan uzaklaştıkça antosiyaninlerin mide ortamına salım oranı artmaktadır. Yani ekstrakt miktarı düşükken kitosa miktarının artması ve ekstrakt miktarı yüksekken kitosa miktarının azalması ile salım miktarı artmaktadır. Diğer bir ifadeyle kitosanın gereğinden fazla olması daha yoğun jel yapısına ve boş hacimde azalmaya neden olacağından salımın artmasına neden olacaktır



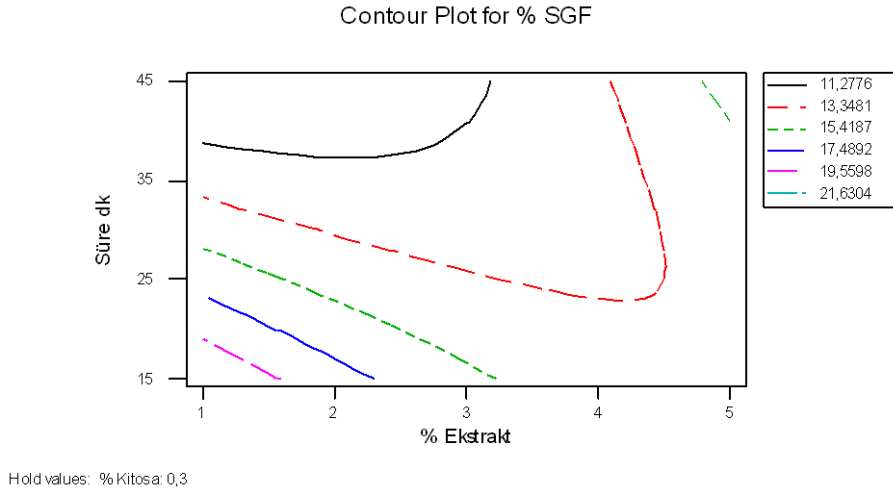
Şekil 6.13: In vitro salım üzerine ekstrakt-kitosan etkisi.

Şekil 6.14'te merkez noktadan uzaklaştıkça salım oranı artmaktadır. Diğer bir ifadeyle karıştırma süresinin kısalması ve kitosan miktarının artması ile kapsül içine hapsedilen antosiyaninlerin mide ortamına salım miktarı artmaktadır. Süre 40 dk ve üzerinde olduğunda salım oranı kitosan miktarından çok fazla etkilenmemektedir. Kapsüller kitosanlı CaCl_2 ortamında ne kadar uzun süre karıştırılırsa Ca-Aljinat ve Aljinat-Kitosan bağları o kadar kuvvetli olacağı için karıştırma süresinin uzaması ile ekstraktın mide ortamına salımı azalacaktır.



Şekil 6.14: In vitro salım üzerinde süre-kitosan etkisi.

Şekil 6.15'te merkez noktadan uzaklaştıkça salım miktarının arttığı görülmektedir. Ekstrakt miktarı $< \%3$ iken karıştırma süresi uzadıkça antosiyanin ekstraktının mide ortamına salım oranının daha az olduğu belirtilmektedir. Ayrıca ekstrakt miktarı $< \%3$ ve süre > 40 dk olduğu durumda ekstrakt miktarı salım oranını daha az etkilemekte ve kapsül içeriğinin daha iyi korunarak daha az salım gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 6.15: In vitro salım üzerinde süre-ekstrakt etkisi.

Litratürdeki enkapsülasyon teknolojisinde RSM kullanılan çalışmalar incelendiğinde bu tez çalışmasına uyumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Örneğin, Lee ve diğ. (2008) kateşin yüklü kalsiyum-pektin bağlı kapsüller ile yaptıkları tepki yüzey metodunda kapsüllerin sertleşme süresi (karıştırma süresi) uzadıkça enkapsülasyon etkinliklerinin azaldığını belirtmiştir. Aynı çalışmada jelleşme ortamındaki CaCl_2 miktarının artmasıyla kalsiyum çapraz bağlı ağ yapısının daha yoğun hale gelmesine ve böylece kateşin yüklü lipozomlar için daha az boş hacim bırakılmasına sebep olduğu için enkapsülasyon etkinliğinde azalmaya sebep olduğu öne sürülmüştür. Jelleşme ortamına biyopolimer ilavesi de benzer şekilde negatif bir etki yaratmıştır. Jelleşme ortamına eklenen biyopolimer belirli bir seviyeye kadar kapsülü koruyarak EE%'ni biraz arttırırken, fazla miktarda kullanımı negatif bir etki göstermiştir. Bu etki daha önce de belirtilen jel ağındaki boş hacimde azalma ve kalsiyum aracılığıyla pektin molekülüne çapraz bağlanmada girişim yaratarak yüklenen kateşinin kapsülden daha kolay dışarı sızması ile açıklanmıştır (Lee ve diğ., 2008).

Karıştırma süresinin uzaması mide ortamına salınan aktif madde miktarının artmasına neden olduğundan %SGF'nin yüksek bulunmasına neden olmuştur. Bu sonuç kapsüllerin yoğun jel yapısındaki kalsiyum iyonlarına daha uzun süre maruz kalması ile açıklanmıştır (Lee ve diğ., 2008).

Pozitif yüklü kitosan ile kaplanacak negatif yüklü kalsiyum-aljinat jelasyonu ile nanoküre oluşumu için düşük konsantrasyonda (<0.2%) CaCl_2 gerektiği bildirilmiştir. Katyonik polimerler kalsiyum ve aljinat iyonları arasındaki ortak bağlanmayı sınırlandırır. Kitosan konsantrasyonundaki artış aljinatın eklenmesi ile

kümelenme oluşturduğu için verim üzerinde negatif etki gösterdiği vurgulanmıştır (Gazori ve diğ, 2009).

