

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GIDA EMÜLSİYONLARININ 3-KLOROPROPAN-1,2-DİOL ESTERLERİNİN
SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Ayşe Nur AKPINAR

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GIDA EMÜLSİYONLARININ 3-KLOROPROPAN-1,2-DİOL ESTERLERİNİN SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ayşe Nur AKPINAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Cansu Ekin BONACINA

3-kloropropan-1,2-diol (3-MCPD) esterleri potansiyel karsinogenik olarak bilinen gıda işleme kontaminantıdır. Gıda emülsiyonlarının biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımını artırdığı bilinmesine rağmen insan sağlığına zararlı olabilecek bileşiklerin emilimi ve toksisitesi üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Tez çalışmasının amacı da gıda emülsiyonlarının 3-MCPD esterlerinin *in vitro* sindirimi sonrasındaki toksisiteyi üzerine etkilerini incelemek ve emilimlerinin azaltılması üzerine stratejiler geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda yemeklik yağların (ceviz, fındık, ayçiçek, soya, mısır ve zeytinyağı) 3- MCPD ester içerikleri belirlenmiştir. Rafine zeytinyağı en yüksek 3-MCPD ester içeriğine sahip yağ olmuştur (1.78 ± 0.13 mg/kg). Daha sonra %10 yağ ve %90 su fazından oluşan emülsiyonlar üretilmiştir. Farklı parçacık boyutlarında (ince, orta, kaba) emülsiyon elde etmek amacıyla su fazında emülgatör olarak %0.15-2 peynir altı suyu proteini izolatu ve 3 ila 10 kpsi basınç aralığındaki mikro akışkanlaştırıcı kullanılmıştır. *In vitro* sindirim modeli kullanılarak serbest yağ asitleri salınımı araştırılmış ve 3- MCPD biyoerişilebilirlikleri hesaplanmıştır. Toksisite testi olarak 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür testi (MTT) hücre canlılık yöntemi kullanılmıştır. Her sindirim fazı sonrasında örneklerin parçacık boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. En küçük parçacık boyutuna sahip olan ince emülsiyon (369.16 ± 3.72 nm), ince bağırsak fazında en yüksek serbest yağ asitleri salınımı göstermiştir (85.27 ± 0.68). İnce emülsiyon aynı zamanda en yüksek 3-MCPD biyoerişilebilirliği göstermiştir (95.03 ± 4.36). Emülsiyonların yağ fazına farklı oranlarda (%10-20-30) limon yağı eklendiğinde serbest yağ asitleri salınımı %30'a, biyoerişilebilirlik ise %45'e kadar azalmıştır. İnce emülsiyonun misel fazı fibroblast hücre hattında, orta emülsiyonun (514.17 ± 2.27 nm) misel fazı ise fibroblast ve Vero hücre hattında toksik etki göstermiştir. Emülsiyonların parçacık boyutu arttıkça ve emülsiyonların yağ fazına limon yağı eklendiğinde yüzde canlılık artmıştır. Özetle; gıda emülsiyonlarında 3-MCPD esterlerinin emilimi ya büyük parçacık boyutuna sahip emülsiyonlar üreterek ya da yağ fazına sindirilemeyen yağ ekleyerek azaltılabilir.

Mayıs 2022, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: 3-MCPD, gıda emülsiyonları, gıda bulaşanları, *in vitro* sindirim sistemi, biyoerişilebilirlik, sitotoksosite

ABSTRACT

Master's Thesis

EFFECT OF FOOD EMULSIONS ON THE CYTOTOXICITY OF 3-CHLOROPROPANE-1,2-DIOL ESTERS

Ayşe Nur AKPINAR

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

Supervisor: Asst. Prof. Cansu Ekin BONACINA

3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters are food processing contaminants, and are known to be potentially carcinogenic. The main purpose of this study was to determine whether the emulsion technique increases the absorption of this contaminant, and to develop strategies to reduce their absorption. 3-MCPD ester contents in edible oils (hazelnut, walnut, sunflower, soybean, corn, and olive oil) were determined. Refined olive oil contained the highest 3-MCPD ester level ($1.78 \pm 0.13\text{mg/kg}$). Then, emulsions (fine, medium, coarse) were prepared with 10% oil and 90% aqueous phase. Aqueous phase contained 0.15-2% emulsifier (whey protein isolate) and microfluidizer was used at 3-10 kpsi pressure for emulsion formation. The free fatty acid release was investigated using an *in vitro* digestion model, and the bioaccessibility of 3-MCPD was calculated. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide test (MTT) cell viability method was used to perform toxicity tests. The zeta potential and droplet size of the samples were measured after each digestion phase. The emulsion with the smallest particle size ($369.16 \pm 3.72\text{ nm}$) resulted in the highest release of free fatty acid ($85.27 \pm 0.68\%$) during small intestinal phase. Fine emulsions also resulted in the highest 3-MCPD ester bioaccessibility ($95.03 \pm 4.36\%$). When an indigestible oil, such as lemon oil, was added to the oil phase of the fine emulsion (up to 30%), the release of free fatty acid decreased by up to 30% as expected and bioaccessibility decreased by up to 45%. The micelle phase of the fine and medium ($514.17 \pm 2.27\text{ nm}$) emulsion had a toxic effect on the fibroblast cell line and the micelle phase of the medium emulsion had a toxic effect on the Vero cell line. When the particle size increased and lemon oil was added to the oil phase of the emulsion, the percent viability increased. Briefly, there are two ways to reduce the absorption of 3-MCPD esters from food emulsions: producing emulsions with larger particle size, or adding indigestible oil to the oil phase.

May 2022, 70 pages

Key Words: 3-MCPD, food emulsions, food contaminants, *in vitro* digestion system, bioaccessibility, cytotoxicity

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her zaman sabır ve hoşgörü ile yaklaşan, her konuda gösterdiği yakın ilgiyle akademik ve bireysel gelişmeye önemli katkıları olan, birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Cansu Ekin BONACINA'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Değerli bilgi ve tecrübelerini her zaman içtenlikle aktaran, her daim gösterdiği destek ve yardımlarından dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. Aziz TEKİN'e (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü),

Çalışmamdaki sonuçları alabilmek için sağlamış olduğu cihaz ve ekipmanlarla desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Behiç MERT'e (Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Sitotoksikite testlerinin uygulanmasında büyük katkıları olan, tez çalışmamın ilerlemesine destek olan sayın Öğr. Gör. Dr. Büşra Moran BOZER'e (Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi),

3-MCPD ve glisidil esterleri analizlerinin yürütülmesinde destek olan sayın Doç. Dr. Aslı Yorulmaz ve çalışma ekibine (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü),

Hem lisans hem de yüksek lisans eğitimim ile bugüne gelmemi sağlayan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Hocalarıma,

Sadece laboratuvar çalışmalarında değil hayatımın her alanında bana destek olan, çok güzel anılar biriktirdiğim dostum sevgili Selvi Seçil ŞAHİN'e, laboratuvar çalışmalarında bana destek olan arkadaşım sevgili Sevda DERE'ye, çalışma sürecimdeki manevi desteğinin yanı sıra yıllara sığdıramadığım, iyi ve kötü her anımda koşulsuz yanımda olan ailemden biriymiş gibi hissettiğim Büşra Ayça AY'a,

Benim bugünlere gelmemi sağlayan ve sevgisini bir an olsun esirgemeyen gölgesinde dinlediğim bir ağaç, ışığında yürüdüğüm bir güneş, içtiğimde ferahladığım bir su olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 119O805 proje numarası ve “Gıda Emülsiyonlarının 3-Kloropropan-1,2-Diol ve Glisidil Esterlerinin Salınımı Üzerine Etkisi ve Bu Maddelerin Emilimlerinin Azaltılmasına Yönelik Stratejilerin Geliştirilmesi” konulu proje ile desteklenmiştir.

Ayşe Nur AKPINAR
Ankara, Mayıs 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterleri	2
2.2 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterlerinin Oluşumu	4
2.3 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterlerinin Sağlık Üzerine Etkisi, Toksikolojik Çalışmalar ve Yasal Düzenlemeler.....	8
2.4 Gıda Emülsiyonları	11
2.5 Sindirim ve Emilim	14
2.6 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterlerinin Sindirimi ve Emilimi	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1 Materyal	22
3.2 3-MCPD ve Glisidil Esterlerinin Belirlenmesi	22
3.3 Serbest 3-MCPD analizi	25
3.4 Emülsiyon Oluşumu.....	27
3.5 <i>In vitro</i> Sindirim Modelinin Uygulanması	28
3.5.1 Ağız fazı.....	29
3.5.2 Mide fazı.....	29
3.5.3 İnce bağırsak fazı	29
3.6 Biyoerişilebilirlik	30
3.7 Parçacık Boyutu Ölçümleri.....	31
3.8 Zeta Potansiyel Ölçümleri	31
3.9 Sitotoksikite Analizi.....	31
3.10 İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33

4.1 3-MCPD ve Glisidil Esterleri İçeriklerinin Belirlenmesi	33
4.2 Hazırlanan Emülsiyonların Özellikleri.....	35
4.2.1 Farklı parçacık boyutlarına sahip zeytinyağı emülsiyonunun özellikleri.....	35
4.2.2 Zeytinyağı emülsiyonlarına <i>in vitro</i> sindirim modelinin uygulanması.....	37
4.2.3 Zeytinyağı emülsiyonlarının biyoerişilebilirliği	44
4.2.4 Limon yağı eklenen emülsiyonların özellikleri.....	46
4.2.5 Limon yağı eklenen emülsiyonlara <i>in vitro</i> sindirim modelinin uygulanması	47
4.2.6 Limon yağı eklenen emülsiyonların biyoerişilebilirliği	53
4.3 Sitotoksikite Testleri	54
5. SONUÇ	59
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ.....	70

SİMGELER DİZİNİ

β	Beta
rpm	Dakikadaki devir sayısı
g	Gram
kg	Kilogram
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
vd	ve diğerleri
%	Yüzde
d_{32}	Yüzey ağırlıklı ortalama ϕ

Kısaltmalar

3-MCPD	3-Kloropropan-1,2-Diol
BfR	Almanya Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
DG	Digliserit
DMSO	Dimetil sülfoksit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
GI	Gastrointestinal
GC-MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GE	Glisidil esterleri
HCl	Hidroklorik asit
LD_{50}	Medyan öldürücü doz
MTT	Metiltiazol tetrazolium
MG	Monogliserit
LOQ	Ölçüm limiti
SYA	Serbest Yağ Asitleri
NaOH	Sodyum hidroksit
Y/S	Su içinde yağ
LOD	Tespit limiti
TG	Trigliserit
TDI	Tolere edilebilir maksimum günlük alım miktarı
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
S/Y	Yağ içinde su
IC_{50}	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kloropropanoller ve kimyasal yapıları	3
Şekil 2.2 3-MCPD mono ve diesterleri	3
Şekil 2.3 L-gliserol molekülünden monokloropropandiol izomerlerinin oluşması	4
Şekil 2.4 Katyon aracılı 3-MCPD ester oluşum mekanizması.....	5
Şekil 2.5 3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve GE'nin serbest radikal aracılı oluşum mekanizması	7
Şekil 2.6 Suda yağ emülsiyonunun fiziksel olarak kararsız hale gelmesine yol açan 4 mekanizma	13
Şekil 2.7 Gastrointestinal sistemden geçerken emülsiyonlardaki olası değişikliklerin şematik gösterimi	16
Şekil 2.8 Gıda matrisinin biyoyararlanım sürecindeki adımların şeması	19
Şekil 3.1 Standart kurve	24
Şekil 3.2 Serbest 3-MCPD standart kurvesi.....	27
Şekil 4.1 Farklı emülgatör oranları ile hazırlanan ve farklı basınçların uygulanmasıyla elde edilen emülsiyonların parçacık boyutları	36
Şekil 4.2 Farklı koşullarda üretilen ince, orta, kaba emülsiyonun parçacık boyut dağılımları.....	37
Şekil 4.3 Rafine zeytinyağı ve ince, orta, kaba emülsiyonların sindirim fazları parçacık boyutları	38
Şekil 4.4 İnce emülsiyon sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı	40
Şekil 4.5 Orta emülsiyon sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı	40
Şekil 4.6 Kaba emülsiyon sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı	41
Şekil 4.7 Zeytinyağı sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı.....	41
Şekil 4.8 Rafine zeytinyağı ve ince, orta ve kaba emülsiyonların sindirim fazları zeta potansiyelleri.....	42
Şekil 4.9 Zeytinyağı ve ince, orta ve kaba emülsiyonların serbest yağ asitleri (SYA) salınım yüzdesi	43
Şekil 4.10 Zeytinyağı ve ince, orta ve kaba emülsiyonların 3-MCPD biyoerişilebilirliği	45
Şekil 4.11 İnce emülsiyonun yağ fazına %10-20-30 limon yağı eklendiğindeki parçacık boyutu	47
Şekil 4.12 Farklı oranlarda eklenen limon yağı emülsiyonların sindirim fazları boyutları	48
Şekil 4.13 %10 Limon yağı eklenmiş emülsiyonun sindirim fazları parçacık boyut dağılımları	49

Şekil 4.14	%20 Limon yağı eklenmiş emülsiyonun sindirim fazları parçacık boyut dağılımları.....	49
Şekil 4.15	%30 Limon yağı eklenmiş emülsiyonun sindirim fazları parçacık boyut dağılımları	50
Şekil 4.16	Farklı oranlarda eklenen limon yağı emülsiyonların sindirim fazlarının zeta potansiyelleri.....	51
Şekil 4.17	Farklı oranlarda eklenen limon yağı emülsiyonlarının serbest yağ asitleri salınım yüzdesi	52
Şekil 4.18	Yağ fazına farklı oranlarda limon yağı eklenen emülsiyonların 3-MCPD biyoerişilebilirliği	53
Şekil 4.19	Fibroblast hücre hattına uygulanan zeytinyağı ve ince, orta, kaba emülsiyonların misel fazlarının yüzde hücre canlılıkları (%)	56
Şekil 4.20	Vero hücre hattına uygulanan zeytinyağı ve ince, orta, kaba emülsiyonların misel fazlarının yüzde hücre canlılıkları (%)	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Avrupa Birliği'nin 2020 yılında belirlediği bazı gıdaların 3-MCPD maksimum limitleri.....	10
Çizelge 3.1 Standart kurve için gerekli olan farklı konsantrasyonlardaki glisidol çözeltilerinin hesaplanan 3-MCPD esterleri içerikleri.....	23
Çizelge 3.2 Standart kurve çizmek için gerekli olan farklı konsantrasyonlardaki 3-MCPD çözeltilerinin hesaplanan 3-MCPD içerikleri.....	26
Çizelge 4.1 Farklı rafine yemeklik yağların 3-MCPD esterleri ve GE içerikleri.....	34
Çizelge 4.2 Bazı bileşiklerin emülsiyon sistemlerindeki biyoerişilebilirlik değişimleri.....	46



1. GİRİŞ

Yenilebilir yağlar sadece gıda katkısı olarak değil kızartma gibi işlemlere ısı transferi ortamı hazırlamak, ağız hissini iyileştirmek, çeşitli gıdalara doku ve tat vermek amacıyla kullanılmaktadır (Hrncirik ve Duijin 2011). Bu yağların üretimi sırasında istenmeyen bileşikler oluşabilmektedir. Bu bileşiklerden bir tanesi de Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı'nın 2012 yılında insanlarda olası karsinojen olarak sınıflandırdığı 3-kloropropan-1,2-diol'dür. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi 2013 yılında kronik oral maruziyet ile 3-MCPD toksisitesi için ana hedef organın böbrek olduğunu, farelerde bağışıklık fonksiyonlarını baskıladığı ve doğurganlığı azalttığını bildirdiği bir rapor yayımlamıştır. Potansiyel kanserojen olan 3-MCPD ve esterleri işlenmiş gıdalarda ve özellikle de bitkisel yağların rafine edilmesi sırasında oluşmaktadır.

Normal fizyolojik fonksiyonlarda kullanmak ve depolamak için vücuda alınan besinin erişilebilir kısmı olan biyoyararlılık, besin maddelerinin gastrointestinal sistem içinde salınımlarını, çözünmelerini, taşınmasını, metabolizmasını ve emilimini kontrol eden gıda matrisleri tasarlanarak geliştirilebilir. Yağ ve su arasındaki ara yüzey alanının artması, olumsuz koşullar altında bileşenlerin bozulmasına karşı koruyabilir, adsorpsiyon ve biyoyararlanımını değiştirebilir.

Biyoaktif bileşenlerin biyoyararlanımı üzerine yapılan birçok çalışma; gıda emülsiyonlarının bu bileşenlerin biyoyararlılığını artırdığını ve parçacık boyutunun biyoyararlanım üzerinde büyük bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ancak, gıda emülsiyonlarının insan sağlığına yararlı olmayan bileşenlerin emilimini ve toksisitesini artırıp artırmayacağı tam olarak bilinmemektedir. Birçok yemeklik yağda 3-MCPD esterleri içeriği tespit edilmesine rağmen yemeklik yağ kullanılarak üretilen gıda emülsiyonlarının vücutta 3-MCPD salınımı ve hücreler üzerinde sitotoksik etkisi araştırılmamıştır. Bu yüzden tezin ana hedefi gıda emülsiyonlarının 3-MCPD esterlerinin *in vitro* sindirimi sonrasındaki hücreler üzerinde toksik etkisini incelemektir. Bu kapsamda farklı yemeklik yağların 3-MCPD esterleri içerikleri belirlenerek, farklı parçacık boyutlarına sahip emülsiyonların toksisitesi araştırılacak ve biyoyararlanımının azaltılması için stratejiler geliştirilecektir.

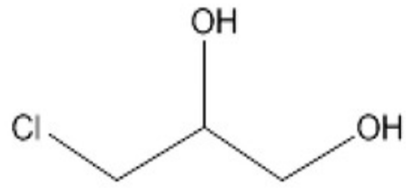
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterleri

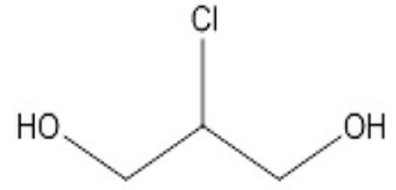
3-Kloropropan-1,2-Diol (3-MCPD) ilk olarak asitle hidrolize edilen sebze proteinlerinde serbest formda tespit edilen bir gıda kontaminantıdır (Velisek vd. 1978). Asitle hidrolize edilmiş bitkisel proteinlerde 3-MCPD yağ esterlerinin (bağlı 3-MCPD) oluşumu ise Velisek vd. (1980) tarafından rapor edilmiştir. Yapılan bazı araştırmalar 3-MCPD'nin sadece asitle hidrolize edilen sebze proteinlerinde değil, aynı zamanda et, süt, tahıl ürünleri ve bitkisel yağlar gibi işlenmiş gıdalarda da oluşabileceğini hatta insan sütünde bile tespit edildiğini göstermiştir (Zelinkova vd. 2006, Zelinkova vd. 2008). İşlenmiş yemeklik yağlar için 3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve glisidil esterleri (GE) önemli kontaminantlardır (Anonymous 2016). Farklı gıda türlerinde tespit edilse de yemeklik rafine yağların çoğunda tespit edilmesinin sonucu olarak Stuttgart Resmi Laboratuvarı, Max-Rubner Enstitüsü işbirliği ile bu konuyu araştırmış ve 3-MCPD esterlerinin rafinasyon prosesinde yüksek sıcaklık ve düşük nem koşullarında olan deodorizasyon işlemi sırasında oluştuğunu bulmuştur (Freudenstein vd. 2013, Zhao vd 2016).

3-MCPD, 2 fonksiyonel alkol grubu ve bir klorür içeren $C_3H_7ClO_2$ molekül formülüne ve 110.54 g/mol bağlı molekül ağırlığına sahip genotoksik olmayan karsinojen bir bileşiktir. Şekil 2.1'de görüldüğü gibi 5 farklı bileşiğe (2-monokloropropan-1,3-diol, 2,3-dikloropropan-1-ol, 1,3-dikloropropan-2-ol, 3-monokloropropan-1-ol ve 3-kloropropan-1,2-diol) sahip kloropropanollerden biridir (Lee ve Khor 2015). 3-MCPD; uçucu olmayan, kaynama noktası 213°C olan bir bileşiktir. Yağ ve yağ matrislerinde çözünürlüğü yüksektir (Jędrkiewicz vd. 2016).

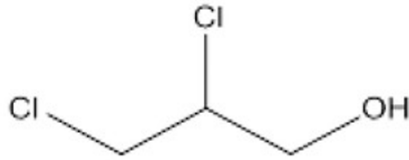
Divinova vd. (2004) 24 farklı gıdanın (sosis, peynir, salam, patates cipsi vb.) pH, su, klorür, yağ miktarı, gliserol ile 3-MCPD içeriğini incelemiş ve 3-MCPD'nin yağ ve gliserol ile pozitif, pH ile negatif bir ilişki olduğu sonucuna varmıştır. Fakat 3-MCPD oluşumunun daha iyi gözlemlenmesi proses sıcaklığı, depolama süresi, ester içeriği gibi farklı parametrelere de bağlı olacağını da eklemiştir.



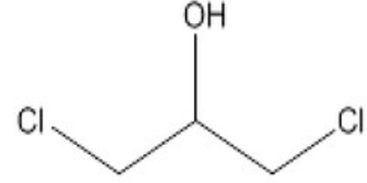
3-kloropropan-1,2-diol (3-MCPD)



2-kloropropan-1,3-diol (2-MCPD)



2,3-dikloropropan-1-ol (2,3-DCP)



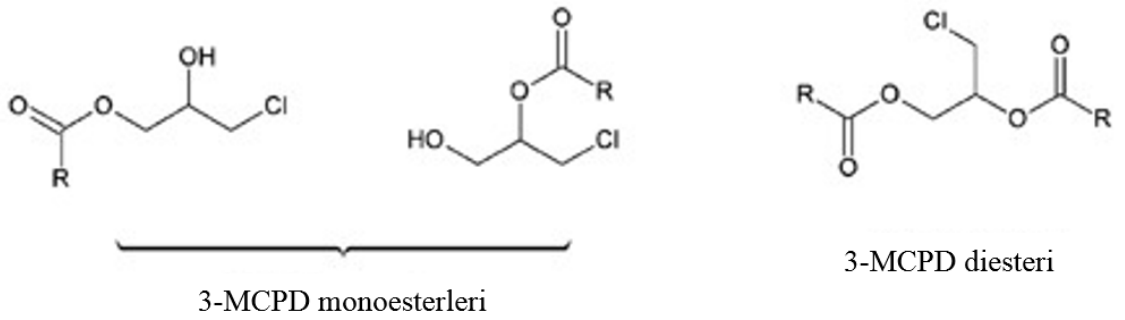
1,3-dikloropropan-2-ol (1,3-DCP)



3-kloropropan-1-ol

Şekil 2.1 Kloropropanoller ve kimyasal yapıları (Lee ve Khor 2015)

3- MCPD genellikle palmitik, oleik veya stearik yağ asitlerinin mono ve diesterleri yani 3-MCPD esterleri olarak oluşabilmektedir (Şekil 2.2). 3-MCPD esterlerinin oluşumunda klor varlığı güçlü bir etkiye sahiptir (Jedrkiewicz vd. 2016). 3-MCPD esterlerinin gastrointestinal sistemde salgılanan lipaz enzimi ile hidrolizi sonucu serbest 3-MCPD salınmaktadır (Zelinkova vd. 2006).

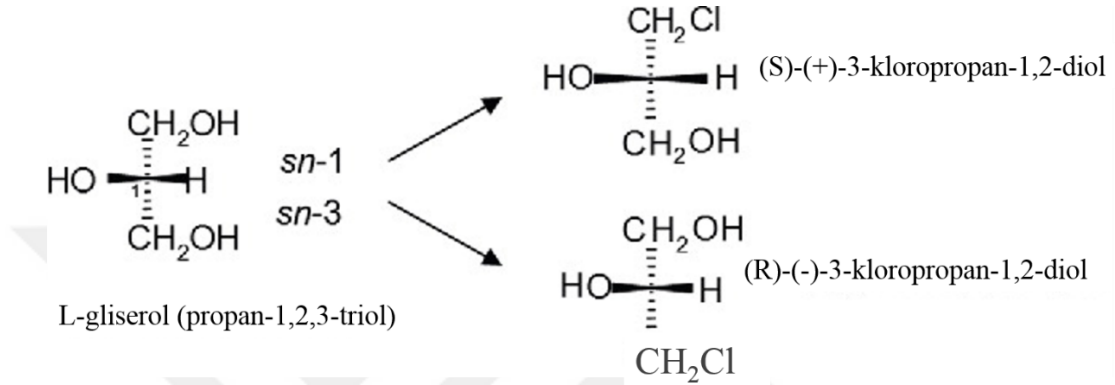


3-MCPD diesteri

Şekil 2.2 3-MCPD mono ve diesterleri (Rahn ve Yaylayan 2011)

2.2 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterlerinin Oluşumu

Kimyasal olarak 3-MCPD, bir gliserol molekülündeki hidroksil gruplarının bir tanesinin klor ile değiştirilmesiyle oluşan bir gliserol klorohidrindir. Bu reaksiyonun sonucu olarak **Şekil 2.3**'te görüldüğü gibi farklı biyolojik aktivite sergileyen iki enantiyomer oluşur (Jędrkiewicz vd. 2016).



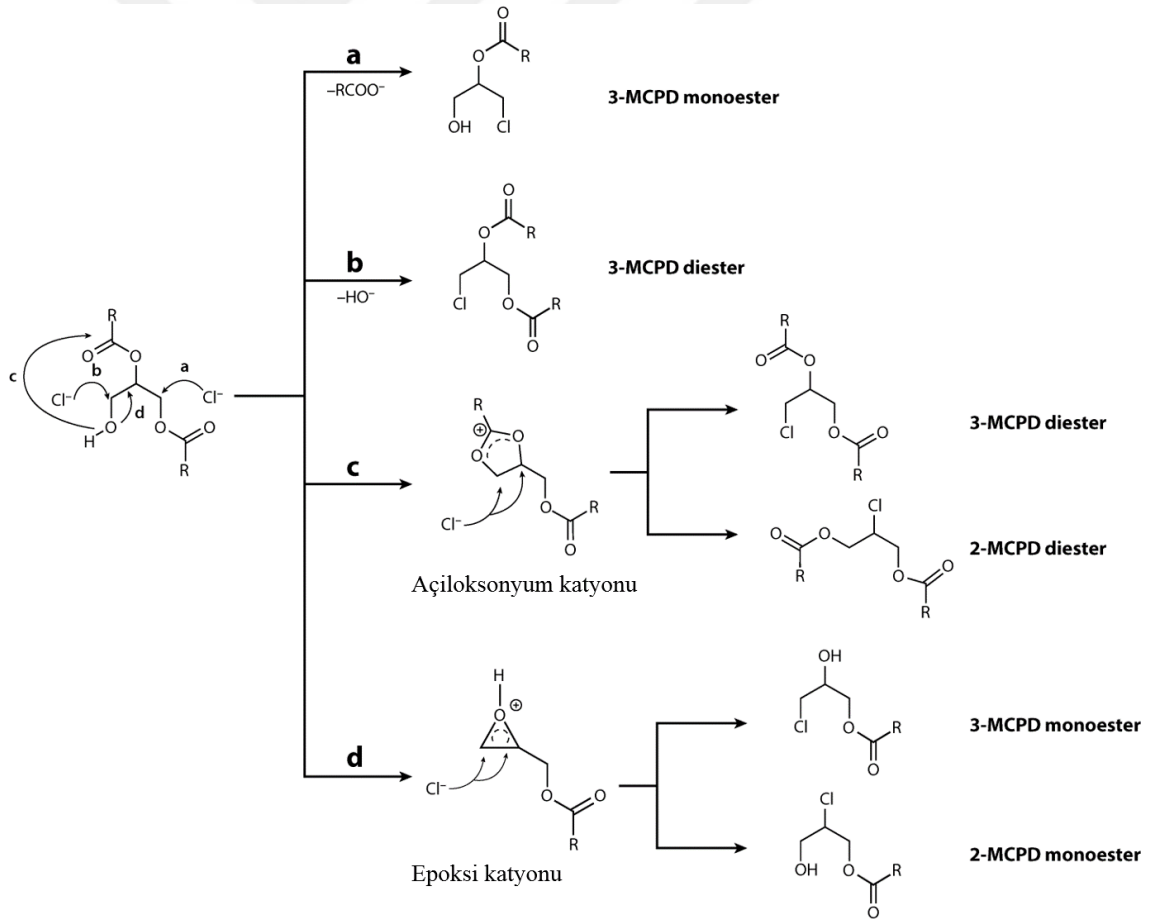
Şekil 2.3 L-gliserol molekülünden monokloropropandiol izomerlerinin oluşması (Jędrkiewicz vd. 2016)

Digliserit (DG) ve monogliserit (MG) varlığı, 3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumunda önemli etkindir. Yağlarda MG ve DG miktarının artmasıyla 3-MCPD oluşumu hızlanmaktadır. Asidik koşullarda MG ve DG'den açiloksonyum iyonları ve GE oluşabilmektedir. Açiloksonyum iyonlarının klor ile reaksiyona girmesiyle de 3-MCPD esterleri oluşabilmektedir (Bansal vd. 2010, Freudenstein vd. 2013, Zhang vd. 2013). Asit aracılı ester hidrolizi serbest 3-MCPD salınmasına yol açabilmektedir (Buhrke vd. 2011).

