

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEİN-KAZEİN İLE KAPSÜLENMİŞ NANE UÇUCU YAĞININ ANTIOKSİDAN VE
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

SEVİL AYÇA BİLİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

MART 2019

ONAY SAYFASI

Tezin Başlığı: Zein–Kazein ile Kapsüllenmiş Nane Uçucu Yağının Antioksidan ve Antimikrobiyal zelliklerinin Belirlenmesi

Tezi Hazırlayan: Sevil Ayça BİLİCİ

Sınav Tarihi:

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri yeleri

Tez Danışmanı: **Dr. Öğretim yesi İncilay GÖKBULUT**
İnönü Üniversitesi

Dr. Öğretim yesi Tuğça BİLENLER
İnönü Üniversitesi

Dr. Öğretim yesi Nurullah DEMİR
Bingl Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Zein-Kazein ile Kapsüllenmiş Nane Uçucu Yağının Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel etik kurallarına aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynaklarda yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Sevil Ayça BİLİCİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEİN–KAZEİN İLE KAPSÜLENMİŞ NANE UÇUCU YAĞININ ANTIOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Sevil Ayça BİLİCİ

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

75 + ix sayfa

2019

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi İncilay GÖKBULUT

Mikrokapsülasyon, uçucu yağların bileşen stabilitesinin sağlanarak saklanması ve biyoaktif özelliklerinin korunması ve/veya arttırılması için sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Çekirdek ve kabuk materyal seçimi ile mikrokapsülasyon etkinliği, çekirdeği koruma etkinliği ve mikrokapsül kararlılığı gibi karakteristik özellikler şekillenmektedir. Bu çalışmada sıvı-sıvı dispersiyon ve liyofilizasyon yöntemleri ile hazırlanan; zein ve farklı oranlarda zein/kazein kompleksleri kullanılarak elde edilen boş ve nane (*Mentha spicata*) uçucu yağı merkezli mikrokapsüllerin etkinlik, antioksidan, antimikrobiyal, boyut ve yüzey, salım periyodu özellikleri belirlenmiştir.

Çalışmada nane bitkisinden Clevenger düzeneği kullanılarak ortalama %1 oranında uçucu yağ elde edilmiştir. Nane uçucu yağının yapısında bulunan bileşen ve miktarları (%) tespit etmek için GC-MS tekniği kullanılmış ve tespit edilen 24 bileşen içerisinde majör bileşenin %45.53 oranla karvon olduğu belirlenmiştir.

Zeine farklı oranlardaki (%1, %3, %5, %7, %9, %11, %13 ve %15) kazein ilavesi ile elde edilen mikrokapsüllerin kapsülasyon etkinliği en yüksek 54.66 ± 3.76 olarak %13'lük zein-kazein formülasyonu ile sağlanırken, sadece zein kullanılarak elde edilen mikrokapsüllerin kapsülasyon etkinliği 46.84 ± 0.22 olarak belirlenmiştir.

Mikrokapsüllerin morfolojisi SEM ile incelenmiş kazein parçacıklarının kapsül yapısını desteklediği görülmüştür. Hazırlanan salım ortamında zein-nane mikrokapsüllerinin zein-kazein-nane mikrokapsüllerine göre daha hızlı ve fazla salım sağladığı tespit edilmiştir. Zein kabuk materyalli mikrokapsüller %64.27 oranında salım yaparken, zein-kazein kabuk materyalli mikrokapsüllerdeki salım oranı %37.86 olarak tespit edilmiştir.

Zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin antioksidan aktivitesi serbest uçucu yağ ve zein-nane mikrokapsüllerine göre daha üstün bulunmuştur. Serbest formda bulunan nane uçucu yağının antimikrobiyal kapasitesinin mikrokapsül forma kıyasla daha yüksek olduğu bu çalışmanın öne çıkan verileri arasındadır.

ANAHTAR KELİMELELER: Mikrokapsülasyon, zein, kazein, *Mentha spicata*, uçucu yağ, antioksidan, antimikrobiyal

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF ZEIN-CASEIN ENCAPSULATED SPEARMINT ESSENTIAL OIL

Sevil Ayça BİLİCİ

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

75 + ix pages

2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İncilay GÖKBULUT

Microencapsulation is a useful and often preferred process to preserve by providing the component stability of the essential oils and to prevent or/and increase bioactivity properties. Characteristic features such as microencapsulation efficiency, microencapsule stability and protection of core are shaped with selected core and coat materials. In this research, the efficiency, antioxidant, antimicrobial, surface and size properties and release period based on empty and essential (volatile) spearmint (*Mentha spicata*) oil microcapsules which are obtained via zein and zein/casein complexes and prepared with liquid-liquid dispersion and lyophilization techniques are identified.

In the study, average 1% essential oil is obtained from spearmint plant with the help of the cleveger apparatus technique. The GC-MS technique is used for determining the components of the spearmint essential oils and their amounts (%). Among 24 detected components, the major one is carvone (45.53%).

While the encapsulation efficiency of 13% zein-casein formulation was 54.66%±3.76% which is the highest encapsulating retention success among the different concentrations (1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, and 15%) of zein-casein microcapsules, the encapsulation efficiency value of microcapsules obtained by using only zein was 46.84%±0.22%.

When investigated microcapsules were by SEM, it was observed that the structure of capsule was supported by casein particles. In addition to that, in the release rate test, release of the spearmint essential oil from microcapsules was determined as 64.27% in microcapsules obtained by using only zein. The release rate of the microcapsules zein-casein was determined as 37.86%.

Antioxidative activity of zein-casein-mint microcapsules is found to be superior to the essential oil and zein-mint microcapsules. The study shows us that the antimicrobial capacity of mint essential oil in free-form is higher than the one in microencapsule form.

KEYWORDS: Microencapsulation, zein, casein, *Mentha spicata*, essential (volatile) oil, antioxidant, antimicrobial

TEŞEKKÜR

Öğrenim hayatım ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan, öneri ve desteklerini esirgmeden çalışmama manevi ve fiili olarak katkılar sunan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi İncilay GÖKBULUT'a (İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı);

Fiili olarak çalışmama önemli katkılar sunan, bilgi, öneri ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Tuğça BİLENLER'e (İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı);

Çalışmayı gerçekleştirirken hem manevi hem de fiili olarak yanımda olan arkadaşım Gıda Yüksek Mühendisi Fatma Sezer ÖZTÜRK'e;

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu tez çalışmam sürecinde de hep yanımda olup her zaman destek olan annem Elif BURAK ve babam Mehmet BURAK'a;

Manevi ve fiili olarak desteklerini her daim hissettirip beni teşvik eden, fikirlerini ve emeklerini esirgmeden tez çalışmam süresince gerek literatür araştırmalarım gerekse çevirilerimde bana destek olan ablam Sibel GÖKDEMİR ile eşi Murat GÖKDEMİR'e, kuzenim Baran Bedran BURAK'a, manevi kardeşim Alev İlke AKIN'a, eşim Emrah BİLİCİ'ye ve her zaman bana inanan tüm aile üyelerim ve dostlarıma;

Minnetlerimi sunar ve teşekkür ederim.

İ.Ü. BAP kapsamında 2014/7 nolu proje ile yüksek lisans tez çalışmamı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	7
2.1. Mikrokapsülasyon	7
2.1.1. Mikrokapsül morfolojisi	8
2.1.2. Mikrokapsülasyon uygulama alanları	10
2.1.3. Kabuk materyalleri	11
2.1.4. Mikrokapsülasyon yöntemleri	13
2.2. Uçucu Yağlar	15
2.2.1. Uçucu yağ elde etme yöntemleri	16
2.2.2. Uçucu yağ bileşenleri	17
2.2.3. Uçucu yağların özellikleri	19
2.2.4. Uçucu yağların kullanım alanları	21
2.3. Nane (<i>Mentha spicata</i>)	22
2.3.1. <i>Lamiaceae</i> familyası	22
2.3.2. <i>Mentha</i> (nane)	23
2.3.3. <i>Mentha spicata</i>	25
2.4. Zein	27
2.4.1. Zeinin çözünürlük özelliği	29
2.4.2. Zeinin plastikleştirici özelliği	29
2.4.3. Zeinin kapsül oluşturabilme özelliği	30
2.5. Kazein	30
2.5.1. Kazeinin özellikleri	32
2.6. Mikrokapsülasyon Teknolojisinde Zein ve Kazein Kullanımı	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM	39
3.1. Materyal	39
3.2. Kullanılan Kimyasallar	39
3.3. Kullanılan Alet Ekipman ve Cihazlar	39
3.4. Kullanılan Mikroorganizmalar	40

3.5.	Yöntem	40
3.5.1.	Nane uçucu yağının elde edilmesi	40
3.5.2.	Nane uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi	41
3.5.3.	Nane uçucu yağının mikrokapsülasyonu	41
3.5.4.	Mikrokapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	42
3.5.5.	Mikrokapsül partiküllerin boyut dağılımı ve yüzey morfolojisinin belirlenmesi ..	43
3.5.6.	Mikrokapsüllerin zamana bağlı uçucu yağ salımlarının belirlenmesi	43
3.5.7.	Nane uçucu yağı içeren mikrokapsüllerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi	44
3.5.8.	Nane uçucu yağı içeren mikrokapsüllerin antimikrobiyal kapasitelerinin belirlenmesi	44
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	46
4.1.	Nane Uçucu Yağının Elde Edilmesi	46
4.2.	Nane Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi	46
4.3.	Nane Uçucu Yağının Mikrokapsülasyonu	48
4.4.	Mikrokapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	49
4.5.	Zein-Kazein Mikrokapsüllerinin Taramalı Elektron Mikroskopuyla (SEM) Partikül Boyut Dağılımının ve Yüzey Morfolojisinin Belirlenmesi	51
4.6.	Mikrokapsüllerin Zamana Bağlı Uçucu Yağ Salımlarının Belirlenmesi	53
4.7.	Nane Uçucu Yağı İçeren Mikrokapsüllerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	55
4.8.	Nane Uçucu Yağı İçeren Mikrokapsüllerin Antimikrobiyal Kapasiteleri	57
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	61
6.	KAYNAKLAR	64
	ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

a_w	Su aktivitesi
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
C	Karbon
C ₅	İzopren
Ca ²⁺	Kalsiyum
CH ₃ OH	Metanol
CMCS	Karboksimetil kitosan
COOH	Karboksilik asit
Da	Dalton
DPPH	2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil
EtOAc	Etil asetat /CH ₃ COOCH ₂ CH ₃
EtOH	Etanol / C ₂ H ₅ OH
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC	Gaz Kromatografi
GC-FID	Gaz Kromatografisi- Alev İyonlaşma Dedektörü
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
GRAS	Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen
HCl	Hidrojen klorür
INT	p-iodotetrazolium violet
kDa	Kilodalton
MHB	Mueller Hinton Broth
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu / MIC
MS	Kütle Spektrometrisi
mV	Milivolt
NaCas	Sodyum kazeinat
NH ₂	Amino grubu
OH	Hidroksil grubu
PBS	Fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline)
pI	İzoelektrik nokta
RI	Retention Index (saklama endeksi)

rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
SO ₂	Kükürt dioksit
Trolox	(±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkrom-2-karboksilik asit
VD ₃	Vitamin D ₃
w/v	Ağırlık / Hacim



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Mikrokapsül morfolojisi	8
Şekil 2.2.	Bazı <i>Mentha</i> türlerine ait görseller	24
Şekil 2.3.	Karvonun molekül yapısı	27
Şekil 2.4.	Granül zein	28
Şekil 3.1.	Kurutulmuş nane bitkisi	39
Şekil 3.2.	Nane uçucu yağı	40
Şekil 3.3.	Homojenizasyon işlemi ve homojenize edilmiş karışım görselleri	41
Şekil 3.4.	Karvon standartının farklı konsantrasyonları ile oluşturulan kalibrasyon grafiği	43
Şekil 4.1.	Nane uçucu yağına ait kromatogram görüntüsü	47
Şekil 4.2.	Mikrokapsüller	49
Şekil 4.3.	Zeine farklı oranlarda kazein ilavesiyle elde edilen mikrokapsüllerin mikrokapsülasyon etkinlik değerleri (%) grafiği	50
Şekil 4.4.	Mikrokapsüllere ait SEM görüntüleri	52
Şekil 4.5.	Örneklerin zamana bağlı salım değerleri grafiği	54
Şekil 4.6.	DPPH süpürme gücü grafiği	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Çeşitli mikrokapsülasyon teknikleri ve her teknikte yer alan süreçler....	14
Çizelge 2.2.	Monoterpenlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları	17
Çizelge 2.3.	Yapılarına göre sesquiterler	18
Çizelge 2.4.	Zein için ikincil çözücüler	29
Çizelge 4.1.	Nane uçucu yağının kimyasal kompozisyonu	47
Çizelge 4.2.	Zeine farklı oranlarda kazein ilavesiyle elde edilen mikrokapsüllerin mikrokapsülasyon etkinlik değerleri (%)	50
Çizelge 4.3.	Zamana bağlı salım değerleri tablosu	53
Çizelge 4.4.	DPPH süpürme gücü tablosu	55
Çizelge 4.5.	Serbest nane uçucu yağı, boş ve dolu <u>zein</u> , <u>zein-kazein</u> mikrokapsüllerinin antimikrobiyal kapasite sonuçları	57

1. GİRİŞ

Günümüzde sentetik kimyasal ilaçlar ve katkı maddelerinin aşırı ve bilinçsiz kullanımı mikroorganizma direncine, akut ve kronik toksisiteye, teratojeniteye neden olmaktadır. Ayrıca bu kimyasalların uzun vadede oluşabilecek farklı yan etkilerine karşı artan bir endişe de vardır. İnsan sağlığı, gıda güvenilirliği ve çevre sağlığı açısından artan endişeler ve mevzuat kısıtlamalarının da etkisiyle tüketici ve üreticiler “doğal” alternatiflere yönelmekte ve bu konuya ilişkin çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Literatürde doğadaki bileşenlerin antioksidan, antimikrobiyal özellikleri üzerine çok sayıda çalışma vardır ve birçok araştırmanın odağında aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağlar yer almaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS) olarak sınıflandırılan bitkisel kökenli etken maddeleri içinde bulunduran uçucu yağlar ve majör bileşenlerinin kullanımı sentetik kimyasalların kullanımına alternatif oluşturarak bunların neden olduğu olumsuz durumların önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Gıda kökenli antimikrobiyal ajanlar, gıda ürünlerini mikrobiyolojik olarak daha güvenli ve daha kaliteli hale getirmek için, patojen mikroorganizmaları inhibe ederek, mikroorganizmalarla mücadeleye önemli katkılar sağlarlar. Bu antimikrobiyal ajanlar gıda formülasyonuna dahil edildiğinde protein ve lipid gibi gıda bileşenlerine bağlanarak, bu bileşenlerin mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliğini sınırlamaktadırlar [1]. Hayvan ve bitki dokularında doğal olarak oluşan antimikrobiyal ajanlar, buldukları ortamda mikrobiyolojik istilaya karşı savunma mekanizmalarının bir parçası olarak evrimleşmiş ve mevcut gıdalarda doğal içerik olarak var olmuşlardır [2, 3]. Bitki yağlarının ve özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi uzun yıllardır bilinen bir gerçektir. Uçucu yağların bakteriler, mayalar ve mantarlara karşı büyüme inhibisyonu da dahil olmak üzere geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi vardır [4, 5]. Uçucu yağların kimyasal koruyucularda olduğu gibi sınırlı miktarda değil, antimikrobiyal etkiyi sağladıkları kritik miktar ve üzerinde kullanılmaları, etkili bir antimikrobiyal aktivite sağlamakta ancak yoğun aroma içerikleri istenmeyen tat ve lezzete sebep olmaktadır [6].

Antioksidanlar oksidatif reaksiyonların başlamasını, devam etmesini inhibe eden ve/veya yavaşlatan etkiye sahip serbest radikal süpürücü maddelerdir. Gıdalardaki özellikle protein ve lipid oksidasyonuna bağlı bozulmaları önlemek için gıda katkı maddeleri olarak yaygın kullanılırken; vücuttaki biyokimyasal reaksiyonların birer ürünü olan serbest radikallerin sorumlu olduğu kronik hastalıkların, çeşitli yaşam tarzıyla ilgili hastalıkların ve yaşlanmanın önlenmesinde ilaç ve kozmetik endüstrisinde önemli bir role sahiptirler. Lipid oksidasyonun önlenmesi için gıdalarda yapay antioksidan maddelerin kullanılması, karsinogenik potansiyele bağlı olarak şüphe yaratmaktadır [7-9]. Sentetik antioksidanların güvenliği ve kullanımı hakkındaki şüpheler ilk kez 1960'ların başında Lalas ve Tsaknis (2002) tarafından belirtilmiştir [10, 11]. Son yıllarda, uygulanabilir ve daha güvenli doğal antioksidanları araştırmaya yönelik

birçok çalışma yapılmıştır [9, 12-16]. Günümüzde araştırmaların odak noktası doğal antioksidan türleri, özellikle yüksek antioksidan özelliklere sahip bitki polifenollerinin olup, tüketim için yüksek oranda tavsiye edilmektedir [17].

Tıbbi aromatik bitkiler ve baharatlar yüzyıllardan bu yana gerek hastalıkların tedavisinde gerekse aroma verici olarak insanoğlu tarafından kullanılmaktadır. Doğal uçucu yağlar aromatik bitkilerin çiçek, yaprak, gövde gibi kısımlarından elde edilmektedirler. Baharatların öğütülmesi ile bitkinin salgı hücreleri, bezleri ve yağının bulunduğu diğer dokular parçalanmakta ve parçalanmış dokulardan dışarı sızan uçucu yağlar suda hafifçe çözünerek, suya tat ve kokularını vermektedirler. Uçucu yağlar terpenler, alkoller, esterler, aldehitler, ketonlar, fenoller, eterler ve diğer küçük bileşikler içeren yapılardır [4, 5]. Lipidlere benzer özelliklerinden dolayı yağ olarak adlandırılırlarken; oda sıcaklığında uçucu özellikte olmalarından dolayı uçucu yağ, aromatik özelliklerinden ve bileşenlerinden dolayı aromatik yağ, esans özelliği taşıdıklarından dolayı esansiyel yağ olarak adlandırılmaktadırlar. Uçucu yağlar içerdikleri etkin biyoaktif bileşenler nedeniyle gıda, ilaç ve kozmetik amaçlı kullanılmaktadırlar. Bu bitkilerin pazarı ve dolayısıyla yetiştiriciliği önem taşımaktadır. Sezik vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada uçucu yağların %65'lik bir bölümü çalı-odunsu, çok yıllık bitki türlerine (yasemin, gül, turunçgiller vb.) ait olmakla birlikte, otsu bitkiler arasında yer alan nane bitkisinden elde edilen uçucu yağların, ilk sırada olduğunu bildirmişlerdir [18]. Farklı şekillerde; demleme işlemi ile çay olarak, yemeklere lezzet katmak için kullanılan çok sayıda bitki ve baharat, doğal antioksidanların övgüye değer kaynakları olarak değerlendirilmektedir [19]. Baharat ve bitkilerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, esansiyel yağların, biyoaktif bileşenlerin ve fenolik bileşenlerin varlığına bağlanmaktadır [20, 21]. Ayrıca bitki polifenollerinin kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı üstün koruma yeteneği gibi pozitif sağlık etkileri olduğu belirtilmektedir [17].

Mentha türünü de içinde barındıran *Lamiaceae* familyasına ait bitkilerin fonksiyonel özellikleri üzerinde uzun yıllardan beri çalışmalar devam etmektedir. Bu bitkiler esansiyel yağ içeren diğer bitkilerde olduğu gibi, kimyasal kompozisyonlarındaki majör bileşenlere göre çeşitli antimikrobiyal, antiviral, antioksidan etkilere sahiptirler. Fakat esansiyel yağların genel olarak gıdalarda Bütillendirilmiş Hidroksi Toluen (BHT) gibi sentetik antioksidanlardan daha az antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Hatta BHT'den daha yüksek konsantrasyonda esansiyel yağ kullanımında, gıda ürünlerinde tüketicilerin kabul edilebilirliğini negatif yönde etkileyen yoğun bir aroma oluşumuna sebep olduğu bildirilmektedir [22-25]. Tıbbi ve aromatik yönden değerli bir bitki sınıfı olan *Mentha* bitkisinin, kullanım açısından da en fonksiyonel kısmı esansiyel yağ fraksiyonudur. Gıda endüstrisinde tatlandırıcı, aroma verici olarak da kullanılmakta olan nane uçucu yağı, antioksidan, antimikrobiyal ve duyuşal özelliklerinden dolayı da kendisine farklı kullanım alanları yaratmaktadır. *Mentha* türleri ve esansiyel yağları uyarıcı, yatıştırıcı, antiviral ve antibakteriyel etkiler sergilemekte, ayrıca

literatürde antiinflamatuvar, antiemetik, antispazmodik, ağrı kesici, bulantı giderici, bronşit, gaz, anoreksi, ülserli kolit ve karaciğer sorunlarını tedavi edici etkilerinden bahsedilmektedir [26-29].

Uçucu yağlar çok önemli doğal biyoaktif özelliklerine rağmen, az miktarlarda dahi kullanıldığında gıdanın duyuşal özelliklerinde arzu edilmeyen değişikliklere neden olmaları, sulu ortamlarda hidrofobik davranış sergilemeleri, uçucu özelliklerinden dolayı kayıplar yaşanması ve kontrolsüz aktivite gösterip biyoaktif özelliklerini hızlı tüketmeleri gibi dezavantajlara sahiptirler. Ayrıca depolama koşullarına bağlı olarak ortamdaki oksijen, nem, sıcaklık, ışık gibi etkenlerden çabuk etkilenmeleri, kimyasal kompozisyonları ve duyuşal özelliklerinde zamanla istenmeyen değişiklikler meydana gelmesine neden olmaktadır. Tüm bu nedenlerle uçucu yağların bileşen stabilitesinin sağlanarak saklanması, biyoaktif özelliklerinin korunması ve/veya artırılması için mikrokapsülasyon yöntemi öne çıkmaktadır.

Kapsülasyon genellikle çevre şartlarına karşı hassas çekirdek materyalin, polimer yapıdaki koruyucu kabuk materyal içine hapsedilerek, toz kapsüller halinde, sabit katı formlara dönüştürülmesi işlemidir. Kapsülasyon uygulamalarında amaç; çekirdek materyal olan aktif bileşiklerin sabit katı formlara dönüştürülmesiyle biyoyararlılıklarının artırılması, korunması ve ürünlerin işlenmesinde üstünlük kazanmasıdır. Mikrokapsülasyon farmasötik, nütrasötik, eczacılık, gıda, kâğıt, kozmetik sektörleri gibi farklı alanlarda yer edinmiştir. Gıda sanayinde katı formdaki mikrokapsüller gıda katkı maddeleri ve takviye gıda maddeleri olarak kullanılmaktadır. Kapsülasyon uygulamalarında taşıyıcı olan kabuk materyal gıda sınıfında olmalıdır. Mikrokapsülasyon nem, pH, ışık, oksidasyon gibi çevresel şartlara karşı koruma sağlarken kontrollü salım mekanizması ile aktif maddelerin gıda içinde ve canlı vücudundaki yararlılığı artmaktadır. Mikrokapsül içeriğinin kontrollü salımı; kesme, çözülme, ısıtma, pH değişimi ve/veya enzim varlığı gibi faktörler tetikleyebilmektedir [30]. Mikrokapsüller, kullanılan materyal ve elde edilme yöntemine göre farklılık gösteren, 1-1000 µm boyut aralığında, morfolojik olarak farklı yapılara ve özelliklere sahip en az bir çekirdek materyal ve bir kabuk materyalden oluşan yapılardır [31]. Çekirdek fazın kapsül içindeki dağılım özelliklerine göre mikrokapsüllerin morfolojisi; mikrokapsül, mikroküre, çok tabakalı mikrokapsül, çok gövdeli ve çok çekirdekli mikroküreler şeklinde sınıflandırılmaktadır [30]. Mikrokapsülasyon uygulamalarında püskürtmeli kurutma, sprey soğutma, akışkan yataklı kaplama, havalı süspansiyon kaplama, ekstrüzyon, santrifüjlü ekstrüzyon, dondurarak kurutma, koaservasyon, rotasyonlu süspansiyon ayrılması, kokristalizasyon, lipozom sıkışması, ara yüzey polimerizasyonu, moleküler inklüzyon gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Yöntem seçimi, mikropartiküllerin istenen boyutu, uygulanacağı gıdanın türü, gıdalarda veya gastrointestinal sistemde çekirdek materyalin kontrollü salınması gibi önemli değişkenlere bağlıdır [32].

Mikrokapsülasyon yöntemi ile uçucu aromatik bileşenler ile uçucu yağların ve bileşenlerinin stabilitesi, çevresel şartlara karşı dayanımı, lezzetlerinin korunumu, maskelenmesi

ve kontrollü salımı istenilen seviyelerde sağlanabilmektedir. Yeniden çözünür ve/veya kontrollü salım özelliğine sahip toz formunda elde edilen kapsüller, katı gıdalara kolaylıkla uygulanarak istenilen özellikleri ürüne sağlarken, raf ömrünü de iyileştirmektedir. Bu tip çekirdek materyallerin kapsülasyonunda karbonhidratlar, proteinler, lipidler, mumlar gibi biyolojik kabuk materyalleri kullanılmaktadır. Karbonhidrat, protein ve lipidlere plastikleştiricilerin eklenmesi, modifiye edilmesi gibi yöntemler, mevcut bileşenlerin yenilebilir özelliklerini kaybetmeleri, toksisiteleri, kanserojenik etkilerinin tam olarak bilinmemesi ve tüketici kaygıları gibi sebeplerle gıda sanayinde tercih edilmemektedir. Mikrokapsülasyon uygulamalarında kabuk materyalleri arasında nişastalar, maltodekstrin, arap zımkı, pektin, kitozan, aljinatlar gibi polisakkaritler yer almaktadır. Hayvansal (peynir altı suyu proteinleri, jelatin, kazein) ve bitkisel (soya proteinleri, bezelye proteinleri, tahıl proteinleri) proteinler de aktif maddelerin kapsülasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların yanısıra yulaf, buğday, arpa ve mısır gibi hububat proteinleri, beslenme ve işlevsel özellikleri açısından potansiyel gıda kaynaklarını oluşturmaktadır [30]. Mevcut kabuk materyallerin tek başına optimum değerleri sağlayamadığı durumlarda aynı veya farklı gruplardan birden fazla kabuk materyali kullanılabilir. Bu nedenle kabuk materyal olarak polimer komplekslere/kompozitlere yönelim artış göstermektedir. Bu çalışmanın içinde de örnekler sunulacağı üzere literatürde tıbbi aromatik bitkilerin uçucu yağları ve etkin maddelerinin mikrokapsülasyonu ve kompozit kabuk materyal kullanımı üzerine çeşitli çalışmalar yer almaktadır. Kabuk materyal seçimi mikrokapsülasyon etkinliği, verimlilik oranını, çekirdeğin dış faktörlerden korunma özelliklerini, mikrokapsül kararlılığı gibi kapsül özelliklerine etki eden önemli bir faktördür.

Zein mısırdaki ana depo proteini olup, FDA tarafından GRAS ve gıda maddesi olarak kabul edilen bir üründür. Mısırdan ekstrakte edilerek elde edilen prolamin grubundaki zein, sulu alkol çözeltilerinde çözünen, iyi film oluşturabilme özellikleri ile tanınan bir protein fraksiyonudur [30]. Teknik olarak, zein gibi alkolde çözünür proteinden yapılmış filmler, diğer proteinlere kıyasla nispeten yüksek bariyer özelliklerine sahiptir. Biyobozunur ve biyoyumluluk özellikleri potansiyel bir kapsülleme materyali olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Nispeten hidrofobik ve termoplastik bir protein olan zein, yapısında bulunan hidrofobik, hidrojen ve sınırlı disülfür bağları sayesinde, iyi bir film ve kaplama ajanı olarak kullanılmaktadır [33]. Yapısında 3/4 oranında lipofilik ve 1/4 oranında hidrofilik amino asit kalıntısı içermekte [34] olup, hidrofobik yapısı nedeniyle yenilebilir film ve kaplamalarda [5], yüksek lipofilik yapısı sayesinde de yağda çözünen bileşiklerin mikrokapsülasyonu ve kontrollü salımı için uygun bir taşıyıcı ajan rolü üstlenmektedir. Küre, çubuk ve film de dahil çeşitli mikroyapılara kendiliğinden geçiş yapabilme yeteneği zein molekülünün amfifilik yapıda olmasından kaynaklanmaktadır [35]. Hidrofilik özelliği yanısıra yüzey morfolojisi gibi diğer yüzey özellikleri sayesinde zein içeren mikrokürelerin yüzey özelliklerinin aktif bileşeni hapsedme veya kapsülasyon verimliliğini önemli oranda etkilediği bildirilmektedir [36]. Mısır

proteini zeinin, biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesinde kabuk materyali olarak kullanımı uzun süredir bilinmektedir [37].

Süt proteinleri, hidrofobik molekülleri bağlama, diğer biyopolimerlerle etkileşme, emülsiyonları stabilize etme, jel oluşturma ve belli seviyelere kadar oksidasyonu geciktirme gibi önemli fonksiyonel özelliklere sahiptirler [38]. Süt bileşenlerinden kazein, süt proteinlerinde %80 oranda bulunan, sindirimi ve emilimi çok yavaş olan bir proteindir. Suda çözündürme, ardından dökme ve kurutma yöntemleri uygulanarak elde edilen kazeinatlar pek çok yenilebilir film ve kaplamaların üretiminde kullanılmaktadır [33]. Ancak, suda çözünür olması ve sulu ortamlarda hızlı salım profilleri göstermesi en büyük dezavantajlarıdır. Kazeinat filmler şeffaf ve esnek olmalarına rağmen, zayıf su bariyeri özelliğine sahiptirler. Kimyasal çapraz bağlama, bileşenleri hapsedme ve kontrollü salım özelliklerini geliştirmek için uygulansa da toksisiteye ve istenmeyen reaksiyonlara neden olabileceğinden gıda ve ilaç sanayinde pek tercih edilmemektedirler [39]. Karşılaştırılabilir analiz koşullarında, kazein filmlerinin, gluten ve soya protein filmleri ile benzer, zein filmlerine göre ise daha düşük nem bariyerlerine sahip olduğu bildirilmektedir [33]. Gıda ürünlerinde serbest film ve kaplama oluşumu için kullanılmakta olan kazein, alerjenik potansiyellerine rağmen benzersiz özellikleri nedeniyle gıda mikrokapsülasyonunda da yaygın kullanım alanı bulmaktadır [40]. Kazeinlerin, gıda ürününün besin özelliklerini etkilemeden, midede kolaylıkla sindirilebildiği ve böylece sindirim sırasında tutulan bileşiğin daha sonra serbest kalmasını sağladığı kanıtlanmıştır. Kazein, doğal, ucuz, hazır, toksik olmayan, stabil, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir ve GRAS özellikli bir proteindir [38].