6.7.2 Optimum koşulların belirlenmesi ve validasyonu

Bu çalışmada enkapsülasyon işlemi için optimum koşulların belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla ilk etapta enkapsüle edilmek istenen aktif maddenin (antosiyenin ekstraktının) kapsül içinde ne kadarının başarıyla yüklendiği önem taşımaktadır. Antosiyeninler gibi fenolik bileşikler pH, ısı, ışık gibi çevresel faktörlere duyarlı olduklarından bu bileşenler vücuda alınsalar dahi gastrointestinal sistemde bozulmalara uğramakta ve emilimleri yeterli olmadığı için biyoyararlılıkları/biyoulaşılabilirlikleri düşük olmaktadır. Antosiyeninlerin önemli bir miktarının emilimi tüketimlerinden kısa süre sonra gerçekleşmekte bu da antosiyeninlerin midede emilerek gastrointestinal sistemin diğer bölümlerine ulaşamamasına neden olmaktadır (McGhie ve Walton, 2007). Bu nedenle, elde edilen kapsüllerin midenin zorlu asidik koşullarında bozulmaması ve ince bağırsağa ulaşarak buradan kana karışması istenmektedir. Bu çalışmada optimize edilmesi gereken önemli diğer bir parametre ise ekstraktın mide sıvısına salım miktarı (% SGF)'dir. Kapsüllerin şekliyle ilgili faktörler (AR ve SF) % EE ve % SGF'ye kıyasla optimizasyonda daha az önem taşıdıklarından dolayı optimizasyonda bu iki parametrenin önemlilik faktörleri daha düşük olarak belirlenmiştir. Optimizasyon çalışması için % EE'nin maksimum, % SGF'nin minimum olduğu ve AR ~1 ile SF ~0,05 olduğu bir aralık Minitab 13.20 paket program kullanılarak belirlenmiştir.

Optimum koşulların belirlenmesi amacıyla başlangıç noktaları EK C'deki gibi ekstrakt %1,20 , kitosan % 0,11 ve süre 20 dk olarak verildiğinde elde edilen çözüm ekstrakt % 2,81, kitosan % 0,19 ve süre 16,87 dk'dır. Bu sistem ile elde edilen çözümün composite desirability (CD) değeri oldukça düşük bulunmuştur (0,12377). Kapsüllerin şekli ile ilgili bilgi veren küresellik faktörü ve uzunluk oranı enkapsülasyon işleminde enkapsülasyon verimi ve ekstraktın mide sıvısındaki salım oranına kıyasla daha az önem taşımaktadır. Bu nedenle, aynı sistemde sadece maksimum % EE ve minimum %SGF salımı hesaba alınarak yapılan optimizasyon çözümünde ise optimum değerler ekstrakt % 1,96, kitosan % 0,10 ve süre 22,67 dk ve CD değeri 0,39061 olarak bulunmuştur. %2 ekstrakt, %0,1 kitosan ve 23 dakika için yapılan enkapsülasyon sonucu elde edilen teorik ve deneysel veriler

karşılaştırıldığında enkapsülasyon etkinliği için sırasıyla %65,16 ve %64,32 olarak bulunmuştur. Hesaplanan hata değeri $\sim\%1,3$ 'tür. *In vitro* salım için ise teorik değer %14,11 ve deneysel sonuçlara göre elde edilen değer %15,02 olmak üzere hata payı $\sim\%6$ olarak belirlenmiştir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

İyonik jelleşme yöntemi dut antosiyaninlerinin enkapsülasyonunda etkili bir yöntem olup, kullanılan kitosan miktarı, ekstrakt miktarı ve jelleşme ortamındaki karıştırma süresi enkapsülasyon etkinliği ve in vitro salım üzerinde önemli etkileri olan faktörlerdir. Belirtilen tepkiler küresellik faktörü ve uzunluk oranı gibi şekil ile ilgili yanıtlar ise iyonik jelasyon yöntemi için göreceli olarak daha az öneme sahiptir. Çünkü bu faktörler daha çok şekil düzgünlüğü ile ilgili fikir vermek amaçlı olup ortalama bir değere sahip olmaları yeterli olmaktadır. Ancak enkapsülasyon çalışmalarında genel olarak enkapsülasyon etkinliği (verimi) yüksek, mide gibi asidik zorlu koşullara dayanıklı, stabil kapsüller elde etmek istenmektedir.

Genel olarak daha düzgün şekilli (uzunluk oranı küçük~1) kapsüller elde etmek için; kullanılan ekstrakt miktarı fazlayken karıştırma süresi uzun, kitosan miktarı azken karıştırma süresi uzun ve kitosan miktarı fazlayken karıştırma süresi kısa olmalıdır. Kapsül küreselliğini arttırmak için (küresellik faktörü ~ 0); ekstrakt miktarı fazlayken ($> \%3$) karıştırma süresi uzun (>35 dk), süre < 25 dk olduğunda kullanılan kitosan miktarı fazla ve kitosan miktarının $< \% 0,2$ olduğunda süre uzun olmalıdır. Enkapsülasyon etkinliği (verimi) yüksek kapsüller elde etmek için ise; ekstrakt miktarından etkilenmeksizin kitosan $> 0,45\%$ ve hemen hemen tüm durumlarda karıştırma süresi kısa tutulmalıdır. Kapsüllerin mideden bozulmadan geçerek ince bağırsağa ulaşması istenmektedir. Bu durumda gastrik sistemde in vitro salımının düşük olması beklenmelidir. Kitosanın gereğinden fazla olması daha yoğun jel yapısına ve boş hacimde azalmaya neden olur. Bu da kapsüllerin salımının fazla olmasına yol açar. Ekstrakt miktarı fazlayken kitosan miktarı az olursa, kitosan aktif maddeyi korumak için yetersiz kalacak ve mide ortamında salımın fazla olmasına neden olacaktır. Kapsüller kitosanlı CaCl_2 ortamında ne kadar uzun süre karıştırılırsa Ca-Aljinat ve Aljinat-Kitosan bağları o kadar kuvvetli olacağı için karıştırma süresinin uzaması ile ekstraktın mide ortamına salımı azalacaktır.

Yapılan RSM analizi sonucu ekde edilen denklemler ile metot validasyonu yapılarak gerçekte ve teorik olarak elde edilen veriler birbirlerine yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar ileride yapılacak çalışmalar için temel oluşturabilir. Örneğin kapsüller farklı

gıda sistemlerine eklenerek aktif maddenin salımında farklı gıda matrislerinin etkisi incelenebilir, belirlenen optimum koşullar için farklı aktif maddeler kaplanarak salım/sindirim çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Abreu, F.O.M.S., Bianchini, C., Forte, M.M.C. ve Kist, T.B.L.,** 2008. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate–chitosan hydrogels, *Carbohydrate Polymers*, (74), 283–289.
- Acosta, E.,** 2009. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, (14), 3–15.
- Akbulut, M., Çoklar, H., ve Çekiç, Ç.,** 2006. BAŞLIK II.Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu.
- Aramwit, P., Bang, N., ve Srichana, T.,** 2010. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits, *Food Research International*, 43, 1093–1097.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. ve Scher, J.** 2011., Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *Journal of Food Engineering*, 104 (4), 467–483.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., Rodríguez, J.A. ve Galán-Vidal, C.A.,** 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. ve Meireles, M.A.A.,** 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems - An overview, *Food Research International*, 44, 499–509.
- Chan, E-S., Lee, B-B., Ravindra, P., ve Poncelet, D.,** 2009. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method, *Journal of Colloid and Interface Science*, 338, 63-72.
- Chan, E-S., Lim, T-K., Ravindra, P., Mansa, R. F., ve Islam, A.,** 2012. The effect of low air-to-liquid mass flow rate ratios on the size, size distribution and shape of calcium alginate particles produced using the atomization method, *Journal of Food Engineering*, 108, 297–303.
- Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva, I. ve Kratchanova, M.,** 2010. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*, 123, 1055-1061.
- Ercisli, S., ve Orhan, E.,** 2008. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey, *Scientia Horticulturae*, 116, 41–46.
- Ercisli, S., ve Orhan, E.,** 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits, *Food Chemistry*, 103, 1380–1384.