İnsan sağlığı açısından zararlı olan 3-MCPD esterlerinin oluşum mekanizmasını anlamak oluşumunu ve vücuttaki emilimini azaltmak açısından son derece önemli ve etkilidir. Genel olarak katyon aracılı ve serbest radikal aracılı mekanizmalar önerilmiştir (Gao vd. 2019). Rahn ve Yaylayan (2011) yaptıkları çalışmada 3-MCPD mono ve di yağ esterlerinin oluşumundaki olası dört mekanizmayı (Şekil 2.4) şu şekilde özetlemiştir: RCOO⁻ grubuna nükleofilik yapı içeren bir klor anyonunun saldırarak bu grupla yer değiştirmesi (Şekil 2.4, yol a), HO⁻ grubuna nükleofilik yapı içeren klor anyonunun saldırarak bu grupla yer değiştirmesi (Şekil 2.4, yol b), açiloksonyum katyonu

oluştuktan sonra klor anyonunun sn-3 veya sn-2 karbonlarına saldırmasıyla nükleofilik halka açma reaksiyonunun gerçekleşerek 3-MCPD veya 2-MCPD diesterlerinin oluşması (Şekil 2.4, yol c), epoksi halka oluşuktan sonra klor anyonunun sn-3 veya sn-2 karbonlarına saldırmasıyla nükleofilik halka açma reaksiyonunun gerçekleşerek 3-MCPD veya 2-MCPD monoesterlerinin oluşmasıdır (Şekil 2.4, yol d).

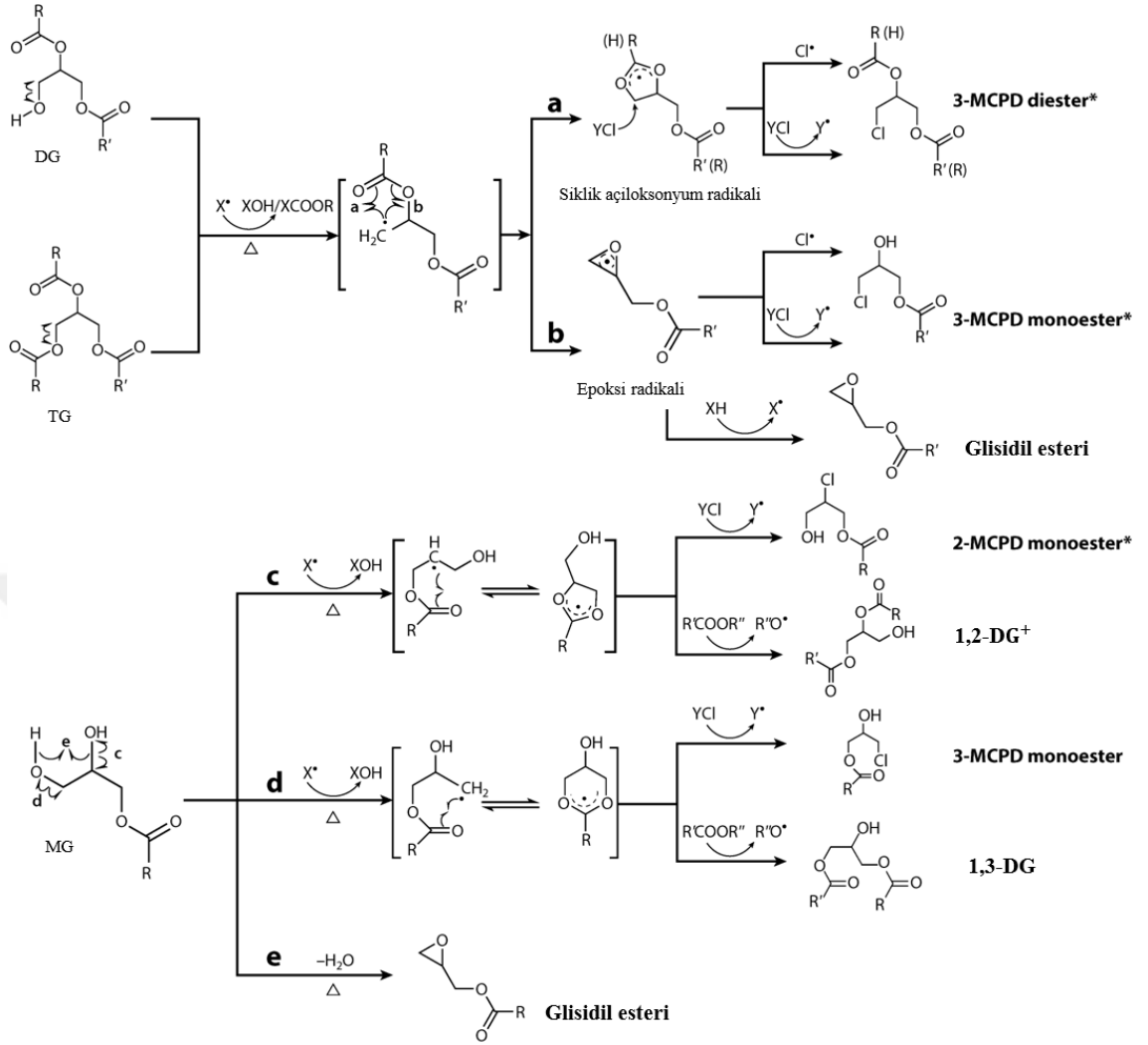
Düşük nem, yüksek sıcaklık koşullarında DG gruplarının 3-MCPD diester oluşumu için serbest radikal mekanizması ile ilgili ilk çalışmayı yapan Zhang vd. (2013) serbest radikal aracılı bir mekanizma göstermişlerdir (Şekil 2.5). Çalışmada serbest radikal mekanizmasının doğrulanması amacıyla DG'nin 120 ve 240°C'de klor eklenerek reaksiyona sokulmasıyla 3-MCPD diesterlerinin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca siklik açiloksonyum serbest radikali de tespit edilmiştir.



Şekil 2.4 Katyon aracılı 3-MCPD ester oluşum mekanizması (Gao vd. 2019)

Zhang vd. (2015a) yaptığı çalışmada yine düşük nem, yüksek sıcaklık koşullarında trigliseritlerin (TG) siklik açiloksonyum veya bir GE radikal ürünü aracılığıyla 3-MCPD esterlerinin oluşumunun olası mekanizmalarını bildirmiştir (Şekil 2.5). Çalışmanın sonuçlarına göre Fe^{+2} ve Fe^{+3} serbest radikal oluşumunu uyararak TG'den 3-MCPD ve GE oluşumunu katalizlemiştir. Zhao vd. (2016) MG'den 3-MCPD ester oluşumu için reaksiyon mekanizması bildirmiştir ve 3-MCPD ve 2-MCPD esterlerinin bir arada bulunmasını ilk kez serbest radikal ara ürünlerinin siklik açiloksonyum içermesinden kaynaklı olabileceğini önermiştir.

Şekil 2.5'te görüldüğü gibi üst kısım TG ve DG'den siklik açiloksonyum (Şekil 2.5, yol a) ve epoksi (Şekil 2.5, yol b) serbest radikali aracılığıyla olası 3-MCPD diesteri, 2-MCPD monoesteri ve GE oluşumunu, alt kısım ise MG'den siklik açiloksonyum serbest radikal aracılığıyla (Şekil 2.5, yol c ve d) 2-MCPD ve 3-MCPD esterlerinin mono ve diesterleri, 1,2-DG, 1,3-DG oluşumunu ve H_2O molekülünün serbest radikal aracılı kaybıyla (Şekil 2.5, yol e) GE oluşumunu göstermektedir.



Şekil 2.5 3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve GE'nin serbest radikal aracılı oluşum mekanizması (Gao vd. 2019)

(X: Lipit, lipit oksit vb., Y: H, Cl, C_6H_5Cl , Na, K, $FeCl_3$, $FeCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$ vb., *: 3-MCPD ve 2-MCPD esterlerinin olası oluşumu, +: 1,2 ve 1,3-DG'lerin oluşumu)

Kısacası 3-MCPD esterlerinin oluşum mekanizmalarının (MG, DG ve TG'den katyon veya serbest radikal aracılı) belirlenmesi nem içeriği, sıcaklık, katalizör varlığı, asitlik ve klor bileşiklerinin türüne bağlıdır (Gao vd. 2019).

Yuan vd. (2022) kızartma yağının oksidasyonu ve hidrolizinin MCPD esteri oluşumu üzerindeki etkilerine çalışmış ve bazı yağ çeşitlerinin (soya, ayçiçek, mısır, palm, kanola, yer fıstığı yağı) ısı uygulanmadan önceki 3-MCPD içeriklerini ölçmüştür.

Çalışmaya göre palm yağı 3-MCPD içeriğinin (7.91 ± 0.84 mg/kg) en yüksek, ayçiçek yağı 3-MCPD içeriğinin (0.42 ± 0.05 mg/kg) ise en düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Turan vd. (2019) yaptığı çalışmaya göre kızarmış mayalı hamurda kızartma sıcaklığı ve süresinin arttıkça 3-MCPD ester miktarının arttığı görülmüştür. 200°C kızartma yağında 5 dakika süre ile yapılan kızarmış hamurların 3-MCPD ester miktarı 55 µg/kg, serbest 3-MCPD miktarı 50.97 µg/kg iken 160°C sıcaklığındaki kızartma yağında 5 dakika ile yapılan kızartmaların 3-MCPD ester miktarı 14.11 µg/kg, serbest 3-MCPD miktarı ise 17.15 µg/kg olmuştur.

Kamikata vd. (2019) 3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve GE'nin zeytinyağı ve yağ karışımlarında (ayçiçek, zeytinyağı, kanola, soya vb. bitkisel yağlar) bulunması ve kalite parametreleri ile korelasyonu üzerine çalışmış ve 76 numuneyi incelemişlerdir. Sızma zeytinyağında genel olarak 3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve GE tespit edilememiştir. Rafine zeytinyağında 3-MCPD esterleri 0.28-3.77 mg/kg, 2-MCPD esterleri 0.17-1.91 mg/kg, GE 1.88 mg/kg tespit edilmiştir. Yağ karışımlarında ise 3-MCPD esterleri 0.18-0.61 mg/kg, GE 0.31-1.84 mg/kg arasında tespit edilmiş, 2-MCPD esterleri tespit edilmemiştir. Sızma zeytinyağı üretiminde yüksek sıcaklık olmadığından 3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve GE'nin tespit edilememesi beklenir. Kamikata vd. (2019)'ye göre sızma zeytinyağında bu esterlerin tespit edilmesi taşıyıcının göstergesi olarak kullanılabilir.

2.3 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterlerinin Sağlık Üzerine Etkisi, Toksikolojik Çalışmalar ve Yasal Düzenlemeler

Avrupa Birliği Gıda Bilimsel Komitesi 2001 yılında yayınladığı rapora göre 3-MCPD'nin genotoksik olmayan bir kanserojen olarak kabul ettiğini ve maksimum tolere edilebilir günlük alım miktarı (TDI) 2 µg/kg vücut ağırlığı olması gerektiğini açıklamıştır (Anonymous 2001). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 2012 yılında 3-MCPD'yi insanlarda olası karsinojen (Grup 2B) olarak sınıflandırmıştır (Anonymous 2012). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) 2013 yılında yayınladığı rapora göre kronik oral maruziyet ile 3-MCPD toksisitesi için ana hedef

organ; adenom ve mikrovasküler düzeyde hasar oluşmasıyla sonuçlanan böbrektir. Ayrıca, farelerde bağışıklık fonksiyonlarını baskıladığı ve doğurganlığı azalttığı tespit edilmiştir. EFSA 2014 yılında 3-MCPD esterlerinin sindirim sırasında serbest forma geçtiğini ve 3-MCPD ile aynı toksisiteye sahip olduğunu bildirmiştir (Anonymous 2014). 2016 yılında EFSA “Gıda Zincirindeki Kontaminasyonlar Paneli (CONTAM)” düzenlemiş ve 2-MCPD, 3-MCPD ve GE hakkında yayınladığı raporda, bitkisel yağların rafinasyonu sırasında yüksek sıcaklığa maruz kaldıklarında oluşan bu bileşiklerin kanserojen bileşikler olduğunu ve TDI miktarının 0.8 µg/kg vücut ağırlığı değerine düşürülmesi gerektiğini bildirmiştir. Gıda Katkı Maddeleri FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA) ve EFSA tekrar risk değerlendirmesi yaparak TDI miktarını 2 µg/kg vücut ağırlığı değerine yükseltmiştir (Anonymous 2016, Anonymous 2018).

3-MCPD esterleri ve GE’nin bebek mamalarında rastlandığını bildiren Almanya Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü (BfR), bebeklerin çoğunlukla bu mamalarla beslenmesinden dolayı bu bulaşanlara karşı daha hassas olabileceğini belirtmiştir (Anonymous 2007). Avrupa Birliği 2020 yılında 3-MCPD maksimum limitleri revize etmiştir ve 1 Ocak 2021 tarihinden itibaren geçerli kılmıştır. Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi özel olarak bebek ve küçük çocukların tüketimine yönelik olan gıdaların limitleri diğer gıdalara göre daha düşük olarak belirlenmiştir (Anonymous 2020). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği’nde, Avrupa Birliği’nin 2020 yılındaki düzenlemesinde olduğu gibi soya sosu ve hidrolize bitkisel proteinin 3-MCPD maksimum limiti 20 µg/kg olarak verilmiştir (Anonim 2011).

Çizelge 2.1 Avrupa Birliği'nin 2020 yılında belirlediği bazı gıdaların 3-MCPD maksimum limitleri

Gıda Maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
Hindistan cevizi, mısır, kanola, ayçiçek, soya, palm ve zeytinyağı ve bu yağların karışımından oluşan katı ve sıvı yağlar	1250
Diğer bitkisel yağlar, balık yağları	2500
Bebek maması ve bebek ve küçük çocuklar için üretilen tahıl bazlı gıda üretime yönelik bitkisel yağlar ve katı yağlar	750
Bebek maması, devam maması, bebeklere ve küçük çocuklara yönelik özel tıbbi amaçlı gıdalar, küçük çocuk maması (toz)	125
Bebek maması, devam maması, bebeklere ve küçük çocuklara yönelik özel tıbbi amaçlı gıdalar, küçük çocuk maması (sıvı)	15

Yapılan çalışmalar 3-MCPD esterlerinin karaciğer ağırlığının değişmesi, inflamutuar hücre inflasyonu ve karaciğer yağ birikimi gibi sorunlara yol açan potansiyel hepatoksisiteye sahip olabileceğini göstermektedir (Gao vd. 2019). Liu vd. (2012) İsviçre farelerinde 3-MCPD mono ve dipalmitik esterlerin akut oral toksisitesi üzerine bir çalışma yapmıştır ve bu çalışma sonucunda 3-MCPD monopalmitik esterlerinin LD₅₀ değeri (medyan ödürücü doz) 2676.81 mg/kg vücut ağırlığı, 3-MCPD dipalmitik esterlerinin LD₅₀ değeri ise 5000 mg/kg vücut ağırlığından yüksek çıkmıştır. Bu da 3-MCPD monoesterlerinin diesterlere göre daha yüksek oral akut toksisitesiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışmada 3-MCPD esterleri potansiyel akut böbrek ve testis toksisitesi de göstermiştir. Liu vd. (2016) yaptığı bir diğer çalışmada ise 3-MCPD'nin 1-stearik, 1-oleik, 1-linoleik, 1-linoleik-2-palmitik ve 1-palmitik-2-linoleik asit esterlerini sentezleyerek toksisite üzerindeki etkilerini incelemiş ve İsviçre

farelerinde akut oral toksisitelerini değerlendirmiştir. 3-MCPD'nin 1-stearik, 1-oleik, 1-linoleik, 1-linoleik-2-palmitik ve 1-palmitik-2-linoleik asit esterlerinin LD₅₀ değeri sırasıyla 2973, 2081, 2016, 5000, >5000 mg/kg vücut ağırlığı olmuştur. LD₅₀ değerinin bu şekilde farklı çıkması 3-MCPD esterlerinin toksisitesinin yağ asitlerinin doymamışlık derecesine, zincir uzunluğuna, ikame sayısı ve konumuna göre farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada ilk kez farelerde timüs ve akciğer toksisiteleride gözlemlenmiştir. Ayrıca, 3-MCPD esterlerinin *in vivo* olarak serbest 3-MCPD salınımını gerçekleştirerek beynin normal işlevlerini bozabileceğini bildirmişlerdir.

Yenilebilir katı ve sıvı yağlarda 3-MCPD esterleri miktarının azaltılmasına yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. 3-MCPD esterlerinin azaltılması ya rafinasyon sırasında kritik reaktanların ham maddeden çıkarılmasıyla ya rafinasyon proses koşullarının değiştilmesi ya da rafinasyon sonrasında 3-MCPD esterlerinin çıkarılmasıyla mümkün olabilir. Bu işlemlerin yağın kalitesini ne derece etkileyeceği önemlidir (Matthaus vd. 2011).

Ramli vd. (2011) fiziksel rafinasyon sırasında degumming (yapışkan maddelerin uzaklaştırılması) ve ağartma işlemlerinin 3-MCPD esterlerinin oluşumdaki etkilerini ham palm yağı kullanarak araştırmıştır. 3-MCPD esterlerinin oluşumunda yüksek sıcaklığın yanında asitliğin de etkili olduğunu belirtmişlerdir. Deodorizasyon sırasında yüksek sıcaklık ve sredeki değişiklikler dikkate alındığında, ağartma ve deodorizasyon öncesinde degumming asit dozunun ayarlanması ve uzaklaştırılmasının 3-MCPD esterleri oluşumunu azaltmanın yolları olduğunu belirtmişlerdir (Ramli vd. 2011). Doğal ağartma killeri ve daha nötr pH'lı asitle aktiveştirilmiş killerin, 3-MCPD esterlerinin oluşumunu azalttığı düşünülmektedir.

2.4 Gıda Emülsiyonları

Emülsiyon, birbiri içerisinde karışmayan genellikle yağ ve su olan 2 sıvıdan birinin diğeri içinde küçük damlacıklar halinde dağılmasıyla oluşur. Emülsiyonlar sulu fazda dağılımiş yağ damlacıklarından oluşuyorsa (dondurma, mayonez gibi) su içinde yağ

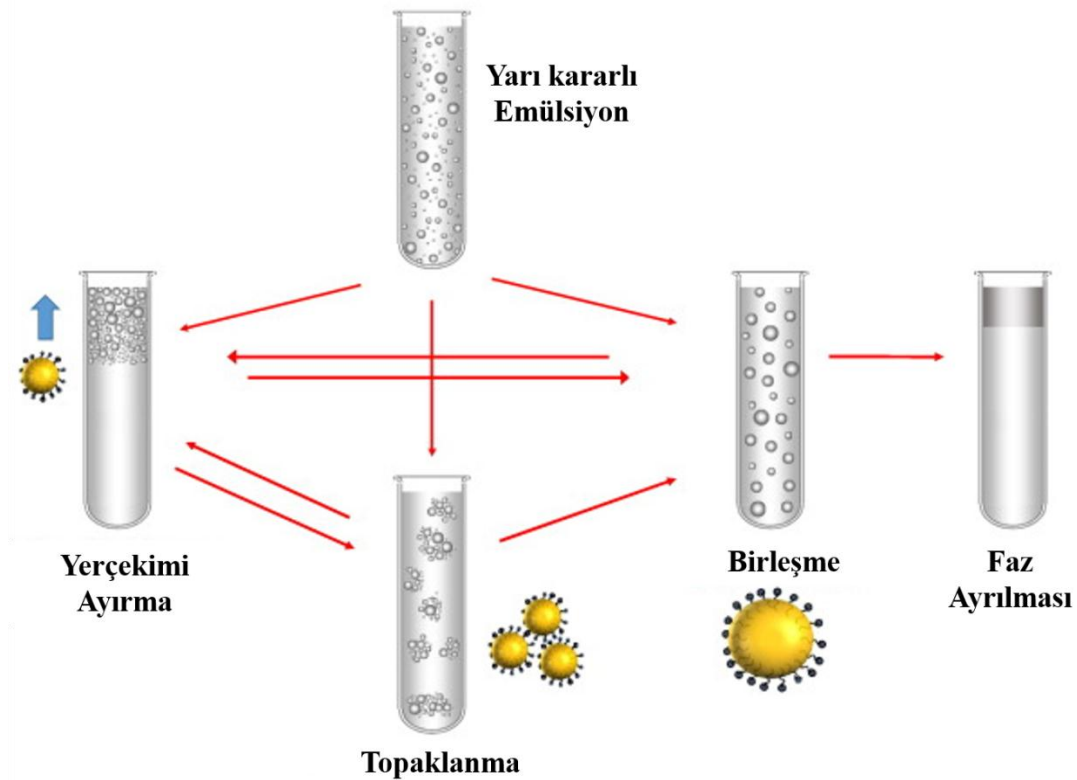
emülsiyonu (Y/S), su damlacıklarının bir yağ fazında dağılmasıyla oluşuyorsa (margarin gibi) yağ içinde su emülsiyonu (S/Y) şeklinde kategorize edilmektedir. Bu geleneksel emülsiyonların dışında yağ içinde su içinde yağ emülsiyonları gibi çoklu emülsiyonlar da üretilebilmektedir (McClements ve Decker 2000, McClements 2007). Emülsiyonlar 1-100 nm parçacık boyutuna sahipse nanoemülsiyon, 100-1000 nm parçacık boyutuna sahipse mikroemülsiyon, 0.5-100 µm parçacık boyutuna sahipse makroemülsiyon olarak sınıflandırılır (Santana vd. 2013).

Emülsiyonlar içerdikleri yağ ve suyun farklı yoğunluklara sahip olması ve bu fazlar arasındaki yüzey alanını artırmak için gereken enerjiden dolayı termodinamik olarak kararsız yapılardır. Bu yüzden daha kararlı emülsiyonlar oluşturabilmek için emülgatör eklenmeli ve homojenizasyon süreci kontrol edilmelidir (McClements 2004). Emülgatörler, başlıca emülsiyon oluşumunu kolaylaştırdığı ve emülsiyon stabilitesini artırdığı için kullanılan, yağ ve su arasındaki ara yüzey gerilimini azaltan, damlacıkların birleşmesini ve topaklanmasını önleyen amfifilik bileşiklerdir. Gıda endüstrisinde kullanılabilecek proteinler (kazein, peynir altı suyu proteini gibi), polisakkaritler (gam arabik, pektin gibi), fosfolipitler (lesitin gibi) ve yüzey aktif maddeler dahil olmak üzere doğal ve yapay emülgatörler vardır. Tüketicilerin son zamanlarda daha sağlıklı ve doğal yaşamak istemeleri ve alışkanlıklarının bu yönde değişmesiyle gıda endüstrisi sentetik emülgatör yerine doğal alternatiflerle değiştirilmesi ve bu yönde yeni ürünler üretilmesini talep etmektedir (Jafari vd. 2007, Öztürk ve McClements 2016). Yağ ve su arasındaki ara yüzey alanının artması, olumsuz koşullar altında bileşenlerin bozulmasına karşı koruyabilir, adsorpsiyon ve biyoyararlanımını değiştirebilir (Santana vd. 2013).

Birçok araştırma gıda emülsiyonlarının biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımını artırdığını göstermiştir. Resveratrol, kuersetin ve yağda çözünen vitaminler gibi lipofilik mikrobelerin biyoyararlanımını artırmak için nanoemülsiyonlarda lipit damlacıkları kapsüllendiğinde; resveratrol daha yavaş ve daha sürekli bir salınım göstererek hedef bölgelere daha iyi ulaşması sağlanmış, kuersetinin biyoyararlanımını 2 kat artırmıştır. Omega-3 yağ asitleri açısından zengin yağlar nanoemülsiyonlara dahil edildiklerinde emilim için daha fazla yağ asitlerinin üretildiği görülmüştür. Daha küçük parçacık boyutuna sahip emülsiyonlar üretildiğinde β-karotenin biyoerişilebilirliğinin de arttığı

bildirilmiştir. Uzun zincirli trigliseritleri içeren yağ ile yapılan nanoemülsiyonların *in vitro* sindirimi sırasında oluşan misellerdeki E vitamini miktarı orta zincirli trigliseritleri içeren yağ ile yapılan emülsiyonlardan daha fazla olmuştur (Donsi vd. 2011, Pool vd. 2013, Sugasini ve Lokesh 2013, Yang ve McClements 2013, Joye vd. 2014, Yi vd. 2014).

Gıda emülsiyonlarının kararsızlığından Şekil 2.6’da görüldüğü gibi topaklanma, birleşme, yerçekimi ayırma, faz ayrımı gibi mekanizmalar sorumludur. Parçacıklar arasındaki van der Waals, hidrofobik gibi çekici kuvvetlerin ve sterik, elektrostatik gibi itici kuvvetlerden fazla olduğunda topaklanma eğilimi gösterir ve böylece daha büyük partiküller oluşarak emülsiyonun daha hızlı kremalaşmasına yol açar. Bu durum emülgatör kullanılmasıyla iyileştirilebilir. Topaklanmada olduğu gibi birleşmede de iki veya daha fazla damlacığın çekici kuvvetleri itici kuvvetlerden fazla olduğunda parçacıklar birleşme eğiliminde olurlar (McClements ve Jafari 2018).



Şekil 2.6 Suda yağ emülsiyonunun fiziksel olarak kararsız hale gelmesine yol açan 4 mekanizma (McClements ve Jafari 2018)

Emülsiyonlar düşük ve yüksek enerjili olarak iki şekilde üretilmektedir. Kendiliğinden emülsiyon oluşması ve faz inversiyon sıcaklığı yöntemi düşük enerjili emülsiyonlaştırmada en çok kullanılan yöntemlerdir. Düşük enerjili yöntemler daha az enerji tüketmelerine rağmen yüksek miktarlarda sentetik sürfaktan kullanılması gerekliliği ve uygun yağ tipi seçimindeki sınırlamadan dolayı gıdalarda fazla kullanılmazlar. Yüksek enerjili emülsiyonlaştırma su ve yağ fazının bileşimine, emülgatör konsantrasyonuna, cihazların tasarımına, işlem süresine, enerji girişine bağlı olan farklı özelliklerde gıda sınıfı emülsiyonlar üretmek için kullanılmaktadır. Yüksek enerjili emülsiyonlaştırma yöntemi ile emülsiyon üretmek için genellikle yüksek

emülsiyonlardaki olası değişiklikleri göstermektedir (Singh vd. 2009). basınçlı homojenizatör, mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonik homojenizatör kullanılır (Jafari vd. 2008, McClements ve Rao 2011, Santana vd. 2013, Saffarionpour 2019).

Biyoaktif bileşikler insan sağlığına faydalı nutrasötiklerdir ve biyoyararlanımı artırmak için emülsiyonlar gibi dağıtım sistemlerine dahil edilirler. Emülsiyonların gıda endüstrisindeki uygulamalarının fazla olması nedeniyle biyoaktif bileşiklerin korunması için bu dağıtım sistemlerinin kullanılması uygundur (Shao vd. 2020).

2.5 Sindirim ve Emilim

Gastrointestinal sistem (GIS); gıdaların ağızdan vücuda alınarak anüse kadar ilerlemesini, gerekli enzim ve hormonların sentez ve salınımını yaparak besinlerin vücudumuzda kullanılabilir hale gelmesini, besinlerin sindirimini, emilimini ve atılımını sağlar. Sindirim sisteminde ağız, tükürük bezi, yemek borusu, mide, pankreas, safra kesesi, ince bağırsak, kalın bağırsak gibi organlar görev almaktadır. Mekanik ve kimyasal olmak üzere sindirim iki şekilde gerçekleşir. Ağızda çiğneme ve mide, bağırsak hareketleri ile mekanik sindirim gerçekleşir. Kimyasal sindirim ise mekanik olarak parçalanan besinlerin tükürük, mide asitleri, safra, karaciğer, pankreas ve bağırsak enzimleri ile değişime uğradıktan sonra bağırsak epitelinden dolaşıma geçebilecek forma dönüşüm sürecidir (Yazıhan 2017).