Zein/kazeinat kompleks nanopartiküller, uçucu yağlar, yağda çözünen vitaminler ve fitokimyasallar dahil olmak üzere çeşitli lipofilik bileşiklerin kapsüllenmesi için uygun bir komplekstir [41-44]. Kazeinin zein ile etkileşime girdiği ve zein nanoparçacıklarının oluşumunu kolaylaştırdığı belirlenmiştir. Zein/kazein mikrokapsülleri, zein nanoparçacıkları ile kıyaslandığında, yüzey hidrofobitesinde azalma olduğu ve bunun sonucunda zein/kazein kompleksinin su dağılımını iyileştirdiği belirtilmektedir. Ayrıca, kazein/zein nano parçacıklarının agregasyona karşı elektrosterik stabilizasyonunu sağlayan, negatif yüklü grupların önemli bir kısmını taşıdığı bildirilmektedir [45]. Zein ve zein/kazeinin birlikte kullanıldığı çalışmalar ışığında mikrokapsülasyonda kabuk materyal olarak zein/kazein kompleksinin kullanılarak özellikleri iyileştirilmiş mikrokapsüllerin elde edilebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, yaygın olarak kullanılan nane uçucu yağının, sıvı-sıvı dispersiyon ve liyofilizasyon yöntemleri kullanarak, zein ve zeine farklı oranlarda kazein ilave edilerek hazırlanan zein-kazein kompleksi ile mikrokapsülasyonunu ve elde edilen mikrokapsüllerin kapsülasyon etkinliği, antioksidan, antimikrobiyal, boyut, yüzey ve salım özelliklerinin incelenmesini içermektedir. Bu çalışmanın ilk amacı elde edilen analiz değerlerinden

yararlanarak, farklı oranlarda kazein içeren zein/kazein kompleks yapısının zein mikrokapsüllerin özellikleri üzerine etkisinin saptanıp yorumlanmasıdır. İkinci amaç ise mikrokapsüllenmiş nane uçucu yağının, serbest nane uçucu yağına göre antioksidan, antimikrobiyal özelliklerinin gelişiminin sağlanmasıdır. Üçüncü amaç ise liyofilizasyon işlemi ile elde edilen nane uçucu yağ içeren mikrokapsüllerin yüzey morfolojisinin saptanmasıdır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Mikrokapsülasyon

Kapsülasyon çekirdek materyallerin kabuk materyaller ile paketler halinde kaplanması işlemidir. Kapsülasyon teknolojisi çekirdek materyalin korunmasını, stabilizasyonunu, istenmeyen tat-kokunun maskelenmesini, *in vivo/in vitro* ortamlarda kütle transferini kontrol altına alarak taşınması, yavaş ve nispeten kontrollü salımının sağlanması için geliştirilen bir teknolojidir. Kapsülasyon işlemlerinde katı, sıvı ve uçucu ya da sabit; ilaçlar ve bileşenleri, gıda maddeleri ve bileşenleri (uçucu yağlar, biyoaktif bileşenler, doymamış yağ asitleri, vitaminler, mineraller, enzimler, aroma maddeleri, pigmentler v.b), mikroorganizmalar ve kaplanacak diğer maddeler “öz, çekirdek, iç faz, aktif madde, dolgu ya da merkez materyal” olarak adlandırılırlar. Çekirdek materyali saran ya da partiküller şeklinde içine alan, stabil katı bileşenlere “membran, kaplama, taşıyıcı, enkapsülant ya da kabuk materyali” denilmektedir. Kapsülasyon gıda sisteminin reolojik özelliklerini geliştirmek, besin değerini yükseltmek, tat ve aroma maddelerinin kaybını azaltmak, antioksidan ve antimikrobiyal etkiyi arttırmak, pigmentleri, esmerleşme reaksiyonlarını durduran iyonları ve vitaminleri ürünün içerisinde tutarak gıda kalitesini ve raf ömrünü arttırmak [46-52], sindirilebilirliği sağlamak, olgunlaşma süresini kısaltmak gibi birçok farklı amaçla uygulanmaktadır [53]. Gıda bileşenlerinin uygun bir polimer yapı üzerine immobilizasyonu veya ortama antimikrobiyal ajanların eklenmesi ile ürünün özelliklerinin geliştirilip iyileştirilmesi yaygın kullanılan bir uygulamadır [54-57]. Seiss ve Divies (1975) [58] immobilize laktik asit bakterilerinin yoğurt üretiminde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Kapsülasyon yöntemleri ile kontrollü salım sayesinde ısı, sıcaklık veya pH değerlerine duyarlı çekirdek materyalleri, gıda sistemlerinde çok uygun bir şekilde kullanılabilmektedir. Salım belirli bir aşamada, belirli bir uyarının etkisi altında gerçekleşmektedir [54]. Mikrokapsül içeriğinin kontrollü oranlarda serbest bırakılması, kesme, çözülme, ısıtma, pH veya enzim etkisi ile tetiklenebilmekte, yarılanma süreleri değişebilmektedir [30].

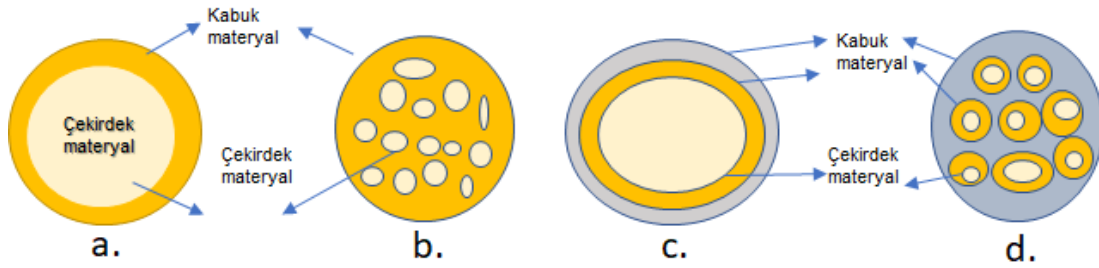
Kapsülasyon işlemi kapsüle ürünün boyutlarına göre adlandırılmaktadır. Çoğu mikrokapsülün çapı birkaç mikrometre ile birkaç milimetre arasında değişmektedir. Kapsülasyon sonucu oluşan kapsüllerin boyutları;

- 0.2 μm 'den küçük ise işlem nanokapsülasyon, ürün nanokapsül
- 0.2-5000 μm aralığında ise işlem mikrokapsülasyon, ürün mikrokapsül
- 5000 μm 'den büyük ise işlem makrokapsülasyon, ürün makrokapsül

olarak adlandırılmaktadır [59]. Mikrokapsülasyon tekniği ile ilgili araştırmalar, yeni mikrokapsül formülasyonları ve mikrokapsül karakterizasyonu olmak üzere farklılık göstermektedir [60, 61].

2.1.1. Mikrokapsül morfolojisi

Farklı yöntemler ve kapsül materyalleri ile farklı boyutlarda ve/veya boyut dağılım aralıklarında mikrokapsül üretimi mümkündür. Mikrokapsül boyutu, elde edilen kapsüllerin reolojisi, morfolojisi, mekanik özellikleri ile yakından ilgilidir. Mikrokapsülasyon ile elde edilen farklı mikro-partikül morfolojileri genelde; bir kabuk tabakası ile çevrilmiş tek bir merkezli mikrokapsül (a), çekirdeğin sürekli bir matriks ağına dağılmış olduğu mikroküre (b), çok tabakalı mikrokapsül (c), çoklu gövde ve çok çekirdekli mikroküre (d) gibi daha kompleks yapılar şeklinde sınıflandırılabilir [30]. Mikrokapsül morfolojisi Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Mikrokapsül morfolojisi

Mikrokapsüllerin görünüşleri, çekirdek materyalinin fiziko-kimyasal özelliklerine, duvar materyalinin kompozisyonuna ve mikrokapsülasyon tekniğine göre değişim göstermektedir [62]. Mikrokapsüllerin morfolojisini etkileyen önemli unsur elde edilen kapsüllerin kurutma sıcaklığı ve kurutma koşullarıdır. Özellikle protein yapılı kabuk materyalleri sıcaklığın etkisiyle denatüre olduğundan ve uçucu özellikteki çekirdek materyallerde kayıplar yaşanabileceğinden, mikrokapsülasyon işlemlerinde sıcaklık önem arz etmektedir. Kurutma esnasında, kapsül yapısından uzaklaşan su ve çözücü maddeler kapsül yapısında porlar oluşturmakta ve bu durum kapsülasyon etkinliğini etkilemektedir. Yüksek sıcaklık (70-100°C), protein denatürasyonundan dolayı protein çözeltilerinde sert yapıların oluşumunu etkilemektedir [33].

Belirli bir mikrokapsül bileşiminin mekanik mukavemeti, kabuk bileşimi, kabuk yapısı, kabuk kalınlığı ve parçacık boyutu gibi özelliklere büyük ölçüde bağlıdır. Mikrokapsüllerin yapısal özellikleri arasında; kabuk kalınlığı, gözenek büyüklüğü, mikrokapsüllerin kristallenmesi, çekirdek materyalin mikrokapsülden ayrılması yer almaktadır [60]. Çekirdek materyalin difüzyonunu doğrudan etkilediğinden kapsüllerin molekül boyutları ve yüzeydeki por büyüklükleri lezzet kaybında önemli rol oynamaktadır. Genellikle, arzu edilen salım oranını sağlayan ideal bir küre boyutu vardır. Büyük küreler, genelde uzun süreler boyunca, yüklerini

yavaşça serbest bırakmakta [35], ayrıca oksidasyona karşı daha iyi koruma sağlamaktadırlar [63].

Uçucu ve sabit yağların çekirdek olarak kullanıldığı proseslerde yüzey yağı mikrokapsüllerin stabilitesi için kritik önem taşımaktadır. Kapsül yüzeyindeki serbest yağ, oksidasyona açık konumda olduğundan kolayca oksidasyona uğrayabilir ve istenmeyen tat-koku meydana gelebilmektedir. Mikrokapsüle edilmemiş, serbest halde ve oksidasyona açık diğer tüm çekirdek materyallerde da bu durum geçerli olduğundan sadece yüzey yağı olarak değerlendirilmemelidir. Genellikle mikrokapsülasyon etkinliği, kurutulmuş mikrokapsüllerin kalite parametresi olarak kullanılmaktadır [63, 64]. Genel görüş, mikrokapsüllemiş bileşenin stabilitesinin, mikrokapsülasyon etkinliğini arttırdığı yönündedir. Bu genelleme mutlak doğru değildir ancak kapsüllemiş bir maddenin optimum stabilizasyonu için mikrokapsülasyon etkinliğinin en üst düzeye çıkarılması gerektiği genel olarak kabul edilmektedir [40].

Su aktivitesi (a_w) mikrokapsüllerin raf ömrünü etkileyen önemli bir parametrelerden biridir [64]. Depolama esnasında, yüksek a_w seviyesi, daha fazla miktarda uçucu madde kaybına yol açmaktadır. Su aktivitesinin kapsüllemiş lezzetlerin salımına etkisi, kabuk matrislerinin yapısal değişiklikleri ile ilişkilendirilebilmektedir. Düşük a_w koşullarında uçucu maddelerin daha yavaş salınması büyük ihtimalle kapsül matrikslerinin cam halindeki lezzet moleküllerinin daha düşük hareket kabiliyetine sahip olmasına bağlıdır. Yüksek a_w koşullarında ise matriks plastikleşmeye başlamakta ve muhtemelen çekirdek materyalin yüksek hareket serbestliğine yol açmaktadır [63]. Düşük sıcaklık ve a_w koşullarında, çoğu polimer camsı bir katı halinde olup gaz difüzyonları sınırlı düzeydedir. Daha yüksek a_w ve sıcaklıkta ise cam geçiş sıcaklığının üstünde, materyaller, moleküler difüzyona izin veren, sıvı benzeri bir kauçuk haline dönüşmektedir [31]. Mikrokapsüllerin fiziko-kimyasal ve yapısal karakterizasyonu için genellikle her biri kendi yetenekleri ve sınırlamaları olan çeşitli karakterizasyon teknikleri mevcuttur [60].

Mikrokapsülasyon materyalleri ve mikrokapsüller, mikroskopik, spektroskopik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak reolojik, morfolojik ve mekanik özellikleri bakımından karakterize edilebilmektedirler. Morfolojik değerlendirme ve mikro yapıları görüntüleme, Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (ESEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrokapsüller üzerinde pürüzlü veya pürüzsüz bir yüzey, diğer substratlara veya yardımcı maddelere yapışmayı destekleyebilmektedir. Bu bağlamda, daha fazla geliştirme yapılmadan önce mikrokapsüllerin yüzey pürüzlülüğünü anlamak önemlidir [60]. Kalitatif olarak, mikrokapsüllerin yüzey pürüzlülüğünü incelemek için SEM kullanımı yaygın [65] olmasına rağmen, SEM görüntüsü ile yüzey pürüzlülüğünü değerlendirmek kolay değildir. Yüzey pürüzlülüğünün kantitatif karakterizasyonunu belirlemek için atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve interferometri kullanılabilir [60]. Mikro yapıların

kütleli kompozisyonlarının nitel ve nicel analizlerinde ise Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-MS), Electro Spray Ionization (ESI-MS), Desorption Electro Spray Ionization (DESI-MS) ve Ion Mobility (IM-MS) gibi çeşitli kütle spektrometrisi (MS) cihazları /yöntemleri kullanılmaktadır [53]. Kütle spektrometrisinin, GC-MS (Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi), LC-MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi) gibi kromatografik sistemlerle kombinasyonları mikrokapsüllerin kütleli karakterizasyonunda sıklıkla kullanılmakta olan yöntemlerdir. Dinamik Işık Saçınımı (DLS), kapsül partiküllerinin gerçek görüntülerinin elde edilmesi, kapsül morfolojisinin belirlemede kullanılan bir yöntemdir [60].

Bir katı parçacık ve onu çevreleyen ortam arasındaki bir arayüzde gelişen yük olan "Zeta Potansiyeli"ni anlamak, formüle edilmiş mikrokapsül süspansiyonlarının stabilitesini tahmin etmede yardımcı olabilmektedir. Yeterli kontrol edilmeyen mikrokapsüllerde kümelenme meydana gelebilmektedir. Zeta potansiyeli, bir dizi farklı deneysel yöntemlerin ardından hesaplanabildiği ve genellikle ölçümlerdeki birincil seçeneğin akış potansiyeli ve elektroforez olduğu bildirilmektedir [60].

2.1.2. Mikrokapsülasyon uygulama alanları

Mikrokapsülasyon tekniği gıda endüstrisinin yanı sıra kimya, ziraat, yem, tıp, eczacılık, kozmetik, veterinerlik, biyoteknoloji gibi birçok farklı alanda uygulamaları mevcuttur. Mikrokapsülasyon uygulamaları gıda sektöründe çekirdek materyallerin;

- Kütle transferini kontrol altına alarak, oksidasyon gibi reaksiyonlardan koruma ve dolayısıyla acılaşıma gibi sonuçlarını engelleme,
- İletimini kolaylaştırma,
- Kontrollü salımını sağlama, çekirdek materyaldeki kayıpları engelleme,
- İstenilen zamanda ve yerde aktivite göstermesini sağlayarak biyoyararlılığını artırma
- İstenmeyen tat-kokusunu maskelerken aynı zamanda istenilen tat-koku özelliklerini uzun süre muhafaza etme,
- Olumsuz çevresel şartlardan koruma,
- Ürün özelliklerini iyileştirerek ürünün kalitesini ve raf ömrünü artırma, maddenin kullanılabilirliğini kolaylaştırma (topaklanmayı engellemek gibi),
- Az miktarda kullanılması istenildiğinde seyreltmeyi homojen şekilde sağlama,
- Gıda işleme ve fonksiyonel ürün geliştirme amaçlarıyla kullanılmaktadır [66].

Gıda sektöründe mikrokapsülasyon yöntemi yaygın olarak bitki uçucu yağlarının kapsüllenmesinde kullanılmaktadır. Aromatik uçucu bileşenlerin stabilizasyonu mikrokapsülasyon ile önemli oranlarda artırılabilir. Uçucu yağ çekirdek materyalli

kapsüller, meyve suları ve diğer içecek gruplarının zenginleştirilmesinde kullanılabilmekte, bu durum fonksiyonel gıda pazarı için önemli bir girdi oluşturmaktadır [67].

Mikrokapsülasyon tekniği, gıda ve eczacılık alanlarında, lipofilik biyoaktif bileşiklerin kapsüllemesi, mevcut alanlarda istikrarın artırılması, işleme ve depolama esnasında sağlığı teşvik edici özelliklerinin korunması gibi önemli faydalarından dolayı ilgi görmektedir. Ayrıca, nutrasötiklerin kontrollü bir şekilde salınmasını sağlayarak, biyolojik aktiviteyi arttırmak ve yüksek uygulama dozlarında oluşabilecek potansiyel hipervitaminozun (vitamin zehirlenmesinin) yan etkilerini azaltıcı etkilere de sahip olduğu bildirilmektedir [68]. Mikrokapsülasyon petrol sondajı uygulamalarında kayganlaştırıcılarda kullanımı gibi küçük uygulama alanlarında da kendine yer bulmuştur [59].

2.1.3. Kabuk materyalleri

Kabuk materyallerinin seçimi, kapsülün morfolojik ve mekanik özelliklerini büyük ölçüde etkilemekte olup, kabuk materyallerin özelliklerinin bilinmesi mikrokapsülasyon yönteminde temel unsurları oluşturmaktadır.

Kabuk materyalleri gıda sınıfında olup GRAS olarak kabul edilmeli ve aşağıdaki özellikleri taşımalıdır:

- Yüksek konsantrasyonlarda reolojik özellikleri iyi olmalı ve kapsülasyon esnasında kolay işlenebilmeli, çözücü kolay uzaklaştırılabilir.
- Emülsiyon ve dispersiyon (dağılım) oluşturma ve stabilize etme özellikleri iyi olmalıdır.
- Sinerjistik etki sağlayarak çekirdeğin özelliklerine katkı sağlamalı ya da en azından inert olmalı, çekirdek materyal ile kapsülasyon esnasında ve/veya sonrasında çekirdek materyalin özelliğini bozacak şekilde antagonist etkileşimde bulunmamalıdır.
- Çekirdek materyallerini hem işlem hem de depolama esnasında stabil bir şekilde tutabilmelidir.
- Çekirdeği aktive olması istenilen koşullara kadar korumalı; istenilen çözgen, yer, zaman, sıcaklık, pH gibi koşullarda salımın başlamasına müsaade etmelidir. Kontrollü salım taleplerini karşılamalıdır.
- Kapsülasyon verimliliği açısından seçilen çekirdek materyale karşı yükleme kapasitesi yüksek olmalıdır.
- Kurutma ve/veya diğer solvent uzaklaştırma koşulları altında solvent veya diğer materyalleri tamamen serbest bırakabilmelidir.
- Gıda matriksiyle uyumlu olmalı; kullanıldığı üründe görünüş, tat, aroma ve stabilitede istenmeyen değişikliğe yol açmamalı, arzu edilmeyen etki yaratmamalıdır.
- Çekirdek materyalini çevresel koşullardan maksimum düzeyde korumalıdır.
- Ucuz / ekonomik olmalıdır [69-72].

Arzu edilen bütün özellikleri tek bir kabuk materyalinin sağlaması çok zordur. Bu sebeple kabuk materyallerine katkı maddeleri, modifiye edici maddeler eklenmesi veya farklı kabuk materyallerinin bir arada kullanılması önerilmektedir [54, 62]. Kabuk materyalleri çözünürlük özelliklerine göre hidrofilik, hidrofobik ve amfifilik olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Soya proteini izolatu, peynir altı suyu proteini izolatu, suda çözünen balık proteinleri ve mung fasulye proteinleri gibi hidrofilik maddeler suda çözünebilir özelliğe sahiptir. Mısır zeini, balmumu gibi hidrofobik maddeler suda çözünmez, ancak alkol gibi polar olmayan gruplar içeren sıvılarda çözünebilmektedirler. Proteinler, iyi bir gaz bariyeri ancak zayıf su buharı bariyeri özelliklerine sahiptirler. Bununla birlikte, zein çok miktarda hidrofobik yan zincir amino asit ihtiva ettiği için, zein gibi bazı protein kaplamaların diğer proteinlerden daha iyi su direncine sahip olduğu bildirilmektedir [33]. Gıda alanında yapılan mikrokapsülasyon çalışmalarında kabuk materyal olarak, ağ yapı oluşturan, film yapma özelliğine sahip proteinler, karbonhidratlar, lipitler, gıamlar ve bunların karışımları tercih edilmektedir.

2.1.3.1. Protein yapısındaki kabuk materyalleri

Proteinler; genellikle suda çözünmeyen fibröz ve su, asit, baz ya da tuzların sulu çözelti ortamlarında çözünen globüler proteinler olarak bulunmaktadır. Fibröz proteinler paralel yapıda olup, genellikle hidrojen bağıyla birbirlerine bağlanarak lifleri oluştururlar ve hayvan dokularının yapısal materyali olarak doğada bulunmaktadır. Globüler proteinler ise, hidrojen, iyonik, hidrofobik ve kovalent (disülfid) bağların kombinasyonu ile bir araya getirilmiş karmaşık, katlanmış, küresel yapılardır. Bu proteinlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri, bileşenin ihtiva ettiği amino asit kalıntılarının nispi miktarlarına ve protein polimer zinciri boyunca bu amino asitlerin yerleşimine bağlıdır. Yenilebilir filmlerin ve kaplamaların üretiminde fibröz protein olarak en fazla kollajen, globüler protein olarak ise gluten, zein, soya proteini ve peynir altı suyu proteini kullanıldığı bildirilmektedir [73, 74]. Proteinler, sahip oldukları fonksiyonel özellikleri ve uçucu yağlar gibi biyoaktif bileşiklerin mikrokapsülasyonunda istenilen jel yapı ve emülsiyon ortamını kolaylıkla oluşturabildikleri için ideal kabuk materyalleridir. Ayrıca lezzet bileşenlerinin bağlanmasında da oldukça iyi oldukları bildirilmektedir [5, 62, 75]. Kabuk materyali olarak genellikle jelatin, peynir altı suyu proteinleri, kazein ve kazeinatlar tercih edilmektedir [62]. Kapsülasyonda kabuk malzemesi olarak kullanılan bazı proteinler:

- Bitkisel; soya proteini, zein, gluten, bezelye proteini, ayçiçeği proteini, yer fıstığı proteini ve çığıt proteini vs.
- Hayvansal; kazein, kazeinatlar, serum, albumin, kollajen/jelatin, keratin, balık miyofibriller proteini, yumurta beyazı proteini ve peynir altı suyu proteini, deri, resilin,

polilisin, poliamino asitler, poli (γ -glutamik asit), elastin, poliarjinil-poliiaspartik asit vs. [76, 77].

İlaveten, çoğu gıda proteini hakkında fizyokimyasal bilgiye sahip olunması nedeniyle bu bileşiklerden hidrojel, mikro veya nano parçacıklar şeklinde yeni iletim sistemlerinin geliştirilmesi mümkündür [5].

Doğal polimerlerin biyo uyumluluk, biyo-parçalanabilirlik, amfifilik ve suda yüksek çözünürlük gibi fonksiyonel özellikleri ile emülsiyon oluşturucu ve köpürme kapasitesi gibi bazı avantajları mevcuttur. Mikrokapsülasyonda bitkisel proteinlerin duvar materyali olarak kullanılması, farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrisinde mevcut "yeşil" eğilimi yansıtmaktadır. Gıda uygulamalarında bitkisel proteinlerin hayvansal proteinlere kıyasla daha az alerjenik olduğu bildirilmektedir. Birkaç fraksiyondan ibaret olan bitkisel proteinlerde, glutenin en büyük fraksiyon olup, alkalın su solüsyonlarında çözünme özelliğine sahiptir. Diğerleri, tuz çözeltilerinde çözünebilir globulin fraksiyonu, su ve etanolde çözünebilir albumin ve prolamin fraksiyonlarıdır. Mikrokapsülasyon yönteminde bitkisel proteinlerin en büyük dezavantajı, asidik ortamlardaki kararsızlıkları olarak düşünülmektedir. Sulu çözeltilerdeki sebze proteinlerinin çoğunluğu için izoelektrik nokta (pI) 3-5 pH olup, bu biyopolimerler proteinlerin iyi çözünürlüğünü elde etmek ve çekirdek materyallerin etkin bir şekilde kapsüllemesini sağlamak için genellikle alkali koşullarda kullanılmaktadırlar [30]. Çözünürlüğü pI'sına bağlı soya protein izolatu ve peynir altı suyu proteini izolatu gibi suda çözünür proteinlerin film ve kaplamalarında pH değerleri önemli bir rol oynamakta olup, maksimum protein çözünürlüğü, pI'ya uzak pH'da elde edilmektedir [33].

2.1.3.2. Karma kabuk materyalleri

Karbonhidrat ve protein yapısındaki kabuk materyallerin mikrokapsülasyon yönteminde emülsiyon oluşturucu ve filmojenik özellikleri iyileştirmek için birlikte kullanımının yaygın olduğu bildirilmektedir [30].

2.1.4. Mikrokapsülasyon yöntemleri

Mikrokapsül elde etmek için birçok farklı yöntem mevcuttur. Mikrokapsülasyon esnasında çekirdek ve kabuk materyallerin özellikleri ile mikrokapsüllerin kullanım amacı yöntem seçiminde önemlidir. Kapsüle edilmiş bileşenlerin salımı; pH değişimi, mekaniksel kuvvet, sıcaklık, enzimatik aktivite, zaman, ozmotik kuvvet gibi tetikleyici faktörlerle başlamaktadır. Mikrokapsülasyon metodu ve kabuk materyallerinin seçimi birbirleriyle bağlantılıdır. Gıda alanında kullanılan çeşitli mikrokapsülasyon teknikleri ve her teknikte yer alan süreçler Çizelge 2.1'de [54, 62] verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çeşitli mikrokapsülasyon teknikleri ve her teknikte yer alan süreçler [54, 62]

Mikrokapsülasyon Tekniği	Mikrokapsülasyon Aşamaları
Püskürterek kurutma	Dağılımın hazırlanması, Dağılımın homojenizasyonu, Besleme dağılımının atomizasyonu, Atomize parçacıkların kurutulması.
Püskürterek dondurma	Dağılımın hazırlanması, Dağılımın homojenizasyonu, Besleme dağılımının atomizasyonu.
Püskürtme ile soğutma	Dağılımın hazırlanması, Dağılımın homojenizasyonu, Besleme dağılımının atomizasyonu.
Akışkan yataklı kaplama	Kaplama çözeltisinin hazırlanması, Çekirdek partiküllerine akışkanlık kazandırılması, Çekirdek partiküllerinin kaplanması.
Ekstrüzyon	Çözgen içinde çözülmüş kaplama çözeltisinin hazırlanması, Çekirdeğin çözülmüş polimer çözeltisine dağılımı, Karışımın soğutulması veya dehidrate edilmesi.
Santrifüjlü ekstrüzyon	Çekirdek çözeltinin hazırlanması, Kabuk malzemesinin çözeltisinin hazırlanması, Çekirdek ve kaplama çözeltisinin birlikte ekstrüzyonu.
Dondurarak kurutma	Çekirdek ile bir kaplama çözeltisinin karıştırılması, Karışımın dondurularak kurutulması: Dondurma, süblimasyon, bağlı suyun dehidrasyonu.
Koaservasyon (Faz ayrımı)	Karışmayan üçlü kimyasal fazın oluşumu, Kaplamanın dinlendirilmesi, Kaplamanın katılaşması.
Santrifüjlü süspansiyon ayırma	Bir kaplama malzemesinde çekirdeğin karıştırılması, Karışımın dönen bir disk üzerine dökülmesi, Kurutma.
Kokristalizasyon	Aşırı doymuş sakkaroz çözeltisinin hazırlanması, Çekirdeklerin aşırı doymuş çözeltiliye eklenmesi, Isı emisyonu ile sakkarozun kristalleşme sıcaklığına ulaştırılması.
Lipozom sıkışması	Mikro akışkanlaştırma, Ultrasonikasyon, Ters fazlı buharlaştırma.

2.1.4.1. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon)

Dondurarak kurutma tekniğine liyofilizasyon da denilmektedir. Dondurarak kurutma yöntemi ısıya duyarlı maddelerin mikrokapsülasyonunda dehidrasyon amaçlı kullanılmak için uygun bir yöntem olmasına rağmen süre uzun ve maliyet yüksektir. Aroma, uçucu bileşen, tat-

kokudaki kayıpların çok az olması, elde edilen ürünün rekonstitüsyon (eski haline getirme) özelliklerinin yüksek olması en büyük avantajlarından. Sıcaklığa duyarlı gıda ürünlerinin (uçucu yağlar, balık yağı, aroma maddeleri, ilaçlar gibi) mikrokapsülasyonunda düşük sıcaklıkların kullanıldığı bu yöntem kapsülasyon teknolojisinde bir alternatif oluşturmaktadır [62]. Yöntemin aşamaları temel olarak;

- Çekirdek materyal karışımının kaplama sıvısı içerisine karıştırılması
- Karışımın dondurularak kurutulması basamaklarından oluşur.

Karışımın dondurularak kurutulması sonucunda, porlu yapıda kapsül partikülleri elde edilmektedir. Bu yöntem aroma maddelerinin, suda çözünür bileşiklerin ve ısıya duyarlı maddelerin kapsülasyonunda kullanılmaktadır [69, 78]. Dondurarak kurutmada aroma kaybının minimum olmasına karşılık, maliyetinin yüksek olması, sürekli bir yöntem olmayıp uzun süreli bir prosese ihtiyaç duyması ve oluşan porlu yapının bariyer görevini iyi sağlayamaması gibi dezavantajları mevcuttur [78].

Dondurularak kurutulmuş ilaç yüklü protein misellerinde, uzun süreli depolamanın yanı sıra kapsülleme verimliliği, yapısal özellikler, kararlılık ve toz rehidrasyonu üzerine liyofilizasyonun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, oral-kazein misellerinin, ilaçların oral yoldan verilmesi için yeni bir araç olabileceği sonucuna ulaşılmıştır [79].

2.2. Uçucu Yağlar

Bitkilerin yaprak, meyve, çiçek, kök gibi kısımlarından elde edilen uçucu ve aromatik özelliklere sahip kompleks yapıdaki bitki özütleri taşıdıkları çeşitli özelliklerden dolayı esansiyel yağ, uçucu yağ, aromatik yağ, eterik yağ, hidrosol gibi adlar ile anılmakta ve bu yağların elde edildiği bitkiler tıbbi ve aromatik bitkiler olarak adlandırılmaktadırlar. Hidrofobik karakterlerinden dolayı su buharı ile sürüklenebilir, suda çözünmez, çeşitli organik çözücülerde çözünebilir [80], buldukları yapıların zedelenmiş ve/veya parçalanmış hücrelerinden dışarı sızarlar. Söz konusu tüm özelliklerinden dolayı uçucu yağlar buldukları yapıdan distilasyon, ekstraksiyon ve presleme yöntemleri kullanılarak çıkarılırlar. Elde edilen uçucu yağlar içerdikleri kimyasal bileşenlerine göre çeşitlilik göstermekle birlikte genellikle açık sarı renkli veya renksiz, oda koşullarında sıvı, uçucu, spesifik kokulu, aromatik, yağmsı ürünlerdir. Yağ olarak adlandırılmalarına karşın gliserid yapı içermezler. Uçucu yağların ve bileşenlerinin nitel ve nicel özellikleri elde edildikleri bitkinin; cinsine, organına, yaşına, yetiştirme şartlarına (iklim, bölge, rakım, sıcaklık, nemlilik ve sulama, toprak gibi), hasat zamanı ve şartlarına, depolanma koşullarına ve yağın elde edilme yöntemine göre şekillenerek değişiklik gösterirler. Uçucu yağların elde edildiği bitkiler genelde sıcak tropik ülkelerle, ılıman Akdeniz iklim bölgesi ülkeleri arasında yer alan coğrafyada yetişmektedir [81].

Türkiye'nin coğrafi yapısı, iklim özellikleri, farklı üç flora bölgesinin kesişme noktasında olması, jeolojik özellikleri, 0-3000 m arasında değişen yükselti farklılıkları ve kısaca birçok karasal ve sucul ekosistemlere sahip olması nedeniyle zengin bir bitkisel biyoçeşitliliğe sahiptirler [82]. Bu durum Türkiye'de endemik bitkilerin de fazla sayıda olduğu sonucunu doğurmaktadır. Avrupa'nın tamamında yaklaşık 13.000 adet bitki tespit edilirken, bu sayı ülkemizde yaklaşık 12.000 civarındadır. Ülkemizde doğadan toplanarak ticareti yapılan bitki türlerinin sayısı 346 olup, bunların 112 adetinin ihraç edildiği ve ihraç edilen bu bitkilerden de 24 adetinin endemik bitki olduğu bildirilmektedir [82, 83].