- Ersus, S. ve Yurdagel, U.**, 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier, *Journal of Food Engineering*, **80**, 805–812.
- Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C. ve Rivas-Gonzalo, J.C.**, 2004. Review: Anthocyanins in cereals, *Journal of Chromatography A*, **1054**, 129–141.
- Fang, Z. ve Bhandari, B.**, 2010. Encapsulation of polyphenols - a review, *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 510-523.
- Fazaeli, M., Yousefi, S. ve Emam-Djomeh, Z.**, 2011. Investigation on the effects of microwave and conventional heating methods on the phytochemicals of pomegranate (*Punica granatum* L.) and black mulberry juices, *Food Research International*.
- Gazori, T., Khoshayand, M.R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A. ve Haririan, I.**, 2009. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization, *Carbohydrate Polymers*, **77**, 599–606.
- George, M. ve Abraham, T.E.**, 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review, *Journal of Controlled Release*, **114**, 1–14.
- Giusti, M.M. ve Wrolstad, R.E.**, 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochemical Engineering Journal*, **14**, 217–225.
- Gong, R., Li, C., Zhu, S., Zhang, Y., Du, Y. ve Jiang, J.**, 2011. A novel pH-sensitive hydrogel based on dual crosslinked alginate/N-a-glutaric acid chitosan for oral delivery of protein, *Carbohydrate Polymers*, **85**, 869-874.
- Gonnet, M., Lethuaut, L. ve Boury, F.**, 2010. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins, *Journal of Controlled Release*, **146**, 276-290.
- Gouin, S.**, 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 330–347.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C.G., Kallithraka, S., Kefalasa, P. ve Garcia-Viguerad, C.**, 2003. Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition, *Food Chemistry*, **83**, 423–436.
- Hepsağ, F., Hayoğlu, İ. ve Hepsağ, B.**, 2012. Karadut meyvesinin antosiyanin içeriği ve antosiyaninlerin gıda sanayinde renk maddesi olarak kullanım olanakları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **7(1)**, 9-19.
- Jie, L., Xiao-ding, L., Yun, Z., Zheng-dong, Z., Zhi-ya, Q., Meng, L., Shao-hua, Z., Shuo, L., Meng, W. ve Lu, Q.**, 2012. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices, *Food Chemistry*.
- Kar, C. E., Ferchichi, A., Attia, F. ve Bouajila, J.**, 2011. Pomegranate (*Punica granatum*) juices: Chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity, *Journal of Food Science*, **76(6)**, 795-800.

- Koca, İ., Karadeniz, B. ve Tural, S.,** 2006. Antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, Türkiye.
- Lee, J., Chung, D. ve Lee, H. G.,** 2008. Optimization of calcium pectinate gel beads for sustained-release of catechin using response surface methodology, *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**, 340–347.
- Lee, P.S., Yim, S.G., Choi, Y., Van Anh Ha, T. ve Ko, S.,** 2012. Physiochemical properties and prolonged release behaviours of chitosan-denatured β -lactoglobulin microcapsules for potential food applications, *Food Chemistry*.
- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. ve Wang, Q.,** 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **85**, 145–152.
- Lou, H., Hu, Y., Zhang, L., Sun, P. ve Lu, H.,** 2012. Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba L.*) fruits development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values, *LWT - Food Science and Technology*, **47**, 19-24.
- Matalanis, A., Jones, O.G. ve McClements, D.J.,** 2011. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds, *Food hydrocolloids*, **25**, 1865-1880.
- McClements, D.J.,** 2009. Structural Design Principles for Improved Food Performance: Nanolaminated Biopolymer Structures in Foods. In: Micro/Nanoencapsulation of Active Food Ingredients, Eds. Huang, Q., Given, P., Qian, M., Washington, DC : American Chemical Society, 1, 4-7.
- McClements, D.J. ve Li, Y.,** 2010. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components, *Advances in Colloid and Interface Science*, **159**, 213-228.
- McGhie, T.K. ve Walton, M.C.,** 2007. Review: The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding, *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 702 – 713.
- Motwani, S.K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F.J. ve Khar, R.K.,** 2008. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**, 513–525.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M.T., Khutoryanskiy, V.V. ve Charalampopoul, D.,** 2012. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice, *Carbohydrate Polymers*.
- Nussinovitch, A.,** 2010. Physical properties of beads and their estimation, in Polymer Macro- and Micro-Gel Beads: Fundamentals and Applications, LLC, Springer, pp.1-22.
- Özen, G. ve Akbulut, M.,** 2008. Dut Suyu antosiyanin içeriğinin belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, Türkiye.