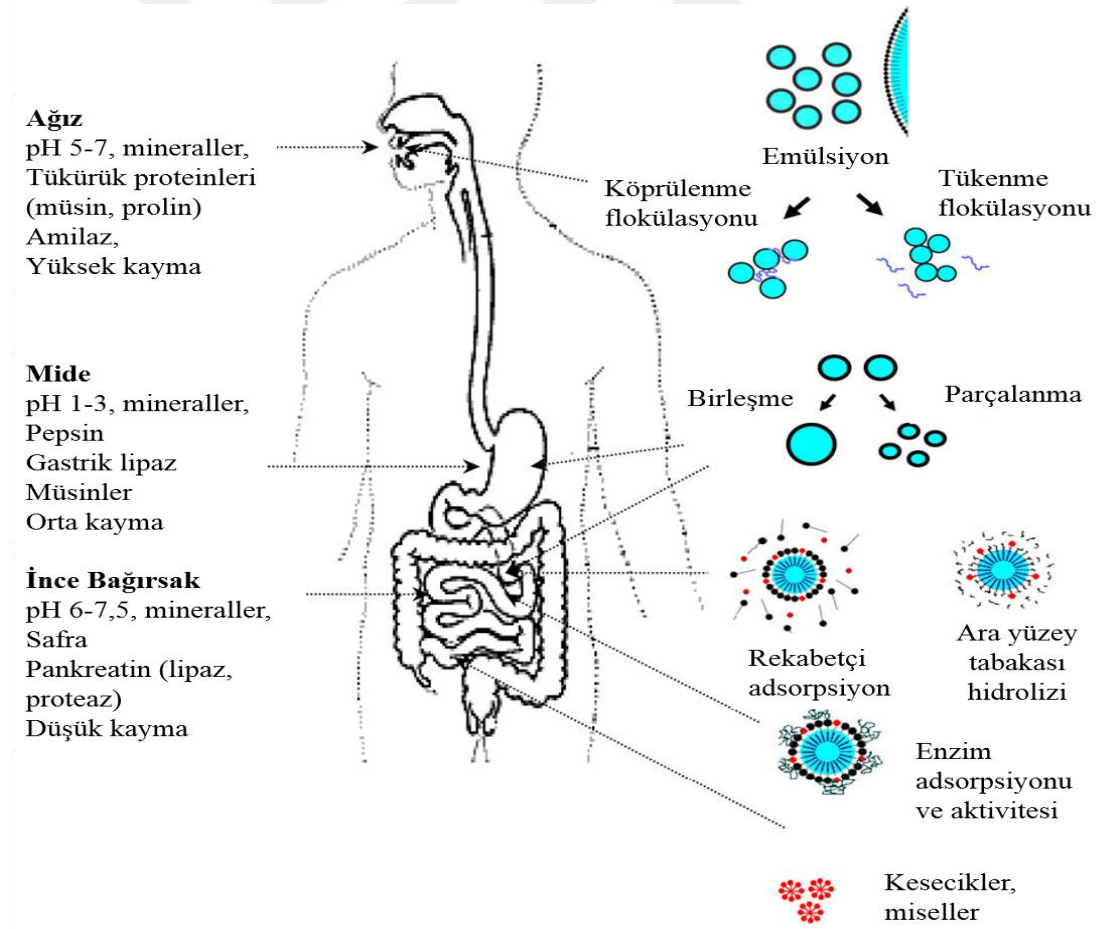
Gıdaların bileşimi, yapısı ve özellikleri, ağızda meydana gelen karmaşık fizikokimyasal, fizyolojik ve biyokimyasal süreçlere bağlı olarak yutma ve çiğneme sırasında önemli ölçüde değişir. Gıda tükürük ile karıştırıldığında pH, iyonik güç ve sıcaklığı değişir. Tükürük, açlık sırasında pH 5.5-6.1 arasındayken gıda ağıza alınarak uyarıldığında pH 7-8 arasında olur. Tükürük dakikada yaklaşık 0.3-0.7 mL salgılanır ve su (%99), mineraller (<%1) ve protein (%0.1-0.2) içerir. Ağızda seyreltme ve karıştırma, matris dağılımı, faz geçişleri, parçalanma ve birleşme gibi işlemler gerçekleşir (McClements vd. 2009).

Bolus (gıdanın ağızda çiğnenmesi sonucu ortaya çıkan karışım) yutulduktan sonra hızla yemek borusu ve mideye geçer. Mide enzimleri, mineraller ve çeşitli yüzey aktif bileşikler içeren asidik sindirim suları ile karıştırılır ve ayrıca midenin kasılmaları nedeniyle bolus mekanik karıştırmaya maruz kalır (McClements vd. 2009). Midede pH ortalama 1-3 civarındadır. Midenin yüksek asitliği, enzim aktivasyonu, gıda bileşenlerinin hidrolizi ve bakterilerin öldürülmesi gibi önemli fizyolojik rol oynar. Mideden salgılanan HCl gastrointestinal sistemde önemli bir role sahiptir. HCl, pepsinojenin pepsine dönüşümü ve pepsinin aktivasyonunda, Ca^{++} ve Fe^{++} gibi mineralleri redükte ederek bağırsaktan emiliminin kolaylaştırılmasında, mikroorganizmaların öldürülmesinde rol alır. Midede, seyreltme, karıştırma, parçacık parçalanması ve birleşmesi, rekabetçi adsorpsiyon, kimyasal sindirim (gastrik lipaz) işlemleri gerçekleşir. (McClements vd. 2009, Yazıhan 2017).

İnce bağırsak, sindirim ve emilimin birlikte gerçekleştiği sindirim sisteminin en önemli organıdır ve üç bölümden oluşmaktadır: duodenum (onikiparmak bağırsağı), jejunum ve ileum. Bağırsak iç yüzeyinde villus adı verilen milyonlarca çıkıntı emilimin gerçekleşmesini sağlar. Kimüs (mide ve bağırsaklardan salgılanan sindirim salgıları ile kısmen sindirilerek bulamaç haline gelmiş yoğun gıda kütlesi) mideden duodenuma aktarılır ve burada sodyum bikarbonat, safra tuzları, fosfolipitler ve karaciğer, pankreas ve safra kesesi tarafından salgılanan enzimler ile karıştırılır. Safra tuzları, konsantrasyonlarına bağlı olarak pankreatik lipazın aktivitesini artırabilir veya inhibe edebilir. Sodyum bikarbonat ise pankreas enzimlerinin en verimli şekilde çalıştığı duodenumda pH' nın midede yüksek asidik (pH 1-3) seviyesinin nötre (pH 5.8-6.5)

yükselmesini sağlar. Safra tuzları, su içinde yağ emülsiyonlarına adsorbe olan yüzey aktif moleküllerdir. Bu nedenle, mekanik karıştırma sırasında lipid damlacık deformasyonunu ve parçalanmasını kolaylaştırabilir, lipid damlacıklarını topaklanmaya karşı stabilize edebilir ve hidrofobik materyalleri çözündürüp taşıyabilen miseller oluşturabilirler. Jejunumun birincil fonksiyonu emilimdir; şeker, amino asit ve yağ asitlerinin emildiği bölgedir. İleum, jejunum tarafından emilmeyen (B12 vitamini ve safra asiti gibi) besinlerin emildiği kısımdır (Aktümsek 2001, McClements vd. 2009, Rogers 2011, Anonim 2021).

Gıda emülsiyonlarının ağız içine alındıktan sonra ve gastrointestinal sistemden geçerken yapısal özelliklerinin nasıl değiştiği hakkında çok az şey bilinmektedir. Şekil 2.7’de gastrointestinal (GI) sistemden geçerken



Şekil 2.7 Gastrointestinal sistemden geçerken emülsiyonlardaki olası değişikliklerin şematik gösterimi (Singh vd. 2009)

İnce bağırsakta emilmeyen içerik; çekum, kolon, rektum ve anal kanal bölümlerinden oluşan kimyasal sindirimin ve villusun olmadığı kalın bağırsağa geçer. Pratikte kalın bağırsak denildiğinde kolon anlaşılmaktadır. Kolonun ana fizyolojik işlevleri, su ve elektrolitlerin emilmesi, polisakkaritlerin ve proteinlerin fermentasyonu, safra tuzlarının tekrardan emilmesi, dışkı maddesinin oluşması ve depolanıp atılmasıdır (McClements vd. 2010, Çomak Göçer vd. 2016). Normal olarak, lipitler midede ve ince bağırsakta tamamen sindirilir, ancak özellikle özel olarak tasarlanmış emülsiyon bazlı taşıyıcı sistemlerinde olan sindirilmemiş bazı lipitler, üst GI yolundan geçebilir. Sindirilemeyen bir lipit fazı (mineral yağ veya alkan gibi) kullanılarak hazırlanan su içinde yağ emülsiyonlarındaki damlacıklar kolona ulaşabilir. Kolon, üst GI kanalında sindirilmeyen gıda bileşenlerini, örneğin diyet lifleri, proteinler ve peptitleri fermente edebilen çok sayıda farklı anaerobik bakteri türü içerir. Bu nedenle, diyet lifi matrisleri içinde kapsüllenmiş herhangi bir lipit ancak bakteriyel fermentasyon nedeniyle kolona ulaştıktan sonra salınabilir. Bazı sindirilmemiş gıda bileşenlerinin, kolonik mikrobiyotanın normal metabolik aktivitesine müdahale edebileceği ve bunun da alt GI sisteminin ve hatta tüm vücudun sağlık durumunu değiştirebileceği ileri sürülmüştür. Gıda bileşenlerinin normal sindirilebilirliğini değiştirebilecek herhangi bir dağıtım sistemi tasarlarken bu faktörü dikkate almak önemlidir (McClements ve Li 2010).

İnsan vücuduna besinlerin alımı, sadece bir gıdadaki besin maddesinin miktarına değil, aynı zamanda biyoyararlanımına da bağlıdır (Schonfeldt vd. 2016). Biyoyararlanım ve biyoerişilebilirlik farklı anlamlar taşıyan terimlerdir. Biyoerişilebilirlik, gastrointestinal lümen (boşluk) içindeki gıda matrisinden salınan ve böylece bağırsak emilimi için uygun hale getirilen bir bileşiğin fraksiyonudur. Biyoyararlılık ise, normal fizyolojik fonksiyonlarda kullanmak ve depolamak için vücuda alınan besinin erişilebilir kısmıdır. Biyoerişilebilirlik, sadece sindirilmiş gıda matrisinin bileşiminden değil, aynı zamanda matrisin pH, sıcaklık ve dokusu gibi fizikokimyasal özelliklerden de etkilenir (Parada ve Aguilera 2007, Rein vd. 2012). Gıda veya ilaç matrislerinden zayıf salınım, gastrointestinal sıvılarda düşük çözünürlük, gastrointestinal sistemde metabolizma veya kimyasal dönüşüm, düşük epitel hücre geçirgenliği gibi nedenlerden dolayı lipofilik maddelein oral biyoyararlanımı sınırlı olabilir. Bu ajanların biyoyararlanımı, özellikle gastrointestinal sistem içinde salınımlarını, çözünmelerini, taşınmasını, metabolizmasını

ve emilimini kontrol eden gıda matrisleri tasarlanarak geliştirilebilir (McClements vd. 2014). Biyoaktif bileşenlerin ve ilaçların biyoyararlanımı ve biyoerişebilirliğinin iyileştirilmesi için çeşitli yaklaşımlar değerlendirilmiştir. Bunlar arasında moleküllerin çözünürlüklerini veya emilim yerlerini geliştirmek için teknolojik ve kimyasal modifikasyonları, koloidal sistemlerin (miseller ve veziküller) tasarımı ve nanosistemlerin (nanopartiküller) kullanımı bulunmaktadır (Yang vd. 2008).

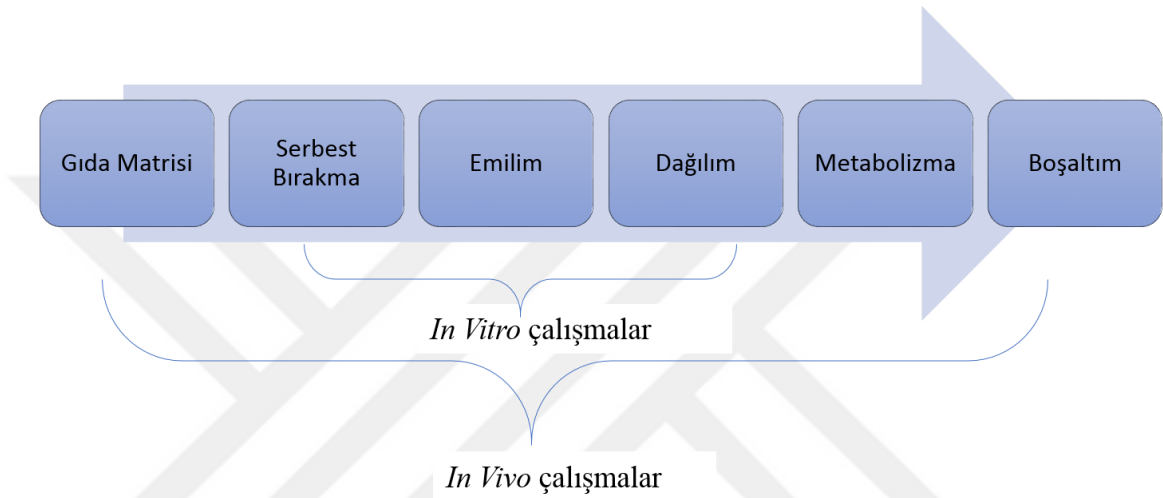
Gastrointestinal sindirim sistemini simüle etmek için statik ve dinamik modeller kullanılmaktadır. Sindirim sistemindeki işlemlere maruz kalması istenen numunenin genellikle hareketsiz olduğu *in vitro* modeller, hidrasyon, karıştırma ve kayma kuvveti gibi çeşitli fiziksel işlemlerin göz ardı edildiği statik modellerdir. *In vivo* modeller ise dinamik modellerdir ve fiziksel, mekaniksel işlemlerin yanında zamana bağlı değişiklikler de simüle edilmektedir (Chen vd. 2011).

In vitro sindirim modellerinde oluşan herhangi bir fizikokimyasal değişikliğin doğasını ve oranını aydınlatmaya yardımcı olmak için bileşim, mikroyapı, lipit parçacık boyutu dağılımı, lipit parçacık yükü, ara yüzey bileşimi, genel reoloji, spesifik bileşenlerin difüzyon katsayıları ve spesifik bileşenler arasındaki bağlanma etkileşimleri işlem sırasında belirli yerlerden örnek alarak ölçülebilir (McClements vd. 2009, Chen vd. 2011). İnsan sindirim sisteminde meydana gelen karmaşık fizikokimyasal ve fizyolojik süreçleri doğru bir şekilde taklit etmek son derece zordur. Bu nedenle, *in vitro* çalışmaların hayvanlar ve insanlar kullanılarak *in vivo* çalışmalarla birleştirilmesi tavsiye edilir. Ek olarak, belirli bir numuneyi test etmek için kullanılan herhangi bir *in vitro* yöntemin güvenilir olmasını sağlamak için *in vitro-in vivo* korelasyonların kurulması önemlidir (McClements ve Li 2010).

In vitro çalışmalar diğer yöntemlere göre daha kolay, hızlı ve güvenilirdir. Bunun yanı sıra *in vivo* çalışmalarda karşılaşılan etik sorunlar bu çalışmalarda olmadığı için *in vitro* çalışmalar günümüzde çok tercih edilmektedir. Ayrıca, *in vivo* çalışmalarda kemirgenlerin kullanımında biyolojik mekanizmalardaki farklılıklar, gıda alım kontrolündeki farklılıklar, enerji metabolizmaları arasındaki farklılıklardan kaynaklı

olarak sınırlamalar vardır. Örneğin, sıçanlarda safra kesesi olmaması, lipitlerin sindirimi ve emilimini anlamada büyük bir fark yaratır (McClements vd. 2009, Chen vd. 2011).

Biyoyerişilebilirlik genellikle Şekil 2.8’de görüldüğü gibi birkaç aşama içeren bir *in vitro* sindirim prosedürü ile belirlenir: gıda matrisinden kurtulma, sindirim koşulları sırasında dönüşüm ve bağırsak epitel hücreleri tarafından emilim (Carbonell Capella vd. 2014).



Şekil 2.8 Gıda matrisinin biyoyararlanım sürecindeki adımların şeması (Carbonell Capella vd. 2014)

2.6 3-Kloropropan-1,2-Diol Esterlerinin Sindirimi ve Emilimi

Toksinler, belli bir dozda veya belli bir zaman diliminde ağız, solunum veya deri yoluyla alındığında biyolojik sistemlerin fonksiyonlarını bozarak zararlı etkilere sebep olan maddelerdir. Doğal toksinler, mikrobiyel toksinler ve kimyasal kirleticiler gıdalarda bulunan toksik maddelerdir. Kimyasal kirliliği sıfır olan gıda olmadığı gibi her gıda maddesi de birden fazla kimyasal kirletici taşıyabilir. Anne sütü bile dikloro difenil trikloroetan, heksaklorosikloheksan ve poliklorofenibifeniller gibi klorlu bileşikler dahil olmak üzere 100’den fazla kimyasal kirlilik içerir. Alınan doza bağlı olarak her kimyasal madde zararlı etkilere sahip olabilir (Ayaz ve Yurttagül 2008). Doğal toksinler sadece insan ve hayvan sağlığı için bir risk oluşturmaz, aynı zamanda insanların sağlıklı gıdalara erişimini azaltarak gıda güvenliğini ve beslenmesini de etkiler. Gıda işlemede eğer tetikleyici şeyler var ise gıdada toksik bileşikler oluşabilir.

Örneğin; derin kızartma işleminde yanlış uygulamalar, aynı yağın birçok kez kullanımı toksik bileşik oluşmasında neden olur (Çakmak Demircigil 2011, Anonim 2018).

Toksik bileşikler için biyoerişilebilirlik, midede gıda matrisinden serbest kalan ve ince bağırsakta emilim için mevcut olan toksin miktarını ifade eder (Gonzalez Arias vd. 2012). Toksik maddeler belirli bir konsantrasyonda membranlardan geçerek etkinliklerini gösterebilirler. Alınan toksik maddenin dozuna ve absorpsiyon hızına bağlı olarak bu konsantrasyon değişir ve kan dolaşımı ile organizmaya dağılır. Toksik maddelerin emilimi; vücuda alınış (maruz kalma) yolları, maddenin konsantrasyonu, maddenin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. GI kanaldan toksik maddelerin absorbe olma hızının belirlenmesinde fiziksel özellikler önemli rol oynamaktadır. Katı toksik maddeler sindirim kanalında önce küçük granül ve partikül haline geçerler ve daha sonra bu tanecikler mide ve bağırsak sıvısında çözünerek absorbe olurlar. Toksik maddelerin membranlardan 4 çeşit geçiş şekilleri vardır: pasif difüzyon (basit difüzyon), aktif taşıma, kolaylaştırılmış difüzyon, endositoz (pinositoz) (Özyazgan 2002).

Versantvoort vd. (2004) gıdalardan kaynaklı bulaşanların biyoyararlanımının değerlendirilmesinde *in vitro* bir sindirim modelinin geliştirilmesi ve uygulanabilirliği üzerine yaptıkları çalışmada *in vitro* sindirim modeli kullanarak gıdalardan kaynaklı bulaşanların biyoerişilebilirliğini tekrarlanabilir bir şekilde belirlemenin teknik olarak mümkün olduğunu göstermiştir. Gıdalardaki azami bulaşan konsantrasyonunun düşük olması, kimüste bulunan bulaşan madde konsantrasyonlarının belirlenmesini sağlamak için çok hassas analitik teknikler gerektirebileceğine dikkat edilmesini önermişlerdir.

Seefelder vd. (2008) bitkisel yağlardaki 3-MCPD esterlerinin 3-MCPD oluşumundaki etkisini anlamak için bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada bağırsak modeli kullanarak bağırsak lipazının 3-MCPD di ve mono esterlerini *in vitro* substratlar olarak kabul edildiğini göstermiştir. 3-MCPD mono esterlerinden 3-MCPD salınımı 3-MCPD diesterlerinden salınımına göre daha hızlı olduğunu belirtmişlerdir.

Abraham vd. (2013) 3-MCPD esterlerinden 3-MCPD'nin oral biyoyararlanımını *in vivo* olarak ölçmüşlerdir. Sıçanlar üzerinde yaptıkları uygulamada 3-MCPD

konsantrasyonları kanda, çeşitli organlarda, dokularda ve bağırsak boşluğunda ölçülmüştür. Sonuçların 3-MCPD esterinin gastrointestinal kanalda enzimatik hidrolizinden 3-MCPD' nin salındığı ve kana, organlara ve dokulara dağıldığını göstermektedir. Zamanla kanda ölçülen 3-MCPD konsantrasyonlarına dayanarak biyoyararlanımın toplam nispi miktarı hesaplanmış ve 3-MCPD diesterinin uygulanmasından sonra biyoyaralanım 3-MCPD' ye göre %14 daha düşük çıkmıştır. Deneysel verilerin sınırlı olmasını da göz önünde bulundurarak risk değerlendirmesi yapıldığında GI sistemdeki 3-MCPD diesterlerin %100 hidrolizinin varsayılmasının doğru olacağını aktarmışlardır. Bu yüzden 3-MCPD yağ asidi esterlerinden 3-MCPD'ye maruz kalma seviyesinin, aynı molar miktarda 3-MCPD' ye maruz kalma ile aynı olduğunu önermişlerdir.

Buhrke vd. (2011) 3-MCPD yağ asidi esterlerinin insan bağırsağında ne kadar hidrolize edildiğini araştırmışlardır. Çalışmada bağırsak bariyeri için hücresel bir *in vitro* model olan farklılaştırılmış Caco-2 hücreleri kullanılmıştır. 3-MCPD monoesterleri hızlı bir şekilde hidrolize edilerek serbest 3-MCPD salınımı gerçekleşmiştir ve böylece insan bağırsağında serbest 3-MCPD yükünü artıracak sonucuna varılmıştır. 3-MCPD diesterleri hücreler tarafından emilerek metabolize edilmiştir yani bağırsak hücrelerinin 3-MCPD diesterlerini detoksifiye etme kapasitesine sahip olabileceği şekilde yorumlanabilir. Serbest 3-MCPD ise hücreler tarafından adsorbe edilmemiştir.

Barocelli vd. (2011) 3-MCPD ve palmitik esterleri için 90 günlük bir toksikolojik çalışma yapmıştır. 3-MCPD için en çok etkilenen organların böbrek ve erkek farelerde testislerin olduğunu ve dipalmitik esterlerinin uygulanmasıyla da farelerde aynı etkilerin daha hafif olduğunu gözlemlemiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışması boyunca kullanılan rafine, fındık yağı, ceviz yağı, ayçiçek yağı, soya yağı ve mısır yağı yerel marketlerden temin edilmiş ve +4°C’de muhafaza edilmiştir. Sindirilemeyen yağ olarak kullanılan limon ve portakal yağı Arifoğlu firmasından temin edilmiştir. 3-MCPD analizleri için 3-kloro-1,2-propanediol ve 3-kloro-1,2-propane-1,1,2,3,3-d₅-diol standartları Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Fenilboronik asit, monobazik sodyum fosfat dihidrat, pepsin, lipaz, safra ve domuz gastrik musin tip 2 Sigma-Aldrich firmasından, dibazik sodyum fosfat Riedel-de Haen firmasından, emülgatör olarak kullanılan peynir altı suyu proteini izolatu Hard Line Nutrition firmasından temin edilmiştir.

3.2 3-MCPD ve Glisidil Esterlerinin Belirlenmesi

3-MCPD ve glisidil esterlerinin toplam miktar analizi için örnek hazırlama DGF (2011) metodu C-VI 18 (10) uygulama A’ya göre yapılmıştır. Buna göre 0.1 g örnek, 100 µL d₅-3-MCPD-1,2-bis-palmitoyl standardı ile 100 µL metil tersiyer bütül eter içinde çözünmüş ve 200 µL metanollü %2’lik (ağırlık/hacim) sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek serbest 3-MCPD ve GE oluşturulmuştur. Reaksiyon %25’lik (hacim/hacim) sülfürik asit çözeltisi eklenerek hazırlanmış asidik sodyum klorür çözeltisinden 600 µL eklenerek durdurulmuş ve istenmeyen polar bileşikler 600 µL izoheksan ile çift ekstraksiyon yapılarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 600 µL dietileter-etilasetat karışımı (3:2) ile ekstrakte edilip 50 µL fenilboronik asit (PBA) ile türevlendirme yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt azot gazı altında kurutulup 500 µL izooktan ile çözünerek Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS, Agilent 7890A) cihazına enjekte edilmiştir.

3-MCPD ester miktarı analizi DGF metodu C-VI 18 (10) uygulama B’ye göre yapılmıştır. Bu yöntemde, reaksiyonu sonlandırmak için asidik sodyum klorür yerine

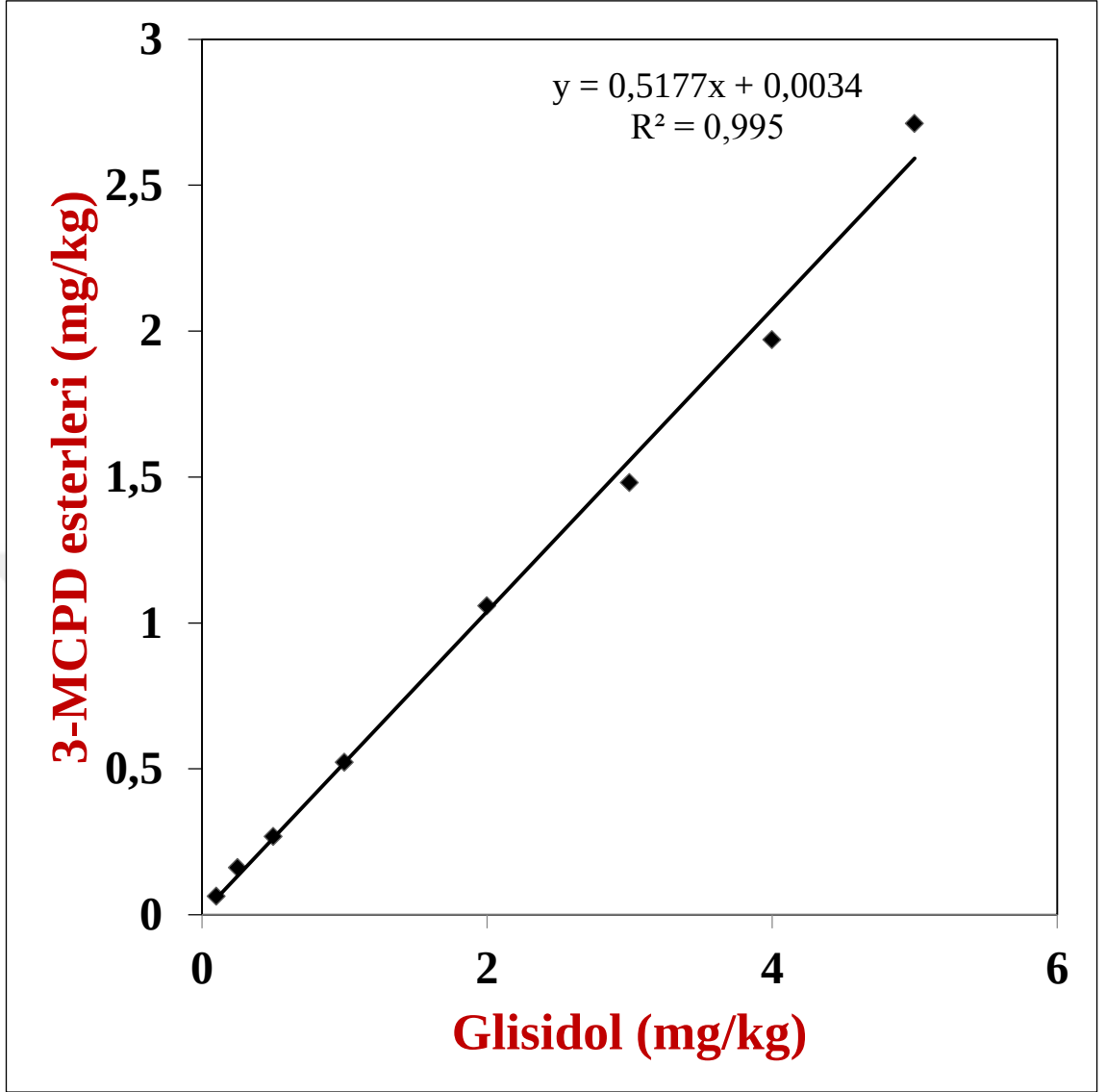
asidik sodyum bromür çözeltisi kullanılmış ve uygulama A'daki aynı işlem basamakları uygulanmıştır.