Dünyada tedavi amaçlı ve baharat olarak kullanılan bitkilerin sayısının 20.000 civarında olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından rapor edilmiştir. Bugün doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından yaklaşık 1/3'ü uçucu yağ içermektedir [84]. Uçucu yağ bileşenlerince zengin familyalar arasında başta *Lamiaceae* (ballıbabagiller) olmak üzere *Asteraceae* (papatyagiller), *Rosaceae* (gülğiller), *Rutaceae* (sedef otugiller), *Iridaceae* (süsengiller), *Apiacea* (maydanozgiller), *Lauraceae* (defnegiller), *Zingiberaceae* (zencefilgiller) ve *Pinaceae* (çamgiller) familyaları gelmektedir [85, 86].

Günümüzde bazı bitki uçucu yağları FDA tarafından GRAS grubunda tat-koku veya gıda katkıları olarak sınıflandırılmıştır [81]. Doğada uçucu yağlar bitkilerin; antibakteriyel, antiviral, antifungal, böcek öldürücü (insektisidal) aktivite gösteren ve bu bitkiler için iştahlarını azaltarak otçullara karşı korunmasında önemli rol oynayan özelliklerdeki sekonder metabolitleridir. Ayrıca polen ve tohumların dağılmasını kolaylaştırır, istenmeyen diğer maddeleri uzaklaştırmak için bazı böcekleri çekebilirler [87]. Uçucu yağ bileşenlerinin bu özellikleri gerek çeşitli haşereleri/zararlıları uzaklaştırma amaçlı ürün formülasyonlarında gerekse bu zararlıları kokusuyla kendine çekerek tuzaklama ürünleri formüle edilmesinde etkilidirler.

Uçucu yağlar sınıflandırılırken hidrosolun kimyasal bileşenleri ile biyoaktif bileşenlerinin tıbbi ve aromatik özelliklerinden faydalanılır. Özellikle majör bileşenlerine göre terpenik, aromatik, azotlu ve kükürtlü, düz zincirli hidrokarbonlar olarak sınıflandırılabilirken, farmakolojik ve fitoterapik etkilerine göre antiromatizmal, antitussif (öksürük kesici), diüretik (idrar söktürücü), antiinflamatuvar (iltihaplanmayı azaltan), dezenfektan gibi gruplara sınıflandırılabilirler [88].

2.2.1. Uçucu yağ elde etme yöntemleri

Uçucu yağlar genel olarak distilasyon (damıtma), ekstraksiyon ve presleme yöntemleri kullanılarak elde edilmektedirler. Presleme yöntemiyle yüksek nitelikli ancak az miktarda hidrosol elde edilirken distilasyon ve ekstraksiyon yöntemlerinde tersi bir durum söz konusudur. Uçucu yağ elde etme yöntemi belirlenirken hammadde özellikleri ile son üründen beklenen değerler, maliyet, süre gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

2.2.2. Uçucu yağ bileşenleri

Uçucu yağların bileşiminde 2000'den fazla kimyasal bileşenin bulunduğunu bildirilmiştir [80]. Ticarileştirilmiş uçucu yağların çoğu gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi analizi ile kemotiplendirilmiştir. Uçucu yağın karakteristik özelliklerini diğer bileşenlere göre uçucu yağda yüksek konsantrasyonlarda bulunan makro bileşenler belirlemektedir. Uçucu yağlarla ilgili yapılan çalışmalar genellikle makro bileşenler üzerinden olup mikro bileşenlerin esansiyel yağın yapısına katkıları, bileşenler arası sinerjistik ve antagonistik etkiler üzerine çalışmalar ilgi çekmemiştir. Yapı bileşenlerini çoğunlukla terpenoidler (isoprenoitler) ve terpenler oluşturmakla birlikte; fenol türevi aromatik bileşikler, düşük molekül ağırlıklı alifatik hidrokarbonları, asitleri, alkolleri, aldehitleri, asiklik esterleri veya laktonları, istisna olarak azot ve sülfür içeren bileşikler, kumarinleri ve fenil propanoidlerin homologlarını da içermektedirler [89-93].

2.2.2.1. Terpenler

Uçucu yağların temel bileşenleri olan terpenler yapısal ve işlevsel açıdan farklı sınıflardan oluşurlar. Bu sınıflar izopren adı verilen 5 karbon bazlı (C_5) birim kombinasyonlarının farklı düzenlemeleri ile meydana gelirler. Ana terpenler; monoterpenler (C_{10}) ve seskiterpenler (C_{15}) olsa da hemiterpenler (C_5), diterpenler (C_{20}), triterpenler (C_{30}) ve tetraterpenler (C_{40}) de bulunur [87]. Temel yapısal formülleri $C_{10}H_{16}$ olup iki izopren molekülünden oluşan bir monoterpendir [85].

Monoterpenler (MT): Monoterpenler(C_{10}), iki izopren (C_5) birliğinin birleşiminden oluşur. Uçucu yağların %90'ını oluşturan en seçkin moleküllerdir ve çok çeşitli yapıların oluşumuna izin verirler. Monoterpenlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları Çizelge 2.2'de [87] verilmiştir.

Çizelge 2.2. Monoterpenlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları [87]

Kimyasal Yapı	Asiklik	Monosiklik	Bisiklik
Karbürler	mirsen, osimen vb.	terpinenler, p-simen, felandren, vb.	pinenler, -3-carene, kampen, sabinen, vb.
Alkoller	geraniol, linalol, sitronellol, lavandulol, nerol, vb.	mentol, a-terpineol, karveol	borneol, fenkol, krizantenol, thuyan-3-ol, vb.
Keton	tegeton, vb.	mentonlar, karvon , pulegon, piperiton, vb.	kamfor, fençon, thujone, ombellulone, pinocamphone, pinokarvon, vb.
Esterler	linalil asetat veya propiyonat, sitronelil asetat, vb.	mentil veya a-terpinil asetat vs.	izobornil asetat, vb.
Eterler Aldehitler Peroksitler Fenoller		1,8-sineol, mentofuran, vb. geranial, neral, sitronelal, vb. askaridol, vb. timol, karvakrol, vb	

Seskiterpenler: Seskiterpenler (C₁₅), üç izopren (C₅) biriminden oluşur. Zincirin uzatılması, çok çeşitli yapılar sağlayarak sayısını artırır. Seskiterpenin yapısı ve işlevi, monoterpenlerin yapı ve işlevlerine benzer [87]. Çizelge 2.3'te yapılarına göre sesquiterler verilmiştir. *Zingibaraceae* (Zencefilgiller) familyasının uçucu yağlarının çoğunluğunu sesquiterler oluşturur [89].

Çizelge 2.3. Yapılarına göre sesquiterler

Kimyasal Yapı	Sesquiter Adı
Karbürler	Azulen, b-bisabolen, kadinenler, b-karyofilen, logifolene, kurkuminler, elemenler, farneseneler, zingiberen vb.
Alkoller	Bisabol, sedrol, b-nerolidol, farnesol, karotol, b-santalol, paçuliol, viridiflorol, vb.
Ketonlar	Germakrone, nootkatone, cis-longipinan-2,7-dion, b-vetinone, turmerones, vb.
Epoksit	Karyofilen oksit, humülen epoksitler, vs.

2.2.2.2. Aromatik bileşikler

Fenilpropandan türeyen aromatik bileşikler, hidrosol yapılarında terpenlerden daha az sıklıkla bulunur. Terpenler ve fenilpropanik türevler ile ilgili biyosentetik yollar genel olarak bitkilerde ayrılır ancak bazılarında bir arada bulunabilirler (sinnamaldehit majör, öjenol ise minör bileşenler, aynı zamanda karanfil yağı, rezene vb.). Aromatik bileşikler şunları içerir:

- Aldehit: sinnamaldehit
- Alkol: sinnamik alkol
- Fenoller: kavikol, öjenol
- Metoksi türevleri: anetol, elemisin, estragol, metil öjenol
- Metilen dioksi bileşikleri: apiol, miristik, safrol.

Anason, tarçın, karanfil, rezene, maydanoz, star anason ve *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae* gibi bazı botanik aileler bu bileşiklerin başlıca bitki kaynaklarıdır [87].

2.2.2.3. Diğer bileşikler

Uçucu yağlar doymamış yağ asitlerinin cis- veya trans-hekzanal, hekzanol, çeşitli laktonlar gibi degradasyon ürünlerini, ayrıca terpen degradasyonundan kaynaklanan C₁₃-norisoprenoidler gibi bileşikler ile kükürt ve azotlu bileşiklerini de (örn: piridin türevler) içerirler [89]. Glukozinolatlar veya izotiosiyanat türevleri (sarımsak ve hardal yağı) azotlu veya sülfürlü bileşenler, çeşitli bitkilerin veya kurutulmuş, ızgara veya kavrulmuş ürünlerin ikincil metabolitleri olarak da bulunmaktadır [87].

2.2.3. Uçucu yağların özellikleri

Uçucu yağlar bileşenlerindeki etken maddelere göre spazm çözücü, uyarıcı, antiseptik, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan [89], karminatif, koloretik, sedatif, diüretik, sindirim düzenleyici, bağışıklık sistemini kuvvetlendirici [88] özellikler gösterebilmektedir. İn vitro fiziko kimyasal analizlerde uçucu yağların çoğu antioksidan olarak karakterize edilir. Bununla birlikte son çalışmalar; ökaryotik hücrelerde uçucu yağların mitokondri gibi hücre içi zarları ve organelleri etkileyen prooksidanlar gibi davranabildiğini göstermektedir. Tip ve konsantrasyonlarına bağlı olarak canlı hücrelere karşı sitotoksik etkiler gösterirler, ancak genellikle non-toksiktirler. Bazı durumlarda, uçucu yağlarla indüklenen hücre içi redoks potansiyelindeki değişiklikler ve mitokondriyal disfonksiyon, antigenotoksik etkiler gösterme kapasiteleri ile ilişkilendirilebilir. Bu bulgular, en azından kısmen, uçucu yağların karşılaşılan yararlı etkilerinin, hücresel düzeyde prooksidan etkilerinden kaynaklandığını ortaya koymaktadır [87]. Bitkisel kökenli uçucu yağlar ve bunların bileşenleri gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaları ve/veya gıdalardaki patojenleri inhibe etmek amacıyla da gıdalarda kullanılmaktadırlar. Literatürdeki pek çok çalışma uçucu yağların doğal gıda koruyucular olarak kullanıldığını göstermektedir [6].

Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri elde edildiği bitkiye, yağın etken bileşenlerine ve bu bileşenlerin karışımdaki miktarları ile kullanılan konsantrasyonuna, hedef mikroorganizma gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte mekanizmaları hakkında edinilen bilgiler sınırlıdır. Uçucu yağların Gram (-) bakterilerde hücre membranını parçalayarak hücre içi materyallerin hücre dışına çıkmasını, Gram (+) bakterilerde ise lipofilik özellikleri sayesinde hücre duvarını delip hücrenin daha iç kısımlarına ulaşarak antimikrobiyal etki gösterdiklerine dair çalışmalar mevcuttur. Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri üzerine in-vitro ve in-vivo çalışmalar yapılmaktadır [81]. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemede genel olarak kullanılan teknikler, agar difüzyon yöntemi, broth dilüsyon yöntemi ve disk difüzyon yöntemleridir [94, 95]. Hidrofobik özellikteki terpenler mikroorganizma hücre duvarındaki lipitler ile etkileşime girip lipitlerin bir araya toplanmasına ve zarın geçirgenliğinin artmasına neden olarak hücrelerin fizikokimyasal bütünlüğünü bozdukları teorisi antimikrobiyal mekanizmaya getirilen geçerli teoridir. Fizikokimyasal bütünlüğün bozulması hücrede iletim aksaklıklarına ve hücre içeriğinin pıhtılaşmasına neden olmaktadır [85]. Fakat uçucu yağlardaki kimyasal grupların çeşitliliği dikkate alındığında antibakteriyel aktivitenin tek bir mekanizmaya bağlı olmadığı, hücrede birçok hedefin olduğu sonucuna varılır [96]. Yüksek bitkilerden elde edilen antimikrobiyal maddeler, mikrobiyal metabolizmanın enzimatik reaksiyonlarını durdurabilmekte, ortamdaki besin maddelerinin alımını engelleyebilmekte, zarın yapısını değiştirebilmekte, çekirdek ve ribozomal seviyede enzim sentezini engelleyebilmektedir [97]. Disk difüzyon metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada, antimikrobiyal aktivitenin Gram (+) bakteri ve maya

suşlarına karşı Gram (-) bakterilerden daha etkili olduğu bildirilmektedir [98]. Gerçekte hücre zarının geçirgenliği, zarı geçmek zorunda olan çözünen bileşenlerin hidrofobisitesine ve zarın kompozisyonuna bağlıdır. Polar fenoliklerin suda çözünürlüklerinin yüksek olmaları nedeniyle hedef organizmaya temas etmesi kolaylaşır. Örneğin nane yağı hidrofobik yapısı sayesinde gıdanın lipid fraksiyonunda daha iyi çözünür ve hidrofilik kısımda yer alan mikroorganizmalarla teması, dolayısıyla antimikrobiyal etkinliği düşüktür [99].

Uçucu yağlar terpenoit ve fenolik bileşenler gibi antioksidan bileşenleri de yapılarında barındırırlar. Uçucu yağların ve bileşenlerin antioksidan özelliği “*in vitro*” olarak fiziksel-kimyasal yöntemlerle sıklıkla doğrulanmıştır. Antioksidasyon organ ve hücrelerdeki fizyolojik stresi azaltması nedeniyle beslenme açısından önemlidir. Hayvan ve insanlarda hastalıklara karşı direnç ve bağışıklık sistemindeki yeterlilik, antioksidasyon mekanizması ile ilişkilendirilmektedir [81]. Antioksidanların doğrudan antimutagenik ve anti-kanserojen olduğu rapor edilmektedir [87].

Antioksidanlar reaktif oksijen türleri ile etkileşerek, lipid, protein ve DNA'yı oksitleyebilen prooksidanlara dönüştürülürler. Uçucu yağların uçucu terpenik ve fenolik bileşenleri, hücrel redoks durumunu etkileyerek prooksidanlar olarak işlev görmektedir. Literatürdeki çeşitli çalışmalarda uçucu yağlar ve aktif bileşenlerinin düşük konsantrasyonlarda antioksidan, antimutagenik özellikler gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda prooksidan, genotoksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [87].

Uçucu yağların biyolojik etkileri arasında sitotoksisite, fototoksisite, nükleer ve sitoplazmik mutajenite, kanserojenite, antimutagenite de yer almaktadır. Tipik lipofiller olarak; hücre duvarı ve sitoplazmik membran, farklı polisakkarid, yağ asitleri ve fosfolipid tabakalarının yapısını bozarak onları geçirgen hale getirmektedirler. Sitotoksisite, bu tür zar hasarı şeklinde kendini gösteren etkileri içermektedir. Hücre duvarından veya dış hücre zarından gelen zincirleme reaksiyonlar, mitokondri ve peroksizomlar gibi farklı organellerin zarları vasıtasıyla tüm hücrelere bulaşmaktadır. Uçucu yağların sitotoksik aktivitesi, genellikle fenoller, aldehitler ve alkollerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu sitotoksik özellik, uçucu yağların sadece belirli insan ya da hayvan patojenlerine ya da parazitlere karşı değil aynı zamanda tarımsal ürünler ile deniz ürünlerinin korunması için de büyük önem taşımaktadır. Uçucu yağlar ya da bazı bileşenler, bakteriler de dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalara karşı gerçekten etkilidir. Muhtemelen uçucu yağların hücre zarlarındaki etkisi göz önüne alındığında, bakteri duyarlılığı veya direnci uygulama biçimine bağlıdır ve antibiyotiklerin hücrelerle ilk önce temasta olması gerektiğini gösterebilir [100].

Bazı uçucu yağlar furokumarinler gibi fotoaktif molekülleri içerirler ancak karanlıkta, kendiliğinden sitotoksik veya mutajenik değildir. Başka bir deyişle, sitotoksisite, fototoksisite ile oldukça zıt düşmektedir. Sitotoksisite durumunda uçucu yağlar hücrel ve organel membranlara zarar verirler ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile proteinler ve DNA

üzerinde prooksidanlar gibi davranabilirler. Bu nedenle ışık maruziyetleri genel tepkimeye pek fazla katkıda bulunmaz. Fototoksisite durumunda uçucu yağlar membranlara, proteinlere ve DNA'ya zarar vermeden hücreye nüfuz eder. Sitotoksisite veya fototoksisite; uçucu yağlarda bulunan moleküllerin türüne ve hücredeki bölümlerine bağlı olarak ışık maruziyeti olan veya olmayan, farklı radikal türleri üretir [87].

Antimutajenite; mutajenik maddelerin mutajen veya kanserojen etkilerinin ortadan kaldırılması ya da bunların DNA ile etkileşimlerinin önlenmesidir. Antimutajenler etki etme şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere iki şekildedir. Mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden yani DNA'nın yapısına dahil olmadan onları inaktif hale getiren antimutajenik maddeler desmutajenler olarak tanımlanmaktadır. Mutajenin DNA'nın yapısına katılmasından sonra DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek mutagenезisi azaltan maddeler ise biyoantimutajenik maddelerdir. Biyoantimutajenler, DNA polimeraz I ve DNA polimeraz III sentezini arttırarak ve hata-eğilimli DNA tamir mekanizmasını engelleyerek etki gösterirler. Antimutajenik özelliğe sahip olduğu bilinen bazı bileşikler; polifenoller, flavonoidler, α -tokoferol, askorbik asit ve karotenoidlerdir [85].

Uçucu yağların yapısını oluşturan yüzlerce bileşen mevcuttur ve bir yağı oluşturan bileşenlerin herhangi bir bileşenle ya da bileşenlerin birbiriyle etkileşimleri mutajeniteye veya antimutajeniteye neden olabilmektedir. Mutajen maddenin aktivasyonunu durduran bazı ajanlar yoluyla yapılan kanser araştırmaları da öncelikli çalışma konuları arasındadır [85].

2.2.4. Uçucu yağların kullanım alanları

Uçucu yağlar uzun yıllardan beri değişik amaçlarla bilimsel ve ticari olarak birçok alanda kullanılmakta olup günümüzde bilinen yaklaşık olarak 3000 esansiyel yağın 300'ü ticari önem taşımaktadır. Uçucu yağların ve bileşenlerinin kullanım alanlarının başında kozmetik, ilaç, kimya ve gıda sanayi, tarım, aromaterapi ve fitoterapi gelmektedir. Örneğin d-limonen, geranil asetat veya d-karvon; parfüm, krem, sabun, gıda için lezzet katkı maddeleri, ev temizleme ürünleri için parfümler ve endüstriyel çözücüler; ayrıca antimikrobiyal, antiseptik, analjezik, sedatif, anti-inflamatuar, stimülan, spazmolitik ve lokal anesteziye ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar [87]. Uçucu yağlar hücre membranından kolaylıkla geçebilen, deriden ve akciğerlerden kolaylıkla absorbe edilebilen bileşenlerdir [85]. Vücudumuzda beyin zarından sadece uçucu yağlar geçebilmekte ve bu geçiş tedavi açısından uçucu yağları önemli kılmaktadır [82]. Bitkilerin tıbbi amaçlı kullanımına yönelik etnobotanik alanı hakkındaki ilk yazılı bilgiler M.Ö. 3000'li yıllara; eski Mısır, Hitit, Grek ve Roma dönemlerine kadar dayanmaktadır. Anadolu tıbbi bitkileri ile ilgili bilgilerimizin kökenleri ise Hititler dönemine kadar dayanmakta, bitkilerin tıbbi amaçla şifahanelerde kullanılması Selçuklu dönemine kadar uzanmaktadır [85]. Çok uzun zamanlardan beri geleneksel/ alternatif tıpta kullanılan bitkilerle

tedavi günümüzde farmakolojinin bir alt dalı olarak fitoterapi adı ile kendisine yer edinmiştir. Sağlıklı, doğal yaşam trendlerinin de etkisiyle fitoterapiye ilgi giderek artmaktadır.

Uçucu yağların, bir prooksidan aktiviteye dayanan sitotoksik kapasitesi, kişisel kullanım için; havanın temizlenmesinde, kişisel hijyeninde veya ağızdan tüketim yoluyla dahili kullanım için mükemmel antiseptik ve antimikrobiyal ajanlardır ve bitkilerin korunması için böcek öldürücü etkisi onları mükemmel hale getirebilir. Dahası, bazıları, antikanserojenik bir aktivite ile bağlantılı olabilecek, çok net bir antimutagenik kapasite göstermekte, prooksidan etkilerle antitümör ajanlar haline gelebilmektedir. Son yıllardaki araştırmalar uçucu yağların veya bunların bazı bileşenlerinin prooksidan aktivitesinin, bazı polifenollerin de olduğu gibi lokal tümör hacmini veya tümör hücresi çoğalmasını apoptotik ve/veya nekrotik etkilerle azaltmada çok etkili olduğunu göstermiştir [87].

Son yıllarda toksik etkilerinden dolayı kısıtlamalar ve artan tüketici endişelerinin de etkisiyle gıda endüstrisinde sentetik antioksidan, antimikrobiyal gibi katkı maddelerinin yerine alternatif doğal katkıların kullanımına yönelim söz konusudur. Buna karşın uçucu yağlar ve bileşenlerinin organoleptik olarak kabul edilebilir ölçüleri gıdalarda genel olarak sentetik katkılarına göre düşük aktivite göstermektedir.

Gıdalarda oksidasyon reaksiyonları en çok lipidlerde görülmektedir. Uçucu yağlar doymamış lipidlerin oksidasyon tepkimelerini önleyerek raf ömrünü arttırması, gıdalar ve bütillenmiş hidrokşianisol gibi sentetik bileşiklerin değiştirilmesi, ayrıca hücre hasarının, yaşlanmanın ve insan hastalıklarının nedeninin önlenmesi için değerli olabilirler [101].

Çevresel şartlar, kullanıldıkları gıda matriksinin yapısal özellikleri ve yağın uçuculuk özellikleri esansiyel yağların kimyasal yapısını değiştirebilen, potansiyel etkinliğini azaltabilen faktörlerdir. Kapsülasyon uygulamaları esansiyel yağların stabilitesini artırarak taşıma ve depolama sürecinde yapılarının korunmasında, nutrasötiklerde ve gıdalarda kullanımlarında meydana gelebilecek olumsuzlukları önlenmesinde önemli yarar sağlamaktadır.

2.3. Nane (*Mentha spicata*)

2.3.1. *Lamiaceae* familyası

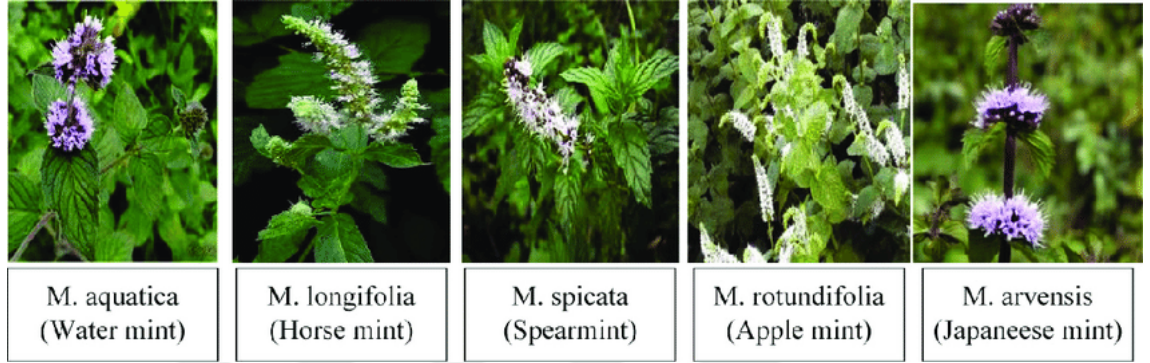
Mentha cinsinin üyesi olduğu *Lamiaceae* ailesi 200 cins ve 4000'den fazla türü içinde barındırmakta olup aile ülkemizde ballıbabagiller adıyla da anılmaktadır [102]. *Lamiaceae* familyası çok yıllık bitkiler grubunda yer alıp çalimsı veya yarı çalimsı, otsu bitkilerden oluşmaktadır. Aileye mensup bitkilerin gövdeleri 4 köşeli, yaprakları basit şekillidir. Verim verme ve gelişme açısından tropikal ve ılıman bölgelerde daha iyi gelişmekle birlikte geniş alanlarda adaptasyon gösterebilmektedirler [103]. Familya çoğunlukla adaçayı (*Salvia spp.*), kekik (*Thymus spp.*), nane (*Mentha spp.*), mercanköşk (*Majorana spp.*), biberiye (*Rosmarinus spp.*), lavanta (*Lavandula spp.*), reyhan (*Ocimum spp.*) ve paçuli (*Pogostemon spp.*) vb gibi tıbbi

ve aromatik bitki türlerini kapsamaktadır. Familya içerisinde yer alan bitkiler tanınmış ve ekonomik öneme sahip bitkilerdir. Ailenin birçok üyesi tıbbi ve aromatik bitkiler içerisinde yer alıp gıdaların muhafazası, hastalıkların tedavisi ve terapide (fitoterapi ve aromaterapi) faydalanılan, antimikrobiyal aktivite gösteren uçucu yağlara sahip katmanlı türler içermektedirler [102]. Bu ailenin bitkileri zengin bir polifenol kaynağı olup güçlü antioksidan özelliklere sahiptirler [9, 104].

2.3.2. *Mentha* (nane)

Mentha genel olarak nane adıyla anılan, tıbbi ve aromatik bitki olarak kabul edilen, çok yıllık, sürüncü gövdelere sahip, otsu bir bitki cinsidir [105]. *Mentha* türlerinde taç yapraklar aktinomorf olup 4 lopludur, 4 stamen eşit boydadır [106]. *Lamiaceae* familyasındaki aromatik, uzun ömürlü *Mentha* cinsi Amerika'dan Avrupa, Asya, Avustralya ve Afrika gibi çeşitli coğrafyalara yayılmış olup melezler dahil bilinen yaklaşık 40 tür içermektedir [107]. *Mentha*'nın ana vatanının Orta Avrupa ve Asya olduğuna dair bilgiler de mevcutken [108], bazı kaynaklarda M.Ö. 1200-1600 yıllarında Mısır'da hüküm süren 20. ve 21. sülalelere ait mezarlarda *Mentha* bitkisinin kalıntılarına rastlandığı bildirilmiştir [109]. *Mentha* türleri insanlar tarafından iki bin yıldan fazla süredir kullanılmaktadır [110]. *Mentha* sözcüğünün Yunanca sterilize etmek, mikroptan arındırmak anlamındaki *minytho* sözcüğünden türediğini ileri sürenler olduğu gibi eski Hintçe beraberce ezmek veya ovuşturmak anlamındaki *menta* sözcüğünden türediğini yazanlar da vardır. Nane adı Arapça ve Farsça 'nana'dan gelmektedir. Orta ve Doğu Anadolu'da kullanılan *anuk*, *annuh*, *annuk* adları Ermenice aynı anlama gelen *ananoh*'dan gelmektedir [111]. *Mentha* cinsi; bitkisi, yağı ve uçucu yağı bileşenleri bakımından ekonomik olarak önemli olup birçok ülkede ticari olarak yetiştirilmektedir. Ekonomik değer taşıyan tüm diğer tıbbi aromatik bitkilerde olduğu gibi *Mentha* cinsinde de her yönden yüksek verimlilikte (birim alandan elde edilen ürün, birim miktardan çıkarılan yağ miktarı gibi) ve kaliteli ürün elde etmek üzere çalışmalar yapılmaktadır. Nananın en çok kullanılan ve ticari olarak en büyük değere sahip; dolayısıyla üzerinde en çok çalışmalar yapılan kısmı uçucu yağ fraksiyonudur. Nane uçucu yağı üretiminin yılda 6000-8000 ton arasında değişmekte ve turuncgil yağından sonra ikinci sırada olduğu bildirilmiştir [112]. Toplam küresel talebin %80'ini 16.000 ton nane yağı ile Hindistan karşılamaktadır [113]. Ayrıca en çok nane yağı üreten ülkeler arasında Fransa, Brezilya, Arjantin, Batı Avrupa Ülkeleri, Çin, Peru, Tayland ve Kore'de kendilerine yer edinmiş [108] olup Akdeniz iklim kuşağında yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. *M. arvensis* L. (mısır nane), *M. x piperita* L. (nane), *M. citrata* Ehrh. (bergamot nane), *M. longifolia* L. (yabani nane) ve *M. spike* L. (mızrak nane) ılıman, Akdeniz ve subtropikal bölgelerde yetiştirilen başlıca türlerdir [102]. *M. x piperita* L. (İngiliz nanesi), *M. arvensis* L. (mısır nane/Japon nanesi) ve *M. spicata* L. (bahçe nanesi), dünyada esansiyel yağ üretimi için yaygın olarak kullanılan üç *Mentha* türüdür [104].

Ülkemizde ise bahçelerde, evlerin önünde ve tarlalarda yetiştirilen nane bitkisi; tıbbi açıdan spazm ve gaz giderici (karminatif), mideyi serinletici, uyarıcı ve diüretik etkilere sahip olup baharat ve bitki çayları şeklinde de çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Nane yağı ilaç, gıda ve kozmetik sanayinde geniş bir uygulama alanı olan mentolün en zengin doğal kaynağıdır [92]. Ülkemizde 7 tür yayılış göstermekte olup bunlar; *M. pulegium*, *M. arvensis*, *M. aquatica*, *M. piperita*, *M. longifolia*, *M. suaveolens*, *M. spicata*'dır [108]. Bazı *Mentha* türlerine ait görseller Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. Bazı *Mentha* türlerine ait görseller

Mentha türlerinden bazılarının mentol, karvon, menton ve pulegon gibi etken bileşenleri içeren uçucu yağa sahip olduğu bildirilmektedir [108]. Nane bitkilerinin mineral içeriği kabul edilebilir sınırlar arasındadır [110]. Literatürde bir dizi kemotip; pulegon, karvon, linalol, piperiton, piperiton oksit, menton/izomenton, pulegon/menthone/izomenton ve pulegon/piperiton prevalansı ile tanımlanmıştır [114-116]. Yapılan bir çalışmada nane uçucu yağ fraksiyonunun %0.1-1 arasında olduğu belirtilmiştir [64]. Diğer esansiyel yağlarda olduğu gibi bitkinin elde edildiği tür, alt tür, yetiştirildiği bölge, yetiştirme şartları (ışık, sıcaklık, sulama, gübreleme, nemlilik, toprak gibi), bitki yaşı, hasat şartları ve kaçınıcı hasat olduğu, depolama koşulları gibi faktörler *Mentha* cinsinin üyelerinde bitki özelliklerine, esansiyel yağ; miktarı, bileşenleri ve bileşen miktarlarına, kalitesine etki eder.

Mentha türlerinin organik ekstraktlarının öjenol, kafeik asit, rosmarinik asit ve α - tokoferolün varlığı nedeniyle antioksidan ve antiperoksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir [117]. Fenilpropanoidler, monoterpener ve oksijenlenmiş seskiterpenler gibi bazı bileşiklerin oksidasyon inhibisyon kapasitesine sahip oldukları rapor edilmektedir [118].