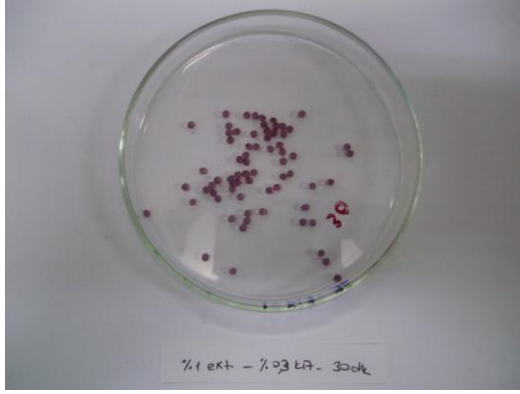
- Özgen, M., Serçe, S. ve Kaya, C.,** 2009. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits, *Scientia Horticulturae*, **119**, 275–279.
- Perrechil, F.A., Sato, A.C.K. ve Cunha, R.L.,** 2011. κ -Carrageenan - sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure, *Journal of Food Engineering*, **104**, 123-133.
- Pliszka, B., Wazbinska, J., Huszcza-Ciolkowska, G. ve Ploszaj, B.,** 2007. Content of polyphenolic compounds and their antioxidative properties in harvested black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit at different ripeness phases. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture*, **26(3)**.
- Potumarthi, R., Subhakar, C., Pavani, A. ve Jetty, A.,** 2008. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods, *Bioresource Technology*, **99**, 1776–1786.
- Rai, S., Wahile, A., Mukherjee, K., Saha, B.P. ve Mukherjee, P.K.,** 2006. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds, *Journal of Ethnopharmacology*, **104**, 322–327.
- Rosso, V.V. ve Mercadante, A.Z.,** 2007. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **8**, 347–352.
- Sadilova, E., Stintzing, F.C., Kammerer, D.R. ve Carle, R.,** 2009. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment, *Food Research International*, **42(8)**, 1023-1033.
- Santos, D.T., Albarelli, J.Q., Beppu, M.M. ve Meireles, M.A.A.,** 2011. Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent, *Food Research International*.
- Sari, P., Wijaya, C.H., Sajuthi, D. ve Supratman, U.,** 2012. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins, *Food Chemistry*, **132**, 1908–1914.
- Shi, P., He, P., Teh, T.K.H., Morsi, Y.S. ve Goh, J.C.H.,** 2011. Parametric analysis of shape changes of alginate beads, *Powder Technology*, **210**, 60-66.
- Sriamornsak, P.,** 1999. Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **8**, 221–227.
- Tsai, P.J., Delva, L., Yu, T.Y., Huang, Y.T. ve Dufosse, L.,** 2005. Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating, *Food Research International*, **38**, 1059–1065.
- Wang, X., Li, X., Chen, L., Xie, F., Yu, L. ve Li, B.,** 2011. Preparation and characterisation of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components, *Food Chemistry*, **126**, 1218-1225.

- Wong, T.W., Chan, L.W., Kho, S.B. ve Heng, P.W.S.**, 2002. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave, *Journal of Controlled Release*, **84**, 99–114.
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., ve Yang, L.**, 2011. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.), *Food Chemistry*, **129**, 443–453.
- Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. ve Oomah, B.D.**, 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113–4117.
- Vidhyalakshmi, R., Bhakyaraj, R. ve Subhasree, R.S.**, 2009. Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review, *Advances in Biological Research*, **3(3-4)**, 96–103.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E. ve Pérez-Álvarez, J.A.**, 2011. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction, *Food Research International*, **44**, 1217–1223.
- Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M. ve Sikkema, J.**, 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components, *International Dairy Journal*, **20**, 292–302.
- Yadav, S.C., Kumari, A. ve Yadav, R.**, 2010. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation, *Peptides*.
- Yoo, S., Song, Y., Chang, P. L. ve Lee, H.G.**, 2006. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, **38**, 25–30.
- Zhang, L. ve Kosaraju, S.L.**, 2007. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants, *European Polymer Journal*, **43**, 2956–2966.
- Zuidam, N. J. ve Shimon, E.**, 2010. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products and Processes and Methods to Make Them. In: N.J. Zuidam and V.A. Nedović (eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*

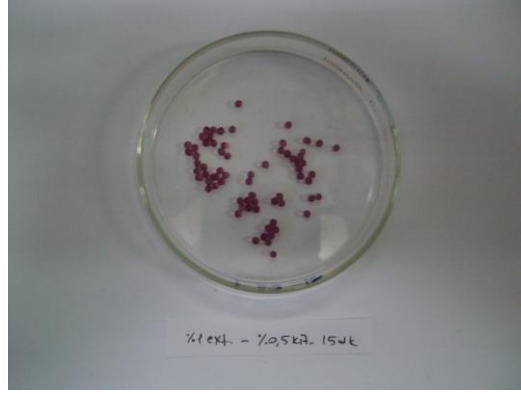
EKLER

- EK A1** : Damlatma yöntemi ile elde edilen kapsüllerin görüntüleri
EK A2 : Damlatma yöntemi ile elde edilen kapsüllerin mikroskop görüntüleri
EK B :Tepki Yüzey Metodu Sonuçları (ANOVA ve regresyon tabloları)
EK C :Yanıtların Optimizasyonu

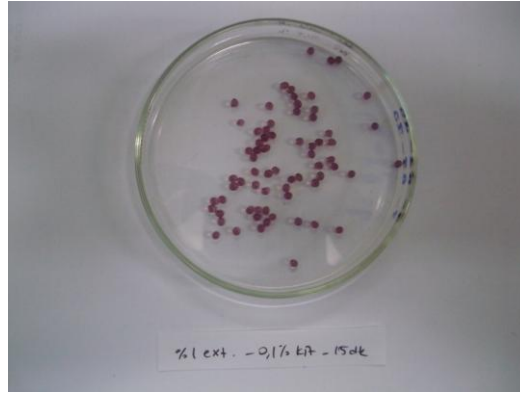
EK A1



(a)

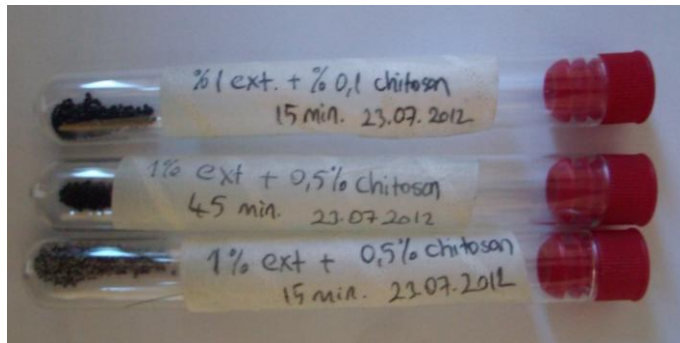


(b)



(c)

Şekil A.1: % 1 ekstrakt kullanılarak üretilen kapsüller (a) %0.3 kitosan ile 30 dk, (b) %0.5 kitosan ile 15 dk, (c) %0.1 kitosan ile 15 dk karıştırıldıktan sonra.



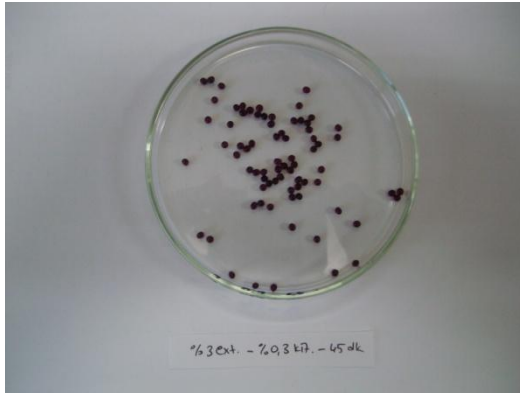
Şekil A.2: %1 ekstrakt içeren kurutulmuş kapsüller.