3-MCPD ve GE bileşiklerinin analizi, Cheng vd. (2016) yöntemine göre yapılmıştır. GC-MS'te ayırma işlemi kapiler kolon (Restek Rxi-17 kolon, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) ile sağlanmıştır. Enjeksiyon splitless mod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1.18 mL/dk sabit akış hızında helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklık programı 80°C'de başlatılmış; dakikada 5°C artışla 155°C'ye ardından dakikada 60°C artışla 300°C'ye yükseltilmiştir. Miktar belirlenmesi, 3- MCPD-d5 için m/z= 150, 3-MCPD için m/z= 147 karakteristik iyonlar izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.1'deki standart kurve oluşturmak için 3-MCPD ve GE ile kontamine olmadığı düşünülen natürel sızma zeytinyağı 0.1 g tartılıp 100 µL glisidol standardı eklendikten sonra uygulama A'ya göre analiz edilmiştir. Glisidol çözeltileri 8 farklı konsantrasyonda (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/kg) hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). GE miktarı hesabında kullanılacak olan standart kurvenin eğimi 0.5177 olarak bulunmuştur. Determinasyon katsayısının 0.995 olması da ölçümlerin birbirleri ile uyumlu çıktığını göstermektedir.

Çizelge 3.1 Standart kurve için gerekli olan farklı konsantrasyonlardaki glisidol çözeltilerinin hesaplanan 3-MCPD esterleri içerikleri

Glisidol standardı konsantrasyonu (mg/kg)	Analiz sonucu hesaplanan 3-MCPD Esteri miktarı (mg/kg)
0.1	0.06
0.25	0.16
0.5	0.27
1	0.52
2	1.06
3	1.48
4	1.97
5	2.71



Şekil 3.1 Standart kurve

Yapılan analizinin doğruluğu ve güvenilirliği son derece önemli olduğu için, tespit limiti (Limit of Detection-LOD) ve ölçüm limiti (Limit of Quantification-LOQ) belirlenmiştir. Standart kurve çizmek için kullanılan en düşük konsantrasyon 0.1 mg/kg Glisidol, 10 kez analiz edilerek ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalaması ve standart sapması alınarak LOD (*ortalama + standart sapma* × 3) ve LOQ (*ortalama + standart sapma* × 10) değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlara göre LOD değeri 0.0664 mg/kg, LOQ değeri ise 0.0833 mg/kg olarak bulunmuştur.

Glisidil esterlerinin miktarı, uygulama A'dan elde edilen değer ile uygulama B'den elde edilen değer farkının standart kurveden elde edilen dönüşüm faktörü ile çarpılması ile elde edilmiştir:

$$\text{Uygulama A: 3-MCPD esterleri ve GE miktarı (mg/kg)} = \frac{3\text{-MCPD } m/z:147 \text{ pik alanı}}{3\text{-MCPD-d}_5 \text{ } m/z:150 \text{ pik alanı}} \times 5$$

$$\text{Uygulama B: 3-MCPD ester miktarı (mg/kg)} = \frac{3\text{-MCPD } m/z:147 \text{ pik alanı}}{3\text{-MCPD-d}_5 \text{ } m/z:150 \text{ pik alanı}} \times 5$$

$$\text{Glisidil Esterleri miktarı (mg/kg)} = (\text{Uygulama A} - \text{Uygulama B}) \times 1/m$$

m: Standart kurveden elde edilen eğim (0.5177)

3.3 Serbest 3-MCPD analizi

Sindirilmiş emülsiyon ve yemeklik yağların serbest 3-MCPD miktarlarını tespit etmek için Küsters vd. (2010) metoduna göre yapılmıştır. Serbest 3-MCPD'nin belirlenmesi için deiyonize su içinde 10 µg/mL konsantrasyonlu 3-MCPD-d5 için standart ile bir stok çözelti hazırlanmıştır. 10 g numune santrifüj tüpüne tartılmıştır. Üzerine 10 µg/mL 3-MCPD-d5 stok çözeltisinden 25 µL eklenip homojenleştirilmiştir. Türevlendirme reaktifi olarak 5 g PBA'nın 19 mL aseton ve 1 mL deiyonize su içinde çözünmesiyle hazırlanan PBA'dan 200 µL eklenmiştir. Daha sonra 90°C'ye hazırlanmış su banyosunda 30 dakika ısıtılmıştır. Süre sonunda su banyosundan alınarak oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Üzerine 2 mL hekzan eklenip 3000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Hekzan tabakası ayrıldıktan sonra üst faz viallere alınarak GC-MS'te okuma yapılmıştır.

GC-MS'te ayırma işlemi kapiler kolon (Restek Rxi-17 kolon, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) ile sağlanmıştır. Enjeksiyon splitless mod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 0.7 mL/dk sabit akış hızında helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklık programı 50°C'de başlatılmış, dakikada 10°C artışla 210°C'ye ardından 5 dakikada 30°C artışla 300°C'ye yükseltilmiştir. Miktar belirlenmesi, 3- MCPD-d5 için m/z= 150, 3-MCPD için m/z= 147 karakteristik iyonlar izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Örnek analizlerinden önce Şekil 3.2'deki standart kurveyi çizebilmek için 3-MCPD standardı 8 farklı konsantrasyonda (0.1; 0.09; 0.07; 0.05; 0.02; 0.01; 0.004; 0.001 mg/kg) hazırlanmış ve örnek yerine distile su kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

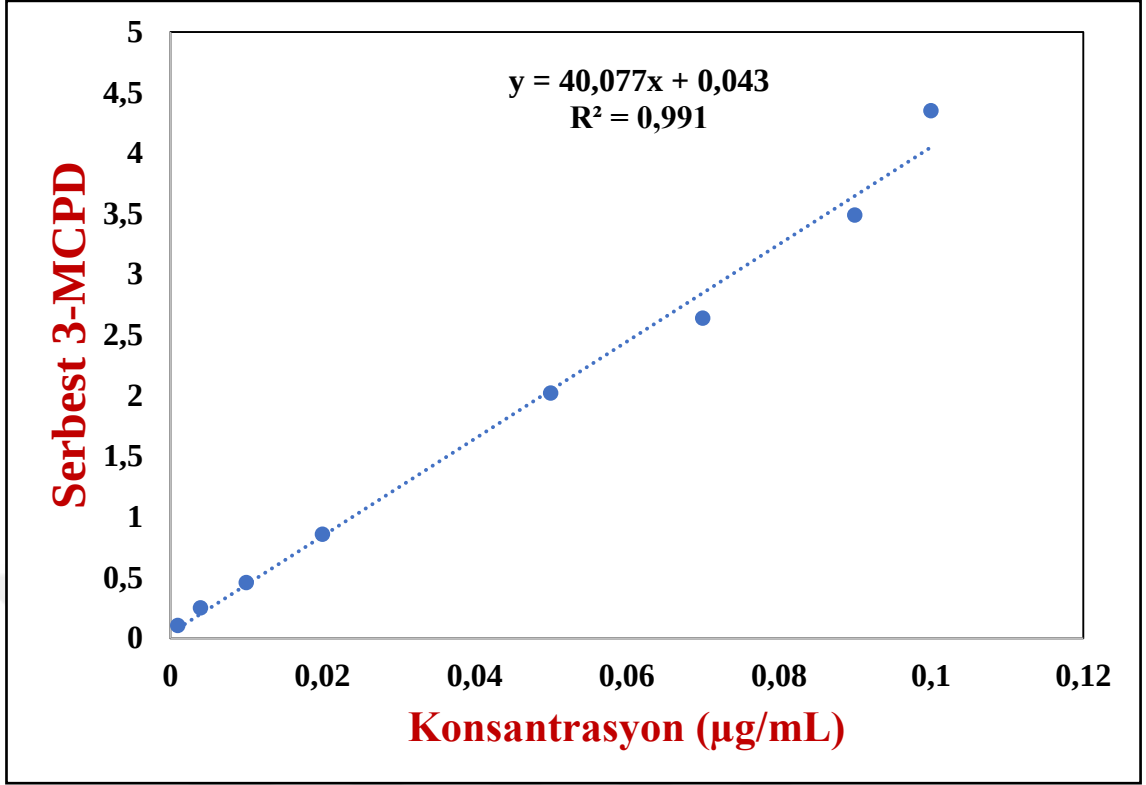
Standart kurveden elde edilen denklem kullanılarak örneklerin serbest 3-MCPD içerikleri hesaplanmıştır:

$$\text{Serbest 3-MCPD miktarı (mg/kg)} = \frac{\left(\frac{3\text{-MCPD } m_{\frac{z}{2}}:147 \text{ pik alanı}}{3\text{-MCPD-}d_5 \frac{m_{\frac{z}{2}}:150 \text{ pik alanı}}{z}} \right) - 0.043}{40.077}$$

Standart kurve çizmek için kullanılan en düşük konsantrasyon 0.001 mg/kg 3-MCPD standardı 10 kez analiz edilerek ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalaması ve standart sapması alınarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlara göre LOD değeri 0.0028 mg/kg, LOQ değeri ise 0.0049 mg/kg olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.2 Standart kurve çizmek için gerekli olan farklı konsantrasyonlardaki 3-MCPD çözeltilerinin hesaplanan 3-MCPD içerikleri

3-MCPD standardı konsantrasyonu (µg/mL)	Analiz sonucu hesaplanan 3-MCPD Esteri miktarı
0.1	4.35
0.09	3.49
0.07	2.64
0.05	2.02
0.02	0.86
0.01	0.46
0.004	0.25
0.001	0.11



Şekil 3.2 Serbest 3-MCPD standart kurvesi

3.4 Emülsiyon Oluşumu

Çalışma kapsamında emülsiyonlar 3 tekerrür olacak şekilde taze üretilerek kullanılmıştır. Su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu hazırlamak için ağırlıkça %10 yağ fazı ve %90 su fazı olacak şekilde karıştırılmıştır. Su fazı için sodyum fosfat monobazik ve sodyum fosfat dibazik kimyasallarından elde edilen 10 mM tampon çözelti pH 7 değerine ayarlanarak kullanılmıştır. Farklı parçacık boyutlarına sahip emülsiyonlar elde etmek için su fazı, bir gün öncesinde peynir altı suyu proteini izolatının tampon çözelti içerisinde 2 saat karıştırılmasıyla hazırlanmıştır ve 24 saat boyunca 4°C’de buzdolabında bekletilmiştir. Analizin yapılacağı gün buzdolabından çıkartılarak yaklaşık 2 saat karıştırılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra filtre edilerek pH değeri 7’ye ayarlanmıştır. Su fazı ve yağ fazı, ön homojenizasyon amacıyla 2 dakika boyunca ultra-turrax cihazında (IKA T18 Basic) karıştırılmıştır. Daha küçük parçacık boyutuna sahip homojen emülsiyonlar üretmek için ikinci aşama olarak mikro akışkanlaştırma cihazı kullanılmıştır. İnce, orta ve kaba emülsiyonlar üretebilmek için farklı basınç (3, 4, 6, 10 kpsi), geçiş sayısı (1, 2, 3) ve emülgatör konsantrasyonu (%2,

1, 0.5, 0.2, 0.15, 0.1) uygulamaları denenmiştir. Her deneme sonrasında parçacık boyutları ölçülmüştür.

3-MCPD'nin emilimini azaltmak amacıyla eklenen sindirilemeyen yağlar ağırlıkça %10 yağ içeren Y/S emülsiyonunun yağ fazına %10, %20 ve %30 olacak şekilde eklenmiştir. Örneğin yağ fazının %10'u limon yağı olması için 2 g limon yağı 18 g zeytinyağı kullanılmıştır. Her bir örnek 3 tekerrür olacak şekilde hazırlanmış ve aynı gün içerisinde gerekli ölçümler yapılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5 *In vitro* Sindirim Modelinin Uygulanması

In vitro sindirim modeli Minekus vd. (2014) yöntemine göre yapılmıştır. Ağız ve mide fazlarının sonunda % 0.5 (ağırlık/ağırlık) yağ içermesi için ağız fazına başlamadan önce numunenin yağ konsantrasyonu %2 olacak şekilde ayarlanmalıdır. Bu nedenle numuneler, pH 7'ye ayarlanmış 10 mM fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Yağın sindirimini simüle etmek için 0.4 g yağ, 3.6 g peynir altı suyu proteini izolatu çözeltisi ve 16 g fosfat tamponu karıştırılarak ağız fazına hazır hale getirilmiştir.

Sindirim modeli için analizden önce yapay tükürük stok çözeltisi (YTSC), mide stok çözeltisi (MSC) ve bağırsak stok çözeltisi (BSC) hazırlanmıştır. Sodyum klorür (1.594 g), Amonyum Nitrat (0.328 g), Potasyum Fosfat (0.636 g), Potasyum Klorür (0.202 g), Potasyum Sitrat (0.308 g), Ürik Asit Sodyum Tuzu (0.021 g), Üre (0.198 g), Laktik Asit Sodyum Tuzu (0.146 g) son hacmi 1 L olacak şekilde çift damıtılmış su içinde çözündürerek YTSC; Sodyum Klorür (2 g) ve Hidroklorik Asit (7 mL) son hacmi 1 L olacak şekilde çift damıtılmış su içinde çözündürerek MSC; Kalsiyum Klorür (4.15 g) ve Sodyum Klorür (32.87 g) son hacmi 150 mL olacak şekilde çift damıtılmış su içinde çözündürerek BSC hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır.

Simüle edilen sindirim sırasında pH ayarlaması yaparken kullanılması için 0.1 N HCl, 1 N HCl, 0.1 N NaOH ve 1 N NaOH çözeltileri hazırlanmıştır.

3.5.1 Ağız fazı

Ağız fazı için analizden 24 saat önce 0.6 g domuz gastrik musin tip 2 ile 20 mL YTSC karıştırılarak yapay tükürük test çözeltisi (YTTÇ) hazırlanmış ve gece boyunca karıştırılmıştır. %2 yağ içeren 20 mL numune ve YTTÇ 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakika sonunda YTTÇ ile numune karıştırılmış, NaOH ve HCl ile pH değeri 6.8'e ayarlandıktan sonra 37°C'de inkübatör çalkalayıcısında (Nüve-ST 30) 10 dakika 100 rpm'de karıştırılmıştır. Süre sonunda ağız fazından parçacık boyutu ve zeta potansiyel ölçümü için örnek ayrılarak soğutulmuştur.

3.5.2 Mide fazı

Mide fazı için analizden 45 dakika önce 0.064 g pepsin ile 20 mL MSC 30 dakika karıştırılarak mide test çözeltisi (MTÇ) hazırlanmıştır. Karıştırıldıktan sonra 37°C'de 15 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda ağız fazından alınan NaOH ve HCl kullanılarak pH 2.5'e ayarlanan 20 mL bolus numunesi ile 20 mL MTÇ karıştırılmıştır. pH değeri NaOH ve HCl ile 2.5'e yeniden ayarlanmıştır. Inkübatör çalkalayıcısında 37°C 100 rpm'de 2 saat boyunca sürekli olarak karıştırılmıştır. Süre sonunda parçacık boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri için örnek ayrılarak soğutulmuştur.

3.5.3 İnce bağırsak fazı

Simüle edilen sindirimin ince bağırsak fazı için otomatik titrasyon (pH-Stat Metrohm 916 Ti-Touch model) cihazı kullanılmıştır. İnce bağırsak fazı için 24 saat önceden 0.1875 g safra tuzları ile 3.5 mL fosfat tamponu birkaç saat çözünme sağlanana kadar karıştırılmıştır ve gece boyunca buzdolabında saklanmıştır. İnce bağırsak fazından 45 dakika önce 0.06 g lipaz ile 2.5 mL fosfat tamponu 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. İnce bağırsak fazından 15 dakika önce 2.5 mL lipaz, 3.5 mL safra tuzu ve 1.5 mL BSC cam tüplere aktararak 37°C su banyosunda bekletilmiştir.

Mide fazı sonunda alınan 30 mL gastrik kimüs pH değeri 6.95-6.99 olacak şekilde NaOH ve HCl çözeltileri ile ayarlanmıştır. 37°C’de olan su banyosuna koyulan gastrik kimüs bulunan beher içerisine pH-Stat’ın aparatları (pH elektrodu, karıştırıcı, büret ucu) yerleştirilmiştir. 0.1 M NaOH ile otomatik titrasyon başlatılmıştır. pH değeri 7 olunca safra tuzu ve BSC eklenmiştir. pH değeri tekrar 7 olduğunda lipaz enzimi eklenmiş ve simüle edilen ince bağırsak fazı başlamıştır. 2 saat boyunca lipid sindiriminden serbest yağ asitlerini (SYA) nötrleştirmek için harcanan 0.1 M NaOH miktarı cihaza kaydedilmiştir. Serbest yağ asitleri miktarı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% SYA = \frac{100 \times V_{NaOH} \times m_{NaOH} \times m_{Lipit}}{w_{Lipit} \times 2}$$

V_{NaOH} : Harcanan NaOH miktarı (L),

m_{NaOH} : NaOH molaritesi,

m_{lipit} : Kullanılan yağın moleküler ağırlığı (g/mol),

w_{lipit} : Sindirim sistemindeki yağın ağırlığıdır (g).

İnce bağırsak fazı bittikten sonra numuneden 20 mL alınarak oda sıcaklığında 40 dakika 4000 rpm’de santrifüj cihazı (Hettich Universal 320 model) ile santrifüj edilmiş ve süre sonunda üstte toplanan misel fazı gerekli ölçümlerin yapılması için ayrı bir tüpe aktarılmıştır.

3.6 Biyoeişilebilirlik

3-MCPD’nin biyoeişilebilirliği hesabı için *in vitro* sindirim modelinde simüle edilen ince bağırsak fazı sonrasında numuneden 10 g alınarak 4000 rpm 40 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra üstte toplanan misel fazı başka bir tüpe aktarılmıştır. Bağırsak fazı (digesta) ve santrifüj sonrası misel fazının 3-MCPD içeriklerini tespit etmek için serbest 3-MCPD analizi yapılmıştır. Çıkan sonuçlara göre yüzde biyoeişilebilirlik (BA) misel fazda tespit edilen 3-MCPD konsantrasyonunun

digestada tespit edilen 3-MCPD miktarına oranının 100 ile çarpılmasıyla bulunmuştur (Pool vd. 2013):

$$BA (\%) = \frac{\text{Misel fazındaki konsantrasyon}}{\text{Digesta fazındaki konsantrasyon}} \times 100$$

3.7 Parçacık Boyutu Ölçümleri

Çalışmada parçacık boyutu ölçümü Malvern Master Sizer 3000 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Master Sizer cihazında yapılan ölçümlerin temel ilkesi; küçük parçacıkların ışığı büyük açılarda dağıtması, büyük parçacıkların ışığı küçük açılarda dağıtmasına dayanmaktadır. Kullanılan yağın refraktif indeks ve yoğunluk gibi bilgileri cihazın programına işlenmiş ve 3 tekerrür olarak hazırlanmış örneklerin her biri için 2 okuma yapılmış, ölçümlerin ortalaması ve standart sapması Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplanmıştır. Tez çalışmasında parçacık boyutları, yüzey ağırlıklı ortalama çap (d_{32}) olarak verilmiştir.

3.8 Zeta Potansiyel Ölçümleri

Çalışma kapsamında zeta potansiyel ölçümü ODTÜ Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan ZetaSizer cihazı ile yapılmıştır. Zeta potansiyel parçacığın içinde bulunduğu sıvının pH değerine bağlı olduğu için numunelerin başlangıç, ağız ve digesta fazı için pH 7'ye ayarlanmış fosfat tamponu ile seyreltilmiş, numunelerin mide fazı ise pH 2.5'e ayarlanmış fosfat tamponu ile seyreltilmiştir.

3.9 Sitotoksite Analizi

Gıda emülsiyonlarında 3-MCPD toksisitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla toksisite testleri için Hitit Üniversitesi'nde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür testi (MTT) uygulanmıştır. Hücre kültüründe büyütülen sağlıklı L929 fibroblast ve vero (böbrek) hücrelerinin dehidrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanan bu metodun uygulanması için hücreler bu enzimlerin

değişime uğrattığı MTT maddesine maruz bırakılmıştır. Enzim aktivitesi canlı hücrelerde gözlenirken ölen hücrelerde gözlenmemektedir. Analizden 1 gün önce plakalara kuyucuk başına 10000 hücre olacak şekilde sayımı yapılan hücrelerle 100 µL medyum hazırlanarak ekim yapılmış ve 24 saat 37°C ve %5 CO₂ ortamda inkübe edilerek hücrelerin yüzeye yapışması sağlanmıştır. Süre sonunda seri dilüsyonlar halinde (100 mg/mL- 1.5625 mg/mL) hazırlanan örnekler ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda vasat uzaklaştırılmış ve 50 µL MTT çözeltisi eklenerek 2 saat karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda MTT ortamdan uzaklaştırılarak 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Peynir altı suyu proteini izolatu çözeltisi başlangıç ve misel fazları için kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyonu yapılan hücreler 570 nm absorbans değerinde spektrofotometrede okumaları yapılmış ve Microsoft Excel programı kullanılarak % canlılık hesaplanmıştır:

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100$$

TS EN ISO 10993-5 standardına göre hücre canlılığı kontrol grubunun %70'i ise madde sitotoksik değil, %70'den azsa maddenin potansiyel olarak sitotoksik kabul edilmiştir ve sitotoksik örnekler için hücre canlılığının %50'lik inhibisyonunu yansıtan (IC₅₀) konsantrasyonu canlılık-konsantrasyon grafiklerinden belirlenmiştir (Anonymous, 2009).

3.10 İstatistiksel Analiz

Tüm analizler üç tekerrür halinde yapılmıştır. Ortalamalar ve standart sapmalar bu değerlerden hesaplanmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel SPSS paket programı (SPSS Statistics 20, IBM) kullanılarak varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Örnekler arasında %5 anlamlılık düzeyinde çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır (p<0.05).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan tez çalışması kapsamında gıda emülsiyonlarının 3-MCPD esterlerinin sitotoksitesisi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 6 farklı yemeklik yağın 3-MCPD esterleri ve GE miktarı tespit edildikten sonra diğer analizler için en yüksek 3-MCPD esterleri içeren yağ ile devam edilmiştir. İnce, orta ve kaba emülsiyonlar üretilerek parçacık boyutunun 3-MCPD'nin biyoerişilebilirliği ve sitotoksitesisindeki değişimleri ve simüle edilen sindirim sistemi boyunca değişen özellikleri incelenmiştir. Sindirilemeyen yağ olarak; düşük serbest yağ asitleri salınımına sahip limon yağı kullanılmıştır. Biyoerişilebilirliği en yüksek olan emülsiyonun aynı koşullarda sadece yağ fazına farklı oranlarda sindirilemeyen yağ eklenerek üretilmesiyle 3-MCPD'nin biyoerişilebilirliği ve sitotoksitesisindeki değişimleri ve simüle edilen *in vitro* sindirim sistemi boyunca değişen özellikleri araştırılmıştır.

4.1 3-MCPD ve Glisidil Esterleri İçeriklerinin Belirlenmesi

Gıda emülsiyonlarının 3-MCPD esterleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla öncelikle 6 farklı rafine yemeklik yağın (zeytinyağı, fındık yağı, ceviz yağı, ayçiçek yağı, soya yağı ve mısır yağı) 3-MCPD esterleri ve GE içerikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Analiz sonucuna göre yağların 3-MCPD esterleri içerikleri, en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: zeytinyağı, ceviz yağı, fındık yağı, mısır yağı, soya yağı, ayçiçek yağı. İstatistikî sonuçlara göre de zeytinyağının içerdiği 3-MCPD esterleri diğer yağlara göre önemli ölçüde daha yüksektir ($p<0.05$). Yağlar içerdiği GE miktarlarına göre sıralandığında ise ceviz yağı en yüksek, ayçiçek yağı ise en düşük GE içeriğine sahip yağ olarak bulunmuştur. Rafine ceviz yağının yüksek GE içermesinin, ham yağında yüksek serbest asit dolayısıyla yüksek kısmi gliserit (özellikle digliserit) bulunması, bu nedenle de rafinasyon işlemlerinde uygulanan yüksek sıcaklıklarda söz konusu kısmi gliseritlerin glisidil esterlerine dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.1 Farklı rafine yemeklik yağların 3-MCPD esterleri ve GE içerikleri

Yemeklik Yağlar	3-MCPD esterleri (mg/kg)	GE (mg/kg)
Fındık Yağı	0.47 ± 0.01^b	2.01 ± 0.18^b
Mısır Yağı	0.21 ± 0.01^c	0.27 ± 0.04^{de}
Ceviz Yağı	0.55 ± 0.01^b	4.78 ± 0.13^a
Zeytinyağı	1.77 ± 0.13^a	0.67 ± 0.30^c
Ayçiçek Yağı	0.17 ± 0.01^c	0.06 ± 0.02^e
Soya Yağı	0.18 ± 0.02^c	0.37 ± 0.04^d

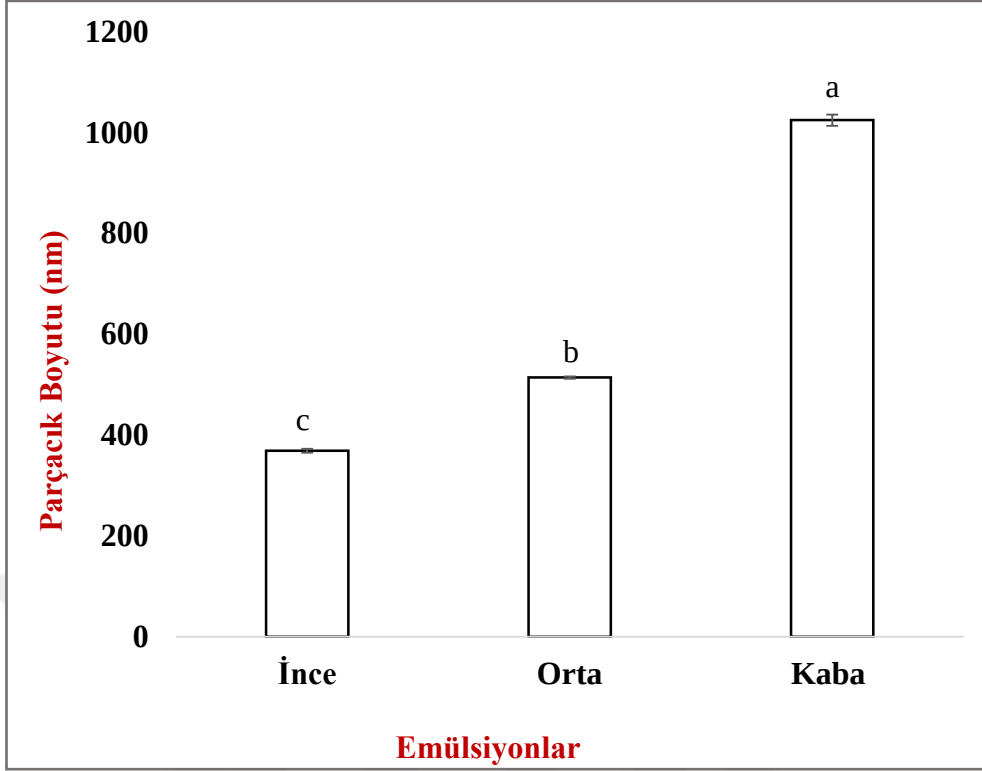
Sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a, b, c, d, e) ortalamalar arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$).