Nane uçucu yağlarının önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu [9, 107, 119] ve Gram (+) ve Gram (-) bakteriler ve bazı mantar suşlarına karşı da güçlü antimikrobiyal bir aktivite sergilediği bildirilmiştir [104, 110, 120, 121]. Nane uçucu yağının seçilmiş bazı mikroorganizmalara (*Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Micrococcus flavus*, *Salmonella typhimurium*, *Trichophyton tonsurans*, *Candida albicans*) karşı

antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir [28, 64, 120, 122]. Yapılan başka bir çalışmada nane uçucu yağlarının *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*'i engellediği belirtilmiştir [123]. Nane yağının *Saccharomyces cerevisiae*'nin iki suşuna karşı etkili olduğu bildirilmiştir [124]. Bununla birlikte diğer birçok biyolojik aktivite gibi antimikrobiyal aktivite; farklı genotipler, kültürler ve *Mentha* cinsinin yabancı türlerinde bulunan uçucu yağın kimyasal bileşimindeki değişkenlik ile yakından ilişkilidir [110, 125]. Nane yağı ve mentolün ampicillin, oksitetrasiklin, eritromicin ve gentamicin antibiyotikleriyle etkileşiminin araştırıldığı çalışmada nane yağı ile oksitetrasiklinin ve mentol ile oksitetrasiklinin birlikte kullanımında additif (ilave) etkisi gözlenmiştir. Nane yağının antiplasmit etkisinde mentol önemli rol almaktadır [124]. Gerçekte hücre zarının geçirgenliği zarı geçmek zorunda olan çözünenlerin hidrofobik özelliğine ve zarın kompozisyonuna bağlıdır. Polar fenoliklerin sudaki çözünürlüklerinin yüksek olmaları nedeniyle hedef organizmaya temas etmesi kolaylaşır. Örneğin nane yağı hidrofobik olması nedeniyle gıdanın lipid fraksiyonunda daha iyi çözünür ve hidrofilik kısımda yer alan mikroorganizmalarla teması, dolayısıyla antimikrobiyal etkinliği zayıftır [99].

Mentha cinsi üyeleri spesifik aroma ve çeşitli biyoaktif özellikleri ile tıbbi ve aromatik bitkiler arasında önemli yer edinmişlerdir. Ayrıca nane türleri de içerdikleri majör bileşenlerin etkisiyle farklı lezzetlere ve farklı biyoaktif özelliklere sahiptir [107]. Nane, nane uçucu yağı ve majör bileşenleri gıdalarda, nutrasötiklerde, eczacılıkta, fitoterapi ve aromaterapide, diş ve ağız bakımı, kozmetik ve parfümeri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. *Mentha* cinsine ait bitkilerin yaprak, çiçek ve sap kısımları ile uçucu yağları ve bileşenlerinin; baharat, bitkisel çay, lezzet ve aroma verici, ferahlatıcı olarak gıdalarda kullanımı yaygın bilinen özelliklerindedir. *Mentha* spp.; bulantı, bronşit, şişkinlik, iştahsızlık, antienflamatuar, karminatif, antiemetik, diyaforetik, antispazmodik, analjezik, uyarıcı, antikansorejen aktiviteler ile ülseratif kolit ve karaciğer iltihabı önleyici özelliklere sahip nutrasötikler olup fitoterapide kullanılmaktadırlar [104]. Nane uçucu yağı antiseptik ve bölgesel anestetik özelliklere sahip olup ağrı giderici, kan akışını hızlandırıcı etkiler sergilemektedir [64].

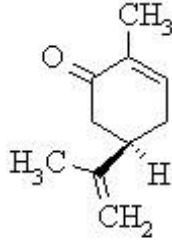
2.3.3. *Mentha spicata*

Mentha spicata (bahçe nanesi/ kıvrıkcık nane); *M. longifolia* (uzun yapraklı nane) x *M. rotundifolia* (elma nane) türlerinin melezidir [105]. *Mentha spicata* L. uçucu yağlarının ekonomik önemi ile karakterize edilmekte ve uçucu yağ üretimi için dünyanın birçok yerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir [9]. *M. spicata* L.; 30-100 cm boyunda büyüyen, yaprakları tırtıklı ve 5-9 cm uzunluğu ile 1.5-3 cm genişliğinde olan bir türdür. Kök kare şeklindedir, nane ailesinin bir ticari markasıdır. *M. spicata* ince sivri çiçekli olup her çiçek pembe veya beyaz ve 2.5-3 mm uzunluğunda ve geniş çiçek üreten bir bitki türüdür [102].

Mentha spicata L. karakteristik güçlü aromatik kokulu, tüsüz, uzun ömürlü bir bitkidir. Kök yapısı sürünen bir rhizomatous (rizom kök- kök gövde) şeklindedir [113]. *M. spicata* ile

ilgili olarak çok yıllık, otsu, kısa boylu, parlak yeşil renkli, dalların ucunda başak şeklinde soluk mavi çiçekleri bir arada olan bir tür olduğunu bildirilmiştir [126]. Özgül ağırlığı 25 °C'de 0.917-0.934, optik çevirme açısı 20°C'de -48°/-59°, kırılma indisi 20°C'de 1.484-1.491, çözünürlük %80'lik etanolde 1 hacim, karvon olarak toplam keton en az %55'tir. Uçucu yağ; çiçekli taze bitkiden, su buharı destilasyonu ile, ortalama %0.6 verimle elde edilmektedir. Başlıca bileşenler; l-karvon (%40-70), limonen (%20), karveoller, karvon izomerleri, karvil asetatlar olup ayrıca mentol, borneol, linalol, menton, jasmon, perilalkol, monoterpenler ve seskiterpenler barındırır [108]. *M. spicata*'dan elde edilen uçucu yağların ana bileşeni karvondur ve bu özellik onu diğer nane türlerinden farklı kılar. *M. spicata* uçucu yağında çoğunlukla %50'nin üzerinde karvon bulunmaktadır [105]. *M. spicata* uçucu yağı esas olarak oksijenli monoterpenlerden oluşmuştur. *M. spicata* uçucu yağının kompozisyonunun %80'inden fazlasını büyük oksijenli monoterpen bileşiklerden olan karvon, cis karveol ve limonen oluşturmaktadır [26]. *M. spicata* yağının aromatik karakteri majör bileşeni karvon içeriği ile şekillenir. Tür sindirim ve gastro uyarıcı olarak yararlı bulunmuştur. Bitkinin tüm kısımları karminatif (gaz giderici) olarak kullanılmasını sağlarken, yapraklar çay tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Taze ve kurutulmuş bitkiler ve bunların uçucu yağları; gıda, kozmetik, şekerleme, sakız, diş macunu ve ilaç endüstrilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. *M. spicata*'nın uçucu yağı güçlü insektisidal (böcek öldürücü) ve mutajenik aktivite göstermiştir [113].

Yapılan çalışmalarda nanenin uçucu yağ fraksiyonunun %0.1-1 arasında olduğu belirtilmiştir [26]. Chauhan vd. (2009) *Mentha spicata* bitkisini kullanarak, soluk yeşilimsi renkte ve taze ağırlık bazında 0.37 ± 0.02 oranında uçucu yağ elde etmişlerdir. Elde edilen toplam yağın %94.0'ünü oluşturan 20 bileşik tanımlanmış olup majör bileşenleri karvon (%57.1), limonen (%10.1); diğer önemli bileşenleri cis-dihidrokarvon (%3.2), dihidrokarveol (%3.2), germacren D (%3.1), 1,8 sineol (%2.9) olarak tespit edilmiştir [113]. *M. spicata* üzerinde yapılan bir diğer çalışmada uçucu yağın %99.84'ünü oluşturan toplam 34 bileşen tespit edilmiş olup, ana bileşenler l-karvon (%50.33), d-limonen (%16.47), borneol (%3.93) ve 4-terpineol (%3.78) olarak saptanmıştır [110]. Yapılan çeşitli çalışmalarda *M. spicata* türünden elde edilen uçucu yağın karvon oranının %39.38-69.41 [92, 127, 128], %42-67 [92, 128], %50-70 [110, 129, 130] aralıklarında bulunduğu bildirilmiştir. Elde edilen değerler daha önceden de belirtilen yetiştirilme, hasat, depolanma faktörlerinden etkilendiğinden çeşitlilik göstermektedir. Literatür taramalarında elde edilen verilere de dayanarak *M. spicata* türünün uçucu yağının kimyasal bileşiminin geniş çapta değişen karmaşık kimyasal karışımlardan oluşmakla birlikte birinci majör bileşeninin karvon olduğu görülmektedir. Şekil 2.3'te karvonun molekül yapısı gösterilmiştir.



(R)-(-)-Karvon

Şekil 2.3. Karvonun molekül yapısı

M. spicata çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir ve geleneksel tıpta antispazmodik, diüretik, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan ajan olarak ve soğuk algınlığı, grip, solunum yolu problemleri, gastralgia, hemoroit ve mide ağrısı tedavisinde kullanılmaktadır [131-133]. *M. spicata* uçucu yağı ve ekstraktları çoğunlukla antimikrobiyal ve antioksidan maddeler olarak bilimsel ilgi konusu olmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarda *M. spicata* uçucu yağının düşük antioksidan etki gösterirken yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesi, yapısında barındırdığı majör bileşen karvon ile ilişkilendirilmiştir [9] ve bu bileşikten tatlandırıcı, koku verici ve inhibitör olarak yararlanılmaktadır. Majör bileşiklerden karvakrol ve karvonun *S. aureus*, *L. Monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'e karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [26]. *M. spicata* uçucu yağının düşük radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu bu durumun da menton ve izomentonun oranından kaynaklanabileceği bildirilmektedir. Uçucu yağların en yüksek antioksidan özelliklerinin fenolik içerikleriyle ilgili olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiş olup *M. spicata* uçucu yağlarındaki düşük radikal süpürme aktivitesinin majör bileşen olarak mentol bileşeni yerine karvon bulundurmasına dolayısıyla fenolik madde içeriğine bağlanabileceği rapor edilmiştir [110, 125].

2.4. Zein

Mısır proteini olan zein bitkinin endospermde bulunan bir prolamin olup alkolde çözünmektedir [68]. Farklı mısır türlerinin protein içeriği kuru bazda %6 ila %12 aralığındadır. Mısırın ihtiva ettiği proteinin yaklaşık %75'i endospermde bulunur. Zein mısır endospermının sertliğini belirler. Zein, 5-35 mm'lik nişasta granülleri arasındaki mısır endosperm hücrelerinin sitoplazması boyunca eşit olarak dağılmış ± 1 mm'lik "zein-body"lerinde bulunur [134]. Çeşitli faktörlere bağlı olarak endospermın toplam proteininin en az %50'si depo proteini zein formundadır. Sulu alkol karışımı ile ekstrakte edilip granül toz halinde kurutulabilir [46]. Şekil 2.4'te granül zein görülmektedir.



Şekil 2.4. Granül zein

Zein 3/4 oranda lipofilik ve 1/4 oranda hidrofilik amino asit kalıntılarına sahiptir [68]. Zeinin hidrofobik karakteristiği, yapısında barındırdığı yüksek polar olmayan amino asitlerle ilgilidir [73, 134]. Nispeten saf halde ekstrakte edilen az sayıdaki tahıl proteinlerinden [135] olan zein, ticari olarak mısır endüstrisinde öğütmenin bir yan ürünüdür. Bir protein olan zein GRAS listesinde yer almaktadır ve FDA tarafından gıda sınıfı bir bileşen olarak sınıflandırılır. Yenilebilir filmler oluşturma kabiliyetine sahip zein gıda ve ilaç endüstrileri için cazip bir materyaldir. Kapsülleme, ilaç dağıtım tabanı ve doku uygulanması araştırılmıştır [136]. Zein ilaç salımı, gıda koruması, antioksidan ve emülgatör gibi katkı maddesi formunda pek çok uygulamada kullanılır [137]. Zein karmaşık yapıda eşsiz bir materyaldir; molekül yapısı ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle özellikle son yıllarda endüstride ve bilimsel çalışmalarda zeine yönelim artış göstermektedir.

Prolamin zein ve ticari zein aynı materyal değildir. Çekirdekte zein yaklaşık 1 µm boyutundaki protein cisimciklerinde yer almaktadır. Biyolojik olarak zein moleküler boyut, yük ve çözünürlük bakımından değişen proteinlerin bir karışımıdır. Bu proteinler diferansiyel çözünürlükler ve ilgili yapıları ile dört ayrı türe ayrılabilir: α -, β -, γ - ve δ -zein, moleküler boyutta (21.000-25.000 moleküler ağırlıklı polipeptit ve 10.000 moleküler ağırlıklı peptit) farklılık gösteren bir peptit karışımıdır [134, 135]. Daha büyük peptitler çoğunlukla hidrofobiklikten sorumludur. Düşük moleküler ağırlıklı peptitler daha az polar olmayan amino aside ve daha düşük bir ortalama hidrofobikliğe sahiptir. Ayrıca zein glutamik asit, lösin, prolin ve alanin içerir; bununla birlikte çözünürlüğün sınırlayıcı bir faktörü olan bazik ve asidik amino asitlerden yoksundur [138, 139]. Lizin ve triptofan gibi esansiyel amino asitler yetersizdir ve besin kalitesinde zayıftır [134]. Zein sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile fraksiyonları olan α -, β -, γ - ve δ -zeine ayrılabilir. Toplam zeinin yaklaşık %70-85'ini α -zein, %10-20'sini γ -zein, %1-5'ini β -zein ve %1-5'ini δ -zein oluşturmaktadır [136].

2.4.1. Zeinin çözünürlük özelliği

Zein çok farklı çözücülerde farklı faktörler altında çözücülük gösterir. Tek bir maddenin zein için iyi bir çözücü olması için, molekülün polar ve nonpolar gruplar arasında doğru denge oluşturması gerekir [140].

Zein tek başına suda çözünmez iken su ve bazı alkollerin ikili çözücü halinde olduğu ortamlarda çözünür özelliğe sahiptir. Prolamin sınıflandırmasından ve alkollerin kolay uzaklaştırılmasından dolayı sulu alkoller en çok kullanılan zein çözücülerdir [134]. Zein için ikili çözücülerin kapsamlı bir araştırması Manley ve Evans (1943) tarafından gerçekleştirilmiştir. Zein için ikincil çözücüler Çizelge 2.4'te [135, 141] verilmiştir. Zein çözeltisinin çözünme gücü ve bulut noktasının, iki bileşenin oranına ve sıcaklığa bağlı olduğu ortaya konulmuştur. Susuz çözeltiler süre ve ısının etkisi altında jöle haline gelme eğilimi göstermiş olup sulu karışımlar gibi köpürme özelliği göstermemiştir [135].

Çizelge 2.4. Zein için ikincil çözücüler [135, 141]

1. Bileşen	2. Bileşen
Su	Aseton, asetonil aseton, n-bütanol, t-bütanol, s-bütanol, dioksalan, dioksan, etanol, izobütanol, izopropanol, metanol, n-propanol,
Düşük bir alifatik alkol	Asetaldehit, aseton, benzen, butil laktat, kloroform, diklorometan, dietilen glikol monoetil eter, etil laktat, etilen diklorür, etilenglikol, etilen glikol monoetil eter, furfural, metil etil keton, metilen klorür, nitroetan'nın, nitrometan, propilen glikol, 1,1,2,2-tetrakloroetan, 1,2,3-trikloroetan, tolüen

CPSC (1949) ve Manley ve Evans (1943)'dan elde edilen veriler

Zein çözeltileri çözeltideki zein ve suyun konsantrasyonuna bağlı olarak zaman ve ısı etkisi ile jelleşir.

2.4.2. Zeinin plastikleştirici özelliği

Zeinin kullanıldığı plastikleştiriciler/akışkanlaştırıcılar için bir polar grup ve polar ve nonpolar gruplar arasında uygun bir dengeye ihtiyaç vardır. Zein plastikleştiriciler birincil plastikleştiriciler; gliseroller, sulfonamidler, yağ asitleri, amidler, aminler, gliseril esterler, esterler olmak üzere gruplandırılırlar. Daha etkili plastikleştiricilerden bazıları trietilen glikol gibi uçucu olmayan çözücülerdir. Su genellikle plastikleştirici etki için zeine ilave edilmese de su zeinin en etkili plastikleştiricisi olabilir. İkincil plastikleştiriciler; gliserol, sorbitol, difenilamin, dibutil fitalat, dibütil sebakat, trifenil fosfattır ve bunlar tek başlarına kullanıldıklarında zein için zayıf plastikleştiricilerdir, karışık sistemlerde etkilidirler [142].

2.4.3. Zeinin kapsül oluşturabilme özelliği

Wang ve Padua, etanol-su çözeltilerinden zein mikrokürelerin oluşumunu kendiliğinden oluşan küreler olarak tanımlamıştır. Kurutma esnasında, etanol sudan daha hızlı buharlaşmakta, solvent ortamı giderek hidrofilikleşmektedir. α -zein, nispeten hidrofobik bir proteindir ve sulu ortamda hidrofobik bağlar oluşturmaya eğilimli olup kendiliğinden oluşum süreçlerine neden olmaktadır [136]. Zeinin hidrofobik ve hidrofilik zonları sürekli salımlı formda kapsülleme için bağlar oluşturabilir. Zeinin sulu etanoldeki çözünürlüğünden yararlanılarak zein çeşitli bitki uçucu yağlarının kapsülasyonunda kullanılmıştır. Zein kabuk materyali ile uçucu yağlar kapsülle edilerek antioksidan aktivitesi, antimikrobiyal aktivitesi, salım kinetiği gibi faktörler için incelenmektedir. Zein nanopartiküllerinde uçucu yağların kapsüllemesi, suda dağılmasını sağlar ve bu da insan patojenik bakterilerin gıda muhafaza ve kontrolünde kullanım potansiyellerini büyük ölçüde artırır. Bu çalışmanın sonuçları, gıda muhafazasında uçucu yağların uygulanmasını kolaylaştırmak için nano kapsüllemenin kullanılmasını desteklemektedir [137].

Zeinin hem etanolde hem de asetonda çözülmesiyle gerilme ve su buharı bariyer özellikleri iyi olan biyobozunur zein filmleri elde edilebilmektedir. Nanoteknoloji yaklaşımlarının zein için özel gıdalarda ve biyobozunur plastik endüstrisinde yeni uygulamalar oluşturacağı düşünülmektedir. Zein, örneğin formaldehit ile muameleden sonra mikrobiyolojik olarak dirençli ve hareketsiz olan, tübular yapılardan oluşan bir ağ örgüsü oluşturabilir [76]. Ayrıca zein nano boncukları veya nanopartikülleri plastik veya biyoaktif gıda ambalajlarının dayanıklılığını geliştirmek için olduğu gibi flavor bileşenleri, aromatik bileşenler, uçucu yağlar veya nutrasötiklerin kapsülasyonu için yenilebilir kabuk olarak da kullanılabilir. Nano boyuttaki zein filmlerinin uniformitesini ve oluşumunu kontrol etmek mekaniksel ve gerilme özellikleri konularında kritik öneme sahiptir [76]. Biyobozunur özellikteki zein gıda ve eczacılık uygulamalarında biyoaktif bileşikleri kapsayan kendiliğinden bir araya getirilmiş nanopartiküller oluşturma kabiliyeti nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır [68].

2.5. Kazein

Sığır sütünün miktarı ve bileşen oranları hayvanın cinsi, ırkı, beslenmesi, laktasyon süreci, mevsim değişikliği, hayvanın bakımı, yaşı, hareketliliği, yavrulaması gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte genelleme yapılacak olursa kabaca yaklaşık %3.0-3.5 protein içeriğine sahip olup süt kuru maddesinin yaklaşık %25'i proteindir [143,144]. Süt proteinlerinin temel fonksiyonu genç bireyin bedensel gelişimi için gerekli temel amino asitlerin sağlanmasıdır. Ayrıca süt immüno globülinler, vitaminler, metal bağlayıcı proteinler ve hormonları sağlayan çeşitli proteinleri de aktif proteinler vasıtasıyla biyolojik olarak sağlamaktır [143]. Süt proteinleri besinsel değeri yüksek, duyuşal özellikler bakımından iyi,

doğal, bulunması kolay ve yaygın, ucuz, GRAS, toksik olmayan, biyouyumlu, biyobozunurdur ve çok sayıda yapısal ve işlevsel özelliklere sahiptir. Süt proteinleri benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle birçok işlenmiş gıdada yer alan önemli işlevsel bileşenlerdir [145].

Süt proteinleri çok karmaşık yapıda yaklaşık 30 fraksiyondan oluşmuştur. Süt proteinleri moleküler ve fizikokimyasal özellikleri birbirlerinden farklı olan kazeinler ve serum proteinleri olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır. Yağsız süttten kazeinler herhangi bir yolla uzaklaştırıldığında geriye kalan kısma süt serumu denir. Proteinlerin elektrik yükleri, protein parçacıklarının bulunduğu sulu ortamdaki pH değerine bağlı olarak değişir. Süt proteinleri hem anyon hem katyon içerdikleri için amfoter karakter gösterirler. Asit çözeltilerde pozitif, alkali çözeltilerde negatif yüke sahip olurlar. Kazein yaklaşık pH 6.6 olan süt pH'sında negatif yüklüdür [146]. Belirli bir pH değerinde pozitif yük ile negatif yük eşit değerlerde olur. Bu pH değerinde protein parçacıkları elektriksel alanda göç etmezler, yani hareket etmezler. Anyon ve katyonların eşit olduğu pH değeri izoelektrik nokta (pI) olarak tanımlanır. Kazeinler pI'da çözünmezler, pI'nın altında veya üstünde çözünürler [144]. Süt proteinleri büyük oranda kazein misellerinden meydana gelmiştir. Sığır sütü proteinlerinin yaklaşık %80'ini kazeinler oluşturur ve bu grup 30 °C'de, pH 4.6'da (pI) çökelmektedir. Süt proteinlerinin geriye kalan yaklaşık %20'lik kısmı kazeinlerin çökelti oluşturduğu koşullarda çözünür olduğundan peynir altı suyu proteinleri, serum proteinleri ve kazein olmayan azot olarak adlandırılan proteinler oluşturmaktadır. Sığır sütünde iz miktarda glikoprotein fraksiyonları da bulunmaktadır [143]. Miseller düzensiz olarak paketlenir, dinamiktir ve sıcaklık değişimine tepki verirler [79]. Süt proteinlerinin %95.2'lik kısmı yaklaşık olarak %80 kazein, %12 albumin, %2 globulin, %2.4 proteoz-pepton olarak da ayrılabilir. Süt proteinleri içerisindeki %80 kazein içermektedir. Kazein türlerine göre ayıracak olursak süt %42 α -kazein fraksiyonlarından, %25 β -kazeinlerden, %9 κ -kazeinlerden, %4 γ -kazeinlerden oluşmaktadır. Serum proteinleri; α -laktoalbumin, β -laktoglobulin, immunoglobulinlerden oluşmaktadır. Sütün 90 °C'ye ısıtılması ile serum proteinleri ve asitliğin pH 4.6'ya düşürülmesi sonucu kazein çöker; proteoz-pepton, çökelekler ayrıldıktan sonra serum içerisinde kalan azotlu maddelerdir. Isıya karşı stabildirler ancak %12'lik TCA'da (triklor asetik asitte) çökelti oluştururlar [144].

Proteinlerin çözünürlüğü üzerine; çözücü ortamın pH'sı, iyonik kuvvetler, sıcaklık, organik çözücü varlığı en etkili faktörlerdir. Organik bir çözücü olan alkol ve aseton, proteinlerin çözünürlüğünü olumsuz yönde etkilemektedir. Sulu çözeltinin elektrik yükünü azaltarak, hidrasyonun azalmasına ve proteinlerin sekonder ve tersiyer yapısında geriye dönüşümü olmayan değişikliklere neden olarak çökmesine neden olmaktadır [144].

Kazein misellerinin varlığı ilk olarak 19. yüzyılda kabul edilmiş olup 1960'ların ortalarında kazein misellerinin iç ve dış yapıları tanımlanırken; proseslerde asitlenme, pıhtılaşma ve bunların yapılar üzerindeki etkilerinin (pıhtının su bağlama yeteneği gibi) ortaya

çıkması ile işlevselliği daha iyi anlaşılabilir konuma gelmiş ve artan bir ilginin oluşmasını sağlamıştır [147].

2.5.1. Kazeinin özellikleri

Gıdalarda tek başına ve/veya farklı kabuk materyalleri ile belirli oranlarda kombine edilerek kullanılabilen yenilebilir süt proteini bazlı film ve kaplamalar yenilebilir film ve kaplamalardan beklenen birçok fonksiyonel özelliği karşılamaktadır [77]. Kazein tüketici tarafından kabul gören bir tadı ile çalışmalarda kullanılmak için uygun bir adaydır. Kazein film gıdayı çevre şartlarına karşı korumada; beslenme kalitesi, kabul edilebilir duyu özellikleri ve yüksek gıda uygulamalarına olanak sağlayabilme yeteneği nedeniyle tercih edilir. Süt proteini filmleri iyi mekanik özellikleri ve mükemmel lipid, oksijen ve aroma bariyeri olarak işlev görürken hidrofilik doğaları nedeniyle nem bariyeri özelliklerine sahip değildir [6]. Proteinler yağ-su arayüzüne adsorbe ederek veya biyoaktif bir madde bağlayarak, tutarak veya kaplayarak kapsüllenmiş biyoaktif maddeleri korumak için gerekli olan bir kalkan oluştururlar [148]. Yağlı su emülsiyonlarında kazeinin lipid oksidasyonunu önlemede son derece etkili olduğu kanıtlanmıştır [149]. Proteinler, oksidasyona ya da bozulmaya neden olan diğer bileşiklerin kapsül içine penetrasyonuna karşı bir bariyer oluşturabilirler; bu durumda bazı süt proteinlerinin antioksidan ve metal bağlama özellikleri kapsülasyonda son derece faydalı olabilir. Kazein demiri bağlar ve bu da kazeine antioksidan özellik kazandırır [148]. Kazein, geçiş metallerini bağlayabilen fosforil artıkları içermektedir. Kazeinin antioksidan özellikleri, serbest radikalleri temizleme ve kazein üzerinde bulunan fosforile serin artıklarının metal katyonlarla kompleksler oluşturduğu bilinmektedir ve prooksidan geçiş metallerini kenetleme kabiliyetine atfedilmektedir [149]. Çeşitli ajanlarla etkinleştirilen süt proteinleri işlenmiş bazı gıdalarda hidroperoksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu önlemek amacıyla bir antioksidan gibi kullanılmaktadır [77]. Kazeinler, 200-300 nm civarındaki güçlü UV absorpsiyon özelliklerini kullanarak radyasyona, özellikle de UV ışığına karşı bir koruma görevi üstlenirler. Süt proteinleri mide içindeki zorlu asit ortamına karşı probiyotik mikroorganizmalar için iyi bir koruma sağlayan mükemmel tamponlama kapasitesine sahiptir [148]. Sodyum kazeinatın kapsülasyon işleminde kabuk materyali olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur [62].

Süt proteinlerinden oluşan yapı ya da matriks, tek başına veya diğer bileşenlerle birlikte bir taraftan çekirdek materyaldeki biyoaktif maddelerin difüzyonuna ve kaçışına karşı bir bariyer oluşturabilirken diğer taraftan sindirim enzimlerinin kabuğu geçip çekirdek materyale doğru erişime karşı bir bariyer oluşturabilir [148]. Ayrıca, kazeinlerin, gıda ürününün besin özelliklerini etkilemeden gıda endüstrisinde uygun bir uygulama sağlayan midede kolaylıkla sindirilebildiği ve böylece sindirim aşaması sırasında tutulan bileşiğin daha sonra serbest kalmasını sağladığı kanıtlanmıştır [38].

Süt proteinleri, gıda bileşenlerinin mikrokapsülasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Allerjenik potansiyellerine rağmen diğer kapsül matrisi bileşenleri ile kolaylıkla değiştirilemeyen benzersiz özelliklere sahiptirler. Sodyum kazeinat yenilikçi kapsülasyon formülasyonlarının ayrılmaz bir parçasıdır [40].

Nanoteknolojinin temelleri arasında moleküler kendiliğinden birleştirme ve ortak montaj bulunmaktadır. Bazı önemli süt proteinleri doğal kendi kendine toplayıcılar ve birlikte birleştiricilerdir [148]. β -kazeinin mükemmel kendiliğinden oluşum özellikleri nedeniyle nano yapılar spesifik ilaçların verilmesi, hidrofobik kemoterapötik ilaçların çözünme özelliklerini geliştirmek ve oral yoldan alınımını kolaylaştırmak için nano tıpta kullanılır [38]. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda hidrofobik nutrasötiklerin nanokapsülasyonu için bu birlikte-oluşum işlemini kullanmasına yer verilmiştir [148]. Kazeinler, nanokapsülasyon amaçları için uygun olan, güçlü bir ilişkilendirme eğilimine sahiptir [38].

Süt proteinleri biyoaktif maddeler için doğal araçlar olup yapısal ve fizikokimyasal özellikleri doğal veya istihdam kullanımlarını kolaylaştırmaktadır. Bu özellikler; çoğunlukla hidrofobikler olmak üzere iyonları ve küçük molekülleri bağlama yetenekleri, mükemmel yüzey özellikleri ve kendi kendine montaj özellikleri, çeşitli çapraz bağlanma mekanizmaları yoluyla mükemmel jelleşme yetenekleri, kapsülleme ve kontrollü salım kabiliyetleri, pH-yanıtlı jel şişme ve kasılma davranışı, diğer makromoleküllerle olan kontrol edilebilir etkileşimleri, bileşenlerin sinerjik kombinasyonları ile kompleksler ve konjugeler oluşturma özellikleri, hassas ürünlerin paketler halinde korunması için çeşitli muhafazaları, biyolojik uyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği, yük arızasının biyolojik olarak erişilebilirliğini kontrol etmek ve biyoyararlanımını artırmak için araç arıza modelinin akılcı tasarımını mümkün kılmaktadır [148]. Kazeinle kapsüle edilen β -karoten çeşitli etkileşimlerin bir sonucunda ısıya, UV ışınlarına, çevre ve sindirim koşullarına, vb. karşı korunarak biyoyararlılığı arttırdığı bildirilmektedir [38].

Yenilebilir film uygulaması olarak meyve üzerinde kazein emülsiyon protein filmi incelenmiştir. Ekmek sarma için sodyum kazeinat filmleri kullanılmıştır [33].

Kazeinler eczacılıkta ilaçların kapsüllemesi ve dağıtımında da kullanılmaktadır. Eczacılık, nütrasötik, farmasötik, kozmetik, gıda alanlarında kazein esaslı kapsülleme ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

2.6. Mikrokapsülasyon Teknolojisinde Zein ve Kazein Kullanımı

Ürün özelliklerini geliştirmek adına iki veya daha fazla polimer tarafından oluşturulan mikro/nanokomplekslerin hazırlanması, karakterizasyonu ve uygulanmasını araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda farklı koşullarda farklı polimerlerin sinerjistik ve antagonistik özellik gösterip göstermediğine, kapsül yapısına; kapsülasyon etkinliği ve kontrollü salımı, boyutu, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere katkısı, prooksidan yapısı gibi

özelliklerine bakılmıştır. Yapılan bu çalışmada kazein ilavesinin zein mikrokapsüllerinin yapısal ve işlevsel özelliklerine etkileri inceleneceğinden zeinin kazein ve kazeinatlarla birlikte kullanıldığı çalışmalar üzerinde literatür incelemesi bir ön gerekliliktir.

Yenilebilir film ve kaplamalar her sınıfın farklı işlevsel özelliklerinden yararlanmak adına polisakkarit, protein ve/veya lipidlerin bir karışımından oluşan heterojen yapılardan oluşturulabilir. İki veya daha fazla sayıdaki aynı grup veya farklı gruplardaki malzemelerin özelliklerinden optimum düzeyde yararlanıp bir araya toplamak ya da ortaya yeni bir özellik çıkarmak amacıyla seçilen malzemelerin makro seviyede birleştirilmesiyle oluşan malzemelere kompozit malzeme denir. Kompozit filmlerin üretilmesinin temel amacı belirli bir işleve ihtiyaç duyulduğunda kaplamanın özelliklerini geliştirmektir. Kabuk materyali çok bileşenli kaplama ve filmler ya karışmayan bileşimlerin bir emülsiyonu, süspansiyonu veya dağılımı formunda ya ardışık tabakalarda (çok tabakalı kaplama ya da filmler) ya da ortak bir çözücü içinde bir çözelti formunda uygulanabilmektedirler [73]. Protein kaynaklı filmlerin mekaniksel ve bariyer özellikleri polisakkarit kaynaklı filmlerden genelde daha iyidir. Süt proteini bazlı filmler, gıdalarda tek başına kullanılacakları gibi diğer kabuk materyalleri ile belirli oranlarda kombine edilerek de kullanılabilirler [77].