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil A.3: % 3 ekstrakt kullanılarak üretilen kapsüller (a) %0.3 kitosan ile 15 dk, (b) %0.3 kitosan ile 30 dk, (c) %0.3 kitosan ile 45 dk ve (d) %0.5 kitosan ile 30 dk karıştırıldıktan sonra.



Şekil A.4: %3 ekstrakt içeren kurutulmuş kapsüller.



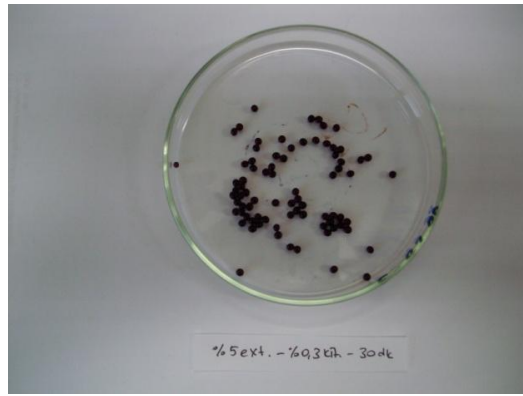
(a)



(b)

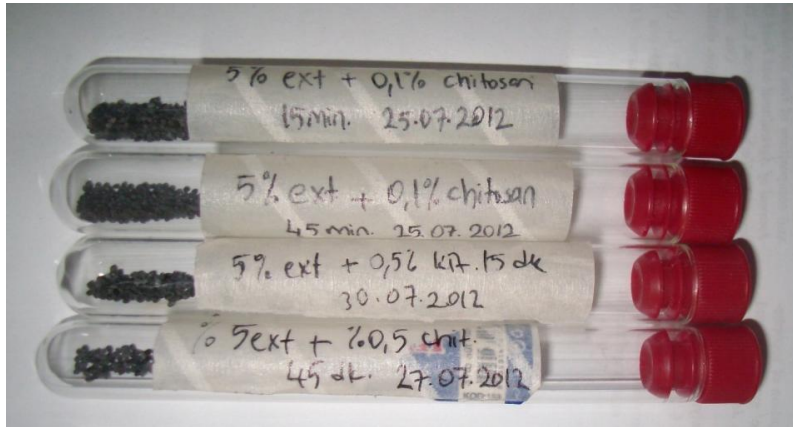


(c)



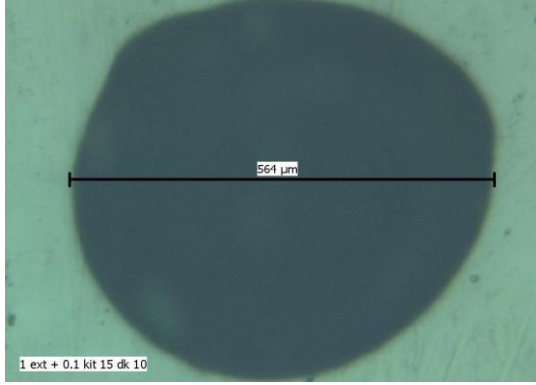
(d)

Şekil A.5: % 5 ekstrakt kullanılarak üretilen kapsüller (a) %0.1 kitosan ile 15 dk, (b) %0.5 kitosan ile 15 dk, (c) %0.5 kitosan ile 45 dk ve (d) %0.3 kitosan ile 30 dk karıştırıldıktan sonra.

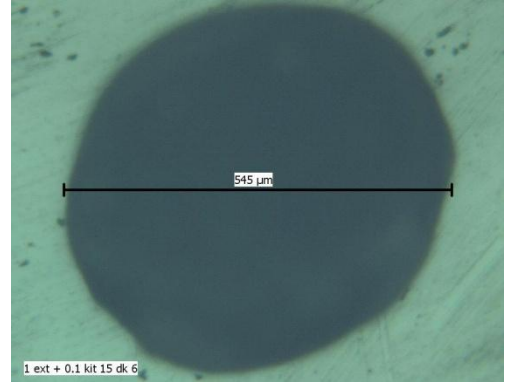


Şekil A.6: %5 ekstrakt içeren kurutulmuş kapsüller.

EK A2

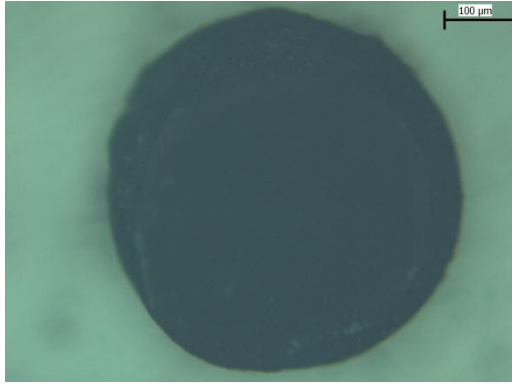


(a)

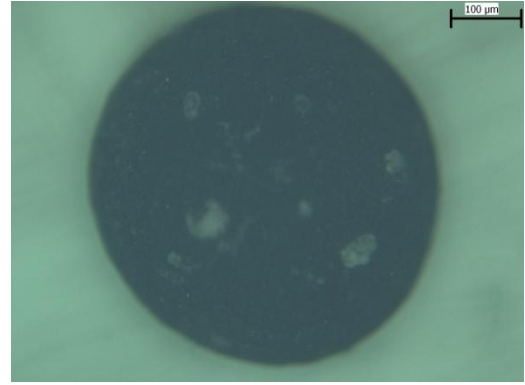


(b)

Şekil A.7: (a) 564x2µm ve (b) 545x2 µm boyutlu %0.1 kitosanlı CaCl₂ çözeltisinde 15 dk karıştırılan %1 ekstrakt yüklü kapsüller için mikroskop görüntüleri.