Kamikata vd. (2019) Brezilya'daki marketlerden satın aldığı 13 farklı markaya ait zeytinyağının 3-MCPD esterleri içeriğini ölçmüşler ve numunelerin 0.28-3.77 mg/kg arasında 3-MCPD esterleri içerdiğini bildirmişlerdir. Kuhlman (2011) rafine yağların 3-MCPD esterleri ve GE içeriklerini araştırmıştır. Çalışmaları sonucunda ayçiçek yağı örneklerinin 0.1-2.1 mg/kg 3-MCPD esteri, 0.1-0.4 mg/kg GE; soya yağı örneklerinin 0.1-0.5 mg/kg 3-MCPD esteri, 0.1-0.6 mg/kg GE; zeytinyağı örneklerinin 0.3-1.2 mg/kg 3-MCPD esteri, 0.1-0.4 mg/kg GE; mısır yağının 0.2 mg/kg 3-MCPD esteri, 0.7 mg/kg GE; ceviz ve fındık yağının ise tesadüfi olarak 19 mg/kg 3-MCPD esteri içerdiğini tespit etmişlerdir. Hung vd. (2017) sızma zeytinyağının taşışını tespit etmek amacıyla 3-MCPD esterlerinin tanımlanması üzerine bir çalışma yapmıştır. Tayvan, Amerika Birleşik Devletleri, İtalya ve İspanya'dan temin ettikleri 42 farklı zeytinyağı (15 tane rafine zeytinyağı) numunesinin 3-MCPD ester içeriklerini ölçmüşlerdir ve rafine zeytinyağı 0.97-7.61 mg/kg 3-MCPD esteri içerdiği tespit edilmiştir (Hung vd. 2017). Literatürdeki bu çalışmalar, tez çalışması kapsamında tespit edilen 6 farklı yağın 3-MCPD esteri ve GE içeriklerini doğrular nitelikte olduğu gözlemlenmiştir.

4.2 Hazırlanan Emülsiyonların Özellikleri

4.2.1 Farklı parçacık boyutlarına sahip zeytinyağı emülsiyonunun özellikleri

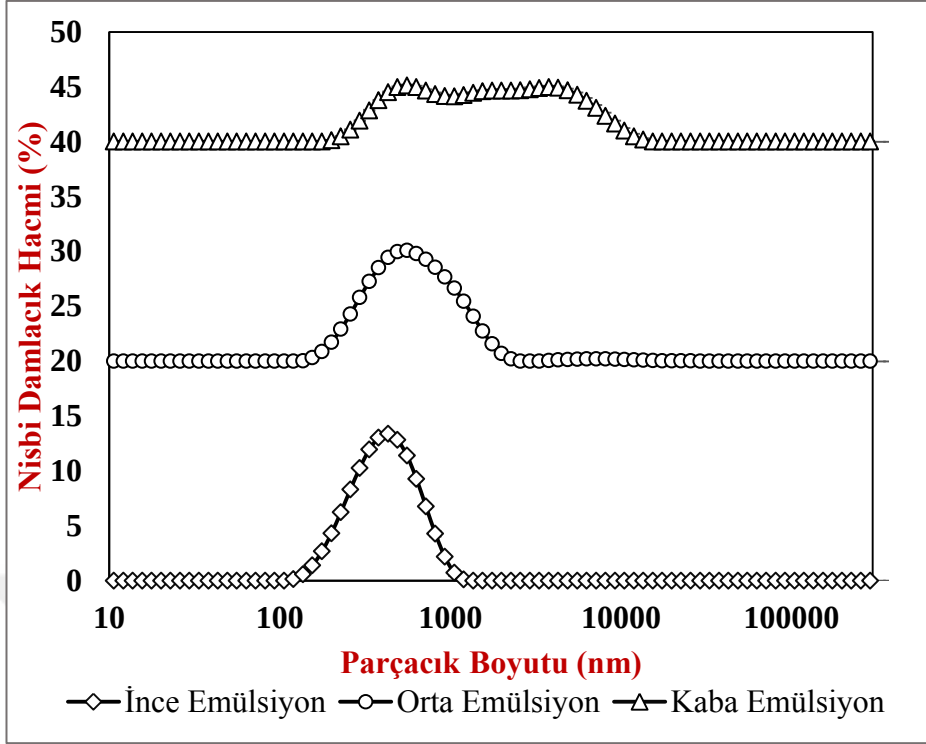
3-MCPD ve glisidil esterleri tespit edilen yemeklik yağlardan en yüksek 3-MCPD içeriğine sahip olan rafine zeytinyağı tez çalışmasının bu aşamasında emülsiyonun yağ fazı olarak kullanılmıştır. 100-450 nm parçacık boyutuna sahip ince emülsiyon, 500-900 nm parçacık boyutuna sahip orta emülsiyon ve 1000-1200 nm parçacık boyutuna sahip kaba emülsiyon üretebilmek için denemeler yapılmış ve bu denemeler sonucunda üretilen emülsiyonların parçacık boyutları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. %2 peynir altı suyu proteini izolatu kullanıldığında ve 10 kpsi basınçta 3 geçiş uygulandığında 369.16 ± 3.72 nm parçacık boyutuna sahip ince emülsiyon üretilmiştir. %2 peynir altı suyu proteini izolatu kullanıldığında ve 6 kpsi basınçta 3 geçiş uygulandığında 514.17 ± 2.27 nm parçacık boyutuna sahip orta emülsiyon üretilmiştir. %0.15 peynir altı suyu proteini izolatu kullanıldığında ve 3 kpsi basınçta 3 geçiş uygulandığında 1025 ± 11.18 nm parçacık boyutuna sahip kaba emülsiyon üretilmiştir. Zhang vd. (2016) mikro akışkanlaştırıcı kullanarak %8 mısır yağı ve %92 su fazı (peynir altı suyu proteini izolatu içeren) ile farklı parçacık boyutuna sahip emülsiyonlar üretmiştir. Araştırmacılar, 170 nm parçacık çapına sahip ince emülsiyonu 11 kpsi 5 geçiş uygulayarak ve 640 nm parçacık çapına sahip orta emülsiyonu 7 kpsi 3 geçiş uygulayarak üretmiştir. Li vd. (2017) mikro akışkanlaştırıcı kullanarak %8 zeytinyağı ve %92 su fazı (%1 peynir altı suyu proteini izolatu içeren) ile farklı parçacık boyutuna sahip emülsiyonlar üretmiştir. Araştırmacılar, 150 nm parçacık çapına sahip ince emülsiyonu 12 kpsi 3 geçiş uygulayarak ve 400 nm parçacık çapına sahip orta emülsiyonu 7 kpsi 3 geçişte üretmiştir. Literatürdeki bu bulgular ile tez çalışmasında üretilen emülsiyon parçacık boyutları benzerdir.



Şekil 4.1 Farklı emülgatör oranları ile hazırlanan ve farklı basınçların uygulanmasıyla elde edilen emülsiyonların parçacık boyutları

(Farklı küçük harfler (a, b, c) ortalamalar arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$)).

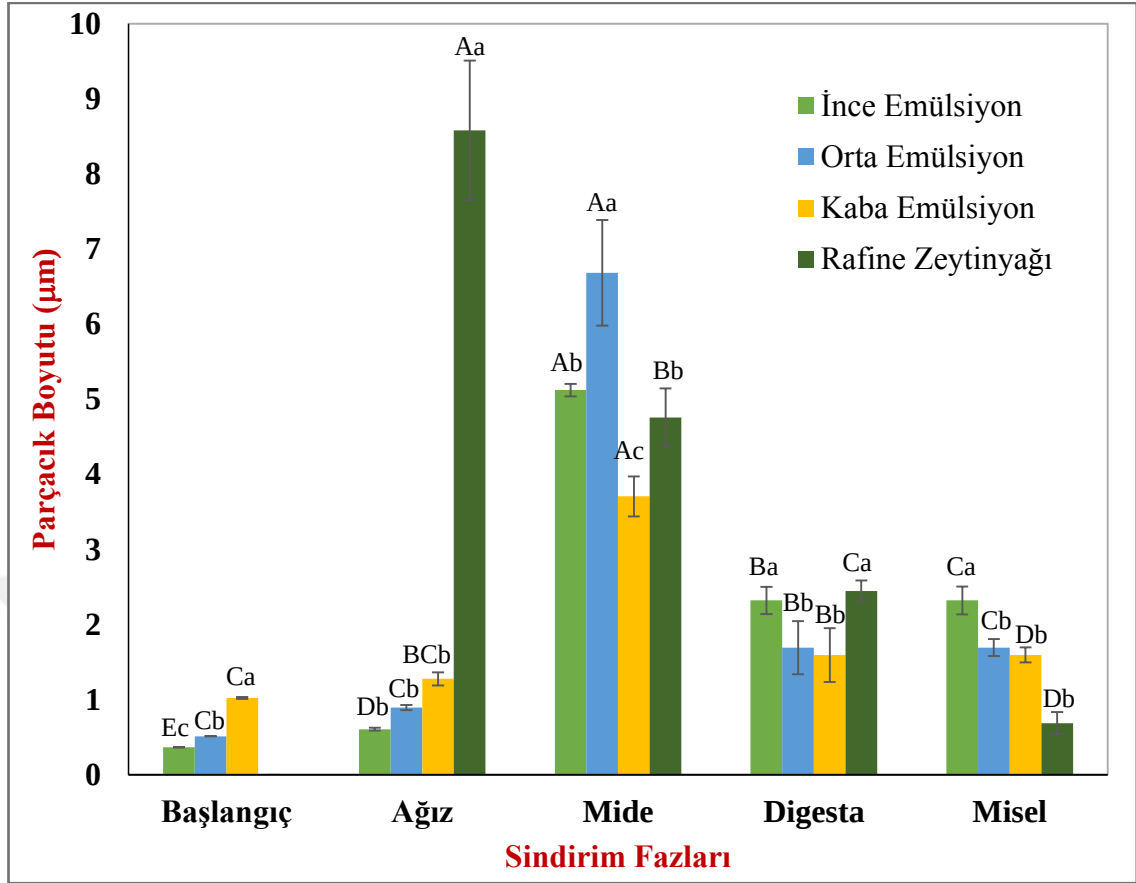
Farklı koşullarda üretilen emülsiyonların parçacık boyut dağılımları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Parçacık boyut dağılımının dar olması sistemdeki parçacık çaplarının birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi parçacık boyut dağılımı en geniş olan kaba emülsiyondur. İnce ve orta emülsiyonlar ise tek modlu partikül boyutu dağılımı göstermiştir. Bu sonuçlar, Li vd. (2017) çalışmasında bulduğu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.2 Farklı koşullarda üretilen ince, orta, kaba emülsiyonun parçacık boyut dağılımları

4.2.2 Zeytinyağı emülsiyonlarına *in vitro* sindirim modelinin uygulanması

Rafine zeytinyağı ve ince, orta ve kaba emülsiyonlar simüle edilmiş ağız, mide ve ince bağırsak modellerine maruz bırakılmıştır ve her faz sonrasında parçacık boyutu ölçümü için örnekler alınmıştır. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi ince, orta ve kaba emülsiyonların ağız fazı sonrasında alınan bolusun parçacık boyutu sırasıyla $0.61 \pm 0.02 \mu\text{m}$, $0.8 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ve $1.28 \pm 0.09 \mu\text{m}$ çıkmıştır. Başlangıç parçacık boyutlarına göre yaklaşık olarak ince emülsiyonda $0.24 \mu\text{m}$, orta emülsiyonda $0.38 \mu\text{m}$ ve kaba emülsiyonda $0.25 \mu\text{m}$ artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3 Rafine zeytinyağı ve ince, orta, kaba emülsiyonların sindirim fazları parçacık boyutları

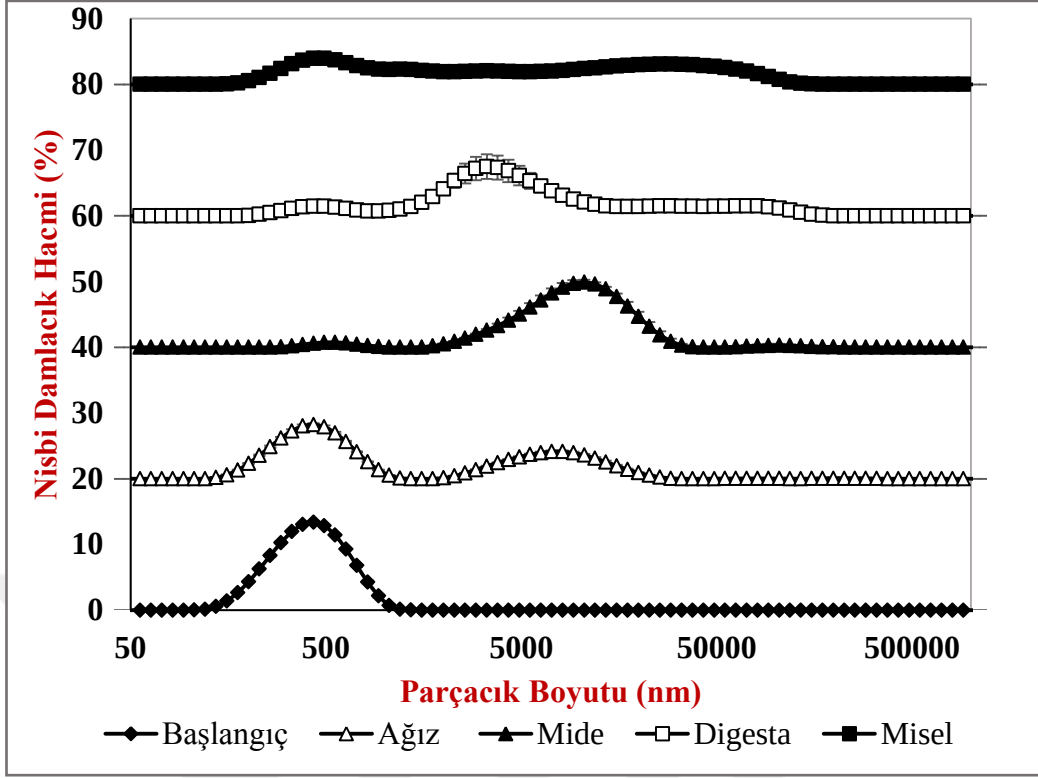
(Farklı küçük harfler (a, b, c) aynı sindirim fazında farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$). Farklı büyük harfler (A, B, C, D, E) aynı örneğin farklı sindirim fazındaki istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

Mide fazı sonrasında her 3 emülsiyonun da parçacık boyutu artmıştır (Şekil 4.3). Daha küçük parçacıklar adsorbe edilmiş bir miktar protein içeriyorsa, proteoliz nedeniyle midede parçacık agregasyonu olasılığı vardır ve bu da parçacık boyutunda bir artışa yol açmaktadır (Singh vd. 2009). Emülsiyonun peynir altı suyu proteini izolatu içermesi, mide fazında parçacık özelliklerindeki değişikliğin ara yüzey protein tabakasının pH değişikliğine ve pepsin kaynaklı hidrolizinden sonra parçacıklar arası sterik ve elektrostatik itmenin azalmasına bağlanabilmektedir (Singh ve Sarkar 2011, Gümüş vd. 2017). Buna ek olarak ağız fazında kullanılan anyonik münin moleküllerinin asidik mide sıvılarında katyonik protein kaplı parçacıkların köprülenme flokülasyonu da mide fazındaki parçacık boyutu artışının nedeni olarak gösterilmektedir (Zhang vd. 2016).

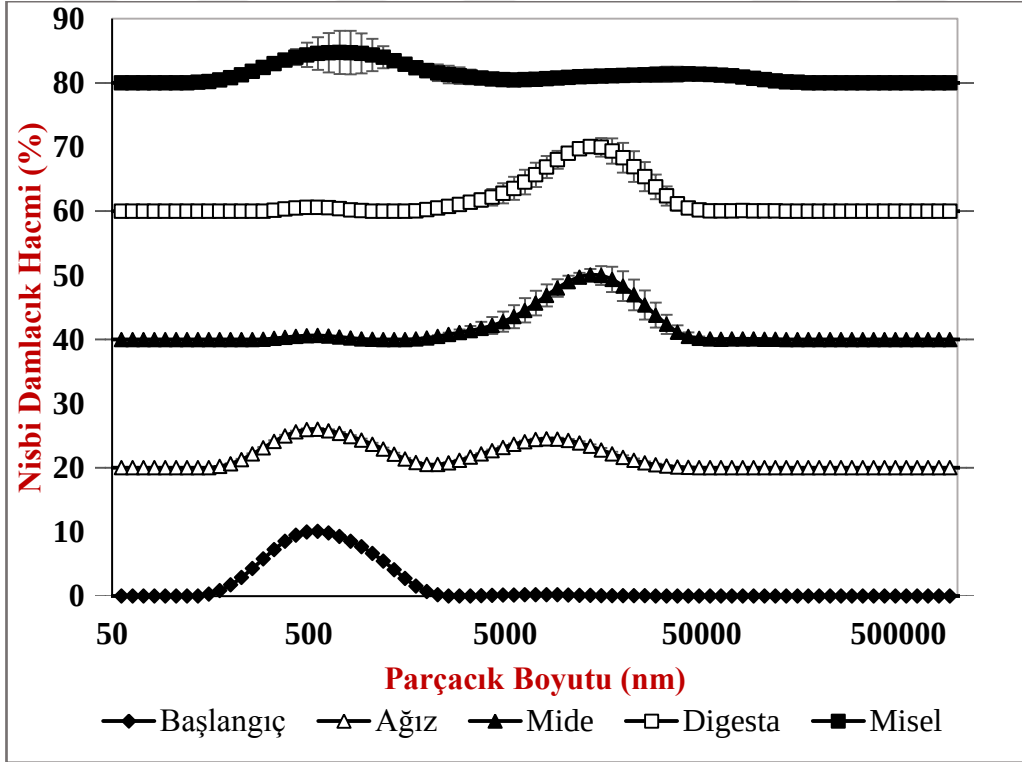
Simüle edilmiş ince bağırsak fazından sonra alınan numunelerin parçacık boyutu mide fazına göre daha küçüktür (Şekil 4.3). Emülsiyon parçacıklarının asidik mide koşullarında topaklaşıp nötr bağırsak koşullarında ise bu topakların dağılma olasılığı parçacık boyutundaki küçülmeye sebep olarak gösterilebilir (Zhang vd. 2016). Ayrıca parçacık boyutunun daha küçük olması nötr koşullarda yağ damlacıklarının lipaz tarafından sindirilmesiyle damlacık topaklaşmasındaki azalma ile açıklanabilir (Xu vd. 2020).

Sindirim sırasında artan parçacık boyutu misel fazında düşmüştür. İnce bağırsak fazından sonra numunenin santrifüjlenerek sindirilmemiş yağ damlacıkları ve kalsiyum sabunları gibi misel fazının toplanması sırasında çözünmeyen kolloidal parçacıkların uzaklaştırılması parçacık boyutunu daha da düşürmüş olabilir (Tan vd. 2021).

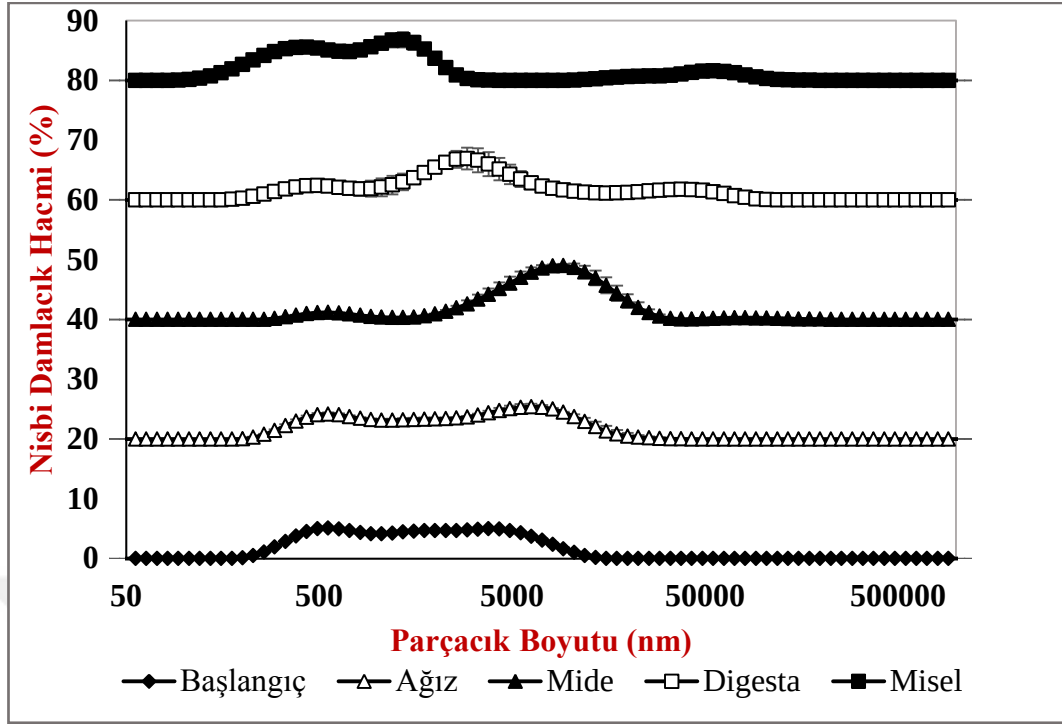
Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te görüldüğü gibi ince ve orta emülsiyonlarda ağız fazına geçildiğinde parçacık boyut dağılımlarının daha belirgin bir şekilde çift modlu hale gelmiş yani parçacıkların bir kısmının topaklaşmaya başladığını göstermiştir. Küçük parçacık boyutuna sahip ince ve orta emülsiyonlarda bu kümeleşme ve topaklaşmalara sindirim modelinin ağız fazında kullanılan müsinin neden olduğu olduğu düşünülmektedir. Kaba emülsiyon (Şekil 4.6) ve rafine zeytinyağında (Şekil 4.7) ise başlangıca göre farklı bir çift modlu görünümün olmaması, karıştırma sırasında birleşmeye duyarlı olacak kadar küçük lipit damlacık boyutlarına sahip olmamasından kaynaklanmaktadır (Zhang vd. 2016). Bu örneklerin digesta ve misel fazlarının geniş bir dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir. Bu geniş dağılımın sebebi; ince bağırsak fazında sindirilmemiş lipit damlacıkları, miseller, veziküller, çözünmeyen kalsiyum tuzları gibi digestanın birçok farklı kolloidal parçacık içermesinden kaynaklı olabilmektedir (Zhang vd. 2016).



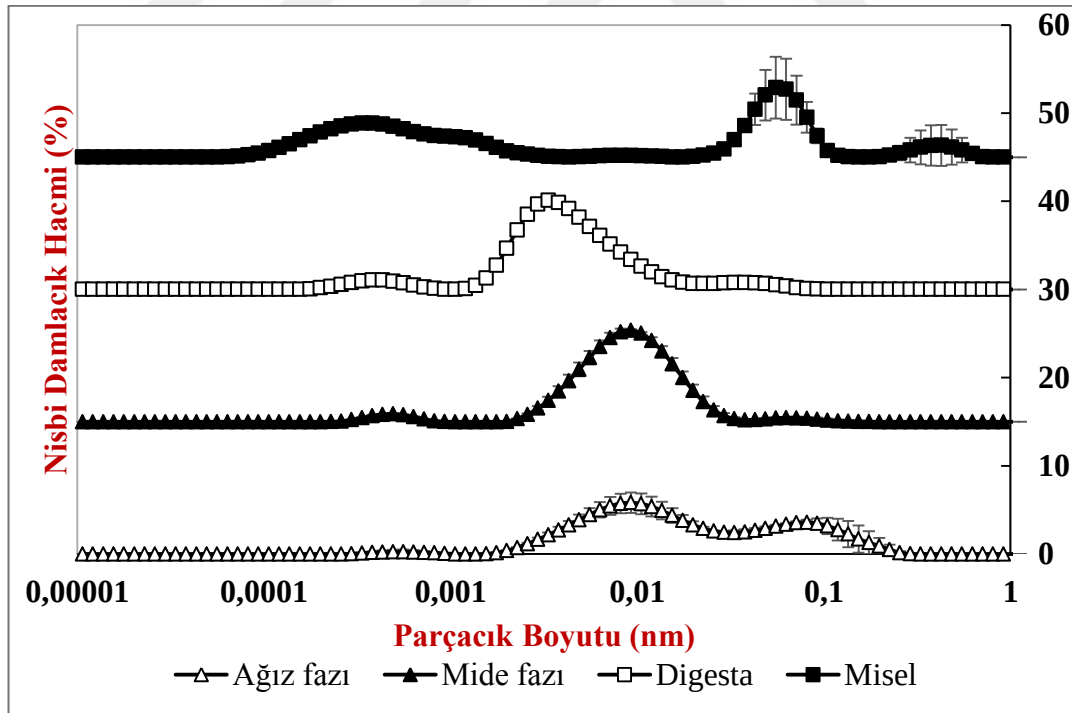
Şekil 4.4 İnce emülsiyon sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı



Şekil 4.5 Orta emülsiyon sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı



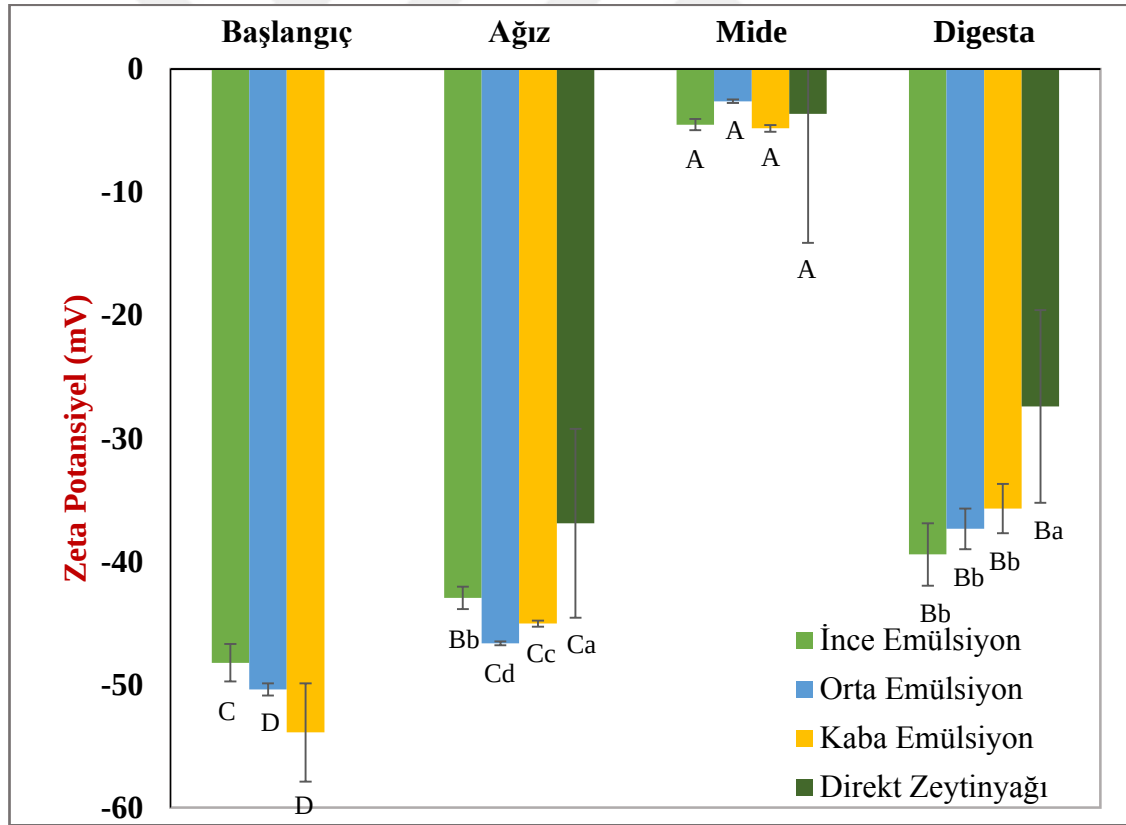
Şekil 4.6 Kaba emülsiyon sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı



Şekil 4.7 Zeytinyağı sindirim fazları parçacık boyutu dağılımı

Simüle edilen sindirim fazlarından sonra numunelerin zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.8’de görüldüğü üzere numunelerde negatif yüzey potansiyeli

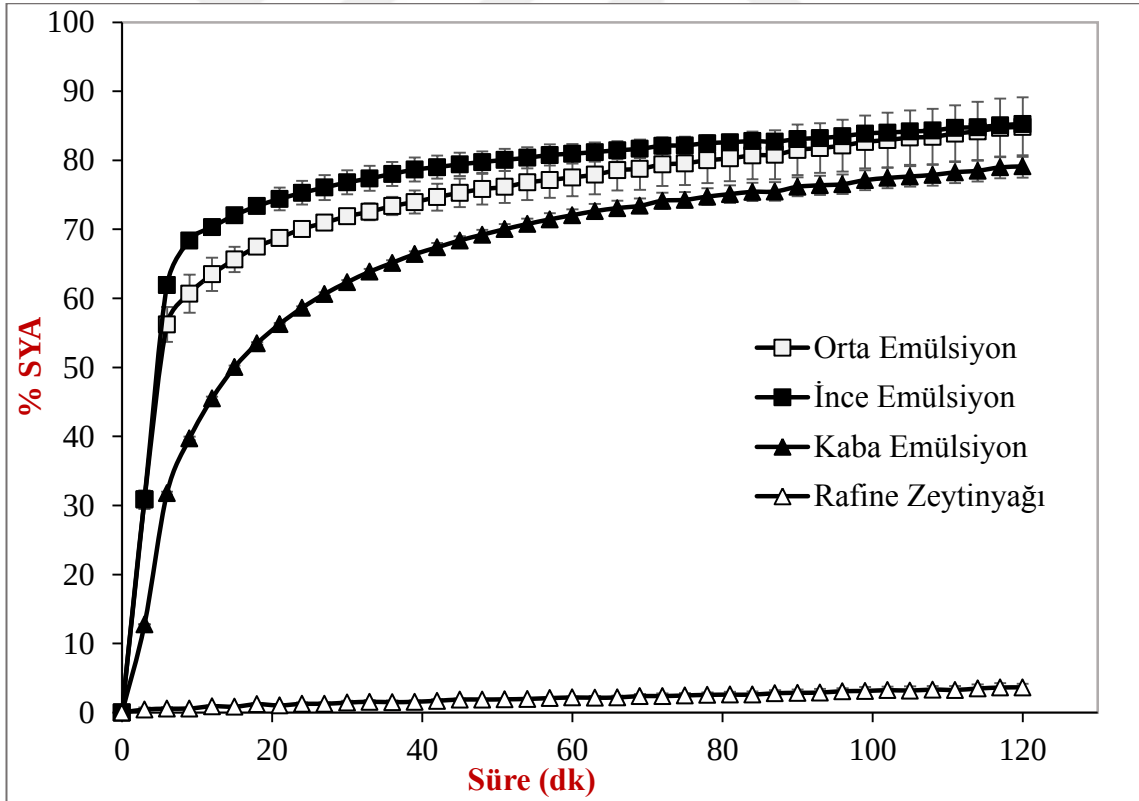
gözlemlenmesine rağmen mide fazında pozitif yönde doğru bir eğilim gözlemlenmiştir. Parçacık yüzeyindeki negatif yükün yüksek olması emülgatör olarak kullanılan peynir altı suyu proteini izolatının güçlü bir negatif yüke sahip olmasından kaynaklanmaktadır. İnce, orta ve kaba emülsiyonların başlangıç zeta potansiyelleri sırasıyla -48.23 ± 1.51 mV, -50.4 ± 0.5 mV ve -53.9 ± 4 mV'dir. Parçacık boyutu arttıkça parçacık yükünün negatif yük yoğunluğu da artmıştır. Bu durum, ya ince emülsiyonun arayüzündeki emülgatörün eksik olmasından ya kaba emülsiyonda adsorbe edilmemiş emülgatör olduğundan ya da lipid fazındaki serbest yağ asitlerinin, mineral iyonlarının oluşturduğu anyonik veya katyonik safsızlıklardan kaynaklanabilmektedir (Tan vd. 2021, Zhang vd. 2015b). Ağız fazına geçildiğinde ise negatif yükün yoğunluğu başlangıç değerlerine göre azalmıştır. Bu azalma müsin moleküllerinin parçacık yüzeyleriyle olan etkileşiminden kaynaklı olabilmektedir (Öztürk vd. 2015).