Uçucu yağların liyofilizasyon esnasında düşük basınç altında kısmen buharlaşması, bu nedenle gerçek kapsülleme etkinliğinin elde edilen deneysel verilerden biraz daha yüksek olması beklenir. Uçuculuğun kapsüllemeye etkisiyle ilgili benzer çalışmalar kabuk materyal zein olan uçucu olan esansiyel yağların kapsülasyon etkinliğinin balık yağı gibi sabit yağlar ile yapılan kapsülmeden düşük olduğu görülmüştür [137].

Zein nispeten hidrofobik ve termoplastik bir malzemedir. Teknik olarak, zein gibi alkolde çözünür bir proteinden yapılmış filmler, diğer proteinlere kıyasla nispeten yüksek bariyer özelliklerine sahiptir ve diğer yenilebilir filmlere kıyasla nispeten iyi su buharı bariyerleridir. Kazeinat filmler rastgele bobin doğası nedeniyle ısı işlem yapılmaksızın sulu solüsyonlardan yapılırlar. Kazeinat filmler şeffaf ve esnektir ancak su bariyeri özellikleri zayıftır. Karşılaştırılabilir test koşullarında kazeinat filmlerin, buğday gluteni filmlerine ve soya protein filmlerine benzer nem bariyerlerine sahip oldukları ancak mısır zein filmlerine göre daha düşük nem bariyerlerine sahip olduğu görülmektedir [33]. Zeine eklenecek kazeinin viskoelastik yapıyı daha kararlı hale getirdiği bilinmektedir. Çeşitli çalışmalar ile zeinin kazeinin yerine kullanılacağı görülmüştür. İki hammadde için çözücüde dağılıbilirlik, işlevsellik, istenilen özelliği karşılama kabiliyeti, maliyet, aynı işlevi yerine getirmek için gerekli miktar gibi parametrelere de bakılıp karşılaştırmalar yapılmıştır [135].

Son zamanlarda geniş bir yelpazedeki iyonik kuvvete karşı iyi dengeyi koruyan ve kuruttuktan sonra iyi bir yeniden dağılıbilirliği koruyan sodyum kazeinat stabilize edilmiş zein koloidal nanopartikülleri Patel ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır. Zein-kazeinat esaslı

nanoparçacıklar, yeniden dispersitenin, biyolojik ve antimikrobiyal aktivitelerin artırılması amacıyla timolü kapsüllemeye kullanılmıştır [45].

İzoelektrik noktasından dolayı nötr pH'a yakın olan kolloidal zein partikülleri hem ürün koşullarında hem de bağırsaktaki fizyolojik pH'da fiziksel stabiliteyi kaybederek agregasyona uğrarlar. Kolloidal zein partikülleri için yeniden dağılıbilir tozların hazırlanması için liyofilizasyon sırasında agregasyona karşı koruma sağlamak da önemli bir zorluktur. Bu yığılmaların önlenip sterik stabilizasyon sağlanması için genel yol sürfaktan kullanımıdır ancak genellikle istenmeyen tada sebep olmaları ve sitotoksikite sorunlarının kullanımını sınırlandırması nedeniyle oral yolla kullanımı tercih edilmez. Bu nedenle doğal biyopolimerler kullanılarak kolloidal parçacıkların stabilizasyonu, kabul edilebilir tat, biyoyumluluk ve biyobozunabilirliği nedeniyle artan bir ilgi görmüştür. Zein kolloidal partikülleri stabilize etmek için tamamen doğal bir oral uygulama sisteminin geliştirilmesi için sodyum kazeinat kullanımı üzerinde çalışılmış, pH ve iyonik kuvvetin bir fonksiyonu olarak kararlılıkları, kurutulduktan sonra yeniden dağılıbilirlik ve enzim hidrolizi incelenmiştir. Antisolvent sulu fazda sodyum kazeinatın eklenmesi son partikül büyüklüğüne herhangi bir etki göstermemiş fakat yüzey yükünün pozitifden negatife kaymasına neden olmuştur. Zein partiküllerinin sodyum kazeinatın sulu solüsyonunda çökmesi prensipte iki işlemin bir yarışması olabilir. Sodyum kazeinat amfifilik ve yüklü yapısı nedeniyle dağınık fazın yüzeyinde yerleşme ve adsorbe etme eğiliminde olup agregasyona karşı elektrostatik ve sterik bir itme sağlar. Mevcut durumda, çökme işlemi sırasında zein ve kazein arasında karşı zıt yükler nedeniyle güçlü elektrostatik çekim vardır. Bununla birlikte çökme işlemi sırasında kullanılan sodyum kazeinatın konsantrasyonu sterik etkilere bağlı olarak kolloidal stabilizasyonu da etkilemiştir [150]. Zeinin pI'sı pH 6.2 ve kazeinat pI'sı pH 4.6'dır [41]. Zein ve kazeinat stabilize kolloidal dispersiyonun pI'sı zein ve kazeinin kendi pI'larından farklılık göstermiştir. Kurutulduktan sonra düz zein kolloidal parçacıklar güçlü agregasyon nedeniyle hiçbir şekilde yeniden dağılmazken zein-kazeinat kolloidal parçacıkları konsantrasyon oranlarına bağlı olarak farklı yeniden dağılıbilirlik (redispersion) özellikleri göstermiştir. Genel olarak protein hidroliz çalışmalarından; sodyum kazeinat ile stabilizasyonun daha yüksek oranda polar olmayan amino asitlere bağlı olarak düşük sindirilebilirliğe sahip olan zeinin sindirim özelliklerini değiştirmede bulunduğu bulunmuştur [134, 150]. Sonuç olarak nötr pH değerinde stabil olan zein kolloidal partiküller, ilk kez elektrolitik stabilizatör olarak sodyum kazeinat kullanılarak başarıyla hazırlanmıştır. Ayrıca, kazeinatın ilave edilmesinin ortam sıcaklığında dispersiyonun fiziksel stabilitesini arttırdığı görülmüştür. Stabilizasyon sadece proteinlerin partiküller üzerindeki adsorpsiyonundan kaynaklandığından ve kullanılan antisolvent su olduğundan bu işlemin potansiyel olarak ölçeklendirilmesi kolaydır. Bu tür koloidal parçacıklar; gıdada (nutrasötikler), farmasötikte (ilaç) ve tarımsal formülasyonlarda, biyoaktif moleküllerin kapsüllemesi/yerleştirilmesi için tamamen doğal bir biyopolimer bazlı kolloidal uygulama

sistemi olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu çalışmalarımızda biyoaktif bileşiklerin verilmesi için bu stabilize kolloidal partiküllerin uygulanabilirliği başarılı bir şekilde araştırılmıştır [150].

Zein-kazeinat ve zein kontrol nano parçacıklarının partikül büyüklüğü, poli dispersite indeksi (PDI), sayım hızlarını ve zeta (ζ) potansiyeli deneysel olarak hesaplanıp karşılaştırılmıştır. Polimerik ilaç dağıtım araçları için partikül boyutu etkin ilaç verme kapasitesini gösteren önemli bir özellik olarak değerlendirilmektedir. Partikül boyutu tüm formülasyonlar için 130 ila 170 nm arasında ölçülürken formülasyondaki kazeinat miktarı ile partikül boyutunda daha küçük değerler gözlemlenmiştir. Kazeinat içermeyen zein kontrol nano parçacıkları 166.9 nm'lik en büyük parçacık boyutu ölçülürken kazeinat içeren nanoparçacıklar için partikül boyutu 131.0 nm'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Bu gözlem kazeinatın zein proteini ile etkileşime girdiği ve zein nano parçacıklarının oluşumunu kolaylaştırdığını, kısmen kazeinatın yüksek yüzey yükünün sağladığı güçlü itici kuvvetlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Bir amfifilik stabilizatör olarak kazeinat, güçlü hidrofobik etkileşimler nedeniyle zein nanopartiküllerinin yüzeyine adsorbe etmiştir. Ayrıca kazeinat, zein nano parçacıklarının agregasyona karşı elektro sterik stabilizasyonunu sağlayan negatif yüklü grupların büyük bir bölümünü de taşır. Kazeinat-zein nanopartiküller yüzeyine adsorbe edilen kazeinat güçlü bir negatif yüzey yükü sağlamış ve bu da zein nanopartiküllerin alımını arttırmıştır. Kazeinatın zein nano parçacıklarının hücre alımını geliştirdiği doğrulanmıştır. Farklı zein/kazeinat kütle oranlarında kazeinat ile stabilize edilmiş zein nanopartikülleri hazırlanmıştır. Zein nanopartiküllerindeki kazeinat içeriği hücre alımını konsantrasyon ve zamana bağlı bir biçimde desteklemiştir [45].

Zein, izoelektrik bir pH'a sahiptir ve dolayısıyla partiküllerin nötr-bazik pH'de toplanma eğilimi mevcuttur. Bu yığılmayı önlemek için kolloidal parçacıklar çökeltme işlemi sırasında polimerik stabilizatörler kullanılarak hazırlanmıştır. Polimer (PVP) ve protein (sodyum kazeinat), stabilizatörler olarak denenmiş ve sodyum kazeinatın %2 (w/v)'de etkili bir stabilizatör olarak hareket ettiği bulunmuştur, bu da oluşan zein kolloidal partiküllerin nötr ve alkali pH'ta birikmesini önlemiştir. Kazeinat stabilize partiküller için ζ -potansiyeli pH 6.5'te 30.2 mV olarak bulunmuştur. Stabilite değerlendirmesi ve muko-yapışma çalışmaları kazeinat stabilize zein-kurkumin kompozit partikülleri kullanılarak yapılmıştır [151].

Yapılan bir çalışmada zein ve sodyum kazeinat, nanopartiküller oluşturmak için anti-solvent çökeltmesinden önce pH 8.0'a ayarlanmış, sıcak %50'lik sulu etanolde birlikte çözülmüştür. Nanopartiküllerin kazein ve zein içerdiği, püskürterek kurutulmuş tozun depolama sırasında iyi bir stabiliteye sahip olup suda kolayca yeniden dağıtıldığı gözlemlenmiştir [152]. Zein nanopartikülleri literatürde de yer aldığı gibi anti-solvent çökeltme işleminden sonra kazeinlerle kompleksler oluşturmuş ve püskürtmeli kurutmada, sprey kurutma çözeltisinden farklı olarak iyi dağıtılmışlardır. Çalışmada dispersiyonlardaki serbest kazeinler sodyum

kazeinatın mükemmel ara yüzey aktivitesi nedeniyle püskürtülerek kurutulmuş, parçacıkların yüzey düzgünlüğüne ilave olarak kısmen katkıda bulunmuş olabileceği vurgulanmıştır [153, 154]. Zein ve kazeinatın birlikte kullanıldığı bu çalışmada kapsülleme verimliliği daha önce yapılan zein ile birlikte çözünmüş timol ve nisin içeren sulu etanol çözeltileri doğrudan püskürtülerek kurutulmuş örneklerden çok daha yüksek ve yağ içeriği değişim yüzdesi çok daha düşük bulunmuştur. Bu, sıvı-sıvı dispersiyonu ile zein nanoparçacık/kazein komplekslerinde öjenol ve timolün kapsüllemesi ile difüzyon direncinin arttığı ve dolayısıyla sprey kurutma sırasında buharlaşmaların azaldığını göstermektedir [42].

Bir başka çalışmada deiyonize suda elektroliz önleyici bir elektrolitik stabilizatör olarak sodyum kazeinat eklendiğinde, zein partikülleri bir sodyum kazeinat katmanı ile başarıyla kaplanmıştır. Antisolvente sulu safhada sodyum kazeinat eklenmesi, nihai parçacık boyutu üzerinde herhangi bir önemli etki göstermezken; yüzey yükünün pozitiften negatife kaymasına neden olmuş ve elde edilen parçacık dondurularak kurutulduktan sonra deiyonize suda yeniden dağılılabirlik özelliğini korumuştur. Filmin kurutma işlemi sırasında etanol içeriği azalmış ve serbest sodyum kazeinat partikül yüzeyi üzerine absorbe edilmiştir. Etanol buharlaşmasına maruz kalan yüzeye veya zein parçacıklarının çekirdeğine doğru sodyum kazeinat migrasyonu eşlik etmiştir. Zein nanoparçacıklarının etrafındaki sodyum kazeinat kabuk tabakası, dökme filmlerine deiyonize suda dağılılabirlik kazandırmıştır [155].

Yapılan bir başka çalışmada zein-kazeinat-pektin kompleks nanopartikülleri; yüksek kapsülleme verimliliği, yavaş salımı, kuruduktan sonra olağanüstü yeniden dağılılabirlik, artırılmış antioksidan aktivite gibi kurkumin için potansiyel bir oral uygulama sistemi olarak önerilmiştir [41, 156]. Zein-kazeinat kompleks nanopartiküller geçmiş yıllarda lipofilik bileşikler için dağıtım sistemleri olarak birçok araştırmacı grup tarafından geniş çapta incelenmiştir. Bununla birlikte tek başına proteinlerden hazırlanan biyopolimer kompleksi nanopartiküllerin; düşük pH, yüksek sıcaklık ve uzun süreli depolama gibi sert koşullar altında protein moleküllerinin agregasyonu nedeniyle genellikle zayıf bir koloidal stabiliteye sahip olduğu belirtilmektedir [156].

Son zamanlarda sodyum kazeinat, zein nanopartiküllerinin stabilizasyonunu sağlamak ve kurutulduktan sonra yeniden dağılılabirliklerini geliştirmek için etkili bir doğal emülgatör olarak önerilmektedir [152]. Zein/kazeinat kompleks nanopartiküller uçucu yağlar, yağda çözünen vitaminler ve fitokimyasallar dahil olmak üzere farklı uygulamalar için çeşitli lipofilik bileşiklerin kapsüllemesi için değerlendirilmiştir [41-44].

pI 6.2 olan zein asidik koşullarda ısıtıldığı takdirde, stabilizatör olarak pektinin varlığında bile şiddetli bir şekilde çökelmesi görülmüştür. Bu nedenle pektin dışında, sodyum kazeinat (NaCas) formülasyona dahil edildiğinde stabiliteyi geliştirme ve zein nano parçacıklarının çeşitli sert koşullar altında fonksiyonelliklerini geliştirme kabiliyeti açısından iyileştirdiği rapor edilmektedir [41, 45, 157]. Zein konsantrasyonunun ve ısı işlem sonucunda

meydana gelen zein/kazeinat/pektin (Z/Cas/P) kompleks nanopartiküllerin temel karakterizasyonu üzerindeki etkilerin araştırıldığı bir çalışmada zeinin iç çekirdeği olduğu, ardından NaCas ve daha sonra pektin olan bir katman-tabaka yapısı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. NaCas'ın amfifilik doğasına bağlı olarak hidrofobik zein çekirdeği ve sulu faz arasındaki arayüzde kalması olası olduğu, hidrofilik karbonhidrat, pektin, suya göre daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu için, en üst tabakada kalma olasılığının daha yüksek olduğu belirtilmiştir [41].

Zein/NaCas kompleks nanopartikülleri daha önce ilaçlar ve besin maddeleri için potansiyel bir oral kabuk materyal olarak önerilmiş olsa da [157, 158] bunların verim etkinliği, gastro intestinal yolundan geçerken nano ölçekli yapıları koruma yeteneklerinden büyük oranda etkilenmektedir. Zein ve NaCas, biyoaktiflerin bağlandığı ince bağırsağa ulaşmadan önce nanopartikül yapının ayrışmasına yol açan, mide içinde enzimatik parçalanma ve sindirime karşı oldukça hassas, biyoaktifleri bağlayıp kapsüllemek için önemli roller oynayan protein molekülleridir. Bu teslimat araçları olarak zein nanopartiküller için stratejik bir gelişme olmasına rağmen, gastro intestinal koşullar altında NaCas-zein nanopartiküllerin stabilitesi hala oral dağıtım araçları olarak gelecekteki uygulamaları için büyük bir engel oluşturmaktadır [41].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Uçucu yağ elde etmek için gerekli olan kurutulmuş nane (*Mentha spicata*) bitkisi yerel bir aktardan ve tek parti üründen temin edilmiştir. Nane bitkisi kullanılıncaya kadar ağzı hava ile teması önleyecek şekilde kapalı olarak, karanlıkta ve +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Şekil 3.1’de kurutulmuş nane bitkisi görseli görülmektedir.



Şekil 3.1. Kurutulmuş nane bitkisi

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal olarak zein, kazein, etanol ($C_2H_5OH/EtOH$), saf su, silikonlu yağ, etil asetat ($CH_3COOCH_2CH_3/EtOAc$), karvon standardı, metanol (CH_3OH), hidrojen klorür (HCl), Phosphate Buffered Saline (PBS) tablet, 2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH), Trolox ((\pm)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkrom-2-karboksilik asit), Nutrient Agar (NA), Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) , Brain Heart Infusion (BHI), Sabouraud Dekstroz Broth (SDB), Mueller Hinton Broth (MHB), p-iodotetrazoliumviolet (INT) indikatörü, ampisillin ve gentamisin antibiyotikleri (standart antimikrobiyal madde) kullanılmıştır.

Kullanılan zein Acros Organics firmasının, kazein, PBS (fosfat tamponu) tabletleri Pan Biotech GmbH firmasının; etanol Carlo Erba Group firmasının; etil asetat, silikon yağı, Trolox, DPPH ve D-karvon standardı, ampisillin ve gentamisin Sigma Aldrich firmasının ürünleridir.

3.3. Kullanılan Alet Ekipman ve Cihazlar

Clevenger düzeneği (Electro termal balon ısıtıcı, Heto CBN8-30 sirkülatör soğutucu, clevenger aparatı), liyofilizatör (Freeze Dryer, Armfield), Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi (GC (Shimadzu GC-2010)- MS (Shimadzu QP-2010)), çalkalamalı su banyosu (Bandelin Sonorex), çoklu ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (DAIHAN SMSH-6), homojenizatör

(Ika–werke T25), spektrofotometre, gaz kromatografisi alev iyonizasyon dedektörleri (GC-FID; Agilent Technologies 7890A GC System), vorteks karıştırıcı, santrifüj cihazları, otomatik pipet seti, pH metre ve hassas terazi tez çerçevesinde yapılan çalışmalar için laboratuvarında kullanılan alet ve ekipmanlardandır.

3.4. Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada üç Gram (+) bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*), üç Gr (-) bakteri (*Escherichiae coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella spp.*) ve iki maya (*Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae*) kullanılarak nane uçucu yağı ve mikrokapsüllerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi (RSHM), American Type Culture Collection (ATCC), Ankara, Türkiye ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından (ML) temin edilmiştir. Test edilen mikroorganizmalar; Gram (+) bakteriler; *S.aureus* (RSHM 1020/06008), *B.cereus* (RSHM 869), *E.faecalis* (ML), Gram (-) bakteriler; *E.coli* (RSHM 347/01003), *S.spp* (ML), *S.flexneri* (RSHM 184), mayalar; *C.albicans*(ATCC90028) ve *S.cereviciae* (RSHM 08022)'dir. Çalışmalarda kullanılıncaya kadar; bakteriler +4 °C'de Nutrient Agarda (NA), mayalar +4 °C'de Sabouraud Dekstroz Agarda (SDA) muhafaza edilmiştir.

3.5. Yöntem

3.5.1. Nane uçucu yağının elde edilmesi

Çalışmada kullanılacak olan kurutulmuş nane bitkisi +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. 80 g tartılarak alınan nane bitkisi balon jöjeye yerleştirilip 1/7 oranında saf su ilave edilmiştir. Clevenger düzeneğinde su buharı distilasyonu yöntemi ile uçucu yağ elde edilmiştir. Elde edilen nane uçucu yağı çalışmada kullanılıncaya kadar +4 °C' de bekletilmiştir. Nane uçucu yağı Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Nane uçucu yağı

3.5.2. Nane uçucu yağının kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

Nane uçucu yağı bileşen kompozisyonu belirlemede, polar bir kapiler kolon bulunan GC (Shimadzu GC-2010)-MS (Shimadzu QP-2010) sistemi kullanılmıştır. Kompozisyonu belirlenecek nane uçucu yağı 1/10 oranında etil asetat kullanılarak seyreltilmiş, 1 µL otomatik enjektör vasıtasıyla sisteme verilmiş ve en iyi ayrımın gerçekleştiği fırın sıcaklığı koşullarında bileşenlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı 250°C ve uygun bir split oranı kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 1mL/ dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Kütle spektrometresi 70 eV' da 15-210 amu aralığında electron impact (EI)-mode'da çalıştırılmıştır. Ayrımı gerçekleştirilen nane uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanmasında Wiley 7 (7thedition), National Institute of Standards and Technology (NIST) kütüphaneleri, her bir pikin alıkonma zamanları hidrokarbon standardının (C₈- C₂₀) alıkonma zamanları kullanılarak hesaplanmasında referans olarak "Retention Index" (RI) değerleri alınmıştır.

3.5.3. Nane uçucu yağının mikrokapsülasyonu

Nane uçucu yağının zein-kazein kabuk materyalleri ile mikrokapsülasyonu Parris vd. (2005) tarafından uygulanan sıvı-sıvı dispersiyon yöntemi esas alınarak gerçekleştirilmiştir [4]. Mikrokapsül üretimi için zein kabuk materyaline %1, %3, %5, %7, %9, %11, %13 ve %15 oranlarında kazein ilave edilmiş, bu amaçla 10-150 mg (1000 mg zein kuru madde üzerinden %1 (10 mg), %3 (30 mg), %5 (50 mg), %7 (70 mg), %9 (90 mg), %11 (110 mg), %13 (130 mg) ve %15 (150 mg) kazein kullanılmıştır. Böylece zein kabuk materyaline farklı oranlarda kazein ilavesiyle farklı zein-kazein-nane mikrokapsülleri elde edilmiş ve her bir mikrokapsülün etkinlik değeri belirlenmiştir. Karşılaştırmalı analizde kullanılmak üzere %13 kazein içerikli zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin üretimi ile işlemlere devam edilmiştir. Şekil 3.3'de homojenizasyon işlemi ve homojenize edilmiş karışım görselleri gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Homojenizasyon işlemi ve homojenize edilmiş karışım görselleri

Mikrokapsül üretimi için; 250 mg nane uçucu yağı, içerisinde 1.0 g zein, 0.13 g kazein, 15 mL %85 etanol içeren karışımda çözündürülmüştür. Elde edilen solüsyona %0.01 silikon yağı içeren 40 mL silikonlu su ilave edilmiş tek bir faz oluşuncaya kadar 17,500 rpm/dk hızda 2 dk boyunca homojenize edilmiştir.

1000 rpm'de 2 dk'lık santrifüjün ardından, oluşan süpernatant örneklerden uzaklaştırılmıştır. Böylelikle mikrokapsülasyon işlemi esnasında kapsüllenmeyen çekirdek ve kabuk materyaller kapsüllenen yapıdan ayrılmıştır. Örnekler liyofilizasyon işlemi için -18 °C'de 1 gece bekletilerek dondurulmuştur. Dondurucudan alınan örnekler Freeze Dryer'e (liyofilizatöre) yerleştirilmiş, cihazda dondurularak kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Aynı işlemler nane uçucu yağı içermeyen zein-kazein (%13'lük), kazein ilavesi yapılmayan zein-nane ve boş zein mikrokapsüllerinin üretimi için tekrarlanmıştır. Elde edilen toz mikrokapsüller kullanılıncaya kadar hava geçirmez kaplarda +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Tüm işlemlerin sonunda boş zein, boş zein-kazein, zein-nane ve zein-kazein-nane olmak üzere 4 farklı mikrokapsül formunun üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. Mikrokapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

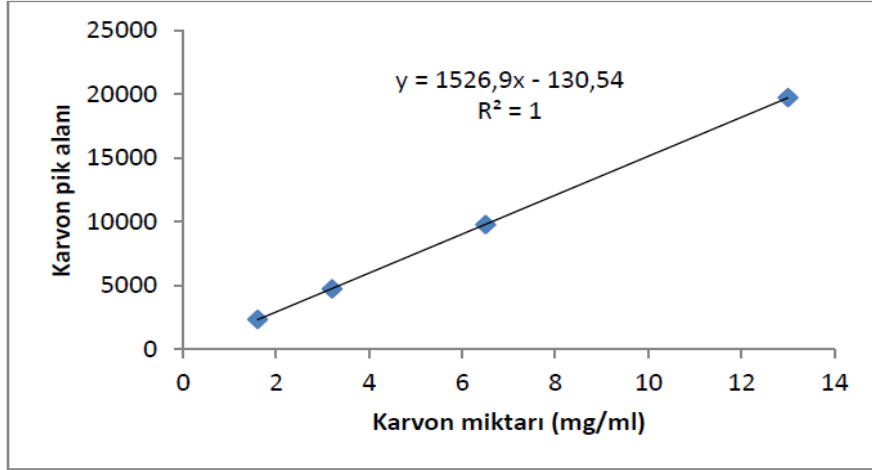
Mikrokapsüllerde hapsedilen ve salınan nane uçucu yağ miktarı gaz kromatografisi (GC-FID) kullanılarak belirlenmiştir. Gaz kromatografisi analizinde Agilent 7890A kapiler kolon (TRB-WAX, TR-140232; 30 m× 0.25 mm i.d, 0.25 µm; Teknokroma, Barselona, İspanya) kolon, oto enjektör (Agilent 7683B), alev iyonizasyon dedektörü (Flame Ionization Detector (FID)) kullanılmış ve splitless modda çalışılmıştır. Enjeksiyon sıcaklığı 200°C, detektör sıcaklığı 270°C, kolon sıcaklığı 260°C olup taşıyıcı gaz He (30mL/dk) olarak belirlenmiştir. Elde edilen zein-nane, zein-kazein-nane, boş zein ve boş zein-kazein mikrokapsül örnekleri santrifüj tüplerine 100'er mg tartılıp üzerlerine 1'er mL etil asetat ilave edilmiştir. Tartım sonrası ağızları kapatılan santrifüj tüpleri vortekste 2 dk karıştırılmış, ardından soğutmalı santrifüjde 20°C'de 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işleminden sonra kapsül içerisinde bulunan nane uçucu yağı süpernatantta geçmiştir. Uçucu yağ içeren süpernatant GC viallerine alınmış ve GC-FID' de analiz edilinceye kadar ağızları (uçucu madde kaybını önlemek amacıyla) parafilmlelenerek -18 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

Belirtilen koşullar kullanılarak GC'de analiz gerçekleştirilerek nane uçucu yağının majör bileşeni karvon olarak tespit edilmiştir. Karvon standartı 50 mg/mL'den 1.6 mg/mL'ye kadar (50-25-12.5-6.25-3.125-1.6) iki kat seri dilüsyonlar halinde hazırlanıp GC-FID cihazında analiz edilmiş, karvona ait bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Şekil 3.4'de karvon standartının farklı konsantrasyonları ile oluşturulan kalibrasyon grafiği gösterilmektedir. Mikrokapsüllerde bulunan majör bileşenin (karvon) pik alanı, kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak mg'a dönüştürülmüştür ($r^2= 1$). Karvonun mg olarak belirlenen miktarı, GC

verilerinden yararlanılarak uçucu yağ olarak ifade edilmiştir. Mikrokapsülasyon etkinliği Formül 3.1. kullanılarak belirlenmiş ve % olarak ifade edilmiştir [15].

$$\% \text{ Kapsülasyon Etkinliği} = \frac{\text{Analiz Sonucu GC-FID'de Belirlenen Esansiyel Yağ mg Değeri}}{\text{Kapsül Yapımında Kullanılan Toplam Esansiyel Yağ mg Miktarı}} \times 100$$

Formül 3.1. Mikrokapsülasyon etkinliği %



Şekil 3.4. Karvon standartının farklı konsantrasyonları ile oluşturulan kalibrasyon grafiği

3.5.5. Mikrokapsül partiküllerin boyut dağılımı ve yüzey morfolojisinin belirlenmesi

Elde edilen mikrokapsüllerin yüzey morfolojilerindeki değişiklik ve partikül boyut dağılımları Quispe-Condori vd. (2011) tarafından uygulanan yöntemle göre Scanning Electron Microscopy (SEM) ile belirlenmiştir [37].

3.5.6. Mikrokapsüllerin zamana bağlı uçucu yağ salımlarının belirlenmesi

Salım hızı testi Luo vd. (2011) uyguladığı yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir [34]. Nane uçucu yağı içeren kapsüllerin en iyi salım hızını belirlemek için; %25 etanol içeren 25 mL PBS (1:4 w/v) tampon çözeltisi üzerine 100 mg mikrokapsül ilave edilmiş ve 37°C'de salım testine bırakılmıştır. Periyodik olarak her saatte bir kez 3 mL örnek alınmış, alınan örnek kadar (3 mL) %25 etanollü PBS tampon çözeltisi mevcut kap içerisine ilave edilmiştir. Alınan örnek üzerine 1 mL etil asetat ilave edilerek karıştırılmış, daha sonra 4000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiş ve kapsüllerden salınan nane uçucu yağ miktarı GC-FID'de analiz edilmiştir. Bu işlem toplam 9 gün boyunca devam etmiştir. Daha önceden majör bileşen olarak belirlenen karvon standardı kullanılarak seri dilüsyonlar hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Mikrokapsüllerde bulunan majör bileşenin (karvon) pik alanı, kalibrasyon eğrisinden elde edilen

denklem kullanılarak mg'a dönüştürülmüştür. Karvonun mg olarak belirlenen miktarı GC verilerinden yararlanılarak % uçucu yağ olarak ifade edilmiştir.

3.5.7. Nane uçucu yağı içeren mikrokapsüllerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi

Antioksidan kapasitelerin belirlenmesinde örneklerin DPPH serbest radikalleri süpürme gücünden faydalanılmış ve Hosseini vd (2013) 'ın önerdiği ve Bondet (1997)'ın uyguladığı spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır [159-161]. DPPH çözeltisi metanol kullanılarak hazırlanmış, standart antioksidan madde olarak Trolox kullanılmıştır. 8 ve 10 mg nane uçucu yağı, çalışılan uçucu yağ miktarı ile aynı miktarlarda uçucu yağ içeren dolu mikrokapsüller ve boş mikrokapsüller deney tüplerine tartılmıştır. Tartım alınan deney tüplerine metanol ile hazırlanan DPPH solüsyonundan 10 mL ilave edilmiş, 60 dakikalık inkübasyon sürelerinin sonunda 517 nm de metanole karşı spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Test tüplerine Trolox standartından 50 µL dağıtılıp 10'ar mL DPPH solüsyonu ilave edilmiş, örnekler vortex yardımı ile 1'er dk karıştırılmış ve ardından karanlıkta 60 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sürelerinin sonunda spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda metanole karşı okumaları gerçekleştirilmiştir [162].

DPPH çözeltisinin hazırlanması: 100 mL'lik mavi kapaklı cam şişeye bir miktar (5-10 mg) DPPH tartılmıştır. Üzerine 100 mL metanol ilave edilip manyetik karıştırıcıda 400 rpm'de 10 dk karıştırılmıştır. Daha sonra kullanılmadan önce DPPH' nin 517 nm dalga boyunda absorbansının 0.700-0.750 değerleri arasına ayarlanması gerekmektedir. Ayarlama işlemi gerçekleştirilirken metanol kullanılmıştır.