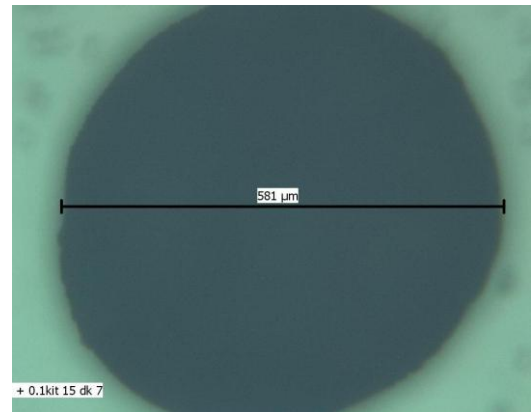
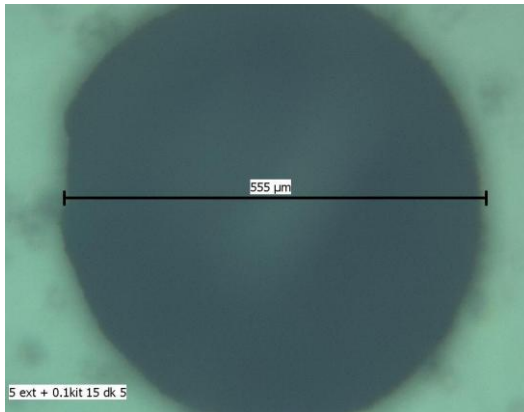


(a)



(b)

Şekil A.8: (a) ve (b) %0.5 kitosanlı CaCl₂ çözeltisinde 30 dk karıştırılan %3 ekstrakt yüklü kapsüller için mikroskop görüntüleri.



Şekil A.9: (a) 555x2µm ve (b) 581x2 µm boyutlu %0.1 kitosanlı CaCl₂ çözeltisinde 15 dk karıştırılan %5 ekstrakt yüklü kapsüller için mikroskop görüntüleri.

EK B

Central Composite Design

Factors: 3 Blocks: none Center points: 3
Runs: 17 Alpha: 1,000

Data Matrix (randomized)

Run	A	B	C
1	0,000	-1,000	0,000
2	-1,000	-1,000	-1,000
3	1,000	-1,000	1,000
4	0,000	0,000	0,000
5	1,000	1,000	-1,000
6	-1,000	-1,000	1,000
7	0,000	0,000	-1,000
8	-1,000	1,000	1,000
9	0,000	0,000	1,000
10	0,000	0,000	0,000
11	0,000	0,000	0,000
12	0,000	0,000	0,000
13	0,000	0,000	0,000
14	0,000	1,000	0,000
15	0,000	0,000	0,000
16	-1,000	1,000	-1,000
17	1,000	-1,000	-1,000

Response Surface Regression: AR versus % Ekstrakt; % Kitosan; Süre

The analysis was done using coded units.

Çizelge B.1: AR için tahminlenen regresyon katsayıları.

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	1,09224	0,005469	199,717	0,000
% Ekstra	-0,01180	0,004042	-2,920	0,022
% Kitosa	0,00290	0,004042	0,718	0,496
Süre	-0,00170	0,004042	-0,421	0,687
% Ekstra*% Ekstra	-0,00217	0,007808	-0,278	0,789
% Kitosa*% Kitosa	0,00533	0,007808	0,683	0,517
Süre*Süre	-0,01267	0,007808	-1,623	0,149
% Ekstra*% Kitosa	0,00412	0,004519	0,913	0,392
% Ekstra*Süre	-0,00812	0,004519	-1,798	0,115
% Kitosa*Süre	0,01288	0,004519	2,849	0,025

S = 0,01278 R-Sq = 78,1% R-Sq(adj) = 49,9%

Çizelge B.2: AR için ANOVA tablosu.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0,004074	0,004074	0,000453	2,77	0,096
Linear	3	0,001505	0,001505	0,000502	3,07	0,100
Square	3	0,000579	0,000579	0,000193	1,18	0,384
Interaction	3	0,001990	0,001990	0,000663	4,06	0,058
Residual Error	7	0,001143	0,001143	0,000163		
Lack-of-Fit	5	0,001143	0,001143	0,000229	*	*
Pure Error	2	0,000000	0,000000	0,000000		
Total	16	0,005218				

Çizelge B.3: AR için belirlenen regresyon katsayıları.

Term	Coef
Constant	1,08896
% Ekstra	0,00238477
% Kitosa	-0,225152
Süre	0,00279007
% Ekstra*% Ekstra	-0,000542254
% Kitosa*% Kitosa	0,133275
Süre*Süre	-5,63067E-05
% Ekstra*% Kitosa	0,0103125
% Ekstra*Süre	-0,000270833
% Kitosa*Süre	0,00429167

Response Surface Regression: SF versus % Ekstrakt; % Kitosan; Süre

The analysis was done using coded units.

Çizelge B.4: SF için tahminlenen regresyon katsayıları.

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,042676	0,002371	17,998	0,000
% Ekstra	-0,001600	0,001752	-0,913	0,392
% Kitosa	-0,002400	0,001752	-1,370	0,213
Süre	-0,004700	0,001752	-2,682	0,031
% Ekstra*% Ekstra	0,000817	0,003385	0,241	0,816
% Kitosa*% Kitosa	0,003817	0,003385	1,127	0,297
Süre*Süre	-0,004683	0,003385	-1,383	0,209
% Ekstra*% Kitosa	-0,002000	0,001959	-1,021	0,341
% Ekstra*Süre	-0,007250	0,001959	-3,701	0,008
% Kitosa*Süre	0,010000	0,001959	5,104	0,001

S = 0,005541 R-Sq = 88,4% R-Sq(adj) = 73,4%

Çizelge B.5: SF için ANOVA tablosu.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0,001631	0,001631	0,000181	5,90	0,014
Linear	3	0,000304	0,000304	0,000101	3,30	0,087
Square	3	0,000074	0,000074	0,000025	0,81	0,529
Interaction	3	0,001253	0,001253	0,000418	13,60	0,003
Residual Error	7	0,000215	0,000215	0,000031		
Lack-of-Fit	5	0,000215	0,000215	0,000043	*	*
Pure Error	2	0,000000	0,000000	0,000000		
Total	16	0,001846				

Çizelge B.6: SF için belirlenen regresyon katsayıları.*

Term	Coef
Constant	0,0535197
% Ekstra	0,00672465
% Kitosa	-0,154254
Süre	0,000660493
% Ekstra*% Ekstra	0,000204225
% Kitosa*% Kitosa	0,0954225
Süre*Süre	-2,08138E-05
% Ekstra*% Kitosa	-0,00500000
% Ekstra*Süre	-0,000241667
% Kitosa*Süre	0,00333333

* Estimated Regression Coefficients for SF using data in uncoded units

Response Surface Regression: % EE versus % Ekstrakt; % Kitosan; Süre

The analysis was done using coded units.

Çizelge B.7: %EE için tahminlenen regresyon katsayıları.