Şekil 4.8 Rafine zeytinyağı ve ince, orta ve kaba emülsiyonların sindirim fazları zeta potansiyelleri

(Farklı küçük harfler (a, b, c, d) aynı sindirim fazında farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$). Farklı büyük harfler (A, B, C, D) aynı örneğin farklı sindirim fazındaki istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

Oldukça asidik olan mide pH aralığının (pH 2.5) kullanılan protein yapılı emülgatörün izoelektrik noktasının (pH 5) altında kaldığı için parçacıkların pozitif yük taşıma eğiliminde olmasına rağmen ölçüm sonuçlarına göre yine de sıfırın altında olduğu gözlemlenmiştir (Chang ve McClements 2016a). Anyonik münin moleküllerinin katyonik protein kaplı lipit damlacıklarının yüzeylerinde yük nötralizasyonuna yol açması sıfıra yakın olmasının nedeni olarak düşünülmektedir (Chang ve McClements 2016b). Simüle edilen ince bağırsak fazı sonrasında alınan digesta örneklerinin zeta potansiyel ölçümleri yapıldığında negatif yük düzeyinin mide fazına göre arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebi olarak ise safra tuzları, fosfolipitler, serbest yağ asitleri, peptitler gibi anyonik kolloidal parçacıkların lipit sindiriminden sonra sistemde bulunmasına atfedilmektedir. Rafine zeytinyağı negatif yüzey yükünün emülsiyonlara göre daha düşük olması, peynir altı suyu proteini izolatu içermemesi ve sindiriminde daha az anyonik serbest yağ asitleri oluşmasından kaynaklı olabilmektedir (Zhang vd. 2016).



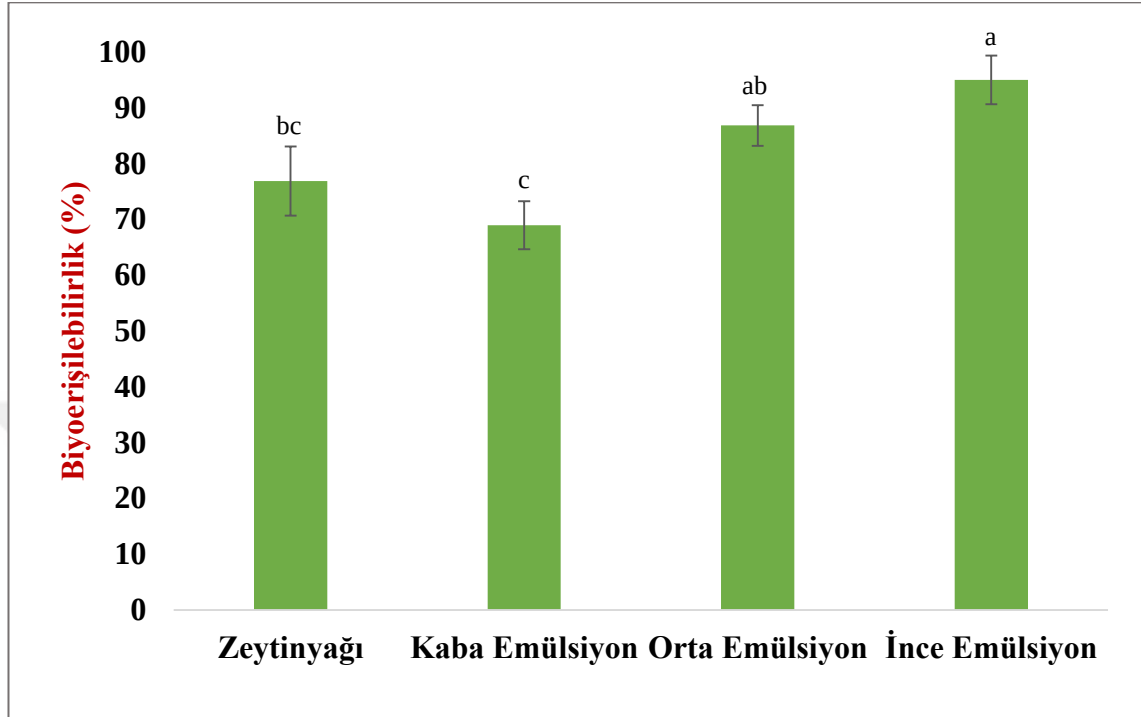
Şekil 4.9 Zeytinyağı ve ince, orta ve kaba emülsiyonların serbest yağ asitleri (SYA) salınım yüzdesi

İnce bağırsak fazında 2 saat boyunca kaydedilen harcanan NaOH miktarına göre bu faz sırasında salınmış olan serbest yağ asitleri miktarı hesaplanmıştır. Şekil 4.9'da da görüldüğü gibi ince, kaba ve orta emülsiyonların her birinin ilk 10 dakikasında rafine zeytinyağına göre daha hızlı bir sindirim gerçekleşmiştir. Farklı boyutlardaki emülsiyonlar arasında serbest yağ asitliği salınımı en fazla olan 85.26 ± 0.68 ile en küçük parçacık boyutuna sahip ince emülsiyon olmuştur. Orta emülsiyon sindiriminin ilk 10 dakikası ince emülsiyona göre daha yavaş gerçekleşse de 2 saat sonundaki SYA miktarı 84.82 ± 5.66 olup ince emülsiyona yakın gerçekleşmiştir. En büyük parçacık boyutuna sahip kaba emülsiyonun ilk 10 dakikadaki sindirimi ince ve orta emülsiyona göre daha yavaş gerçekleşmiştir; aynı zamanda 79.11 ± 2.53 ile en düşük lipid sindirimine sahip emülsiyon olmuştur. Rafine zeytinyağının sindiriminin ise 7.23 ± 0.50 ile emülsiyonlara göre daha düşük olduğu tayin edilmiştir. Yapılan birçok çalışma da olduğu gibi tez çalışması kapsamında da parçacık boyutunun küçülmesiyle birlikte, ince bağırsak fazında birim zamanda salınan serbest yağ asitleri miktarı artmıştır (Troncoso vd. 2012, Salvia-Trujillo vd. 2013a, Li vd. 2017).

4.2.3 Zeytinyağı emülsiyonlarının biyoerişilebilirliği

Emülsiyonların 3-MCPD biyoerişilebilirliği Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Emülsiyonlar arasında en küçük başlangıç parçacık boyutuna sahip ince emülsiyon en yüksek 3-MCPD biyoerişilebilirliğine (95.03 ± 4.36) sahip olduğu tespit edilmiştir. Orta emülsiyon 86.86 ± 3.65 ; kaba emülsiyon 68.97 ± 4.29 ; rafine zeytinyağı 76.89 ± 6.19 3-MCPD biyoerişilebilirliğine sahip olmuştur. Parçacık boyutu azaldıkça 3-MCPD biyoerişilebilirliği artmıştır. Literatürdeki başka bileşiklerle ilgili olan sonuçlar bu veriyi desteklemektedir. Örneğin, Tan vd. (2021) yaptığı çalışmada A vitamininin biyoerişilebilirliği $\sim 10 \mu\text{m}$ parçacık boyutuna sahip kaba emülsiyonda 51.3 'ken $\sim 0.1 \mu\text{m}$ parçacık boyutuna sahip ince emülsiyonda 95.9 'dur. Rafine zeytinyağının 3-MCPD biyoerişilebilirliğinin daha düşük olması, emülsiyonların misellerin içine daha hızlı bir şekilde dahil edilmesinden kaynaklanmaktadır (Pool vd. 2013). Rafine zeytinyağı ve kaba emülsiyonun biyoerişilebilirliği arasında çok fark olmaması ise sindirim sırasında kısmen homojen edilmesinden ve parçacık boyutlarının çok farklı

olmayışından kaynaklanabilmektedir. Bu yüzden kaba emülsiyon ve zeytinyağı arasında kesin bir yorum yapmak doğru olmayacaktır (Zhang vd. 2016).



Şekil 4.10 Zeytinyağı ve ince, orta ve kaba emülsiyonların 3-MCPD biyoreşilebilirliği (Farklı küçük harfler (a, b, c) farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

Tez çalışmasında 3-MCPD biyoreşilebilirliği gıda emülsiyonlarında azalan parçacık boyutuna bağlı olarak %9-18 artmıştır. Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi bazı bileşiklerin emülsiyon sistemlerine dahil edilmesiyle biyoreşilebilirliklerinin artmış olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4. 2 Bazı bileşiklerin emülsiyon sistemlerindeki biyoerişilebilirlik değişimleri

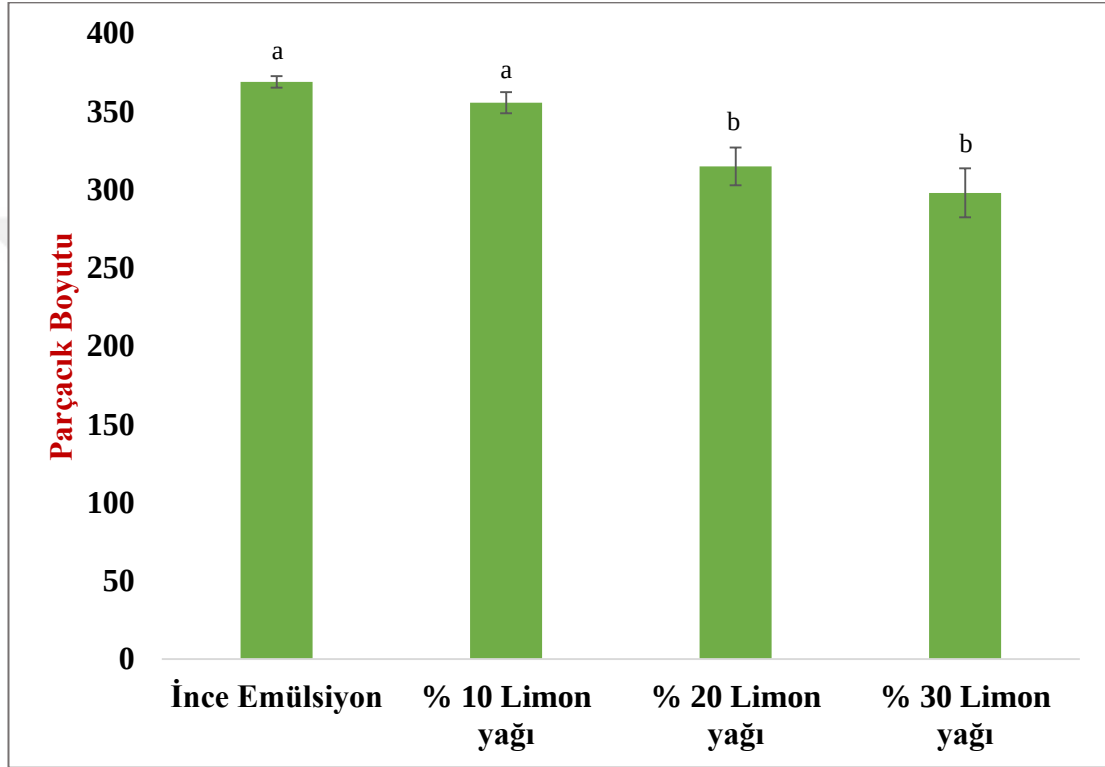
Bileşik	Sonuç	Kaynak
Kurkumin	Taşıyıcı yağa bağlı olarak %1-58 artmıştır.	Ahmed vd. 2012
β -karoten	Yağ fazında uzun zincirli trigliseritin artmasıyla %86 yükselmiştir.	Salvia-Trujillo vd. 2013b
Kuersetin	İçeriğine bağlı olarak yağ ve su fazındakinden %29-53 artmıştır.	Pool vd. 2013
D ₃ Vitamini	Yağ içeriğine bağlı olarak %20-60 artmıştır	Öztürk vd. 2015
Likopen	Çiğ domateste %7.5 iken emülsiyona eklenmesiyle %10-12.5 olmuştur.	Salvia-Trujillo ve McClements 2016
A Vitamini	Parçacık boyutunun azalmasıyla %51'den %95.9'a yükselmiştir.	Tan vd. 2021

Aynı zamanda McClements (2021) nanoemülsiyonlarda sindirim, biyoyararlanım ve potansiyel toksisite üzerine yaptığı çalışmada, emülsiyonların hidrofobik biyoaktif maddelerin biyoyararlanımını artırmasının istenilen bir durum olmasına rağmen biyoaktif maddelerin yüksek düzeyde tüketildiğinde veya toksik bir maddenin biyoyararlanımını artırdığında sağlık üzerine olumsuz etkilerin olabileceğini bildirmiştir.

4.2.4 Limon yağı eklenen emülsiyonların özellikleri

Farklı parçacık boyutlarına sahip emülsiyonlar arasından en yüksek biyoerişilebilirliğe ince emülsiyon koşullarında olduğu için tez çalışmasının bu adımında ince emülsiyonun koşulları uygulanmıştır. Ön denemelerde sindirilemeyen yağ olarak portakal ve limon yağı *in vitro* sindirim modeli uygulandığında serbest yağ asitleri salınımı sırasıyla %12.25 ve %2.08 olmuştur. Daha az serbest yağ asitleri salınımı limon yağında olduğu için emülsiyonların yağ fazına %10-20 ve 30 oranlarında limon yağı eklenmiştir. Limon yağı sindirilebilir triaçilgliserol yerine monoterpen, seskiterpen ve bunların oksijenatlarından oluşur. Triaçilgliserol içermediği için serbest yağ asitlerine dönüşemez (Qian vd. 2012, Rao ve McClements 2012, Rao vd. 2013). Normalde 369.16 ± 3.72 nm parçacık boyutuna sahip emülsiyonun parçacık boyutu %10 limon yağı eklendiğinde 355.83 ± 6.69 nm, %20 limon yağı eklendiğinde 315.17 ± 12.08 nm, %30 limon yağı eklendiğinde ise 298.17 ± 15.62 nm olmuştur (Şekil 4.11). Rao ve

McClements (2012) limon yağıyla çalıştıklarında limon yağı emülsiyonu parçacık boyutunu 112-296 nm arasında bulmuştur. Tez çalışmasında da ön denemelerde limon yağı emülsiyonun parçacık boyutunu 175 nm bulunmuştur, bu yüzden ince emülsiyonun yağ fazına belli oranlarda limon yağı eklendiğinde parçacık boyutu küçülmüştür. Parçacık boyut dağılımlarında ise bir fark bulunamamıştır (veri gösterilmemiştir).



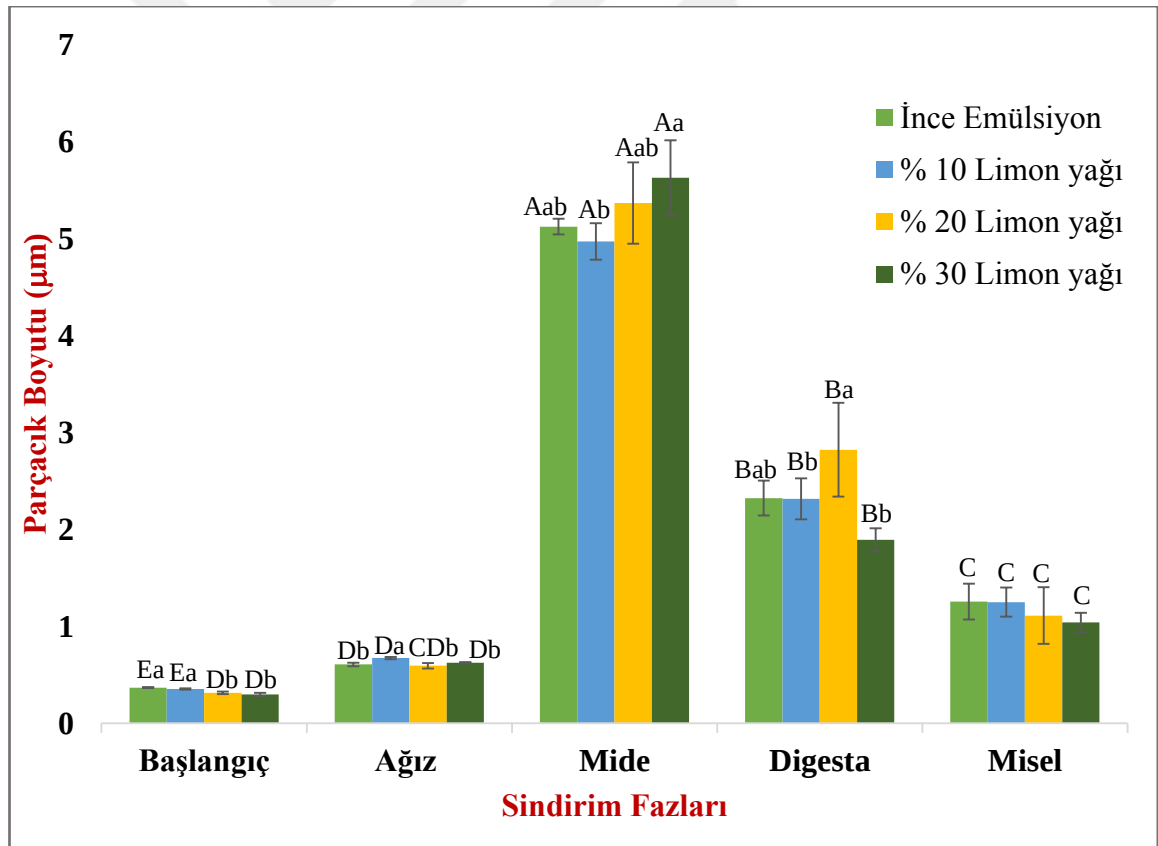
Şekil 4.11 İnce emülsiyonun yağ fazına %10-20-30 limon yağı eklendiğindeki parçacık boyutu

(Farklı küçük harfler (a, b) farklı örneklerin istatistikî önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

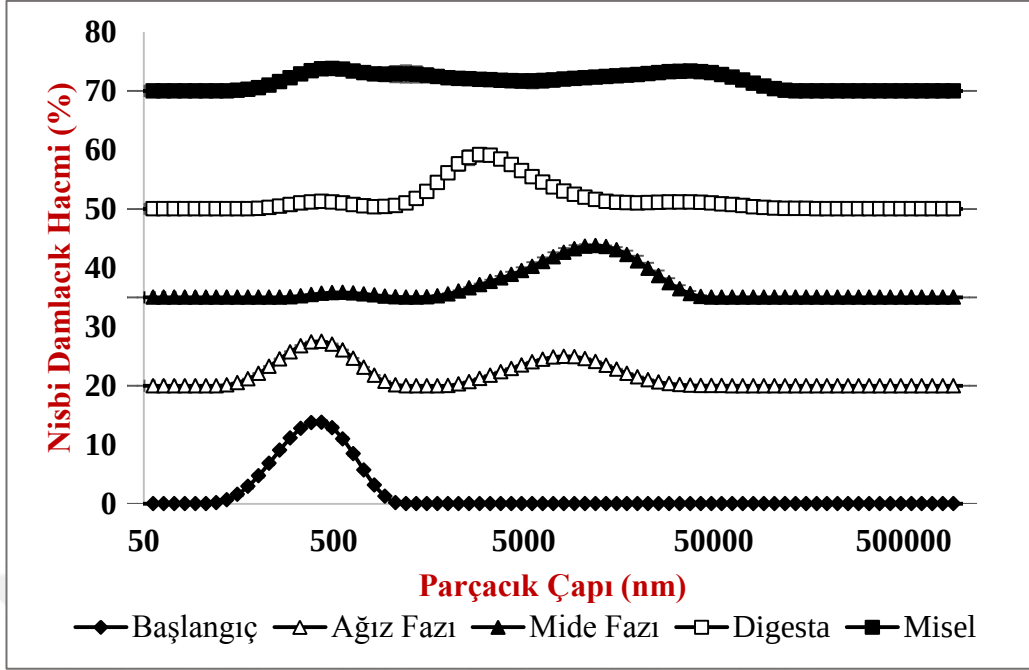
4.2.5 Limon yağı eklenen emülsiyonlara *in vitro* sindirim modelinin uygulanması

Yağ fazının %10-20-30'si limon yağından oluşan rafine zeytinyağı emülsiyonu örneklerine *in vitro* sindirim modeli uygulayarak emülsiyonların serbest yağ asitleri salınımı ve sindirim boyunca değişen özellikleri incelenmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi ağız fazında küçük de olsa emülsiyonların parçacık boyutlarında yukarıda sayılan sebeplerden dolayı artış olmuştur. Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilen limon yağı eklenmiş emülsiyonların parçacık boyut dağılımlarına göre ağız fazında 3 farklı

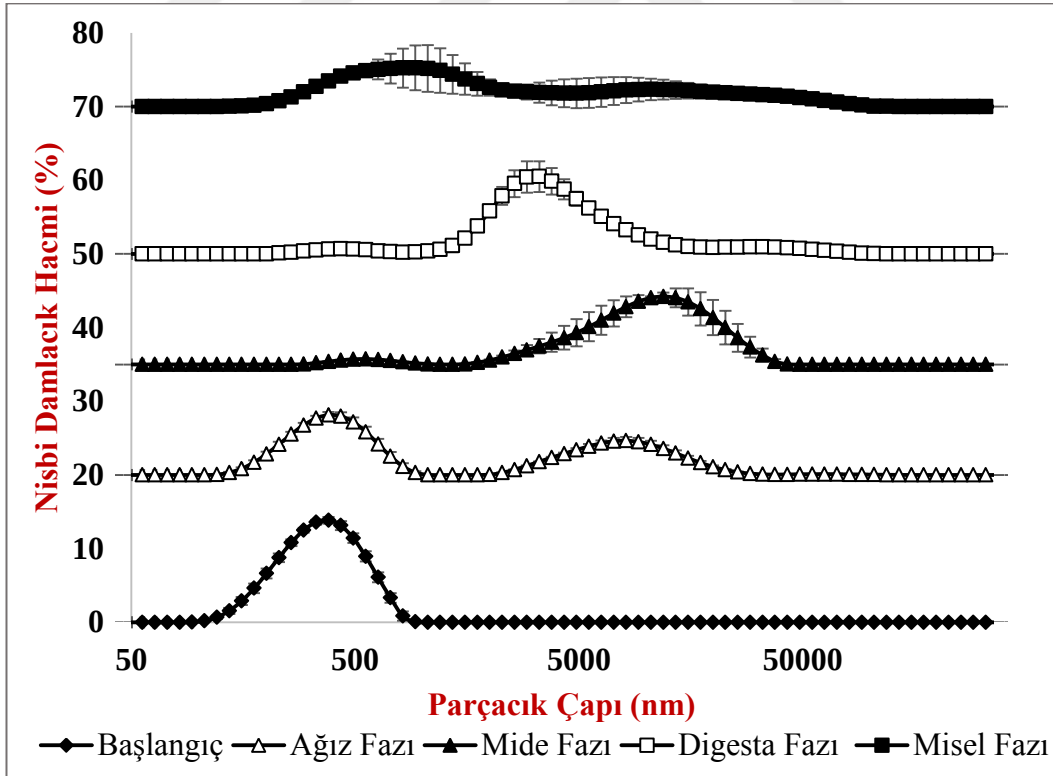
emülsiyonda da çift modlu hale geldiği görülmektedir. Bu parçacıkların topaklaşmaya başladığını göstermektedir. Simüle edilen mide fazında parçacık boyutu 3 farklı emülsiyon için de 5 µm'den fazla çıkmıştır. Parçacık boyut dağılımlarına bakıldığında daha geniş bir dağılıma sahiptir bu da emülsiyonların midenin asidik ortamda inkübe edilmesinin parçacık agregasyonuna sebep olabileceğini göstermektedir (Rao vd. 2013). Simüle edilen ince bağırsak fazından sonra alınan örnekler (digesta fazı) göre parçacık boyutu küçülmüştür ve parçacık boyut dağılımlarına bakıldığında çoklu mod oluşmuştur. Lipaz yağ damlacıklarında bulunan triaçilgliserol moleküllerini hidrolize ederek uzun zincirli serbest yağ asitlerine ve monoaçilgliserollere dönüştürebilir. Bu ürünler sulu faza doğru hareket ettikçe yağ damlacıklarının boyutunda ve sayısında bir azalma beklenebilir (Rao vd. 2013). İnce bağırsak fazından sonra alınan örneklerin santrifüjlenmesi (misel faz) parçacık boyutlarını küçültmüştür.