3.5.8. Nane uçucu yağı içeren mikrokapsüllerin antimikrobiyal kapasitelerinin belirlenmesi

Serbest nane uçucu yağı ve mikrokapsüllerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde farklı mikroorganizma gruplarından seçilen toplam 8 (üç Gram pozitif bakteri; *S.aureus*, *B.cereus*, *E.faecalis*, üç Gram negatif bakteri; *E.coli*, *S.flexneri*, *Salmonella.spp* ve iki maya; *C.albicans* ve *S.cerevisiae*) mikroorganizmaya karşı Andrews'in (2001) geliştirdiği broth dilüsyon yöntemi uygulanmıştır [163]. Dilüsyon testlerinde, mikroorganizmaların antibiyotikğin seri seyreltilmiş bir dizi agar dilüsyon veya sıvı dilüsyon gözle görülür bir üreme oluşturması test edilir. Tanımlanmış bir süre içinde bir mikroorganizmanın gözle görülebilen üremesini engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC/ MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) olarak tanımlanmaktadır ve mg/L olarak ifade edilir. Sıvı dilüsyon, eş hacimde besi yeri ve antibiyotik çözeltisi içeren kaplara (genellikle artan geometrik konsantrasyonlarda) belli sayıda mikroorganizmanın inoküle edildiği bir tekniktir [164].

Antimikrobiyal denemelerde kullanılması amacıyla daha önce belirtilen şartlarda (bakteriler +4 °C'de Nutrient Agarda (NA), mayalar +4 °C'de Sabouraud Dekstroz Agarda

(SDA)) muhafaza edilen mikroorganizmalardan Bakteriler için Brain Heart Infusion (BHI) broth'a 37 °C'de, mayalar için Sabouraud Dekstroz Broth'da (SDB) 30 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda aktif kültürler elde edilmiştir. Aktif kültürler 10⁸ CFU/mL oranında seyreltilerek antimikrobiyal analizlerde kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktiviteleri belirlenecek bütün materyaller; nane uçucu yağı ve %13'lük zein-kazein-nane, zein-nane, boş zein, %13'lük boş kazein-zein mikrokapsülleri aynı koşullarda test edilmiştir.

Antimikrobiyal kapasitenin belirlenmesi için yapılan analizlerde ampicillin ve gentamisin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) antibiyotikleri referans alınmıştır. Steril MHB bulunduran test tüplerine aktif kültürlerin ekiminin yapıldıktan sonra tüplerdeki referans antibiyotik konsantrasyonu 1000 µg/mL den 125 µg/mL olacak şekilde iki katı seri dilüsyonları (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL) ilave edilmiştir. MHB tüplerin son hacimleri 10 mL'ye tamamlanıp inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sıcaklıkları bakteriler için 37°C, mayalar için 25°C olarak belirlenmiştir.

Referans antibiyotiklerin analizi için izlenen yöntem serbest nane uçucu yağı için de izlenmiştir. Steril MHB test tüplerine nane uçucu yağı 1000 µg/mL den 125 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde iki katı seri dilüsyonları hazırlanıp elde edilen her bir aktif mikroorganizma kültürünün ekimleri yapılmıştır. Tüplerin son hacmi 10 mL olacak şekilde MHB ilavesi yapıp tüpler inkübasyona bırakılmıştır.

Dolu mikrokapsüllerin etkinlik değerlerinden yararlanarak test edilen uçucu yağ konsantrasyonlarında nane uçucu yağ ihtiva eden kapsül miktarları hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlerde mikrokapsüller test tüpleri içerisine tartılıp üzerlerine aktif kültürlerin ekimi yapılmıştır. Tüplere son hacimleri 10 mL olacak miktarlarda steril MHB eklenip tüpler inkübasyona bırakılmıştır. Nane uçucu yağ merkezli mikrokapsüller için izlenen yöntem boş mikro kapsül için de uygulanmıştır. Boş mikro kapsüllerin tartım miktarı dolu kapsüller için hesaplanan miktardan içerdikleri yağ miktarlarının çıkarılması ile elde edilmiştir.

Ekimler sonunda inkübasyona bırakılan tüplerden 24. saat ve 48. saatlerde steril şartlarda steril tüplere örnekler alınmıştır. Alınan örneklere 50 µL indikatör INT (0.2 mg/mL) ilave edilip 37°C'de 30 dk inkübasyon bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda mikroorganizma büyümesinin olmadığı en düşük etken madde konsantrasyonu "Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu" olarak tanımlanan MİK değerleri belirlenmiştir. Şeffaf tüplere indikatör damlatılması sonrası tüplerde; kırmızı renge dönme gözlemlenirse test edilen konsantrasyonun tüpdeki mikroorganizmayı inhibe etmekte yetersiz olduğunu, renk değişimi gözlemlenmezse test edilen konsantrasyonun tüpdeki mikroorganizmayı inhibe ettiğini ifade eder.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında nane (*Mentha spicata*) bitkisine ait uçucu yağ elde edilmiş, elde edilen yağın bileşenlerinin kimyasal kompozisyonu çıkarılmıştır. Kazein ilavesinin zein mikrokapsüllerinin yapısına ve özelliklerine etkisini incelemek amacıyla kabuk materyali olarak zein ve farklı kazein oranlarında zein-kazein kullanılarak çekirdek materyali nane uçucu yağı olan mikrokapsüller sıvı-sıvı dispersiyon/liyofilizasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin etkinlik sonuçları karşılaştırılarak farklı kabuk kombinasyonlarının başarısı kıyaslanmıştır. Mikrokapsülasyon etkinliği en yüksek olan zein-kazein mikrokapsülleri ile zein mikrokapsüllerinin SEM görüntüleri alınarak morfolojileri karşılaştırılmıştır. Mikrokapsüllerin ve serbest haldeki nane uçucu yağının antioksidan ve antimikrobiyal kapasiteleri ile mikrokapsüllerin zamana bağlı uçucu yağ salım profili incelenmiştir.

4.1. Nane Uçucu Yağının Elde Edilmesi

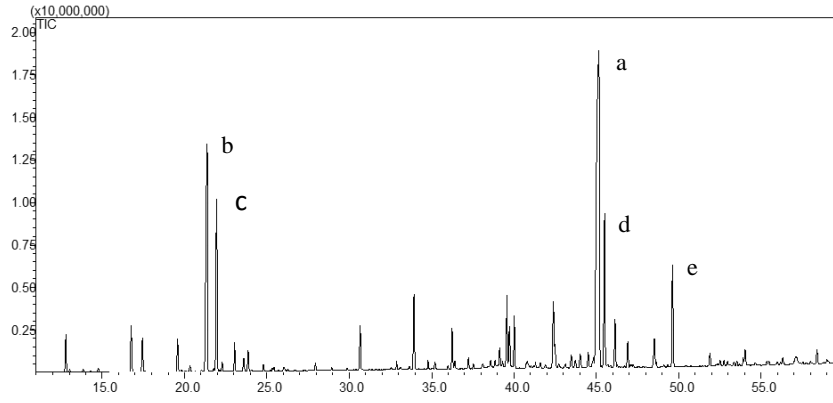
Kurutulmuş naneden uçucu yağ eldesi su buharı distilasyonu yöntemi kullanılarak Clevenger düzeneğinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 80 gram kuru naneden su buharı distilasyonu uygulamalarından sonra yaklaşık 0.8 mg uçucu yağ (%1 oranında) elde edilmiş olup çalışmada kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen nane esansiyel yağı açık sarı renktedir ve hoş bir nane kokusuna sahiptir.

Yapılan bir çalışmada *M. spicata*'dan elde edilen uçucu yağ verimi kuru nane ağırlığına göre % 1.2 bulunmuştur. Ayrıca çeşitli çalışmalarda *M. spicata* türünden elde edilen yağ verimi; % 0.1-1.8 aralığında ve % 0.9 olarak bildirmiştir [9]. Elde edilen nane uçucu yağ değerleri literatürle uyumludur. Bitkinin yetiştirilme, kurutulma ve depolanma koşulları elde edilen uçucu yağın miktarını etkilemektedir.

4.2. Nane Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonunun Belirlenmesi

Nane uçucu yağında bulunan bileşenlerin kimyasal kompozisyonu ve buna bağlı olarak majör bileşeni belirlenirken polar bir kapiler kolona sahip GC-MS cihaz sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 4.1'de görüntüsü verilen nane uçucu yağına ait kromatogramdan yararlanılarak nane uçucu yağının kimyasal kompozisyonu; bileşimi ve bileşenlerin yüzde (%) değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Nane uçucu yağ kompozisyonunu gösteren çizelgede görüldüğü üzere toplam 24 bileşen tespit edilmiş olup belirlenen majör bileşenin %45.53 değerle karvon olduğu görülmektedir. Diğer önemli bileşenler ökapitol (%14.25), limonen (%11.64), karyofilen, (%5.32), cis-sabinenhidrat (%2.74), β -feladren (2.43), β -pinen (%2.43) ve α -pinen (%1.74) olarak belirlenmiştir. Literatürde nane uçucu yağ kompozisyonunun belirlendiği birçok çalışma mevcut olup elde edilen sonuçların pek çoğu bulgularla paralellik göstermektedir.



a. karvona ait pik, b. Ökaptola ait pik, c. Limonen ait pik, d. Karyofilen ait pik, e. cis-sabinenhidrata ait pik

Şekil 4.1. Nane uçucu yağına ait kromatogram görüntüsü

Çizelge 4.1. Nane uçucu yağının kimyasal kompozisyonu

BİLEŞEN ADI	RETENTION INDEX (RI)	% ALANI
2-Metilbutanal	908	0.03
3-Metilbutanal	911	0.03
2-Etilfuran	947	0.10
α -Pinen	1021	1.74
β -Pinen	1096	2.43
β -Miresen	1165	0.85
Limonen	1198	11.64
Ökaptol	1218	14.25
2-Hekzenal, (E)-	1228	0.59
β -Feladren	1233	2.43
β -Osimen	1251	0.47
γ -Terpinen	1260	1.18
α -Terpinolen	1270	0.80
3-Oktanol	1400	1.57
cis-sabinenhidrat	1456	2.74
Kopaen	1491	0.18
Linalol L	1551	0.34
β -elemen	1589	0.82
Karyofilen	1594	5.32
(E)-dihidrokarvon	1607	1.76
Terpineol	1690	1.69
α Terpineol	1695	2.03
Karvon	1740	45.53
Karvofilenoksid	1990	1.09

Yapılan çalışmalarda karvon majör bileşenine sahip nane türünün *Mentha spicata* (kıvrırcık nane) olduğu, ülkemizde ve ılıman iklim şartlarında yaygın olarak yetiştirildiği, uçucu yağ kompozisyonunun bitkinin alt tür, varyete, yetiştirildiği bölge, yükseklik ve iklim koşullarına göre değişiklik gösterdiği görülmektedir [165].

Hussain vd. (2010) yaptığı çalışmada nane bitkisine ait uçucu yağ içeriğini %1.2 olarak tespit etmişlerdir. GC-MS tekniği kullanılarak yapılan analizlerde toplam 19 bileşen belirlenmiş olup ana bileşenler; karvon (%51.7), cis-karveol (%24.3), limonen (%5.3), 1,8 cineole (%4.0), cis-dihidrokarvon (%2.2) olarak belirlenmiştir [9].

Park vd. (2011) üç farklı nane türünün kimyasal bileşimlerindeki net farkı göstermek için hiyerarşik küme analizi ve ana bileşen analizinden yararlanmışlardır. GC-MS ile yapılan kimyasal bileşen analizinde bahçe nanesine (*Mentha spicata*) ait uçucu yağın major bileşeninin karvon (%33.0) olduğu, bunu R-(+)-limonen (%11.7) ve β -felladrenin (%9.7) izlediği tespit edilmiştir [107].

Hindistan'ın Kuzey-Batı Himalaya bölgesinin farklı alt-tropik ve ılıman bölgelerinden toplanan *Mentha spicata* L. türü nanelerden elde edilen uçucu yağlarda en fazla tespit edilen bileşenin karvon (%49.62-%76.65) ve limonen (%9.57-%22.31) olduğu rapor edilmektedir [113].

Toprak (2005) tarafından gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması kapsamında Malatya çevresinden toplanan *Mentha spicata* bitkisinin uçucu bileşenlerinin GC-MS ile analizi sonucunda 33 bileşen saptanmış olup en fazla tespit edilen bileşenin karvon (%48.43) ve 1,8-sineol (%21.27) olduğu rapor edilmiştir [165].

4.3. Nane Uçucu Yağının Mikrokapsülasyonu

Uçucu yağların buldukları ortamla etkileşip fiziksel ve kimyasal değişikliklere uğramalarını engellemek ve biyoaktif özelliklerinden kontrollü yararlanmak için mikrokapsülasyon yöntemlerine başvurulmaktadır. Kullanılacak kaplama materyalleri (kabuk materyaller ve çekirdek materyaller) ve uygulanacak mikrokapsülasyon yöntemi ayrı düşünülemez. Bu nedenle zein kabuklara ilave edilen kazeinin mikrokapsüllerin yapısına ve özelliklerine etkisinin gözlemlenmesi amacıyla sıvı-sıvı dispersiyon/liyofilizasyon yöntemi ile boş zein, zein-nane ve farklı kazein konsantrasyonlarında zein-kazein-nane, zein-kazein mikrokapsülleri elde edilmiştir. Çalışma kapsamında farklı bileşim oranlarında mikrokapsül formülasyonlar hazırlanmıştır. Nane yağının uçucu olmasından kaynaklanan fiziksel kararsızlığı ve aktivite kayıplarının bulunması, sistemik metabolizmasının yüksek olması nedeniyle mikrokapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bu işlemde sıvı-sıvı dispersiyon/liyofilizasyon yöntemi ile zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsülleri elde edilmiştir. Dondurularak kurutma sırasında mikrokapsüllerdeki yüzey yağ da uzaklaştırılmıştır. Chang vd. (2017) zein

son konsantrasyonunun, partikül özelliklerini önemli ölçüde etkileyen önemli bir faktör olduğunu belirtmiştir [41].

Analizler için hazırlanan zein-kazein-nane, zein-nane, zein-kazein ve zein mikrokapsüllerinde görsel olarak bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.2’de elde edilen mikrokapsüller gösterilmiştir. Bununla birlikte dolu kapsüllerde belirgin bir nane kokusu tespit edilirken, boş kapsüllerde zeine ait karakteristik bir koku belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Mikrokapsüller

4.4. Mikrokapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

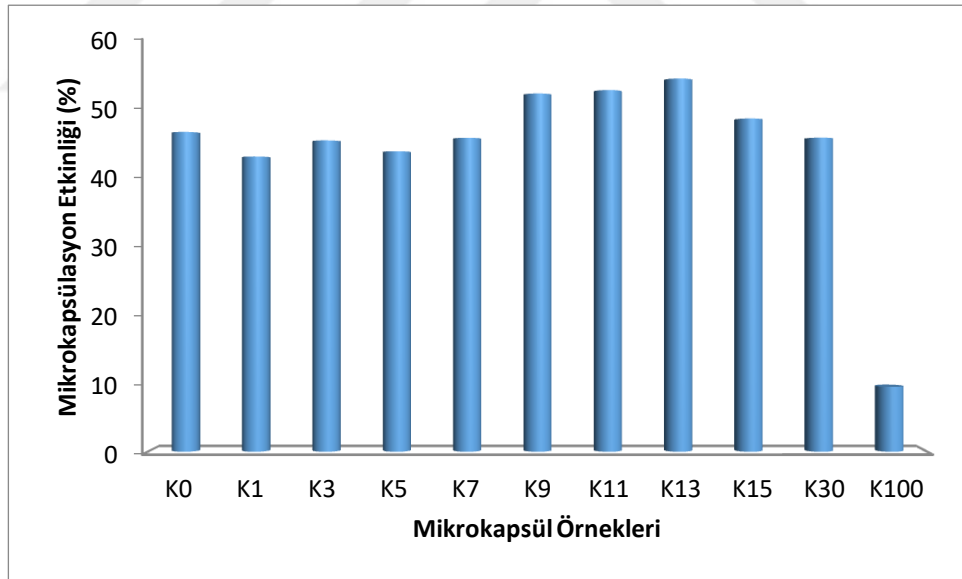
Zein kuru maddesi üzerinden farklı zein-kazein konsantrasyonlarında (%0, %1, %3, %5, %7, %9, %11, %13, %15) ve sabit miktarda (250 mg) nane uçucu yağ sıvı-sıvı dispersiyon/liyofilizasyon yöntemi ile mikrokapsüle edilmiş, mikrokapsüllerin kapsülasyon etkinlik değerleri GC-FID ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre farklı santrifüj koşulları ve zein-nane uçucu yağı formülasyonuna farklı konsantrasyonlarda kazein ilavesinin mikrokapsülasyon etkinliğinde değişikliklere neden olduğu görülmüştür.

Zeine farklı oranlarda kazein ilavesiyle elde edilen mikrokapsüllerin mikrokapsülasyon etkinlik değerleri (%) Çizelge 4.2’de tablo, Şekil 4.3’te grafik formatında verilmiştir. Mikrokapsülasyon etkinliği formülü (Formül 3.1.) kullanılarak hesaplanan değerler sonucunda en yüksek etkinlik değerini 54.66 ± 3.76 oranı ile zeine %13 oranında kazein ilave edilerek hazırlanan mikrokapsüllerin sağladığı görülürken, kazein ilave edilmeden sadece zein kullanımıyla hazırlanan zein-nane mikrokapsüllerinin etkinlik değeri 46.84 ± 0.22 olarak tespit edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda en iyi mikrokapsülasyon etkinlik değerini veren %13’lük zein-kazein-nane ve %13’lük boş zein-kazein boş mikrokapsülleri ile boş zein ve dolu zein-nane mikrokapsüllerinin karşılaştırmalı analizlerde kullanılmak üzere üretimleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.2. Zeine farklı oranlarda kazein ilavesiyle elde edilen mikrokapsüllerin mikrokapsülasyon etkinlik değerleri (%)

Örnek	Mikrokapsüldeki Kazein Oranı (%)	Mikrokapsülasyon Etkinlik Değerleri (%)
K ₀	0	46.84
K ₁	1	43.24
K ₃	3	45.60
K ₅	5	44.01
K ₇	7	45.98
K ₉	9	52.47
K ₁₁	11	52.97
K₁₃	13	54.66
K ₁₅	15	48.81
K ₃₀	30	46
K ₁₀₀	100	9.5

K₀: %0 kazein içeren zein-nane kapsülü, K₁: %1 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₃: %3 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₅: %5 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₇: %7 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₉: %9 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₁: %11 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₃: %13 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₅: %15 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₃₀: %30 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₀₀: %100 kazein içeren kazein-nane kapsülü.



K₀: %0 kazein içeren zein-nane kapsülü, K₁: %1 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₃: %3 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₅: %5 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₇: %7 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₉: %9 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₁: %11 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₃: %13 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₅: %15 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₃₀: %30 kazein içeren zein-kazein-nane kapsülü, K₁₀₀: %100 kazein içeren kazein-nane kapsülü.

Şekil 4.3. Zeine farklı oranlarda kazein ilavesiyle elde edilen mikrokapsüllerin mikrokapsülasyon etkinlik değerleri (%) grafiği

Kapsüle edilerek uçucu bileşenlerin olumlu etkilerinden faydalanmak için Wu vd. 2012'de yaptıkları bir çalışmada farklı pH'larda timol içeren kapsüllerin etkinlik değerleri

grafikte yaklaşık %60-92 aralığında, karvakrol içeren kapsüllerin etkinlik değerleri yaklaşık %60-72 değerleri arasında gösterilmiştir. Kullanılan uçucu yağların %50'den fazlasının zein içinde kapsüllendiği ifade edilmiştir. Uçucu yağların liyofilizasyon sırasında kısmen buharlaşmasının beklendiğini ve bu nedenle gerçek kapsülleme verimliliğinin deneysel verilerden biraz daha yüksek olması beklendiğini belirtmişlerdir [137]. Uçuculuğun kapsülleme üzerindeki etkisini belirlemek için gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, uçucu bitki yağlarının sadece %65-75'inin kapsüllenebildiği halde, uçucu olmayan balık yağının %90'ından fazlasının zein ile kapsüllenebildiği rapor edilmiştir [166].

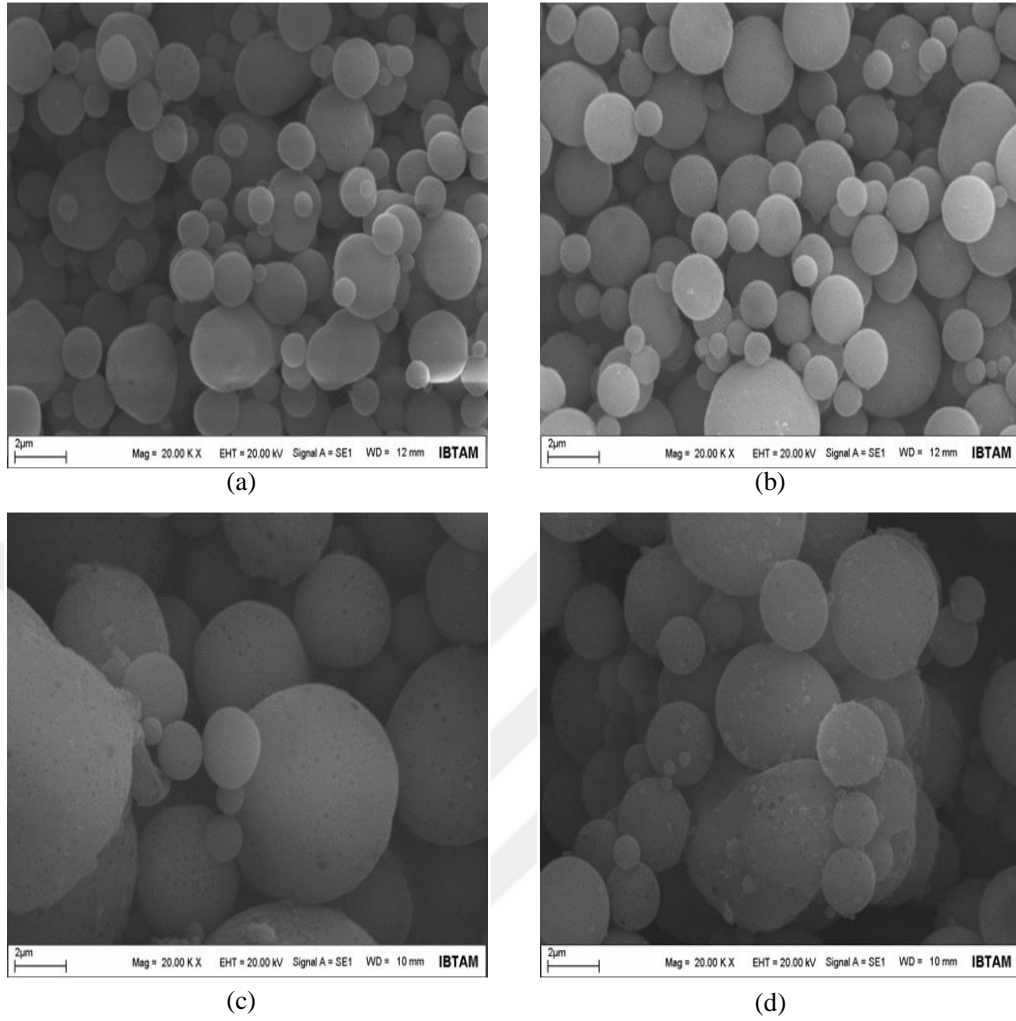
Yapılan bir başka çalışmada karboksimetil kitosan (CMCS) ile kaplanmış zein nanopartiküller, D₃ vitamini (VD₃) kapsüllemiştir. Kapsülleme veriminin CMCS kaplamasından sonra %87.9 oranı ile tek bir kapsülleyici olarak zein kullanıldığında elde edilen %52.2 oranına kıyasla büyük ölçüde geliştirildiği saptanmıştır [68].

Yüksek sıcaklıklar bozulmaya ve polifenolik bileşiklerin kaybına neden olur, bu nedenle dondurarak kurutma işleminin, bitki özlerinden polifenolik maddeler içeren kuru boncukların üretilmesi için daha verimli olduğunu ima eder [17]. Yapılan ön denemelerde homojenizasyon ve santrifüj şartlarının (kuvvetlerinin ve sürelerinin) aynı formülasyonla hazırlanan dolu mikrokapsüllerin kapsülleme etkinliği üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Bilen vd. (2015) yaptıkları çalışmada bu durumun örneklerin kapsülleme verimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu belirtmiştir [167]. Ayrıca liyofilizasyon işlemi sürecinde cihazın çalıştırıldığı değerlerin (basınç, sıcaklık, motor gücü v.b.) mikrokapsülasyon etkinlik değerlerine etki eden birer parametre olduğu düşünülmektedir. Kabuk materyallerin miktarı ve formülasyonda birbirlerine oranı, mikrokapsüle edilen uçucu yağın cinsi ve kimyasal kompozisyonunun mikrokapsülasyon etkinliğine etkisi olduğu ifade edilebilir.

4.5. Zein-Kazein Mikrokapsüllerinin Taramalı Elektron Mikroskopuyla (SEM) Partikül Boyut Dağılımının ve Yüzey Morfolojisinin Belirlenmesi

Mikrokapsüllerin partikül boyutları ve yüzey morfolojileri SEM ile belirlenmiş olup mikrokapsüllere ait SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir.

SEM örneklerin morfolojileri ve partikül büyüklükleri hakkında direkt bilgi vermektedir [137]. Zein solvent evaporasyonu gerçekleştiği sırada küresel partikül halini almaktadır. Hidrofobik protein-protein etkileşimi etanol evaporasyonu ile tetiklenmektedir, etanol evaporasyonu ile çözücü daha hidrofilik karakter kazanmakta ve böylece hidrofobik kendinden şekil alma işlemi gerçekleşmektedir [168].



(a) Boş zein mikrokapsüllerine ait görüntü, (b) Boş zein-kazein mikrokapsüllerine ait görüntü, (c) Zein-nane mikrokapsüllerine ait görüntü, (d) Zein-kazein-nane mikrokapsüllerine ait görüntü

Şekil 4.4. Mikrokapsüllere ait SEM görüntüleri

Nane uçucu yağı merkezli mikrokapsülün partikül boyutun 886 nm ile 2.05 µm arasında ve boş mikrokapsülün partikül boyutu 126 - 642 nm arasında dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Zein mikrokapsülü üretiminde farklı merkez materyallerinin kullanıldığı çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Zhong vd. zein mikrokapsül üretiminde homojenizasyon hızının mikrokapsüllerinin morfolojisi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla SEM kullanmış ve 2 farklı hızda (5000 ve 15000 rpm) ürettikleri zein partikülünün partikül boyutunun homojenizasyon hızı arttıkça küçüldüğünü belirlemişlerdir [166]. Wu vd. timol ve karvakrolun kapsülasyonunu zein kullanarak gerçekleştirmiş ve elde ettikleri kapsüllerin partikül boyutlarının 100-500 nm arasında değiştiğini belirlenmiştir. Paris vd. timol ve sinnamaldehiti çekirdek materyallerini faz ayrımı yöntemini kullanarak kapsüle etmiş ve elde ettikleri partiküllerin partikül büyüklüklerini SEM analizleri ile belirlemişlerdir. Örneklerin partikül boyutlarını 100-250 nm olarak tespit etmişlerdir [4]. Karboksimetil kitosan (CMCS) ile

kaplanmış zein nanopartiküller, D₃ vitamini (VD₃) kapsüllemesi ile elde edilen CMCS kaplamalı nanoparçacıkların, 86 ila 200 nm arasında partikül boyutu olan küresel bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir [68].

Mikrokapsüllere ait SEM görüntüleri incelendiğinde boş mikrokapsüllerin dolu mikrokapsüllere göre daha küçük boyutlarda oldukları ve daha küçük porlar içerip daha pürüzsüz yüzeylere sahip oldukları görülmektedir. Zein mikrokapsülleri ile zein-kazein mikrokapsülleri karşılaştırıldığında ise mikrokapsül yüzeylerindeki porlara kazein parçacıklarının tutunarak kapsül yapısını desteklediği görülmektedir. Yüzey aktif madde özelliklerinden dolayı formülasyona katılan kazeinin düşünüldüğü gibi güçlü kapsül yapısı oluşumuna katkı sağladığı söylenebilir. Dolu kapsül yüzeylerindeki porlar daha büyük olduğundan bu kazein desteği daha belirgin ve yoğun gözelebilmektedir. Ayrıca kapsüllerin yüzey morfolojilerine bakılarak kazeinin mikrokapsül yüzeylerine desteğinin; kapsül dayanıklılığını artırdığı, yüzeydeki porları kapatması nedeniyle çekirdek materyali daha iyi koruduğu ve kayıplarını azalttığını, mikrokapsülasyon etkinlik değerlerine ve salım periyoduna etki ettiği söylenebilir.

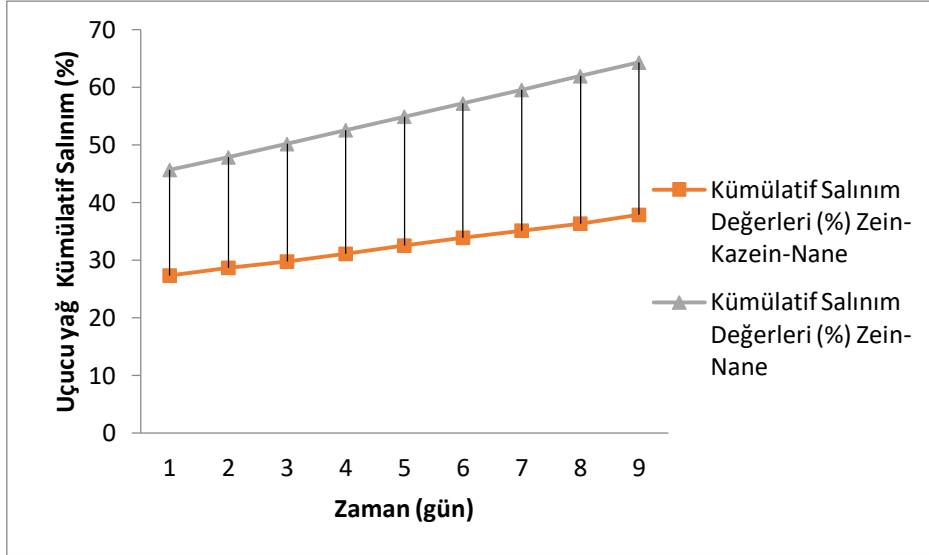
4.6. Mikrokapsüllerin Zamana Bağlı Uçucu Yağ Salımlarının Belirlenmesi

Mikrokapsüllerdeki çekirdek materyalin salımında kabuk materyalin özellikleri, mekanik kuvvet, sıcaklık değeri, zaman, pH, ozmotik basınç, enzimatik aktivite gibi çeşitli faktörler etkilidir [169].

Farklı alkol konsantrasyonlarında yapılan ön denemelerde alkol konsantrasyonu arttıkça % salım değerlerinin arttığı görülmüş olup mikrokapsüllerin salım analizleri için %25 etanolü PBS stok çözeltisi kullanılmıştır. Alınan örnekler GC-FID de analiz edilmiş, mikrokapsüllerin kümülatif salım yüzdeleri örnek alma sürelerine bağlı olarak belirlenmiş ve örneklerden elde edilen verilerden bir salım eğrisi grafiği oluşturulmuştur. Zamana bağlı salım değerleri tablosu Çizelge 4.3'te ve örneklerin zamana bağlı salım değerleri grafiği Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Zamana bağlı salım değerleri tablosu

Örnek Alma Süre (Gün)	Kümülatif Salım Değerleri (%)	
	Zein-Kazein-Nane	Zein-Nane
1	27.34	45.66
2	28.68	47.84
3	29.77	50.14
4	31.1	52.55
5	32.53	54.89
6	33.89	57.16
7	35.13	59.53
8	36.34	61.91
9	37.86	64.27



Şekil 4.5. Örneklerin zamana bağlı salım değerleri grafiği

Zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin salım değerleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde her iki mikrokapsül örneğinin de ilk 24 saatte hızlı bir salım sağladığı ilerleyen zamanla birlikte salımlarının daha yavaş devam ettiği görülmüştür. Zein-nane mikrokapsüllerin zein-kazein-nane mikrokapsüllerine göre daha hızlı ve fazla salım sağladığı söylenebilir. Zein-nane mikrokapsülleri 9 günün sonunda %64.27 oranında salım yaparken bu değer zein-kazein-nane mikrokapsüllerinde %37.86 ile yaklaşık yarı orandadır.