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	58,526	0,3129	187,031	0,000
% Ekstra	-1,297	0,2313	-5,609	0,001
% Kitosa	1,237	0,2313	5,350	0,001
Süre	-4,805	0,2313	-20,777	0,000
% Ekstra*% Ekstra	-2,328	0,4468	-5,210	0,001
% Kitosa*% Kitosa	5,040	0,4468	11,282	0,000
Süre*Süre	1,635	0,4468	3,660	0,008
% Ekstra*% Kitosa	0,162	0,2586	0,625	0,552
% Ekstra*Süre	0,134	0,2586	0,518	0,621
% Kitosa*Süre	-0,154	0,2586	-0,594	0,571

S = 0,7313 R-Sq = 99,0% R-Sq(adj) = 97,7%

Çizelge B.8: %EE için ANOVA tablosu.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	370,552	370,552	41,1725	76,99	0,000
Linear	3	262,985	262,985	87,6617	163,92	0,000
Square	3	107,026	107,026	35,6752	66,71	0,000
Interaction	3	0,541	0,541	0,1804	0,34	0,799
Residual Error	7	3,744	3,744	0,5348		
Lack-of-Fit	5	3,077	3,077	0,6154	1,85	0,388
Pure Error	2	0,667	0,667	0,3333		
Total	16	374,296				

Çizelge B.9: % EE için belirlenen regresyon katsayıları.*

Term	Coef
Constant	81,1735
% Ekstra	2,58792
% Kitosa	-69,0938
Süre	-0,754415
% Ekstra*% Ekstra	-0,581928
% Kitosa*% Kitosa	126,007
Süre*Süre	0,00726795
% Ekstra*% Kitosa	0,404063
% Ekstra*Süre	0,00446250
% Kitosa*Süre	-0,0512083

*Estimated Regression Coefficients for % EE using data in uncoded units

Response Surface Regression: % SGF versus % Ekstrakt; % Kitosan; Süre

The analysis was done using coded units.

Çizelge B.10: % SGF için tahminlenen regresyon katsayıları.

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	12,625	0,7317	17,255	0,000
% Ekstra	-0,283	0,5407	-0,524	0,617
% Kitosa	0,765	0,5407	1,414	0,200
Süre	-2,454	0,5407	-4,539	0,003
% Ekstra*% Ekstra	1,735	1,0446	1,660	0,141
% Kitosa*% Kitosa	0,972	1,0446	0,930	0,383
Süre*Süre	0,777	1,0446	0,743	0,481
% Ekstra*% Kitosa	-1,942	0,6045	-3,212	0,015
% Ekstra*Süre	3,757	0,6045	6,215	0,000
% Kitosa*Süre	-1,357	0,6045	-2,245	0,060

S = 1,710 R-Sq = 92,7% R-Sq(adj) = 83,3%

Çizelge B.11: %SGF için ANOVA tablosu.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	259,528	259,528	28,8365	9,86	0,003
Linear	3	66,883	66,883	22,2945	7,63	0,013
Square	3	34,803	34,803	11,6010	3,97	0,061
Interaction	3	157,842	157,842	52,6140	18,00	0,001
Residual Error	7	20,466	20,466	2,9237		
Lack-of-Fit	5	19,164	19,164	3,8328	5,89	0,152
Pure Error	2	1,302	1,302	0,6509		
Total	16	279,994				

Unusual Observations for % SGF

Observation	% SGF	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
5	13,107	14,702	1,524	-1,595	-2,06R
16	16,532	14,076	1,228	2,456	2,06R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Çizelge B.12: % SGF için belirlenen regresyon katsayıları.*

Term	Coef
Constant	28,8380
% Ekstra	-5,04448
% Kitosa	17,3787
Süre	-0,610690
% Ekstra*% Ekstra	0,433629
% Kitosa*% Kitosa	24,3004
Süre*Süre	0,00345117
% Ekstra*% Kitosa	-4,85406
% Ekstra*Süre	0,125246
% Kitosa*Süre	-0,452458

*Estimated Regression Coefficients for % SGF using data in uncoded units

EK C

Response Optimization

Çizelge C.1: Yanıt optimizasyonu için belirlenen değerler - 1.

		Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Import
AR	Minimum	1,00	1,00	1,10	1	0,5	
SF	Minimum	0,03	0,03	0,05	1	1,0	
% EE	Maximum	60,00	70,00	70,00	1	5,0	
% SGF	Minimum	12,00	12,00	15,00	1	5,0	

Starting Point

Ekstrakt = 1,20
Kitosan = 0,11
Süre = 20,00

Local Solution

Ekstrakt = 2,8169
Kitosan = 0,1957
Süre = 16,8754

Predicted Responses

AR = 1,0904; desirability = 0,09552
SF = 0,0495; desirability = 0,02338
% EE = 64,7545; desirability = 0,47545
% SGF = 14,8616; desirability = 0,04614