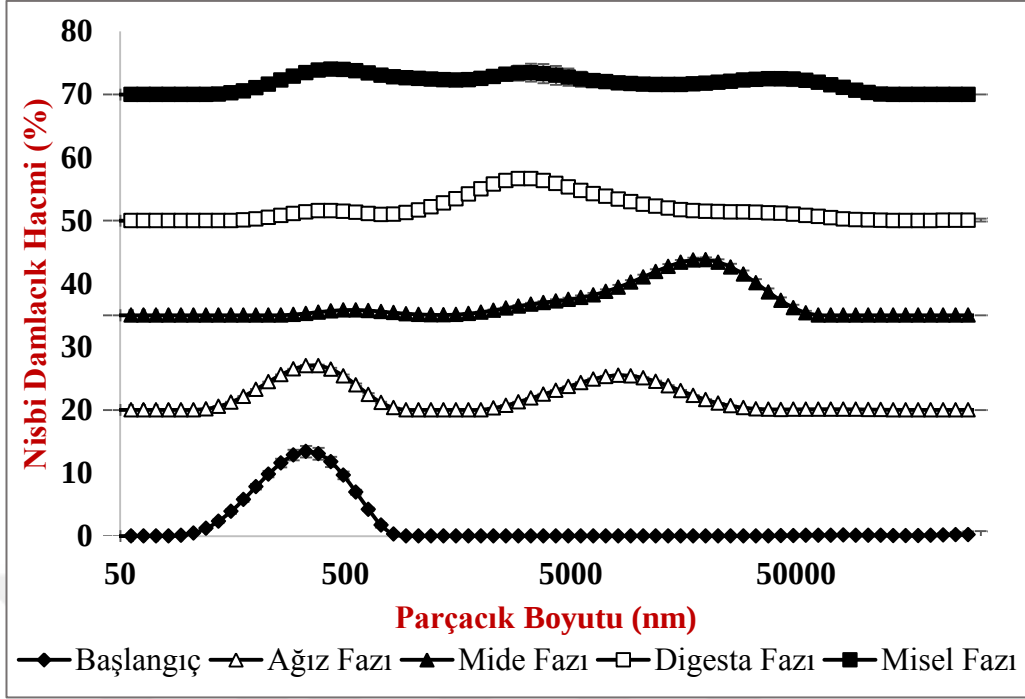
Şekil 4.12 Farklı oranlarda eklenen limon yağı emülsiyonların sindirim fazları boyutları (Farklı küçük harfler (a, b) aynı sindirim fazında farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$). Farklı büyük harfler (A, B, C, D, E) aynı örneğin farklı sindirim fazındaki istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)



Şekil 4.13 %10 Limon yağı eklenmiş emülsiyonun sindirim fazları parçacık boyut dağılımları

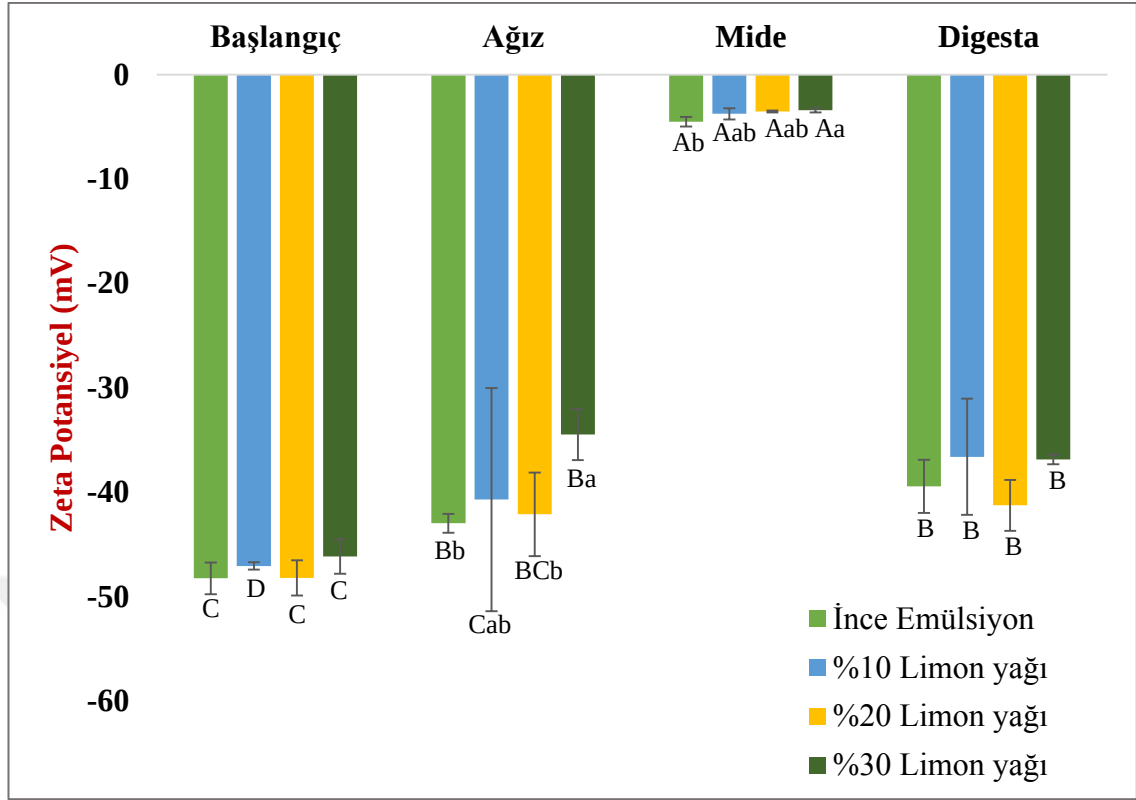


Şekil 4.14 %20 Limon yağı eklenmiş emülsiyonun sindirim fazları parçacık boyut dağılımları



Şekil 4.15 %30 Limon yağı eklenmiş emülsiyonun sindirim fazları parçacık boyut dağılımları

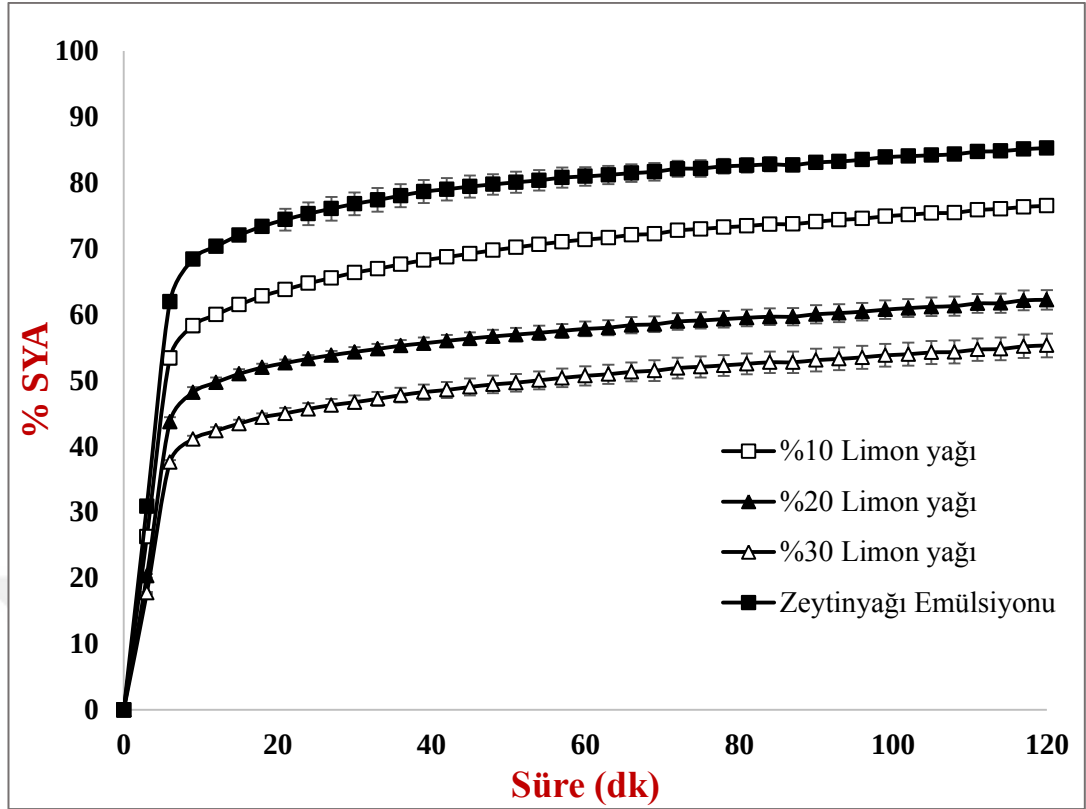
Şekil 4.16’da gösterildiği gibi limon yağı eklenen rafine zeytinyağı emülsiyonları başlangıçta benzer bir şekilde yüksek negatif yüklere sahiptir. %10 limon yağı eklenen emülsiyonun zeta potansiyel değeri -47.05 ± 0.35 mV, %20 limon yağı eklenen emülsiyonun zeta potansiyel değeri -48.2 ± 1.7 mV ve %30 limon yağı eklenen emülsiyonunun zeta potansiyel değeri -46.15 ± 1.65 mV’dir. Limon yağı eklenmemiş olan zeytinyağı emülsiyonlarının zeta potansiyel değeri yaklaşık -48 mV olup, limon yağı eklenmesiyle bu değerden olan sapma istatistiki olarak önemsiz olmuştur ($p>0.05$). Rao vd. (2013) yaptığı çalışmada mısır yağına belli oranlarda limon yağı eklemiştir ve zeta potansiyel değerleri ~ -50 mV olduğunu bildirmişlerdir. Simüle edilmiş ağız fazından sonra emülsiyonların negatif yük büyüklüğü azalmıştır. Bunun sebebi olarak müsinin parçacık topaklaşmasına neden olması veya parçacık yüzeylerine adsorbe olarak parçacık yükünü azaltıp elektrostatik itmede bir azalmaya sebep olması sayılabilmektedir (Silletti vd. 2007, Rao vd. 2013).



Şekil 4.16 Farklı oranlarda eklenen limon yağı emülsiyonların sindirim fazlarının zeta potansiyelleri

(Farklı küçük harfler (a, b, c) aynı sindirim fazında farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$). Farklı büyük harfler (A, B, C, D) aynı örneğin farklı sindirim fazındaki istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

Simüle edilmiş mide fazından sonra alınan örneklerde pozitif yüke doğru ciddi bir eğilim olduğu Şekil 4.16'da görülmektedir. Bu negatif yükün azalması düşük pH değerine bağlanabilmektedir. Parçacık yükü büyüklüğünün azalması parçacıklar arasındaki elektrostatik itmenin gücünü azaltarak topaklaşmasına neden olabilmektedir (Rao vd. 2013). Simüle edilmiş ince bağırsak fazına geçildiğinde ise emülsiyonların negatif yük büyüklüğü tekrardan artmıştır. Lipit sindiriminden sonra safra tuzları, fosfolipitler, serbest yağ asitleri, peptitler gibi anyonik kolloidal parçacıkların sistemde bulunması bu artışa neden olabilmektedir (Zhang vd. 2016).

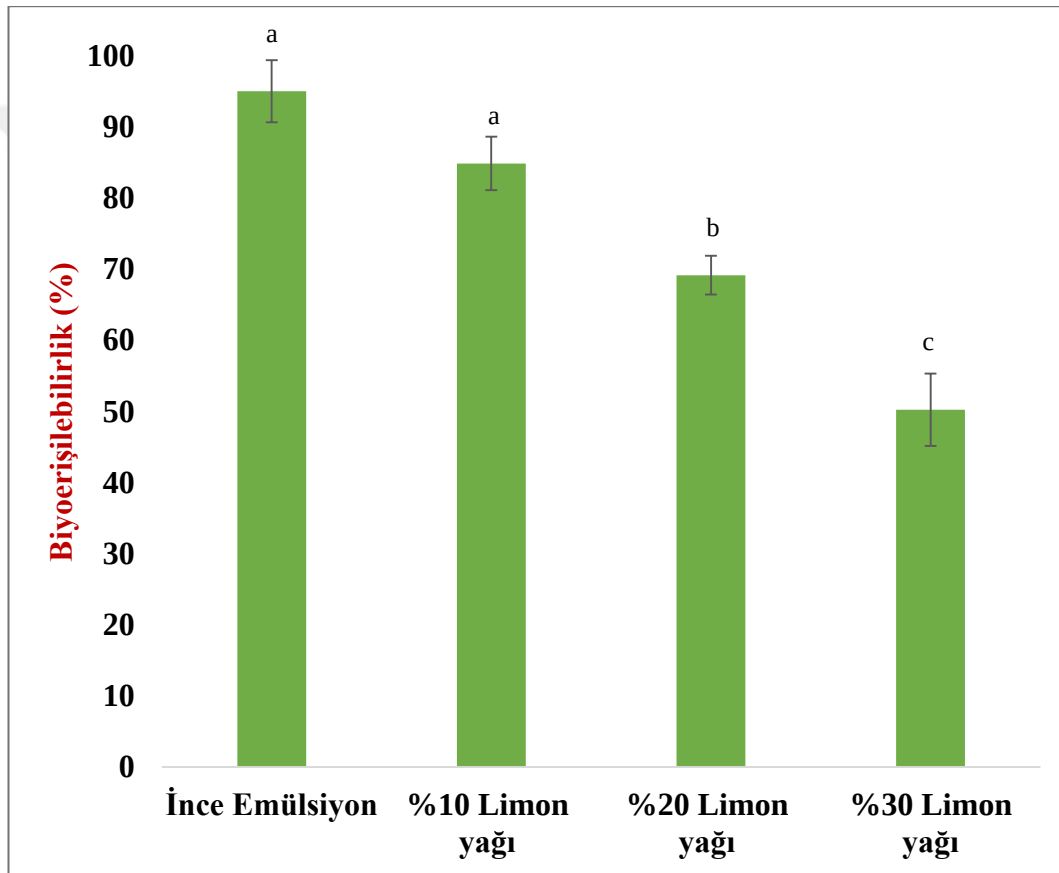


Şekil 4.17 Farklı oranlarda eklenen limon yağı emülsiyonlarının serbest yağ asitleri salınım yüzdesi

Yağ fazına limon yağı eklenerek hazırlanan emülsiyonlar 2 saatlik simüle edilmiş ince bağırsak fazı boyunca harcanan NaOH miktarına göre yüzde serbest yağ asitleri miktarı Şekil 4.17’de görüldüğü gibi hesaplanmıştır. Yağ fazına %10 limon yağı eklenen emülsiyonların serbest yağ asitleri salınımı %76.5; %20 limon yağı eklenen emülsiyonların serbest yağ asitleri salınımı %62.2; %30 limon yağı eklenen emülsiyonların serbest yağ asitleri salınımı %55.3 olmuştur. Bu sonuçlara göre eklenen limon yağı oranının artmasıyla salınan serbest yağ asitleri yüzdesi azalmıştır. Özellikle %30 limon yağı eklenen emülsiyona bakıldığında limon yağının triaçilgliserollerin sindirimini engelleyerek sadece yarısının sindirilebildiği görülmüştür. Limon yağı molekülleri triaçilgliserol molekülünü çevreleyerek lipazın triaçilgliserollerdeki ester bağlarına ulaşmasını engellemiş olabildiği düşünülmektedir (Rao vd. 2013). Benzer bir çalışma olarak Rao vd. (2013) mısır yağına belli oranlarda eklediği limon yağı ile hazırladıkları emülsiyonların serbest yağ asitleri yüzdesinin düştüğünü bildirmişlerdir.

4.2.6 Limon yağı eklenen emülsiyonların biyoerişilebilirliği

Yağ fazına farklı oranlarda limon yağı eklenen emülsiyonların 3-MCPD biyoerişilebilirliği Şekil 4.18’de gösterilmiştir. %10, %20, %30 limon yağı eklenen emülsiyonların 3-MCPD biyoerişilebilirlikleri sırasıyla 84.86 ± 3.75 , 69.15 ± 2.72 ve 50.23 ± 5.08 olduğu gözlemlenmiştir. Sindirilmeyen yağ olarak limon yağının artan oranlarda eklenmesi 3-MCPD biyoerişilebilirliğini düşürmüştür.



Şekil 4.18 Yağ fazına farklı oranlarda limon yağı eklenen emülsiyonların 3-MCPD biyoerişilebilirliği

(Farklı küçük harfler (a, b, c) farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

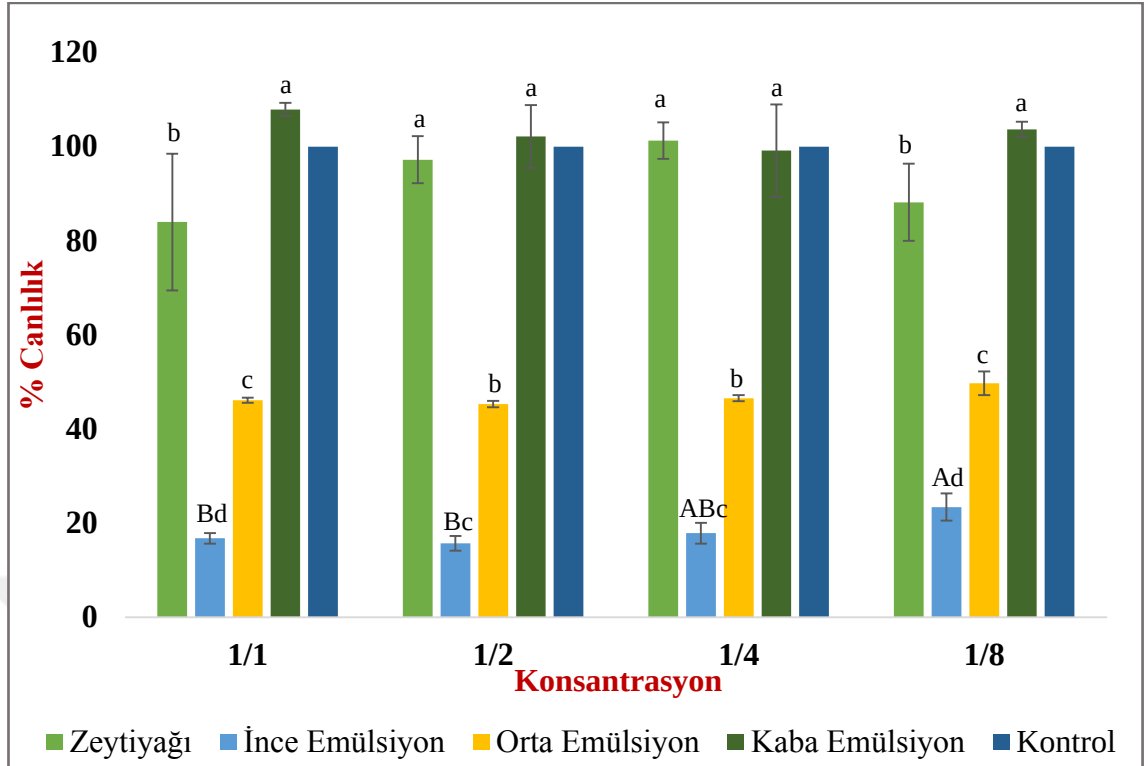
Rao vd. (2013) mısır yağı kullanıldığında β -karoten biyoerişilebilirliğinin yaklaşık %76 iken limon yağının kullanılmasıyla biyoerişilebilirliğin %5 olduğunu ve mısır yağına belirli oranlarda limon yağı eklendiğinde β -karoten biyoerişilebilirliğinin düştüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar; limon yağının sindiriminden sonra misel

fazında β -karoten olmasını, simüle edilmiş bağırsak sıvısında bulunan safra tuzu ve fosfolipidlerin oluşturduğu misellerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Serbest yağ asitleri dışında oluşan miseller, lipofilik biyoaktif bileşikler çözündürme yeteneğine sahip olsalar da serbest yağ asitleri, monoasitler safra tuzları ve fosfolipitlerden oluşan karışık misellerin çözünme kapasitesinden farklı olmaktadır (Rao vd. 2013). β -karoten biyoerişilebilirliği üzerine yapılan bir diğer çalışmada sindirilemeyen yağ olarak portakal yağının kullanılması düşük biyoerişilebilirlik sonuçlanmış; bunun sebebini ise portakal yağı gibi aroma yağlarının triasitler bileşenlerini içermediğinden serbest yağ asitlerine sindirilememesine ve lipofilik bileşenleri çözündürebilen ve taşıyabilen daha az sayıda karışık misel olmasına bağlamıştır (Qian vd. 2012). Tan vd. (2019) enkapsüllenmiş D₃ vitamininin biyoerişilebilirliğinin yağ fazına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada yağ fazı olarak sindirilemeyen yağ kullanıldığında %20.7 olan biyoerişilebilirlik, sindirilen bir yağ olan mısır yağı kullanıldığında %75.2 olmuştur; iki yağ aynı oranda karıştırılarak emülsiyon hazırlandığında ise biyoerişilebilirlik %35.6 olmuştur. Kısacası biyoaktif maddelerin biyoerişilebilirliği emülsiyon sistemine eklenen sindirilemeyen yağın etkilediği sindirim oranını aşarak, biyoerişilebilirliği katıldığı orandan daha fazla düşürmektedir. Tez çalışmasında da %30 oranında limon yağı eklenmesi sonucu biyoerişilebilirlik toplamda yaklaşık %45 oranında azalmıştır.

4.3 Sitotoksikite Testleri

2016 yılında EFSA “Gıda Zincirindeki Kontaminasyonlar Paneli (CONTAM)” yayınladığı raporda 3-MCPD esterlerinin kanserojen bileşikler olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle numunelere sitotoksikite testleri uygulanmıştır. Farklı parçacık boyutlarına sahip ince, orta ve kaba zeytinyağı emülsiyonlarının ve yağ fazına farklı oranlarda limon yağı eklenerek elde edilen emülsiyonların başlangıç örnekleri ve simüle edilen *in vitro* sindirim modeli sonrasında alınan misel fazındaki örnekler için sitotoksikite testleri uygulanmıştır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi 2013 yılında kronik oral maruziyet ile 3-MCPD toksisitesi için ana hedef organın böbrek olduğunu bildirdiği için örneklere Fibroblast (L929) hücrelerinin yanı sıra böbrek (Vero) hücreleri de uygulanmıştır. Uygulanan bu örneklerin başlangıç grubunda sitotoksik bir etkisi

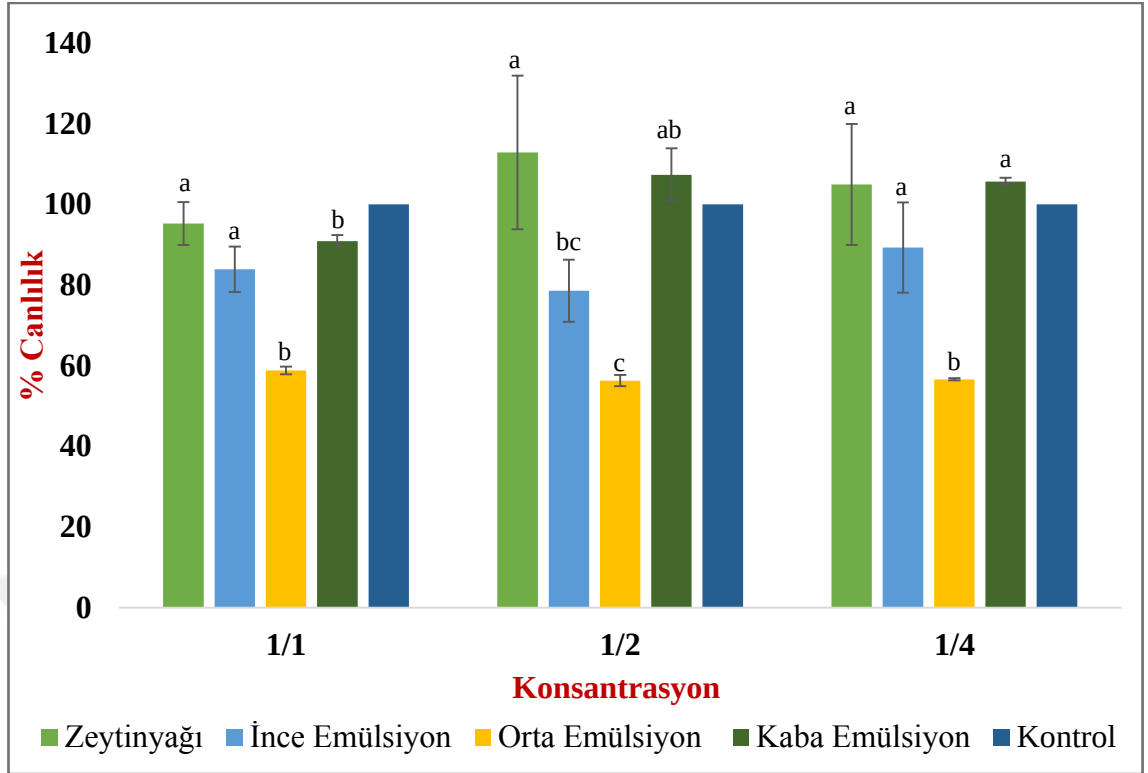
olmadığı, hücre canlılıklarının %100'e yakın olduğu gözlemlenmiştir. Fakat Şekil 4.19'da gösterildiği gibi fibroblast hücre hattına uygulanan testler sonucunda ince ve orta emülsiyonun misel fazlarının canlılıkları %70'den düşük olduğu bulunmuştur. İnce emülsiyon misel fazı için tam konsantrasyon uygulandığında hücreler %16.75 canlılık göstermiş, konsantrasyon azaltıldığında bile canlılığı ~ %20 olmuş, ancak uygulanan 1/32 konsantrasyonundan itibaren %100'e yakın canlılık göstermeye başlamıştır. Orta emülsiyon misel fazı için tam konsantrasyon uygulandığında hücreler %46.1 canlılık göstermiş ve konsantrasyon azaltıldığında %45-49 arasında olduğu gözlemlenmiş, ancak uygulanan 1/16 konsantrasyonundan itibaren %100'e yakın canlılık göstermeye başlamıştır. Kaba emülsiyon ~ %100 canlılık göstererek sitotoksik bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Zeytinyağı ve kaba zeytinyağı emülsiyonu örneklerinin misel fazı sitotoksik bir etki göstermezken, nispeten daha küçük parçacık boyutuna sahip ince ve orta emülsiyonlar sitotoksik etki göstermiştir. Parçacık boyutu büyüdükçe hücre canlılığı yüzdesi Şekil 4.19'da görüldüğü gibi artmıştır. Uygulanan konsantrasyon- % hücre canlılığı grafiğinden ince ve orta emülsiyonun IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. İnce emülsiyon için IC₅₀ değeri 4.16 ± 0.32 mg/mL, orta emülsiyon için 2.18 ± 0.23 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Ancak, kesin bir yargıya ulaşabilmek için *in vitro* olarak uygulanan bu test sonuçlarının *in vivo* testlerle desteklenmesi gerekmektedir.



Şekil 4.19 Fibroblast hücre hattına uygulanan zeytinyağı ve ince, orta, kaba emülsiyonların misel fazlarının yüzde hücre canlılıkları (%)

(Farklı küçük harfler (a, b, c, d) aynı konsantrasyonda farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$). Farklı büyük harfler (A, B) aynı örneğin farklı konsantrasyondaki istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

Vero hücre hattına uygulanan testlerde örneklerin başlangıç fazının hücre canlılıkları ~ %100'dür. Fakat bu testler örneklerin misel fazına uygulandığında orta emülsiyonun misel fazının hücre canlılığı %70'den düşük olduğu bulunmuştur (Şekil 4.20). Orta emülsiyonun misel fazı için tam konsantrasyon uygulandığında hücreler %58.8 canlılık göstermiştir. Konsantrasyon azaltıldığında hücre canlılığı yine yaklaşık %58 olmuş, 1/8 konsantrasyondan sonra ise hücreler ~ %100 canlılık göstermiştir. Uygulanan konsantrasyon - % hücre canlılığı grafiğinden Vero hücre hattında orta emülsiyonun misel fazı örnekleri için IC_{50} değeri hesaplanmış ve 1.70 ± 0.25 mg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20 Vero hücre hattına uygulanan zeytinyağı ve ince, orta, kaba emülsiyonların misel fazlarının yüzde hücre canlılıkları (%)

(Farklı küçük harfler (a, b, c) aynı konsantrasyonda farklı örneklerin istatistiki önemini belirtmektedir ($p < 0.05$).)

Yağ fazına farklı oranlarda limon yağı eklenen emülsiyonların başlangıç ve misel fazlarına sitotoksikite testleri uygulanmıştır. Bu testlerde fibroblast ve böbrek hücre hattına uygulanan örneklerin hücre canlılıkları %70'den büyüktür. Hücre canlılıklarının %70'den büyük olması bu örneklerin sitotoksik bir etkisinin olmadığını göstermiştir. İnce ve orta emülsiyonların misel fazının fibroblast hücre hattında gösterdiği sitotoksik etki emülsiyonların yağ fazına limon yağı eklendiğinde kaybolmuştur. Orta emülsiyonunun misel fazının vero hücre hattında gösterdiği sitotoksik etki de emülsiyonların yağ fazına limon yağı ekleyerek kaybolmuştur. Kısacası, örneklerle en düşük oranda uygulanan %10'luk limon yağı eklenmesi dahi sitotoksik etkiyi ortadan kaldırmıştır.