Litaratürde Liu vd. (2005) yaptıkları çalışmada serbest bırakma eğrisi 9 gün testi ile iki fazlı incelenmiştir. İlk aşamada, patlama etkisi genelde mikrokürelerin yüzeyine yakalanmış olan ilaca atıf yapmaktadır ve bunu çok yavaş serbest bırakma aşaması izlemiştir. 1 gün sonra sıkışan ivermektinin (IVM) yaklaşık % 40'ı serbest bırakılmış, ancak serbest bırakma oranı daha sonraki "yavaş" fazda kuyruk eğilimi göstermiştir. Yakalanan IVM'nin yaklaşık% 90'ı 9 gün sonra serbest bırakılmıştır. Salım hızının yavaşlaması, muhtemelen zein matrisinde daha derinlemesine sıkışan IVM'nin uzun difüzyon yolunu temsil etmektedir. Mikrosferlerden ilaç salınım kinetiğine karşılık gelen parametreler, su alımı oranı, ilaç eritme/difüzyon oranı ve matris erozyon/bozunma hızı da dahil olmak üzere mikro küre boyutudur. Zein'in hidrofobik özelliği su penetrasyonunun gecikmesine neden olmakta ve böylece ilacın serbest bırakma ortamına difüzyonu gecikebileceğini belirtmişlerdir [39]. Bu çalışmanın salım verileri yorumlandığında benzer şekilde önce hızlı salım ardından difüzyon yolunun uzamasının etkisiyle çok daha yavaş salım gözlemlenmiştir. Litaratüre bakılarak zeinin hidrofobik özelliklerinin de salım değerlerini etkilediği söylenebilir.

Uçucu yağın salım değerlerini yüzey morfolojisi sonuçları ile birlikte değerlendirilirse; SEM görüntülerinde kazein parçacıklarının kapsül yüzeyindeki porlara absorbe olup kapattıkları görülmüş ve bu durumun mikrokapsüllerin salım değerlerini etkileyeceği yorumu yapılmıştır ki salım değerleri, kazein ilavesinin mikrokapsül duvar yapısını geliştirdiğini desteklemektedir.

4.7. Nane Uçucu Yağı İçeren Mikrokapsüllerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

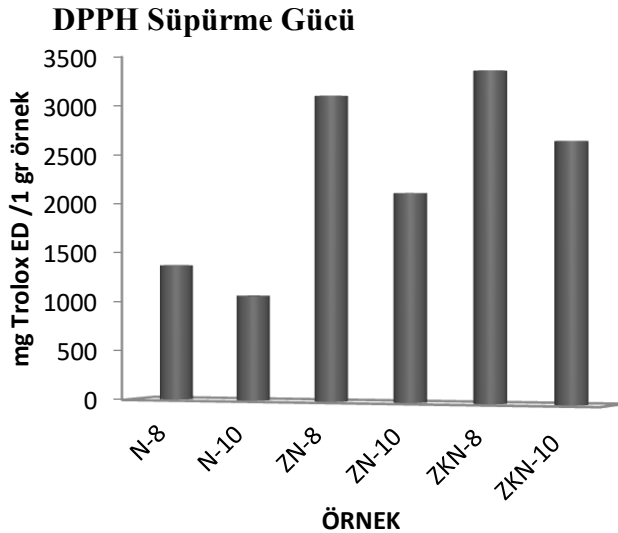
Serbest uçucu yağ ve aynı miktarlarda uçucu yağ içeren zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin antioksidan aktivite değerleri DPPH süpürme gücü metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bir antioksidanın etkinliği, belirli süre içerisinde, oksidasyondan sorumlu olan peroksil radikalleriyle etkileşim kurarak zincir radikal sürecini bloke etme olasılığını temsil etmektedir.

Çalışmada 8 ile 10 mg uçucu yağ içeren örneklerin 60 dakika inkübasyon sonunda DPPH radikaline karşı gösterdikleri antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda okunan değerler 1 mg Trolox eşdeğerine/1 gr örnek hesaplaması yapılarak Çizelge 4.4'da DPPH süpürme gücü tablosu olarak verilmiş ve tablo değerleri Şekil 4.6'da DPPH süpürme gücü grafiği olarak aktarılmıştır.

Çizelge 4.4. DPPH süpürme gücü tablosu

Örnek	Mg Trolox ED/1 Gr örnek
N-8	1371.667
N-10	1063.333
ZN-8	3090.431
ZN-10	2105.457
ZKN-8	3324.203
ZKN-10	2616.202

* N-8: 8 mg serbest nane uçucu yağı, N-10: 10 mg serbest nane uçucu yağı, ZN-8: 8 mg nane yağı içeren zein-nane mikrokapsülü, ZN-10: 10 mg nane yağı içeren zein-nane mikrokapsülü, ZKN-8: 8 mg nane yağı içeren: zein-nane-kazein mikrokapsülü, ZKN-10: 10 mg nane yağı içeren: zein-nane-kazein mikrokapsülü



* N-8: 8 mg serbest nane uçucu yağı, N-10: 10 mg serbest nane uçucu yağı, ZN-8: 8 mg nane yağı içeren zein-nane mikrokapsülü, ZN-10: 10 mg nane yağı içeren zein-nane mikrokapsülü, ZKN-8: 8 mg nane yağı içeren: zein-nane-kazein mikrokapsülü, ZKN-10: 10 mg nane yağı içeren: zein-nane-kazein mikrokapsülü

Şekil 4.6. DPPH süpürme gücü grafiği

Yapılan değerlendirmeler sonucunda; tüm örneklerin antioksidan aktivite gösterdiği, ancak %13 oranında kazein ilavesiyle elde edilen zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin antioksidan aktivitesinin serbest uçucu yağa ve zein-nane mikrokapsüllerine göre daha üstün olduğu belirlenmiştir. Kabuk materyaller olan zein ve kazeinin belli oranda kendi antioksidan aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Zhang vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada zeinin hafif antioksidan aktivite sergileyip tek başına serbest radikalleri engelleyebildiği gözlemlenmiştir [170]. Matalanis vd. (2012) besin proteinlerinin (kazein) emülsiyon haline getirilmiş lipidlerin lipid oksidasyonunu önlemede oldukça etkili olabileceğini belirtmiştir [149]. Mikrokapsüle balık yağının oksidatif stabilitesi kabuk matristeki sodyum kazeinat içeriğinin artması ile azalmaktadır. Sodyum kazeinat esaslı kabuk matrislerdeki yağların oksidatif stabilitesi hakkında çok az sayıda güvenilir çalışma mevcuttur [40]. Dolayısıyla mikrokapsül materyallerinin sinerjistik etki oluşturduğu, mikrokapsülasyon işlemi sonucunda materyallerde fizikokimyasal değişikliklerin meydana geldiği ve bu nedenlerle de kapsüllenmiş materyallerde antioksidan aktivitenin daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Balık yağı, zein sulu etanol çözeltilerinin elektrospinningiyle üretilen nanofibre içine de kapsüllenmiştir. Elektrospinn zein elyafları kapsüllenmemiş balık yağı ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir oksidatif stabilite sağlamıştır [32]. Özdemir (2013), karabiber oleorezinini β -SD kullanarak kapsüle etmiş ve burada dondurarak kurutma tekniği ile çalışmıştır. Çalışmada karabiber oleorezininin DPPH radikali yakalama aktivitesini %44.54 bulurken, mikrokapsüller için bu değerin %63.51'e yükseldiğini belirtmiştir. Özgün'ün (2015) yaptığı çalışmada mikrokapsüllerin DPPH radikali yakalama aktivitesi nane uçucu yağına göre daha fazla olduğunu bildirmiştir. Bu durumu mikrokapsülasyon işlemi ile yağın sudaki çözünürlüğünün artmasına bağlamıştır. Dolayısıyla ihtiyaç duyulan aktif bileşen konsantrasyonu azalmakta ve inklüzyon kompleksi oluşturulması ile yağın antioksidan aktivitesi gelişmektedir. Mikrokapsülasyonda kullanılan teknik ve kaplama materyaline bağlı olarak çekirdek materyalin antioksidan aktivitesi değişebilmektedir [108]. Bu çalışma ile literatürdeki mikrokapsül çalışmalarının anti oksidan aktiviteleri birlikte değerlendirildiğinde mikrokapsülasyon işleminin DPPH radikali yakalama aktivitesi üzerine olumlu etkisinin olduğu anlaşılmaktadır.

Bilenler vd.'nin (2015) yaptıkları çalışmada kekik uçucu yağının serbest radikal temizleme zamanının zein-kekik uçucu yağı kapsülleri ile uzatıldığı gösterilmiştir. Örnekler ve DPPH radikalleri arasındaki etkileşim süresi kapsülleme ile genişletilmiştir. Bu davranış, kekik esans yağının kapsüllenmiş formda bir antioksidan olarak kullanıldığı zaman etki süresini uzatmak için gıda matrisinde kullanılabileceği öngörülmüştür [167]. Bu çalışma kapsamında yer almamakla birlikte inkübasyon süresi uzatılarak serbest nane uçucu yağı, zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin zaman bağlı DPPH süpürme gücü ve buna bağlı olarak kazeinin kapsül yapısına etkisi başka bir çalışma ile araştırılabilir.

Antioksidan etkiye sahip nane uçucu yağın miktarı arttığında antioksidan etkisinin artması tahmin edilmiş, hipotezlenmiş fakat mikrokapsülasyon işlemi sonrasında hem serbest hem de mikrokapsüllenmiş formlarda antioksidan aktivitenin konsantrasyonla negatif ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde de antioksidan aktivitenin konsantrasyonla orantılı olmadığını gösteren çalışmalar vardır. Gortzi vd. (2008) *Myrtus communis* bitki ekstraktını kapsülleyerek antioksidan aktiviteyi belirledikleri çalışmalarında antioksidan aktivitenin konsantrasyonun artmasıyla doğrusal olarak artmadığını, ayrıca yüksek ekstrakt miktarlarında pro-oksidan olarak hareket ettiğini rapor etmişlerdir [11]. Bitkisel antioksidanlarda konsantrasyona bağlı antioksidan aktivitede azalmanın sebepleri kütle transfer direncinin, pro-oksidan etkinin ve belirli konsantrasyonların üzerinde antagonist etkinin artması olabileceği düşünülmektedir.

4.8. Nane Uçucu Yağı İçeren Mikrokapsüllerin Antimikrobiyal Kapasiteleri

Serbest nane uçucu yağı, boş zein, boş zein-kazein, zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin üç Gram (+) (*S. aureus*, *B. cereus*, *Enterococcus* spp.), üç Gram (-) (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella flexneri*) bakteri ve iki mayaya (*C. albicans*, *S. cerevisiae*) karşı antimikrobiyal kapasiteleri test edilmiştir. Serbest nane uçucu yağı, boş ve dolu zein, zein-kazein mikrokapsüllerinin antimikrobiyal kapasite sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Serbest nane uçucu yağı, boş ve dolu zein, zein-kazein mikrokapsüllerinin antimikrobiyal kapasite sonuçları

Mikroorganizmanın		UY	Z-K-N	Z-N	Z-K	Z	(+)Kontrol		(-) Kontrol
Sınıfı	Adı						A	G	
Gram (+) Bakteri	<i>S.aureus</i>	500	>1000	500	>1000	>1000	3.1	1.5	+
	<i>B.cereus</i>	250	>1000	500	>1000	>1000	6.2	1.5	+
	<i>Enterococcus</i>	500	250	1000	>1000	>1000	6.2	>100	+
Gram (-) Bakteri	<i>E.coli</i>	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>100	12.5	+
	<i>Salmonella</i>	500	1000	1000	>1000	>1000	6.2	50	+
	<i>S.flexneri</i>	500	>1000	1000	>1000	>1000	>100	12.5	+
Maya	<i>C.albicans</i>	>1000	500	>1000	>1000	>1000	-	-	+
	<i>S.cerevisiae</i>	>1000	500	>1000	>1000	>1000	-	-	+

*MİK(µg/mL) sonuçları verilmiştir. UY: nane uçucu yağı, Z-K-N: zein-kazein-nane uçucu yağ mikrokapsülü, Z-N: zein-nane uçucu yağ mikrokapsülü, Z-K: boş zein-kazein mikrokapsülü, Z: boş zein mikrokapsülü, A: ampisilin antibiyotiği, G: gentamisin antibiyotiği, -, test edilmedi, +; Büyüme var

Tanımlanmış bir süre içinde bir mikroorganizmanın gözle görülebilen üremesini engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu (mg/L) MİK olarak tanımlanmaktadır.

Bakteriler duyarlı, orta veya dirençli olarak sınıflandırılır. Geçerli yorumlama sınır değerleri için bu referans yöntemi uygulayan standartlara bakılabilir. Duyarlı; başarı sağlayacak antibiyotik konsantrasyonu ile inhibe olan bakteri suşudur. Orta; etkisi belirsiz olan bir antibiyotik konsantrasyonu ile inhibe olan bakteri suşudur. Dirençli; büyük olasılıkla başarısız olacak antibiyotik konsantrasyonu ile inhibe olan bakteri suşudur [164].

Antimikrobiyal analizlerde antimikrobiyal madde; 100 µg/mL'den düşük bir MİK değeri gösterdiğinde antimikrobiyal aktivite iyi, mikroorganizma duyarlı; 100 ila 500 µg/mL antimikrobiyal aktivite orta dereceli, mikroorganizma orta; 500 ila 1000 µg/mL arasında antimikrobiyal aktivite zayıf; 1000 µg/mL'nin üzerinde özüt aktif olmadığı, mikroorganizma dirençli kabul edilir [171].

Zein ve zein-kazein boş mikrokapsüllerinin seçilen mikroorganizmalar üzerinde hiçbir antimikrobiyal etkisinin olmadığı görülmüştür. Nane uçucu yağı 24 saatlik inkübasyon sonunda en iyi antimikrobiyal aktivitesini serbest formda göstermiştir. Serbest formdaki nane uçucu yağı en iyi antimikrobiyal aktiviteyi *B. cereus*'a karşı göstermiştir. Serbest nane uçucu yağının seçilen bütün Gram (+) bakteriler üzerinde; *S. aureus* ve *Enterococcus spp.* MİK değeri 500 µg/mL, *B. cereus* MİK değeri 250 µg/mL ile orta derecede, seçilen Gram (-) bakterilerden; *S. flexneri* ve *Salmonella spp.*'nin MİK değeri 500 µg/mL ile orta dereceli, *E. coli* MİK değeri 1000µg/mL ile zayıf antimikrobiyal kapasite gösterirken, seçilen mayalar üzerinde; *C. albicans* ve *S. cerevisiae* MİK değeri >1000 µg/mL ile etkisiz olduğu belirlenmiştir.

Zein-nane uçucu yağ mikrokapsüllerinde; bakterilerden *S.aureus*'e karşı antimikrobiyal kapasite korunurken kapsüllenme diğer tüm bakterilere karşı antimikrobiyal kapasiteyi düşürmüştür. Seçilen mayalara karşı serbest nane uçucu yağında olduğu gibi zein-nane mikrokapsülleri de antimikrobiyal olarak etkisiz kalmıştır.

Zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin antimikrobiyal test sonuçlarına baktığımızda ise Gram (+) bakteriler; *S.aureus* ve *B.cereus*'a karşı MİK değeri >1000 µg/ml ile etkisiz olduğu test edilirken, hem serbest nane uçucu yağı hem de zein-nane mikrokapsüllerine göre bakterilerin direnç gösterdiği görülmüş; *Enterococcus*'a karşı MİK değeri 250 µg/m ile orta derecede etki ile hem serbest nane uçucu yağı hem de zein-nane mikrokapsüllerine göre daha iyi bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Örneklerin Gram (+) bakteriler üzerindeki etkilerine bakıp kapsülleme etkisi ile ilgili yorum yapmak oldukça güçtür. Zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin seçilen Gram (-) bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkilerine bakıldığında kapsüllenmenin tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal kapasiteyi düşürdüğünü; *E.coli* ve *S.flexneri*'e karşı MİK değeri >1000 µg/ml ile etkisiz, *Salmonella*'a karşı MİK değeri 1000 µg/ml ile zayıf etkili olduğunu görülmektedir. Gram (-) bakterilere karşı kapsüllenme benzer etkiler göstermiş antimikrobiyal kapasite kapsüllenme ile düşmüştür. Zein-kazein-nane

mikrokapsüllerinin antimikrobiyal kapasitelerinin seçilen mayalar üzerinde; *C.albicans* ve *S.cereviciae* MİK değeri 500 µg/ml ile orta dereceli olduğu belirlenmiştir.

Orhan vd. (2012) , genel olarak uçucu yağda gözlemlenen antimikrobiyal etkinin zayıf ya da güçlü olmasının bu bileşenler arasında oluşan sinerjik veya antagonistik etkiden kaynaklanabildiklerini belirtmişlerdir. Uçucu yağların antimikrobiyal mekanizmalarıyla ilgili en geçerli teori, terpenlerin hidrofobik özelliğine bağlı olarak hücrelerin fizikokimyasal bütünlüğünü bozmasıdır. Terpenlerin, mikroorganizma hücre duvarındaki lipitler ile interaksyonu, lipitlerin bir arada toplanmasına ve zarın geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Uçucu yağ içerisindeki küçük moleküllerden, büyük moleküllere kadar tüm bileşenlerin ayrı ayrı etkileri olabileceği gibi birbirleri ile olan etkileşimleri de bu etkiyi azaltıp çoğaltabilmektedir [85]. *M. piperita* ve *M. spicata* uçucu yağının mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri, inhibisyon bölgelerinin ve bölge çapının varlığı veya yokluğu ile incelenmiştir. Nane yağının geniş bir insan patojenik Gram (+) ve Gram (-) bakteri ve mantar suşlarına karşı güçlü bir aktivite sergilediği bildirilmiştir. *M. spicata* uçucu yağı *C. albicans'a* karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir [110]. I. Hussain vd.(2010) çalışmalarında *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* ve *P. multocida* ve beş patojenik mantar: *A. niger*, *M. mucedo*, *F. solani*, *B. theobromae* ve *R. solani* kullanarak nane yağının antimikrobiyal potansiyelini araştırmışlardır. Test edilen tüm mikroorganizmalar, nane yağının kayda değer bir antimikrobiyal potansiyeliniden güçlü bir şekilde etkilenmiştir. Sonuçlar yağın Gram (-) bakterilere kıyasla Gram (+) bakterilere karşı anlamlı daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [9]. Nano veya mikro kapsüllenmiş malzemenin antimikrobiyal aktivitesinin, serbest formdan daha büyük olduğu genellikle kabul edilir. Ancak kapsüllenmiş kekik esans yağının serbest formdaki antimikrobiyal aktivitesi, doğrudan bir parçacık olarak test edilen kapsüllenmiş formdan daha büyük bulunmuştur. Test ortamında (su bazlı) zeinin zayıf çözünürlüğü, zein partiküllerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi sırasında kekik esans yağının salınmasını da önleyebileceği belirtilmiştir [167]. Esansiyel yağların mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesini araştıran çalışmaların çoğu, uçucu yağların Gram (-) bakterilere göre Gram (+) karşısında daha aktif olduğunu kabul eder [167, 9, 102]. Bunun nedeni, lipofilik esansiyel yağın geçişini baskılayan Gram (-) bakterilerin hidrofilik bir dış zarının korunması, Gram (+) bakterilerde ise hücre içine penetrasyonun daha kolay gerçekleşmesi olduğu düşünülmektedir.

Antimikrobiyal ajanların gıda bileşenine bağlanarak bileşenlerin mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliğini sınırlandırarak da etki sağlayabilecekleri antimikrobiyal avtivate mekanizması hakkındaki görüşlerdendir. Uçucu yağlar doğal lipofilte nedeniyle mikrobiyal membran ile etkileşimle antimikrobiyal aktivite gösterebilir. Ayrıca mikroorganizmalar üzerinde büyüme inhibasyonu ve sitoplazmik bozulma da antimikrobal etki yaratan unsurlardır.

Birçok Gram (-) bakterinin direncinin nedenleri, esansiyel yağların etki şekli daha iyi anlaşılncaya kadar spekülatif olarak kalacaktır. Mevcut hipotezler, bakteriyel hücre zarının bütünlüğü üzerindeki olumsuz etkileri desteklemektedir. Bununla birlikte, küçük esansiyel yağ bileşenlerinin etki şekli bilinmemektedir. Bu bakteri gruplarının hücre zarındaki farklılıklar göz önüne alındığında, membrana erişimin Gram (-) bakterilerde daha kısıtlı olduğu düşünülmektedir [172].

Serbest nane uçucu yağı ve zein-nane mikrokapsülleri mayalara karşı etkisizken zein-kazein-nane mikro kapsülleri orta dereceli etki ile belirgin bir fark göstermiştir. Boş zein-kazein kapsüllerinin seçilen mikroorganizmalar üzerinde etkisiz olduğunu düşünüldüğünde mayalar üzerindeki bu etkiye materyaller arası sinerjistik etkinin sebep olmuş olabileceği söylenebilir. Uçucu yağ bileşenleri ve miktarlarının antimikrobiyal aktiviteye etki ettiği düşünülecek olursa bileşenlerin kabuktan ayrılma mekanizmaları ve miktarının da bu sonuca neden olmuş olabileceği de söylenebilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikrokapsülasyon, gıda sektöründe gıda maddesinin dış etkenlere karşı korunması (nem, sıcaklık, hava ve ışık gibi), buharlaşarak kayıpların önlenmesi, fiziksel özelliklerinin daha iyi korunması, taşınma kolaylığı, hedeflenen yerde ve doğru zamanda kontrollü salımının gerçekleştirilmesi, arzu edilmeyen tat/kokunun maskelenmesi ve başka bileşenlerle reaksiyona girmesinin önlenmesi gibi farklı amaçlarla yaygın olarak kullanılmakta olan yenilikçi bir uygulamadır.

Tıbbi ve aromatik yönden değerli bir bitki sınıfı olan *Mentha* (nane) bitkisi gıda endüstrisinde tatlandırıcı, aroma verici olarak kullanılmakta ayrıca antioksidan, antimikrobiyal ve duyuşal özelliklerinden dolayı da kendisine ayrıca yeni bir kullanım alanı yaratmaktadır.

Nane yağının uçucu olmasından kaynaklanan kısa süreli etkisinin elimine edilmesi, biyoaktif özelliklerinin yüksek olması ve bahsi geçen bu faydalarının incelenmesi nedeniyle mikrokapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde sıvı-sıvı dispersiyon ve liyofilizasyon yöntemleri ile hazırlanan; zein ve farklı oranlarda zein/kazein kompleksleri kullanılarak elde edilen boş zein, zein-kazein, zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin etkinlik, antioksidan, antimikrobiyal, boyut ve yüzey, salım periyodu özelliklerinin belirlenmesi bu çalışmanın ilk amacıdır. İkinci amacımız mikrokapsüllenmiş nane uçucu yağının, serbest nane uçucu yağına göre özelliklerinin gelişiminin sağlanmasıdır.

Ana hedefler kapsamında tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bir bütün halinde aşağıda sunulmuş ve maddeler halinde öngörülen hedeflerin başarısı değerlendirilmiştir.

HEDEF I: Nane bitkisinin ihtiva ettiği uçucu yağın uygun koşullarda elde edilmesi, uçucu yağa ait bileşenlerin belirlenmesi ve karakterizasyonunun sağlanması.

GERÇEKLEŞME: Kuru nane bitkisinden Clevenger düzeneğinde su buharı distilasyonu yöntemi kullanılarak her distilasyon uygulamasından sonra yaklaşık 0.8 mg (%1 oranında) nane uçucu yağı elde edilmiştir.

Nane uçucu yağı kompozisyonunun belirlenmesinde GC/MS tekniği kullanılarak, toplam 24 adet bileşen tespit edilmiştir. Belirlenen bileşenler içerisinde en fazla bulunan (majör) bileşenin %45.53 değeri ile karvon olduğu tespit edilmiştir. Diğer önemli bileşenler ise ökaptol (%14.25), limonen (%11.64), karyofilen (%5.32), cis sabinenhidrat (%2.74), β -feladren (2.43), β -pinen (%2.43) ve α -pinen (%1.74) olarak belirlenmiştir.

Bitki uçucu yağının bileşen analizi GC-FID ile gerçekleştirilmiştir. Nane uçucu yağının majör bileşeni karvon olarak tespit edilmiş ve karvon standartı kullanılarak seri dilüsyonlar hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Mikrokapsüllerde bulunan majör bileşenin (karvon) pik alanı, kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak mg'a dönüştürülmüştür. Karvonun mg olarak belirlenen miktarı, GC verilerinden yararlanılarak uçucu yağ olarak ifade edilmiştir.

HEDEF II: Mikrokapsülasyonda kabuk materyali olarak zein materyaline, farklı oranlarda kazein ilavesinin uygunluğunun ve zein/kazein kompleks yapısının zein mikrokapsüllerin özellikleri üzerine etkisinin saptanmasıdır.

GERÇEKLEŞME: Zein kabuklara eklenen kazeinin mikrokapsüllerin yapısına ve özelliklerine etkisinin gözlemlenmesi amacıyla sıvı-sıvı dispersiyon/liyofilizasyon yöntemi ile boş zein, zein-kazein, zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsülleri elde edilmiştir. Nane uçucu yağ mikrokapsülasyonu için zein kabuk materyaline %1, %3, %5, %7, %9, %11, %13 ve %15 oranlarında kazein ilavesi gerçekleştirilmiştir. Zeine farklı oranlardaki kazein ilavesi ile elde edilen mikrokapsüllerin kapsülasyon etkinliği en yüksek 54.66 ± 3.76 olarak %13'lük zein-kazein formülasyonu ile sağlanırken, sadece zein kullanılarak elde edilen mikrokapsüllerin kapsülasyon etkinliği 46.84 ± 0.22 olarak tespit edilmiştir. Zein ve kazeinin yapısında bulunan amino asitlerin hidrofilik/hidrofobik özellikleri sayesinde apolar yapıdaki nane uçucu yağ daha yüksek etkinlikle mikrokapsüle edilmiştir.

Kapsüle edilen mikrokapsüllerin morfolojik yapıları SEM ile incelenmiş; boş mikrokapsüllerin dolu mikrokapsüllere göre daha küçük boyutlarda oldukları ve daha küçük porlar içerip daha pürüzsüz yüzeylere sahip oldukları görülmüştür. Zein-nane mikrokapsülleri ile zein-kazein-nane mikrokapsülleri karşılaştırıldığında ise mikrokapsül yüzeylerindeki porlara kazein parçacıklarının tutunarak kapsül yapısını desteklediği söylenebilir.

HEDEF III: Kapsüllerde zamana bağlı uçucu yağ salım miktarlarının belirlenmesi.

GERÇEKLEŞME: Mikrokapsüle formdaki uçucu yağın serbest hale salımı hakkında fikir edinebilmek için %25 etanollü PBS tampon ortamında uçucu yağın salım oranları saptanmıştır. Çalışmada zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin de ilk 24 saatte hızlı bir salım sağladığı, ilerleyen zamanla birlikte salımlarının daha yavaşladığı tespit edilmiştir. Zein-nane mikrokapsüllerin zein-kazein-nane mikrokapsüllerine göre daha hızlı ve fazla salım sağladığı belirlenmiştir. Zein-nane mikrokapsüllerinin %64.27 oranında salım sağladığı, bu değer zein-kazein-nane mikrokapsüllerde %37.86 ile yaklaşık yarı oranda olduğu tespit edilmiştir.

HEDEF IV: Kapsüllenmiş nane uçucu yağlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi.

GERÇEKLEŞME: Serbest uçucu yağ ve aynı miktarlarda kapsüle uçucu yağ içeren zein-nane ve zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin antioksidan aktivite analizleri DPPH süpürme gücü metodu kullanılarak yapılmıştır. Tüm örnekler antioksidan aktivite gösterirken; zein-kazein-nane mikrokapsüllerinin antioksidan aktivitesi, serbest nane uçucu yağ ve zein-nane mikrokapsüllerine göre daha üstün bulunmuştur. Antioksidan etkiye sahip nane uçucu yağının antioksidan aktivitesinin konsantrasyonla orantılı olmadığı gözlemlenmiştir.

HEDEF V: Kapsüllenmiş nane uçucu yağının antimikrobiyal kapasitelerinin belirlenmesi.

GERÇEKLEŞME: Zein ve zein-kazein boş mikrokapsüllerinin seçilen mikroorganizmalar üzerinde hiçbir antimikrobiyal etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Nane uçucu yağı 24 saatlik inkübasyon sonunda en iyi antimikrobiyal aktivitesini serbest formda ve *B. cereus*'a karşı göstermiştir. Serbest nane uçucu yağının seçilen tüm Gram (+) bakteriler üzerinde; *S. aureus* ve *Enterococcus spp.* MİK değeri 500 µg/mL, *B. cereus* MİK değeri 250 µg/mL ile orta derecede, seçilen Gram (-) bakterilerden; *S. flexneri* ve *Salmonella spp.*'nin MİK değeri 500 µg/mL ile orta dereceli, *E. coli* MİK değeri 1000 µg/mL ile zayıf antimikrobiyal kapasite gösterirken, seçilen mayalar üzerinde; *C. albicans* ve *S. cerevisiae* MİK değeri >1000 µg/ml ile etkisiz olduğu belirlenmiştir.

Bu veriler ışığında sıvı-sıvı dispersiyon/liyofilizasyon yöntemleri kullanılarak, zeine farklı konsantrasyonlarda kazein ilavesinin mikrokapsülasyon etkinliğine katkı sağladığı görülmüştür. Kapsüllerin yüzey morfolojilerine bakılarak kazeinin mikrokapsül yüzeylerine desteğinin; kapsül dayanıklılığını artırdığı, yüzeydeki porları kapatması nedeniyle çekirdek materyali daha iyi koruduğu ve çekirdek materyalin kayıplarını azalttığı, mikrokapsülasyon etkinlik değerlerine ve salım periyoduna olumlu etki ettiği söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] D. Xiao, P.M. Davidson, and Q. Zhong, *Spray-dried zein capsules with coencapsulated nisin and thymol as antimicrobial delivery system for enhanced antilisterial properties*, **J. Agric. Food Chem.**, 59 (2011) 7393-7404.
- [2] J.N. Sofos, L.R. Beuchat, P.M. Davidson and E.A. Johnson, *Naturally occurring antimicrobials in food*, **Regul. Toxicol. Pharm.**, 28 (1998) 71-72.
- [3] J.R. Calo, P.G. Crandall, C.A. O'Bryan and S.C. Ricke, *Essential oils as antimicrobials in food systems-A review*. **Food Control**, 54 (2015) 111-119.
- [4] N. Parris, P.H. Cooke and K.B. Hicks, *Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles*, **J. Agric. Food Chem.**, 53 (2005) 4788-4792.
- [5] N. Parris, P.H. Cooke, R.A. Moreau and K.B. Hicks, "Chapter 10 Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles", in N. Parris (Ed.), *New Delivery Systems for Controlled Drug Release from Naturally Occurring Materials*, ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2008, p. 175-192.
- [6] A. Broumand, Z. Emam-Djomeh, M. Hamed and S.H. Razavi, *Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 44 (2011) 2316-2323.
- [7] J.W. Ho and M. Jie, *Pharmacological activity of cardiovascular agents from herbal medicine*, **Cardiovasc. Hematol. Agent. Med. Chem.**, 5 (2007) 273-277.
- [8] S.M. Jeong, S.Y. Kim, D.R. Kim, S.C. Jo, K.C. Nam, D.U. Ahn and S.C. Lee, *Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels*, **J. Agric. Food Chem.**, 52 (2004) 3389-3393.
- [9] A.I. Hussain, F. Anwar, M. Shahid, M. Ashraf and R. Przybylski, *Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (Mentha spicata L.) from Pakistan*, **J. Essent. Oil Res.**, 22:1 (2010) 78-84.
- [10] S. Lalas and J. Tsaknis, *Extraction and identification of natural antioxidant from the seeds of the Moringa oleifera tree variety of Malawi*, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 79:7 (2002) 677-683.
- [11] O. Gortzi, S. Lalas, I. Chinou, J. Tsaknis, *Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of Myrtus communis extract before and after encapsulation in liposome*, **Eur. Food Res. Technol.**, 226 (2008) 583-590.
- [12] L. Majhenic, M. Skerget, Z. Knez, *Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts*, **Food Chem.**, 104 (2007) 1258-1268.
- [13] G. Ruberto, M.T. Baratta, S.G. Deans and H.J.D. Dorman, *Antioxidant and antimicrobial activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum essential oils*, **Planta Med.**, 66:8 (2000) 687-693.
- [14] B. Tepe, M. Sokmen, A. Sokmen, D. Daferera and M. Polissiou, *Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of Cyclotrichium organifolium (Labill.) Manden. and Scheng*, **J. Food Eng.**, 69:3 (2005) 335-342.
- [15] S. Iqbal, M.I. Bhangar and F. Anwar, *Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan*, **LWT-Food**

Sci. Technol., 40:2 (2007) 361-367.