Composite Desirability = 0,12377

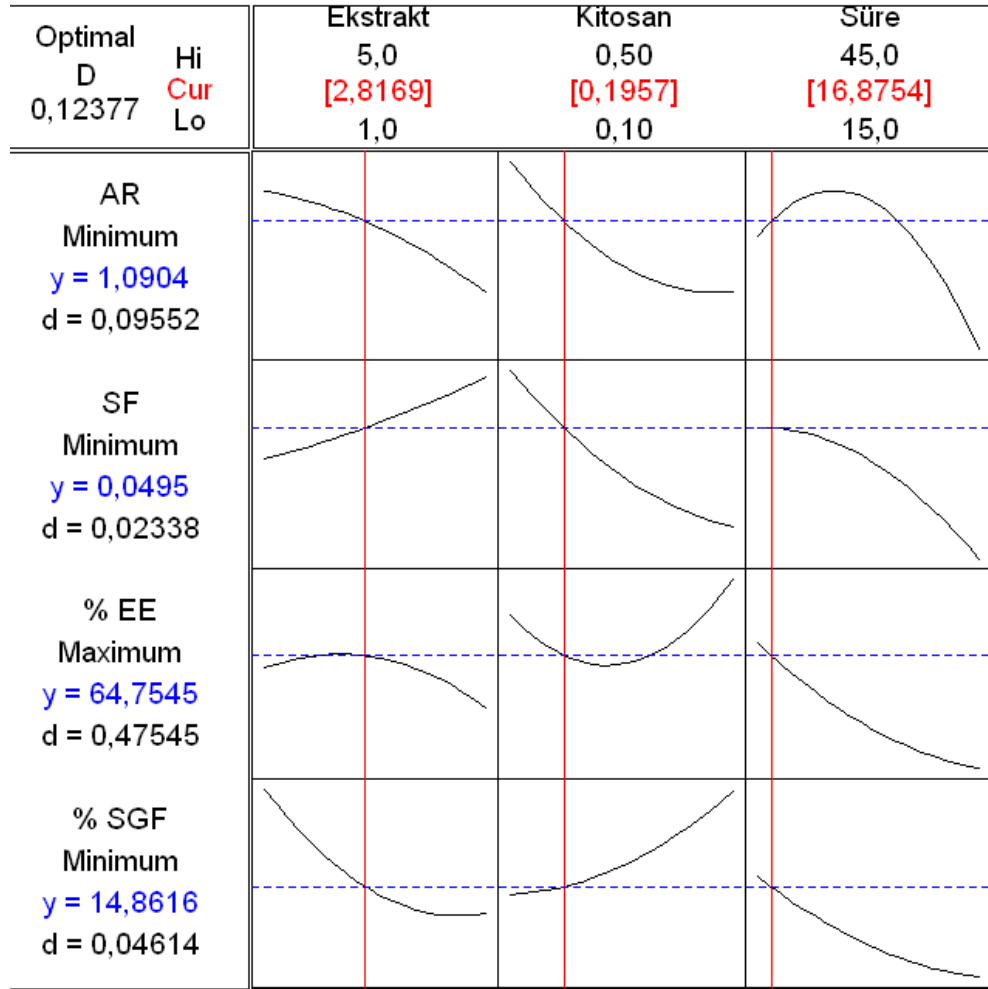
Global Solution

Ekstrakt = 2,8169
Kitosan = 0,1957
Süre = 16,8754

Predicted Responses

AR = 1,0904; desirability = 0,09552
SF = 0,0495; desirability = 0,02338
% EE = 64,7545; desirability = 0,47545
% SGF = 14,8616; desirability = 0,04614

Composite Desirability = 0,12377



Şekil C.1: Yanıt optimizasyon garifği -1.

Çizelge C.2: Yanıt optimizasyon değerleri -2.

	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Import
% EE	Maximum	60	70	70	1	5
% SGF	Minimum	12	12	15	1	5

Starting Point

Ekstrakt = 1,20
Kitosan = 0,11
Süre = 20,00

Local Solution

Ekstrakt = 1,9626
Kitosan = 0,1000
Süre = 22,6697

Predicted Responses

% EE = 65,1563; desirability = 0,51563
 % SGF = 14,1123; desirability = 0,29590

Composite Desirability = 0,39061

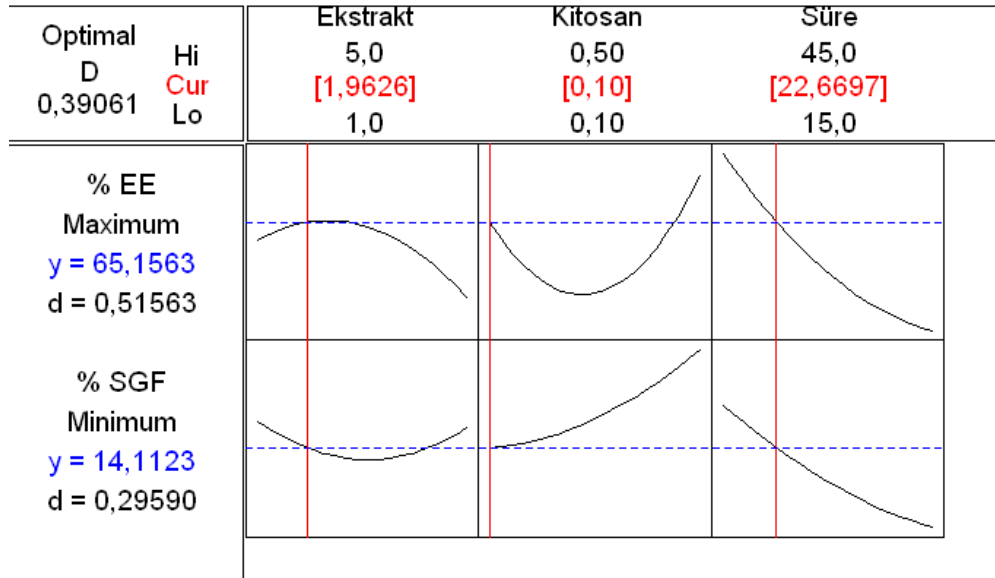
Global Solution

Ekstrakt = 1,9626
 Kitosan = 0,1000
 Süre = 22,6697

Predicted Responses

% EE = 65,1563; desirability = 0,51563
 % SGF = 14,1123; desirability = 0,29590

Composite Desirability = 0,39061



Şekil C.2: Yanıt optimizasyon grafiği -2.

ÖZGEÇMİŞ

VESİKALIK
FOTO

Ad Soyad: Tuğçe Çoruhli

Doğum Yeri ve Tarihi: 07.08.1987/ Fatih

Adres:

E-Posta: tugcecoruhlu@hotmail.com

Lisans: Gıda Mühendisliği (İstanbul Teknik Üniversitesi 2005-2010)

Mesleki Deneyim ve Ödüller: IFF Aroma ve Esans- İçecek Uygulama Mühendisi (2012-...)

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- **Coruhli, T.,** Özçelik, B., 2012. Extra-virgin olive oil microencapsulation by chitosan coated alginate beads and influence of oil content on encapsulation efficiency. *10th Euro Fed Lipid Congress*, 23-26 September 2012, Cracow Poland (Poster)
- Özçelik, B., Engüdar, G., **Çoruhli, T.,** Karaca, A.C., Demir, N.S., 2012. Encapsulation of tea catechins and transport&release studies from alginate beads by continuous system. *11th International Hydrocolloids Conference*, 14-18 May 2012, Purdue University, Indiana USA (Poster).
- Özçelik, B., Engüdar, G., Giz, H., **Coruhli, T.,** Demir, N.S., 2012. Monitoring tea catechins transport and release processes from alginate beads by continuous system. *103rd AOCS Annual Meeting*, April 29 – May 2 2012, Long Beach California USA (Poster).
- Özçelik, B., **Çoruhli, T.,** Demir, N.S. Encapsulation of olive oil into calcium alginate beads. *YABİTED 1. Bitkisel Yağ Kongresi*, 12-14 Nisan 2012, Adana, TÜRKİYE (Poster).
- Özçelik, B., Engüdar, G., Demir, N.S., **Coruhli, T.,** 2011. Monitoring tea catechins transport and release processes from alginate beads. *18th International Microencapsulation Symposium*, 12-14 September 2011, Antalya, TURKEY (Poster).