Schultrich vd. (2021) 3-MCPD'nin böbrek ve karaciğer hücre hattındaki emilimi ve metabolizması ile ilgili çalışmıştır. Çalışma bulgularına göre insan ve sıçan böbrek hücreleri kullanılan hücre hattında mM düzeyde 3-MCPD uygulandığında (0.01-100

mM) hücre canlılığında azalma olmuştur. Sitotoksosite testlerinde kullanılan 4 farklı böbrek hücresinden üçünde 30 mM 3-MCPD konsantrasyonundan sonra sitotoksosite gözlemlenmiş, birinde ise 1 mM 3-MCPD konsantrasyonundan sonra hücre canlılıklarında önemli bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Karaciğer hücreleri için hücrelerde 10 mM 3-MCPD konsantrasyonundan sonra azalma olduğunu görmüşlerdir. Çalışmada uyguladıkları 3-MCPD konsantrasyonlarının gerçekte insanların gıdalarla olabilebileceğinden çok fazla olduğunu vurgulamışlardır. Tee vd. (2011) MTT yöntemiyle yaptığı sitotoksosite testlerinde 2-oleil-3-kloropropandiol'ün 781 mg/kg seviyesinde hücresel sitotoksositeye sebep olduğunu, IC₅₀ değerinin 520 mg/kg olduğunu göstermiştir. Sıçanlar üzerinde 4 farklı esteri 50, 200 ve 400 mg/kg uygulayarak yaptıkları deneyde ise organ ve vücutlarında toksik bir etki olmadığını LD₅₀ değerinin 400 mg/kg'dan fazla olduğunu belirlemişlerdir (Liu vd. 2012).

Toksikolojik olarak 3-MCPD'nin *in vitro* koşullarda mutajenik olduğu, dişi sıçanlarda kanserojenik kanıtlar bulunduğu için genotoksik olmayan kanserojen olduğu bilinmektedir. 3-MCPD esterlerinin toksikolojik özellikleri sindirim sisteminde serbest 3-MCPD'ye salınmasıyla oluştuğu bu yüzden 3-MCPD esterlerinin toksik etki aralığının serbest 3-MCPD ile aynı olduğu kabul edilmektedir (Barocelli vd. 2011, Abraham vd. 2013, Anonymous, 2016). Tez çalışmasında sindirim sonrası misel fazından alınan örneklerin bazılarında sitotoksik bir etkinin olması 3-MCPD esterinin, serbest 3-MCPD'ye dönüşmesinden kaynaklanabilmektedir.

5. SONUÇ

Biyoaktif bileşenlerin biyoyararlanımı üzerine yapılan birçok çalışma; gıda emülsiyonlarının bu bileşenlerin biyoyararlılığını artırdığını ve parçacık boyutunun biyoyararlanım üzerinde büyük bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ancak, gıda emülsiyonlarının insan sağlığına yararlı olmayan bileşenlerin emilimini ve toksisitesini artırıp artırmayacağı tam olarak bilinmemektedir. Potansiyel kanserojen olan 3-MCPD ve esterleri işlenmiş gıdalarda ve özellikle de bitkisel yağların rafine edilmesi sırasında oluşmaktadır. Birçok yemeklik yağda 3-MCPD içeriği tespit edilmesine rağmen gıda emülsiyonlarının vücutta 3-MCPD salınımı ve sitotoksite üzerine etkileri araştırılmamıştır. Bu yüzden tezin ana hedefi gıda emülsiyonlarının 3-MCPD esterlerinin vücutta sindirimi sonrasındaki toksisiteyi üzerine etkilerini incelemektir. Bu kapsamda farklı yemeklik yağların 3-MCPD esterleri içerikleri belirlenerek, farklı parçacık boyutlarına sahip emülsiyonların toksisitesi araştırılmış ve biyoyararlanımın azaltılması için stratejiler geliştirilmiştir.

İlk olarak 6 farklı yemeklik yağın 3-MCPD ve glisidil esterleri içerikleri tespit edilmiştir. Analiz sonucuna göre yağların 3-MCPD esterleri içerikleri, en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: rafine zeytinyağı, ceviz yağı, fındık yağı, mısır yağı, soya yağı, ayçiçek yağı. İstatistiki sonuçlara göre de rafine zeytinyağının içerdiği 3-MCPD esteri (1.78 ± 0.13 mg/kg) diğer yağlara göre en yüksek olanıdır. 3-MCPD içeriği en yüksek olan yağ zeytinyağı olduğu için bir sonraki analizlerde zeytinyağı kullanılmıştır. Peynir altı suyu proteini izolatu kullanarak 3 farklı parçacık boyutuna sahip emülsiyon üretilmiştir: ince, orta ve kaba emülsiyon. İnce emülsiyonun parçacık boyutu 369 nm, orta emülsiyonun parçacık boyutu 514 nm ve kaba emülsiyonun parçacık boyutu da 1025 nm olmuştur. Daha sonra bu emülsiyonlar ve rafine zeytinyağı *in vitro* sindirim modeli kullanılarak simüle edilmiş ağız, mide ve ince bağırsak fazlarına maruz bırakılmıştır ve her faz sonrasında parçacık ve zeta potansiyel değişimleri gözlemlenmiştir. Başlangıç fazından ağız fazına geçildiğinde parçacık boyutlarında bir miktar artış olsa da en fazla parçacık boyutu artışı mide fazında gözlemlenmiştir. İnce bağırsak fazına geçildiğinde ise parçacık boyutu küçülmüştür. Sindirim sırasında artan parçacık boyutu misel fazında iyice azalmıştır. Bu örneklerin digesta ve misel fazlarının parçacık boyutları ise geniş bir dağılıma sahip olduğu görülmüştür. Simüle edilen

sindirim fazlarından sonra numunelerin zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Numunelerde negatif yüzey potansiyeli gözlemlenmesine rağmen mide fazında pozitif doğru bir eğilim gözlemlenmiştir. Başlangıçta parçacık boyutu büyüdükçe parçacık yüzeyindeki negatif yükün de arttığı görülmüştür. Ağız fazına geçildiğinde ise negatif yükün büyüklüğü başlangıç değerlerine göre azalmıştır. Simüle edilen ince bağırsak fazı sonrasında alınan digesta örneklerinin zeta potansiyel ölçümleri yapıldığında negatif yük düzeyinin mide fazına göre arttığı gözlemlenmiştir. İnce bağırsak fazında 2 saat boyunca kaydedilen harcanan NaOH miktarına göre yüzde serbest yağ asitleri miktarı hesaplanmıştır. İnce bağırsak fazında rafine zeytinyağından SYA salınımı bu süre sonunda %7.23 olmasına rağmen emülsiyonların yağ fazında yer aldığına ise SYA salınımının daha fazla olduğu görülmüştür. İnce bağırsak fazında, ince emülsiyondan SYA salınımı %85.26, orta emülsiyondan SYA salınımı %84.82, kaba emülsiyondan SYA salınımı ise %79.11 olmuştur. Emülsiyonlar arasında en küçük başlangıç parçacık boyutuna sahip ince emülsiyon en yüksek 3-MCPD biyoerişilebilirliğine (%95.03) sahip olduğu tespit edilmiştir. Orta emülsiyon %86.86; kaba emülsiyon %68.97; rafine zeytinyağı %76.89 3-MCPD biyoerişilebilirliğine sahip olmuştur. Rafine zeytinyağının 3-MCPD biyoerişilebilirliği ile kaba ve orta emülsiyonlarının 3-MCPD biyoerişilebilirliği arasında istatistiki açıdan bir fark söz konusu değilken ($p>0.05$), rafine zeytinyağı ve ince emülsiyonun 3-MCPD biyoerişilebilirliği arasında istatistiki açıdan fark vardır ($p<0.05$).

Parçacık boyutu azaldıkça 3-MCPD biyoerişilebilirliği arttığı sonucuna varıldıktan sonra emülsiyonların yağ fazına sindirilmeyen yağ olarak belirli oranlarda limon yağı eklenmiştir. İnce emülsiyonun parçacık boyutu, sadece zeytinyağı içerdiğinde 369 nm, %10 limon yağı eklendiğinde 355 nm, %20 limon yağı eklendiğinde 315 nm, %30 limon yağı eklendiğinde ise 298 nm olarak tespit edilmiştir. %10-20-30 limon yağı içeren emülsiyonlara *in vitro* sindirim modeli uygulandığında ağız fazında küçük de olsa emülsiyonların parçacık boyutunda artış olmuştur. Simüle edilen mide fazında parçacık boyutu 3 farklı emülsiyon için de 5 μm 'den büyük olarak bulunmuştur. İnce bağırsak fazında ise parçacık boyutu küçülmüştür ve çok tepeli parçacık boyut dağılımı saptanmıştır. Zeta potansiyel değerleri ölçüldüğünde başlangıçta %10 limon yağı eklenen emülsiyonun zeta potansiyel değeri -47.05 mV, %20 limon yağı eklenen

emülsiyonun zeta potansiyel değeri -48.2 mV ve %30 limon yağı eklenen emülsiyonun zeta potansiyel değeri -46.15 mV olduğu ve bu örnekler arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Simüle edilmiş mide fazından sonra alınan örneklerde pozitif yüke doğru ciddi bir eğilim olsa da ince bağırsak fazına geçildiğinde emülsiyonların negatif yük yoğunluğu tekrardan artmıştır. Yağ fazına limon yağı eklenerek hazırlanan emülsiyonlar 2 saatlik simüle edilmiş ince bağırsak fazı boyunca harcanan NaOH miktarına göre yüzde serbest yağ asitleri miktarı hesaplanmıştır. %10, %20, %30 limon yağı eklenen emülsiyonların 3-MCPD biyoerişilebilirlikleri sırasıyla %84.86, %69.15, %50.23 olduğu gözlemlenmiştir. Yani sırasıyla %10.2, %25.9 ve %44.8 olacak şekilde 3-MCPD biyoerişilebilirliğini düşürmüştür. Burada ilginç olan, sindirilmeyen yağ olarak limon yağının artan oranlarda eklenmesinin, 3-MCPD biyoerişilebilirliğini katıldıkları orandan daha yüksek oranda azaltmış olmasıdır. Bu da ince bağırsak fazında daha yoğun kısa zincirli yağ asidi olması sebebiyle daha düşük konsantrasyonda şilomikron oluşumuna ve yağda çözünen bileşenlerin emiliminin etkilenmesine bağlanabilir.

Farklı parçacık boyutlarına sahip ince, orta ve kaba su-içinde-zeytinyağı emülsiyonlarının ve yağ fazına farklı oranlarda limon yağı eklenen emülsiyonların başlangıç örnekleri ve simüle edilen *in vitro* sindirim modeli sonrasında alınan misel fazındaki örnekler için sitotoksikite testleri uygulanmıştır. Fibroblast (L929) ve böbrek (Vero) hücrelerine uygulanan bu örneklerin başlangıç grubunda sitotoksik bir etkisi olmadığı hücre canlılıklarının %100'e yakın olduğu gözlemlenmiştir. Fakat fibroblast hücre hattına uygulanan testler sonucunda ince ve orta emülsiyonun misel fazlarının canlılıkları %70'den düşük olduğu bulunmuştur. İnce emülsiyon misel fazı için tam konsantrasyon uygulandığında hücreler %16.75 canlılık göstermiş, orta emülsiyon misel fazı için tam konsantrasyon uygulandığında hücreler %46.1 canlılık göstermiştir. Kaba emülsiyon ~ %100 canlılık göstererek sitotoksik bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Zeytinyağı örneğinin misel fazı sitotoksik bir etki göstermemiştir. İnce emülsiyon için IC_{50} değeri 4.16 ± 0.32 mg/mL, orta emülsiyon için 2.17 ± 0.23 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Kesin bir yargıya ulaşabilmek için *in vitro* olarak uygulanan bu test sonuçlarının *in vivo* testlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Vero hücre hattına uygulanan testlerde örneklerin başlangıç fazının hücre canlılıkları ~ %100'dür. Fakat bu testler örneklerin misel fazına uygulandığında orta emülsiyonun misel fazı için tam konsantrasyon uygulandığında hücreler %58.8 canlılık göstermiş, ancak 1/8 konsantrasyondan sonra ise hücreler ~ %100 canlılık göstermiştir. IC₅₀ değeri ise 1.70 ± 0.25 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Fibroblast ve böbrek hücre hattına uygulanan limon yağı eklenen emülsiyonların hücre canlılıkları %70'den büyüktür. İnce ve orta emülsiyonların misel fazının fibroblast hücre hattında gösterdiği sitotoksik etki emülsiyonların yağ fazına limon yağı eklendiğinde kaybolmuştur. Orta emülsiyonunun misel fazının vero hücre hattında gösterdiği sitotoksik etki de emülsiyonların yağ fazına limon yağı ekleyerek kaybolmuştur.

Sonuç olarak gıda emülsiyonlarının 3-MCPD biyoyararlanımı üzerine etkisi olduğunu, parçacık boyutu azaldığında biyoerişilebilirliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak büyük parçacık boyutuna sahip emülsiyonlar üreterek ya da emülsiyonların yağ fazına limon yağı gibi sindirilemeyen yağ ekleyerek 3-MCPD esterlerinin sitotoksitesinin düşürülebileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, K., Appel, K. E., Berger-Preiss, E., Apel, E., Gerling, S., Mielke, H., Creutzenberg, O., Lampen, A. 2013. Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats. *Archives of Toxicology*, 87(4), 649-659.
- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D. J., Xiao, H. 2012. Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry*, 132(2), 799-807.
- Aktümsek, A. 2001. *Anatomi ve Fizyoloji*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Anonim. 2011. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Resmî Gazete sayı: 28157 (3. Mükerrer).
- Anonim. 2018. Web Sitesi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/natural-toxins-in-food>. Erişim Tarihi: 24.12.2021.
- Anonim. 2021. Web Sitesi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/> . Erişim Tarihi: 25.12.21
- Anonymous. 2001. Opinion of the scientific committee on food on 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD). Scientific Committee on Food in European Commission. Brüksel, Belçika.
- Anonymous. 2007. Infant formula and follow-up formula may contain harmful 3-MCPD fatty acid esters. BfR Opinion No: 047/2007.
- Anonymous. 2009. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. ISO 10993-5:2009.
- Anonymous. 2012. 3-Monochloro-1,2-propanediol. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC), 101. Lyon, Fransa.
- Anonymous. 2014. Commission Recommendation of 10 September 2014 on the monitoring of the presence of 2 and 3-monochloropropane-1,2-diol (2 and 3-MCPD), 2- and 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in food. EFSA, Official Journal of the European Union, L 271, 93-95.
- Anonymous. 2016. Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). *EFSA Journal*, 14(5), 4426, 1-159.
- Anonymous. 2018. Update of the risk assessment on 3-monochloropropanediol and its fatty acid esters. *EFSA Journal*, 16(1), 5083.
- Anonymous. 2020. European Commission 1322, Commission Regulation (EU) 2020/1322 of 23 September 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of 3-monochloropropanediol (3-MCPD), 3-MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in certain foods, Official Journal of the European Union, 310, 2-5.
- Ayaz, A. Yurttagül, M. 2008. *Besinlerdeki Toksik Öğeler*. T.C. Sağlık Bakanlığı, 32, Ankara.

- Bansal, G., Zhou, W., Barlow, P.J., Lo, H.L. and Neo, F.L. 2010. Performance of palm olein in repeated deep frying and controlled heating processes. *Food Chemistry*, 121(2), 338-347.
- Barocelli, E., Corradi, A., Mutti, A. and Petronini, P.G. 2011. Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters in a 90-day toxicological study. *EFSA Supporting Publications*, 8, 187E.
- Buhrke, T., Weißhaar, R., Lampen, A. 2011. Absorption and metabolism of the food contaminant 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its fatty acid esters by human intestinal Caco-2 cells. *Archives of Toxicology*, 85, 1201-1208.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A. 2014. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 155–171.
- Chang, Y. ve McClements, D. J. 2016a. Influence of emulsifier type on the *in vitro* digestion of fish oil-in-water emulsions in the presence of an anionic marine polysaccharide (fucoidan): Caseinate, whey protein, lecithin, or Tween 80. *Food Hydrocolloids*, 61, 92-101.
- Chang, Y. ve McClements, D. J. 2016b. Characterization of mucin e lipid droplet interactions: influence on potential fate of fish oil-in-water emulsions under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 56, 425-433.
- Chen, J., Gaikwad, V., Holmes, M., Murray, B., Povey, M., Wang, Y., Zhang, Y. 2011. Development of a simple model device for *in vitro* gastric digestion investigation. *Journal of Food & Function*, 2, 174-182.
- Cheng, W., Liu, G. and Liu, X. 2016. Formation of glycidyl fatty acid esters both in real edible oils during laboratory-scale refining and in chemical model during high temperature exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(29), 5919-5927.
- Çakmak Demircigil, G. 2011. Kızartma İşlemi ile İlgili Toksik Bileşiklerin Oluşumu, Filtrasyon Yöntemleri ve Yasal Düzenlemeler. *Gıda Dergisi*, 36(2), 105-112.
- Divinova, V., Svejtkovska, B., Novotny, O., Velisek, J. 2004. Survey of 3-Chloropropane-1,2- Diol and its Precursors in Foods in the Czech Republic. *Czech Journal Food Science*, 22, 267-271.
- DGF. 2011. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft, DGF Standard Methods Section C-Fats C-VI 18 (10) Fatty-acid-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxypropane-1-ol (glycidol): Determination in oils and fats by GC/MS (Differential measurement).
- Donsì, F., Sessa, M., Mediouni, H., Mgaidi, A., Ferrari, G. 2011. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion-based delivery systems. *Procedia Food Science*, 1, 1666-1671.
- Freudenstein, A., Weking, J., Matthaus, B. 2013. Influence of precursors on the formation of 3-MCPD and glycidyl esters in a model oil under simulated deodorization conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 286-294.
- Gao, B., Li, Y., Huang, G., Yu, L. 2019. Fatty Acid Esters of 3-Monochloropropanediol: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 259-284.

- Gümüş, C.E., Decker, A.E., McClements, D.J. 2017. Gastrointestinal fate of emulsion-based ω -3 oil delivery systems stabilized by plant proteins: Lentil, pea, and faba bean proteins. *Journal of Food Engineering* 207,90-98.
- Hrncirik, K. ve Duijn, G.V. 2011. An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011(113), 374-379.
- Hung, W. C., Peng, G. J., Tsai, W. J., Chang, M. H., Liao, C. D., Tseng, S. H., Kao, Y.M., Wang, D.Y., Cheng, H. F. 2017. Identification of 3-MCPD esters to verify the adulteration of extra virgin olive oil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10(3), 233-239.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. 2008. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22, 1191-1202.
- Jędrkiewicz, R., Kupska, M., Głowacz, A., Gromadzka, J., Namieśnik, J. 2016. 3-MCPD: A Worldwide Problem of Food Chemistry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2268-2277.
- Joye, I.J., Davidov-Pardo, G., McClements, D.J. 2014. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 40, 168-182.
- Kamikata, K., Vicente, E., Ariseto-Bragotto, A.P., Miguel, A.M.R.O, Milani, R.F., Tfouni, S.A.V. 2019. Occurrence of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters in extra virgin olive oils, olive oils and oil blends and correlation with identity and quality parameters. *Food Control*, 95, 135-141.
- Kuhlmann, J. 2011. Determination of bound 2, 3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 335-344.
- Küsters, M., Bimber, U., Ossenbrüggen, A., Reeser, S., Gallitzendörfer, R., Gerhartz, M. 2010. Rapid and simple micromethod for the simultaneous determination of 3-MCPD and 3-MCPD esters in different foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6570-6577.
- Küsters, M., Bimber, U., Reeser, S., Gallitzendörfer, R., Gerhartz, M. 2011. Simultaneous determination and differentiation of glycidyl esters and 3-monochloropropane-1, 2-diol (MCPD) esters in different foodstuffs by GC-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(11), 6263-6270.
- Lee, B.Q., Khor, S.M. 2015. 3-Chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in soy sauce: A review on the formation, reduction, and detection of this potential carcinogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 48-66.
- Li, Q., Li, T., Liu, C., Dai, T., Zhang, R., Zhang, Z., McClemnets, D. J. 2017. Enhancement of carotenoid bioaccessibility from tomatoes using excipient emulsions: Influence of particle size. *Food Biophysics*, 12(2), 172-185.
- Liu, M., Gao, B.Y., Qin, F., Wu, P.P, Shi, H.M., Luo, W., Ma, A.N., Jiang, Y.R., Xu, X.B., Yu, L.L. 2012. Acute oral toxicity of 3-MCPD mono- and di-palmitic esters in Swiss mice and their cytotoxicity in NRK-52E rat kidney cells. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 50, 3785-3791.

- Liu, M., Liu, J., Wu, Y., Gao, B., Wu, P., Shi, H., Sun, X., Haiqiu, H., Wang, T.T.Y., Yu, L.L. 2016. Preparation of five 3-MCPD fatty acid esters, and the effects of their chemical structures on acute oral toxicity in Swiss mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 841-848.
- Matthaus, B., Pudiel, F., Fenling, P., Vosmann, K., Freudenstein, A. 2011. Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 380–386.
- McClements, D.J., Decker, E.A. 2000. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, 65, 1270-1282.
- McClements, D.J. 2004. *Food Emulsion Principles, Practices and Techniques*. CRC Press, Boca Raton.
- McClements, D.J. 2007. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611-649.
- McClements, D.J., Decker E.A., Park, Y. 2009. Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 48-67.
- McClements, D.J., Li, Y. 2010. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Journal of Food & Function*, 1, 32-59.
- McClements, D.J., Rao, J. 2011. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330.
- McClements, D.J., Jafari, S.M. 2018. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 55-79.
- McClements, D. J. 2021. Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research*, 81, 101081.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodtkor, A. 2014. A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Journal of Food Function*, 5, 1113-1124.
- Öztürk, B., Argin, S., Ozilgen, M., & McClements, D. J. 2015. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. *Food Chemistry*, 187, 499-506.
- Öztürk, B., McClements, D.J. 2016. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Food Chemistry And Biochemistry*, 7, 1-6.
- Özyazgan, S. 2002. Toksikokinetik. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Zehirlenmeler Sempozyumu, 32, Aralık, İstanbul.
- Parada, J., Aguliera, J.M. 2007. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), 21-32.

- Pool, H., Mendoza, S., Xiao, H., McClements, D. J. 2013. Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. *Food & Function*, 4(1), 162-174.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*, 135(3), 1440-1447.
- Rahn, A.K.K, Yaylayan, V.A. 2011. What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 323-329.
- Ramli, M. R., Siew, W. L., Ibrahim, N. A., Hussein, R., Kuntom, A., Abd. Razak, R. A., Nesaretnam, K. 2011. Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(11), 1839-1844.
- Rao, J., McClements, D. J. 2012. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. *Food Chemistry*, 134(2), 749-757.
- Rao, J., Decker, E. A., Xiao, H., McClements, D. J. 2013. Nutraceutical nanoemulsions: influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3175-3183.
- Rein, M. J., Renouf, M., Hernandez, C.C., Goretta, L.A., Thakkar, S.K., Pinto, M.S. 2012. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602.
- Rogers, K. 2011. *The Digestive System*. Britannica Educational Publishing, New York.
- Saffarionpour, S. 2019. Preparation of Food Flavor Nanoemulsions by High and Low-Energy Emulsification Approaches. *Food Engineering Reviews*, 11, 259-289.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., McClements, D. J. 2013a. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141(2), 1472-1480.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. 2013b. Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chemistry*, 139(1-4), 878-884.
- Salvia-Trujillo, L., McClements, D.J. 2016. Enhancement of lycopene bioaccessibility from tomato juice using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size. *Food Chemistry*, 210, 295-304.
- Santana, R.C., Perrechil, F.A., Cunha, R.L. 2013. High- and Low-Energy Emulsifications for Food Applications: A Focus on Process Parameters. *Food Engineering Reviews*, 5, 107-122.
- Schonfeldt, H., Pretorius, B., Hall, N. 2016. Bioavailability of Nutrients. *Encyclopedia of food and health*. Academic Press, Oxford, UK.
- Schultrich, K., Oez, F., Bergau, N., Buhrke, T., Braeuning, A. 2021. Absorption and metabolism of 3-MCPD in hepatic and renal cell lines. *Toxicology in Vitro*, 70, 105042.

- Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G., Scanlan, F. P., Stadler, R. H. 2008. Esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD. *Food Additives and Contaminants*, 25(4), 391-400.
- Shao, P., Feng, J., Sun, P., Xiang, N., Lu, B., Qiu, D. 2020. Recent advances in improving stability of food emulsion by plant polysaccharides. *Food Research International*, 137, 1-10.
- Silletti, E., Vingerhoeds, M. H., Norde, W., Van Aken, G. A. 2007. The role of electrostatics in saliva-induced emulsion flocculation. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 596-606.
- Singh, H., Ye, A., Horne, D. 2009. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48(2), 92-100.
- Singh, H., Sarkar, A. 2011. Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 47-57.
- Sugasini, D., Lokesh, B. R. 2013. Enhanced incorporation of docosahexaenoic acid in serum, heart, and brain of rats given microemulsions of fish oil. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 382(1), 203-216.
- Tan, Y., Liu, J., Zhou, H., Mundo, J. M., McClements, D. J. 2019. Impact of an indigestible oil phase (mineral oil) on the bioaccessibility of vitamin D3 encapsulated in whey protein-stabilized nanoemulsions. *Food Research International*, 120, 264-274.
- Tan, Y., Zhou, H., Zhang, Z., McClements, D. J. 2021. Bioaccessibility of oil-soluble vitamins (A, D, E) in plant-based emulsions: Impact of oil droplet size. *Food & Function*, 12(9), 3883-3897.
- Tee, V.P., Shahrim, Z., Nesaretnam, K., 2011. Cytotoxicity Assays and Acute oral Toxicity of 3-MCPD Esters. Abstracts of Papers, 9th Euro Fed Lipid Congress, Rotterdam.
- Troncoso, E., Aguilera, J. M., McClements, D. J. 2012. Influence of particle size on the *in vitro* digestibility of protein-coated lipid nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 382(1), 110-116.
- Turan, S., Solak, R., Keskin, S. 2019. Investigation of the Formation of Free and Bound 2- and 3-Monochloropropane-1,2-Diols During Deep Frying of Leavened Dough Using Response Surface Methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121, 1-11.
- Velisek, J., Davidek, J., Kubelka, V., Janicek, G., Mankova, B. 1978. Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 167, 241-244.
- Versantvoort, C.H.M., Van de Kamp, E., Rempelberg, C.J.M. 2004. Development and Applicability of an In Vitro Digestion Model in Assessing the Bioaccessibility of Contaminants from Food. National Institute for Public Health and the Environment.
- Xu, X., Sun, Q., McClements, D. J. 2020. Effects of anionic polysaccharides on the digestion of fish oil-in-water emulsions stabilized by hydrolyzed rice glutelin. *Food Research International*, 127, 108768.

- Yang C.S., Sang S, Lambert J.D., Lee M.J. 2008. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 139-151.
- Yang, Y., McClements, D. J. 2013. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. *Food Chemistry*, 141(1), 473-481.
- Yi, J., Li, Y., Zhong, F., Yokoyama, W. 2014. The physicochemical stability and *in vitro* bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions. *Food Hydrocolloids*, 35, 19-27.
- Yazıhan, N. 2017. İnsan Sindirim Sistemi ve Gıda Uygulamalarında Kullanılan Modeller. Tübitak Proje No: San-tez 0899.STZ.2015.
- Yuan, Y., Cui, C., Liu, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, Y., Yan, H. 2022. Effects of oxidation and hydrolysis of frying oil on MCPD esters formation in Chinese fried dough sticks. *LWT-Food Science and Technology*, 154, 112576.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zou, L., Xiao, H., Zhang, G., Decker, E. A., McClements, D. J. 2016. Enhancement of carotenoid bioaccessibility from carrots using excipient emulsions: influence of particle size of digestible lipid droplets. *Food & Function*, 7(1), 93-103.
- Zhang X., Gao B., Qin F., Shi H., Jiang Y., Xu X. and Yu L. 2013, A Free Radical Mediated Formation of 3-Monochloropropanediol (3-MCPD) Fatty Acid Diesters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2548–2555.
- Zhang, Z., Gao, B., Zhang, X., Jiang, Y., Xu, X., Yu, L. 2015a. Formation of 3-Monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) Di- and Monoesters from Tristearoylglycerol (TSG) and the Potential Catalytic Effect of Fe^{2+} and Fe^{2+} *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1839-1848.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., McClements, D. J. 2015b. Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: *In vitro* digestion study. *Food Research International*, 75, 71-78.
- Zhao, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Liu, J., Wang, Y., Gao, B., Niu, Y., Sun, X., Yu, L. 2016. Formation of 3-MCPD Fatty Acid Esters from Monostearoyl Glycerol and the Thermal Stability of 3-MCPD Monoesters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8918-8926.
- Zelinkova, Z., Svejtkovska, B., Velisek, J., Dolezal, M. 2006. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1290-1298.
- Zelinková, Z., Novotný, O., Schůrek, J., Velíšek, J., Hajšlová, J. and Doležal, M. 2008. Occurrence of 3-MCPD fatty acid esters in human breast milk. *Food Additives and Contaminants*, 25(6), 669-676.