- [16] F. Anwar, A. Siddiq, S. Iqbal and M.R. Asi, *Stabilization of sunflower oil with Moringa oleifera leaves under ambient storage*, **J. Food Lipids**, 14:1 (2007) 35-49.
- [17] R. Stojanovic, A. Belscak-Cvitanovic, V. Manojlovic, D. Komes, V. Nedovic and B. Bugarski, *Encapsulation of thyme (Thymus serpyllum L.) aqueous extract in calcium alginate bead*, **J. Sci. Food Agr.**, 92:3 (2011) 685-696.
- [18] E. Sezik, Ş. Ellialtıoğlu ve Ş. Sevengör, *Şanlıurfa'da nane tarımının geliştirilmesi üzerinde çalışmalar*, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmakognazi Anabilim Dalı, Ankara (2006).
- [19] A.T. Mata, C. Proença, A.R. Ferreira, M.L.M. Serralheiro, J.M.F. Nogueira and M.E.M. Araújo, *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices*, **Food Chem.**, 103:3 (2007) 778-786.
- [20] G. Singh, P. Marimuthu, C.S. de Heluani and C.A.N. Catalan, *Antioxidant and biocidal activities of Carum nigrum (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components*, **J Agric Food Chem.**, 54:1 (2006) 174-81.
- [21] D. Yadegarinia, L. Gachkar, M.B. Rezaei, M. Taghizadeh, S.A. Astaneh and I. Rasooli, *Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils*, **Phytochemistry**, 67:12 (2006) 1249-1255.
- [22] R.H. Olmedo, C. Asensio, V. Nepote, M.G. Mestrallet and N.R. Grosso, *Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil*, **J. Sci. Food Agr.**, 89 (2009) 2128-2136.
- [23] R.H. Olmedo, V. Nepote and N.R. Grosso, *Sensory and chemical stability in coated peanuts with the addition of essential oils and synthetic antioxidants*, **Int. J. Fat Oils**, 63:1 (2012a) 5-13.
- [24] R.H. Olmedo, V. Nepote and N.R. Grosso, *Aguaribay and cedron essential oils as natural antioxidants in oil-roasted and salted peanuts*, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 89:12 (2012b) 2195-2205.
- [25] R.H. Olmedo, V. Nepote, M.G. Mestrallet and N.R. Grosso, *Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried-salted peanuts*, **Int. J. Food Sci. Tech.**, 43 (2008) 1935-1944.
- [26] B. Başığit ve M. Çam, *Püskürtmeli kurucutu ile mikrokapsüle edilmiş nane (Mentha piperita ve Mentha spicata) esansiyel yağının salım profili*, **Gıda**, 42:2 (2017) 186-196.
- [27] M.M. Cowan, *Plant products as antimicrobial agents*, **Clin. Microbiol. Rev.**, 12:4 (1999) 564-582.
- [28] G. İşcan, N. Kirimer, M. Kürkcüoğlu, K.H.C. Başer ve F. Demirci, *Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils*, **J Agric Food Chem.**, 50:14 (2002) 3943-3946.
- [29] L. Moreno, R. Bello, E. Primo-Yu'fera and J. Esplugues, *Pharmacological properties of the methanol extract from Mentha suaveolens Ehrh.*, **Phytother. Res.**, 16:S1 (2002). 10-13.
- [30] A. Nesterenko, I. Alric, F. Silvestre and V. Durrieu, *Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness*, **Ind.**

Crop. Prod., 42 (2013) 469-479.

- [31] P.M.M. Schrooyen, R. Van Der Meer and C.G. de Kruif, *Microencapsulation: its application in nutrition*, **P. Nutr. Soc.**, 60:04 (2001) 475-479.
- [32] C. Encina, C. Vergara, B. Giménez, F. Oyarzún-Ampuero and P. Robert, *Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil*, **Trends Food Sci. Tech.**, 56 (2016) 46-60.
- [33] T. Wittaya, "Protein-Based Edible Films: Characteristics and Improvement of Properties", in A.A. Eissa (Ed.), *Structure and Function of Food Engineering*, 2012, p. 43-70
- [34] Y. Luo, B. Zhang, M. Whent, L (Lucy) Yu and Q. Wang, *Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study*, **Colloid. Surface. B.**, 85:2 (2011) 145-152.
- [35] Y. Wang and G.W. Padua, *Formation of zein spheres by evaporation-induced self-assembly*, **Colloid Polym. Sci.**, 290:15 (2012) 1593-1598.
- [36] K. Shi, J.L. Kokini and Q. Huang, *Engineering zein films with controlled surface morphology and hydrophilicity*, **J. Agric. Food Chem.**, 57:6 (2009) 2186-2192.
- [37] S. Quispe-Condori, M.D.A. Saldaña and F. Temelli, *Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 44:9 (2011) 1880-1887.
- [38] M.J. Sáiz-Abajo, C. González-Ferrero, A. Moreno-Ruiz, A. Romo-Hualde and C.J. González-Navarro, *Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry*, **Food Chem.**, 138:2-3 (2013) 1581-1587.
- [39] X. Liu, Q. Sun, H. Wang, L. Zhang and J.Y Wang, *Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system*, **Biomaterials**, 26:1 (2005) 109-115.
- [40] S. Drusch, Y. Serfert, A. Berger, M.Q. Shaikh, K. Rätzke, V. Zaporojtchenko and K. Schwarz, *New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein*, **Food Hydrocolloid.**, 27:2 (2012) 332-338.
- [41] C. Chang, T. Wang, Q. Hu and Y. Luo, *Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: formation and characterization*, **Int. J. Biol. Macromol.**, 104 (2017) 117-124.
- [42] H. Chen, Y. Zhang and Q. Zhong, *Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol*, **J. Food Eng.**, 144 (2015) 93-102.
- [43] K.K. Li, S.W. Yin, Y.C. Yin, C.H. Tang, X.Q Yang and S.H. Wen, *Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization*, **J. Food Eng.**, 119:2 (2013) 343-352.
- [44] O.A.A. Ahmed, K.M. Hosny, M.M. Al-Sawahli and U.A. Fahmy, *Optimization of caseinate-coated simvastatin-zein nanoparticles: improved bioavailability and modified release characteristics*, **Drug Des. Dev. Ther.**, 9 (2015) 655-662.
- [45] Y. Luo, Z. Teng, T.T.Y. Wang and Q. Wang, *Cellular uptake and transport of zein nanoparticles: effects of sodium caseinate*, **J Agric Food Chem.**, 61:31 (2013) 7621-7629.

- [46] H. Temiz ve A.F. Yeşilsu, *Bitkisel protein kaynaklı yenilebilir film ve kaplamalar*, **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 2 (2006) 41-50.
- [47] E. Küçüköner, O. Kılınççeker ve İ.S. Doğan, Gıdalara yenilebilir kaplama uygulamalarında süt ürünlerinin kullanım olanakları. Süt Ürünlerinde Yeni Eğilimler Sempozyumu. Bildiri, No: P14. Tıbsan Yayıncılık. İZMİR (2003).
- [48] M.A. Koyuncu ve H.E. Savran, *Yenilebilir film ve kaplamalar ve bahçe ürünlerinde kullanımı*, **S.D.Ü. Fen Bilimleri Dergisi**, 6:3 (2002) 73-83.
- [49] S. Ou, Y. Wang, S. Tang, C. Huang and M.G. Jackson, *Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate*, **J Food Eng.**, 70 (2005) 205-210.
- [50] C. Marquie and S. Guilbert, "Formation and properties of cottonseed protein films and coatings", A Gennadios (Ed), *Protein-Based Films and Coatings*, Bölüm 5, CRC Pres, New York, 2002, p. 139-158.
- [51] W.S. Choi and J.H. Han, *Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films*, **J Food Sci.**, 66:2 (2001) 319-322.
- [52] M. Aydınli and M. Tutaş, *Water sorption and water vapour permeability properties of polysaccharide (loust bean gum) based edible films*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 33:1 (2000) 63-67.
- [53] S. Gökmen, R. Palamutoğlu ve C. Sarıçoban, *Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları*, **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 7:1 (2012) 36-50.
- [54] K.G.H. Desai and H.J. Park, *Recent developments in microencapsulation of food ingredients*, **Dry. Technol.**, 23:7 (2005) 1361-1394.
- [55] D.S. Cha, K. Cooksey, M.S. Chinnan and H.J. Park, *Release of nisin from various heat-pressed and cast films*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 36:2 (2003) 209-213.
- [56] D.S. Cha, J.H. Choi, M.S. Chinnan and H.J. Park, *Antimicrobial films based on Nalginat and κ -carrageenan*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 35:8 (2002) 715-719.
- [57] W.Y. Choi, H.J. Park, D.J. Ahn, J. Lee and C.Y. Lee, *Wettability of chitosan coating solution on 'Fuji' apple skin*, **J. Food Sci.**, 67 (2002) 2668-2672.
- [58] W. Seiss and C. Divies, *Microencapsulation*, **Angew. Chem. Int. Edit.**, 14 (1975) 539-550.
- [59] S. Abbasi and S. Rahimi, *Microwave-assisted encapsulation of citric acid using hydrocolloids*, **Int. J. Food Sci. Tech.**, 43:7 (2008) 1226-1232.
- [60] A. Gray, S. Egan, S. Bakalis and Z. Zhang, *Determination of microcapsule physicochemical, structural and mechanical properties*, **Particuology**, 24 (2016) 32-43.
- [61] B. Andrade, Z. Song, J. Li, S.C. Zimmerman, J. Cheng, J.S. Moore, et al., *New frontiers for encapsulation in the chemical industry*, **ACS Appl. Mater. Inter.**, 7:12 (2015) 6359-6368.
- [62] M. Koç, M. Sakin ve F. Kaymak Ertekin, *Mikrokapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı*, **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 16:1 (2010) 77-86.
- [63] R. Baranauskienė, E. Bylaitė, J. Žukauskaitė and R.P. Venskutonis, *Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage*, **J Agric Food Chem.**, 55:8 (2007) 3027-3036.

- [64] B. Başığit ve M. Çam, *Püskürtmeli kurutucu ile nane (Mentha piperita ve Mentha spicata) esansiyel yağı mikrokapsülasyonu*, **Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi**, 21:1 (2017) 24-34.
- [65] R.A. Chowdhury, M.V. Hosur, M. Nuruddin, A. Tcherbi-Narteh, A. Kumar, V. Boddu, et al., *Self-healing epoxy composites: Preparation, characterization and healing performance*, **J. Mater. Res. Tech.**, 4 (2015) 33-43.
- [66] F. Shahidi and X.Q. Han, *Encapsulation of food ingredients, critical reviews*, **Food Sci. Nutr.**, 33 (1993) 501-547.
- [67] B. Başığit, İ. Hayoğlu ve F. Atasoy, *Kekik esansiyel yağı ve mikrokapsülasyon uygulamaları*, **Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi**, 7:1/2 (2017) 63-70.
- [68] Y. Luo, Z. Teng and Q. Wang, *Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3*, **J Agric Food Chem.**, 60:3 (2012) 836-843.
- [69] G.V. Barbosa-Canovas, E. Ortega-Rivas, P. Juliano and H. Yan, "Encapsulation Processes", in *Food Powders; Physical Properties, Processing and Functionality*, Kluwer Academic, New York, 2005, p.199-219.
- [70] J. Ubbink and J. Krüger, *Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods*, **Trends Food Sci. Tech.**, 17 (2006) 244-254.
- [71] Evren Demircan. *Elma kabuklarından elde edilen fenolik bileşiklerin lipozom ile enkapsülasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Türkiye, 2016.
- [72] D.J. McClements, E.A. Decker, Y. Park and J. Weiss, *Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods*, **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 49:6 (2009) 577-606.
- [73] T. Bourtoom, *Review Article Edible films and coatings: characteristics and properties*, **Int. Food Res. J.**, 15:3 (2008) 237-248.
- [74] R.K. Scope, "Separation by Precipitation", in Scope, R.K. (Ed.), **Protein Purification; Prin. Pract.**, New York, Springer-Verlag, 1994, p. 71-101.
- [75] P. Landy, C. Druaux and A. Voilley, *Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution*, **Food Chem.**, 54 (1995) 387-392.
- [76] S. Dursun, N. Erkan ve M. Yeşiltaş, *Doğal biyopolimer bazlı (biyobozunur) nanokompozit filmler ve su ürünlerindeki uygulamaları*, **Journal of Fisheries Sciences**, 4:1 (2010) 50-77.
- [77] S. Dursun ve N. Erkan, *Yenilebilir protein filmler ve su ürünlerinde kullanımı*, **Journal of FisheriesSciences.com**, 3:4 (2009) 352-373.
- [78] Gizem Cansu Feyzioğlu. *Satureja hortensis L. uçucu yağı yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin ve kitosan filmlerin üretimi ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Türkiye, 2016.
- [79] M. Bachar, A. Mandelbaum, I. Portnaya, H. Perlstein, S. Even-Chen, Y. Barenholz and D. Danino, *Development and characterization of a novel drug nanocarrier for oral delivery, based on self-assembled β -casein micelles*, **J. Control. Release**, 160:2 (2012) 164-171.

- [80] E. Çelik ve G. Yuvalı Çelik, *Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri*, **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 5:2 (2007) 1-6.
- [81] M. Bayaz, *Esansiyel yağlar: antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri*, **Akademik Gıda**, 12:3 (2014) 45-53.
- [82] N. Yaylı, *Uçucu yağlar ve tıbbi kullanımları, 1. İlaç Kimyasi, Üretimi, Teknolojisi, Standardizasyonu Kongresi*, Kimyagerler Derneği, Antalya. Mart 29-31 (2013), pp: 1-8.
- [83] Orman Genel Müdürlüğü (OGM), 2012. Ormancılık ve Su Şurası 2013-Ormanlardan Faydalanma Çalışma Grubu Raporu (Şura Çalışma Belgesi), Ankara.
- [84] E. Faydaoğlu ve M.S. Sürücüoğlu, *Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları*, **EÜFBED-Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 6:2 (2013) 233-265.
- [85] Elif Ayşe Erdoğan. *Lamiaceae familyasına ait bazı bitkilerin uçucu yağ içeriklerinin belirlenmesi, antimikrobiyal ve antimutajenik aktivitelerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Türkiye, 2014.
- [86] Çiğdem Pişkin. *Lamiaceae familyasına mensup bazı baharat bitkilerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Türkiye, 2007.
- [87] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, *Biological effects of essential oils–A review*, **Food Chem. Toxicol.**, 46:2 (2008) 446-475.
- [88] E. Şengezer ve T. Güngör, *Esansiyel yağlar ve hayvanlar üzerindeki etkileri (Derleme)*, **Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi**, 48:2 (2008) 101-110.
- [89] M. Evren ve B. Tekgüler, *Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri*, **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi**, 09:3 (2011) 28-40.
- [90] J. Grassmann and E.F. Elstner, *Essential oils/properties and uses*, **Enc. Food Sci., Food Technol. Nutr. (Elsevier Science Ltd.)**, (2003) 2177-2184.
- [91] R.J. Wallace, *Antimicrobial properties of plant secondary metabolites*, **Proc. Nutr. Soc.**, 63 (2004) 621-629.
- [92] M. Özgüven ve S. Kırıcı, *Farklı ekolojilerde nane (Mentha) türlerinin verim ile uçucu yağ oran ve bileşenlerin araştırılması*, **J. of Agriculture and Forestry**, 23 (1999) 465-472.
- [93] H.J.D. Dorman and S.G. Deans, *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*, **J. Appl. Microbiol.**, 88 (2000) 308-316.
- [94] M. Oussalah, S. Caillet, L. Saucier and M. Lacroix, *Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a Pseudomonas putida strain isolated from meat*, **Meat Sci.**, 73 (2006) 236-244.
- [95] B. Öztürk, N.Ü. Karabay ve L. Gökünneç, *Türkiye’de doğal yayılış gösteren bazı Mentha L. taxonlarından elde edilen uçucu yağların karşılaştırmalı antimikrobiyal etkileri*, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, Mayıs 29-31 (2002), pp. 341-343. ISBN 975-94077-2-8.
- [96] S. Toroğlu, M. Dığrak ve M. Çenet, *Baharat olarak tüketilen Laurus nobilis Linn ve Zingiber officinale Roscoe bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve antibiyotiklere in-vitro etkilerinin belirlenmesi*, **KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi**, 9:1

- (2006) 20-26.
- [97] Filiz Uçan. *DL-Limonenin mayalar üzerine antifungal etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Türkiye, 2008.
- [98] E. Dağcı, K. İzmirli ve M. Dığrak, *Kahramanmaraş ilinde yetişen bazı ağaç türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması*, **KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi**, 5:1 (2002) 99-110.
- [99] R.A. Holley and D. Patel, *Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials*, **Food Microbiol.**, 22 (2005) 273-292.
- [100] F. Rafii and A.R. Shahverdi, *Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantoin against enterobacteria*, **Chemotherapy**, 53 (2007) 21-25.
- [101] M.T. Baratta, H.J.D. Dorman, S.G. Deans, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso and G. Ruberto, *Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils*. **Flavour and Frag. J.**, 13:4 (1998) 235-244.
- [102] M. Snoussi, E. Noumi, N. Trabelsi, G. Flamini, A. Papetti and V. De Feo, *Mentha spicata essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of Vibrio spp. Strains*, **Molecules**, 20:8 (2015) 14402-14424.
- [103] Anonim (2017). <http://www.bitkicenter.com/ballibabagiller-familyasi-bitkiler/> (on-line erişim 26 Haziran 2017).
- [104] M. Gulluce, F. Sahin, M Sokmen, H. Ozer, D. Daferera, A. Sokmen, M. Polissiou, A.A. Adiguzel and H. Ozkan, *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia*, **Food Chem.**, 103 (2007) 1449-1456.
- [105] F.A. Özdemir, M.U. Yıldırım and M.P. Kahriz, *Mentha spicata subsp. spicata hipokotilinden in vitro çoklu sürgün rejenerasyonu*, **Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi**, 30 (2015) 126-129.
- [106] N. Tanker, M. Koyuncu ve M. Coşkun, *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları No: 78, Ankara, Türkiye, 1998
- [107] K.W. Park, D.Y. Kim, S.Y. Lee, J.H. Kim and D.S. Yang, *A multivariate statistical approach to comparison of essential oil composition from three Mentha species*, **Kor. J. Hort. Sci. Technol.**, 29:4 (2011) 382-387.
- [108] Nuriye Özgün. *Nane uçucu yağının siklodekstrinler ile mikrokapsülasyonu*. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Türkiye, 2015.
- [109] Ayşe Büyükbayraktar. *Konya ekolojik şartlarında farklı azot dozlarında yetiştirilen Mentha piperita L. Ve Mentha spicata L. türlerinin kurutma yöntemlerine göre drog verimi ve bazı kalite özelliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Türkiye, 2014.
- [110] S. Kızıllı, N. Haşimi, V. Tolan, E. Kılınç, and U. Yüksel, *Mineral content, essential oil components and biological activity of two mentha species (M. piperita L., M. spicata L.)*, **Turk. J. Field Crops**, 15:2 (2010) 148-153.
- [111] Anonim. (2017). <https://www.bilgio.net/bahce-nanesi-nedir-ozellikleri-faydalari->

[zararlari-ve-kullanildigi-yerler-nelerdir/](#)(on-line erişim 24 Temmuz 2017).

- [112] B. Çolak Esetlili, Ö. Çobanoğlu, M. Tepecik, B. Öztürk and D. Anaç, *Yield, essential nutrients and essential oils of peppermint (Mentha x piperita L.) grown under organic farming conditions*, **U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 29:1 (2015) 29-36.
- [113] R.S. Chauhan, M.K. Kaul, A.K. Shahi, A. Kumar, G. Ram and A. Tawa, *Chemical composition of essential oils in Mentha spicata L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India*, **Ind. Crop. Prod.**, 29 (2009) 654-656.
- [114] K.H.C. Başer, M. Kürkçüoğlu, G. Tarımcılar and G. Kaynak, *Essential oils of Mentha species from Northern Turkey*, **J. Essent. Oil Res.**, 11:5 (1999) 579-588.
- [115] I. Telci, N. (Incekara) Sahbaz, G. Yılmaz and M.E. Tugay, *Agronomical and chemical characterization of Spearmint (Mentha Spicata L.) originating in Turkey*, **Econ. Bot.**, 58:4 (2004) 721-728.
- [116] I. Telci, I. Demirtas, E. Bayram, O. Arabaci and O. Kacar, *Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (Mentha spicata L.)*, **Ind. Crop. Prod.**, 32:3 (2010) 588-592.
- [117] P. Arumugam, P. Ramamurthy, S.T. Santhiya and A. Ramesh, *Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from Mentha spicata Linn.: An analysis by ABTS⁺ decolorization assay*. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, 15 (2006) 119-124.
- [118] G. Ruberto, M.T. Baratta, S.G. Deans and H.J.D. Dorman, *Antioxidant and antimicrobial activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum essential oils*, **Planta Med.**, 66 (2000) 687-693.
- [119] M. Mahboubi and G. Haghi, *Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil*, **J. Ethnopharmacol.**, 119:2 (2008) 325-327.
- [120] N. Mimica-Dukic, B. Bozin, M. Sokovic, B. Mihajlovic and M. Matavulj, *Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils*, **Planta Med.**, 69 (2003) 413-419.
- [121] C.C. Tassou, E.H. Drosinos and G.J.E. Nychas, *Effects of essential oil from mint (Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4°C and 10°C*, **J. Appl. Bacteriol.**, 78:6 (1995) 593-600.
- [122] N. Karagözlü, B. Ergönül and D. Özcan, *Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of E. coli O157:H7 and S. typhimurium in fresh-cut lettuce and purslane*, **Food Control**, 22:12 (2011) 1851-1855.
- [123] A. Akgül and M. Kıvanç, *Sensitivity of four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs and citrus peel*, **J. Sci. Food Agr.**, 47:1 (1989) 129-132.
- [124] Z. Schelz, J. Molnar and J. Hohmann, *Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils*, **Fitoterapia**, 77:4 (2006) 279-285.
- [125] N. Mimica-Dukic, O. Gasic, R. Jancic and G. Kite, *Essential oil composition of some populations of Mentha arvensis L. in Serbia and Montenegro*, **J. Essent. Oil Res.**, 10:5 (1998) 502-506.
- [126] A. Akgül, *Baharat bilimi ve teknolojisi*, **Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları**, 15 (1993) 449.

- [127] M. Singh, V.P. Singh and D.V. Singh, *Effect of planting time on growth, yield and quality of spearmint (Mentha spicata L.) under subtropical climate of Central Uttar Pradesh*, **J. Essent. Oil Res.**, 7:6 (1995) 621-626.
- [128] H. Wagner, S. Bladt and E.M. Zgainski, *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, 1984.
- [129] A. Aflatuni, *The Yield and Essential Oil Content of Mint (Mentha ssp.) in Northern Ostrobothnia*, Oulu University Press, Finland, 2005, p. 52.
- [130] Abdullah Ijaz Hussain, *Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae*, PhD Thesis, Faisalabad, Pakistan, 2009.
- [131] M. Leporatti and K. Ghedira, *Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia*, **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, 5:1 (2009) 31.
- [132] K. Tawaha, F. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad and T. El-Elimat, *Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species*, **Food Chem.**, 104:4 (2007) 1372-1378.
- [133] F. Tetik, S. Civelek and U Cakilcioglu, *Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey)*, **J. Ethnopharmacol.**, 146:1 (2013) 331-346.
- [134] R. Shukla and M. Cheryan, *Zein: the industrial protein from corn*, **Ind. Crop. Prod.**, 13:3 (2001) 171-192.
- [135] J.W. Lawton, *Zein: a history of processing and use*, **Cereal Chem. J.**, 79:1 (2002) 1-18.
- [136] P. Nonthanum, Y. Lee and G.W. Padua, *Effect of γ -zein on the rheological behavior of concentrated zein solutions*, **J. Agr. Food Chem.**, 60:7 (2012) 1742-1747.
- [137] Y. Wu, Y. Luo and Q Wang, *Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 48:2 (2012) 283-290.
- [138] Rachel Bloom, *Feasibility of using zein in gluten-free baking*, Master of Science, Kansas State University, Manhattan, Kansas, 2015.
- [139] J.W. Lawton, *Viscoelasticity of zein-starch doughs*, **Cereal Chem.**, 69:4 (1992) 351-355.
- [140] L.C. Swallen and J.P. Danehy, *Zein*, **Colloid Chem.**, 6 (1946) 1140-1148.
- [141] R.H. Manley and C.D. Evans, *Binary solvents for zein*, **Ind. Eng. Chem.**, 35 (1943) 661-665.
- [142] D.W. Hansen, *Plasticized prolamine base composition*, U.S. Patent 2,115,716, May 1938.
- [143] C. Phadungath, *Casein micelle structure: a concise review*, **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 27:1 (2005) 201-212.
- [144] E. Şenel, <http://cv.ankara.edu.tr/duzenleme/kisisel/dosyalar/12012015132355.pdf>, 27/11/2016.
- [145] A. Ye, *Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions*, **Int. Dairy J.**, 21:1 (2011) 14-20.
- [146] D. Xiao, P.M. Davidson and Q. Zhong, *Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures*, **LWT-Food Sci. Technol.**,

44:10 (2011) 1977-1985.

- [147] D.G. Dalgleish, *On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements*, **Soft Matter**, 7:6 (2011) 2265-2272.
- [148] Y.D. Livney, *Milk proteins as vehicles for bioactives*, **Curr. Opin. Colloid In.**, 15:1-2 (2010) 73-83.
- [149] A. Matalanis, E.A. Decker and D.J. McClements, *Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres*, **Food Chem.**, 132:2 (2012) 766-772.
- [150] A.R. Patel, E.C.M. Bouwens and K.P. Velikov, *Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles*, **J. Agr. Food Chem.**, 58:23 (2010) 12497-12503.
- [151] A. Patel, Y. Hu, J.K. Tiwari and K.P. Velikov, *Synthesis and characterisation of zein-curcumin colloidal particles*, **Soft Matter**, 6:24 (2010) 6192.
- [152] H. Chen and Q. Zhong, *Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate*, **Food Hydrocolloid.**, 35 (2014) 358-366.
- [153] S.A. Hogan, B.F. McNamee, E.D. O’Riordan and M. O’Sullivan, *Microencapsulating properties of sodium caseinate*, **J. Agr. Food Chem.**, 49:4 (2001) 1934-1938.
- [154] Y. Zhang, H. Hu, L. Song, L. Cai, R. Wei and W. Jin, *Epirubicin-mediated expression of miR-302b is involved in osteosarcoma apoptosis and cell cycle regulation*, **Toxicol. Lett.**, 222:1 (2013) 1-9.
- [155] K.-K. Li, S.-W. Yin, X.-Q. Yang, C.-H. Tang and Z.-H. Wei, *Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein-sodium caseinate (SC) nanoparticles*, **J. Agr. Food Chem.**, 60:46 (2012) 11592-11600.
- [156] M. Veneranda, Q. Hu, T. Wang, Y. Luo, K. Castro and J.M. Madariaga, *Formation and characterization of zein-caseinate-pectin complex nanoparticles for encapsulation of eugenol*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 89 (2018) 596-603.
- [157] Y. Luo and Q. Wang, *Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review*, **J. Appl. Polym. Sci.**, 131:16 (2014) 40696 (1 of 12).
- [158] R. Paliwal and S. Palakurthi, *Zein in controlled drug delivery and tissue engineering*, **J. Control. Release**, 189 (2014) 108-122.
- [159] S.M. Hosseini, H. Hosseini, M.A. Mohammadifar, A.M. Mortazavian, A. Mohammadi, K. Khosravi-Darani, ... R. Khaksar, *Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process*, **Int. J. Biol. Macromol.**, 62 (2013) 582-588.
- [160] V. Bondet, W. Brand-Williams and C. Berset, *Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 30:6 (1997) 609-615.
- [161] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*, **LWT-Food Sci. Technol.**, 28:1 (1995) 25-30.
- [162] Y. Niu, D. Ke, Q. Yang, X. Wang, Z. Chen, X. An and W. Shen, *Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0*, **Food Chem.**, 135:3 (2012) 1377-1382.

- [163] J.M. Andrews, *Determination of minimum inhibitory concentrations*, **J. Antimicrob. Chemoth.**, 48:1 (2001) 5-16.
- [164] UM/Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (2015). *MIK Saptama Yöntemleri (Gradient difüzyon, sıvı dilüsyon ve agardilüsyon)*, UM Standart No AMD-TP-04 Sürüm No 1.0. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
- [165] Yağmur Toprak. *Mentha spicata L. subsp. spicata bitkisinin uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal etkisi üzerine araştırmalar*. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2005.
- [166] Q. Zhong, H. Tian and S. Zivanovic, *Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion*, **J. Food Process. Pres.**, 33:2 (2009) 255-270.
- [167] T. Bilenler, I. Gokbulut, K. Sislioglu and I. Karabulut, *Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles*, **Flavour Fragr J**, 30:5 (2015) 392-398.
- [168] Y. Wang, C. Ping Su, M. Schulmeric, G.W. Padua, *Characterization of core-shell structures formed by zein*, **Food Hydrocolloid.**, 30 (2013) 487-494.
- [169] N. Sözer and J.L. Kokini, "The Applications of Nanotechnology", *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Academic Press, Oxford, UK, 2012, p. 145-170.
- [170] B.C. Zhang, Y.C. Luo and Q Wang, *Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of alpha-zein*, **Food Chem.**, 124:1 (2011) 210-220.
- [171] I. Gokbulut, T. Bilenler and I Karabulut, *Determination of chemical composition, total phenolic, antimicrobial, and antioxidant activities of Echinophora tenuifolia essential oil*, **Int. J. Food Prop.**, 16:7 (2013) 1442-1451.
- [172] P.J. Delaquis, K. Stanich, B. Girard and G. Mazza, *Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils*, **International Journal of Food Microbiology**, 74:1-2 (2002) 101-109.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sevil Ayça BİLİCİ

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya, 25.09.1988

Adres: Avcılar/İSTANBUL

E-Posta: s.ayca.b@hotmail.com, sayca.burak@tarimorman.gov.tr

Lisans: İnönü Üniversitesi, Gıda Mühendisliği

Çalışma: Kepsut İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü (2014-2016)

Malatya İl Tarım ve Orman Müdürlüğü (2016- 2018)

Avcılar İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü (2018-Halen)