

**Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve NMR
Relaksometre Teknikleri Kullanılarak Karakterize Edilen
Lipozom Sistemleri ile Yağ Oksidasyonunu Önleyici Sprey
Ürün Geliştirilmesi**

Program Kodu: COST

Proje No: 113O442

**Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Mecit H. ÖZTOP**

Bursiyer(ler):

Mete Kilercioğlu
Barış Özel
Emrah Kırtıl
İrem Alaçık
Selen Güner
Damla Dağ

Nisan 2017
ANKARA

ÖNSÖZ

Projede gıda endüstrisinde emülgatör olarak kullanılan yumurta ve soya lesitininden bir enkapsülasyon sistemi olan lipozomların, mikroakışkanlaştırma ve ultrasonik homjenizasyon tekniklerini kullanarak oluşturulması amaçlanmış ve bu sistemlerin farklı teknikler kullanarak karakterizasyonu hedeflenmiştir. Tasarlanan lipozom sistemleri yeşil çay özütü ile yüklenmiş ve fındık, ceviz gibi yağ oksidasyonuna hassas gıdalara uygulanabilecek bir sprey ürün geliştirilmiştir. Proje TÜBİTAK 3501 programı kapsamında 1130442 Proje no'su ile desteklenmiş, projenin başında ekipman tedariğinde yaşanan sıkıntılardan dolayı 4 ay uzatma talep edilerek, proje 15.02.2017 tarihinde tamamlanmıştır. Ayrıca Avrupa Birliği COST Programı çerçevesinde desteklenen FP1405 numaralı **Active and intelligent fibre-based packaging - innovation and market introduction** başlıklı COST Aksiyonuna bu proje kapsamında Türkiye'yi temsil eden bir Management committee üyesi olarak katılım sağlanmıştır. Eylül 2015 ve Mart 2016 tarihlerinde Lizbon ve Münih'te gerçekleşen toplantılara katılmış, Mart 2017'de projede çalışan bir bursiyer aksiyon çerçevesinde önerilen *Short Term Scientific Mission programı (STSM)* kapsamında, projede üretilen sprey ürünün farklı uygulamalarını denemek üzere (plastik ambaljlara kaplama maddesi uygulaması denemesi amacı ile) İsviçre'nin Zürih şehrindeki bir araştırma laboratuvarına ziyaretçi araştırmacı olarak gitmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	7
3.1 Boş (Yüklenmemiş) Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	7
3.1.1 Yüksek Şiddetli Ultrasonikasyon.....	7
3.1.2 Yüksek Basınçla Homojenizasyon.....	8
3.1.3 Parçacık Boyut Analizi.....	8
3.1.4 Transmisyon Elektron ve Işık Mikroskopları Deneyleri.....	8
3.1.5 Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	9
3.1.6 NMR Relaksometre Deneyleri.....	9
3.1.7 Boş lipozom sistemlerinin kimyasal dayanıklılığının incelenmesi.....	9
3.2 Dolu (Yüklenmiş) , Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	9
3.2.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Ölçümü.....	10
3.2.2 Antioksidan Aktivite Ölçümü.....	10
3.2.3 İstatistiksel Analiz.....	11
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	12
4.1 Boş (Yüklenmemiş) Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	12
4.1.1 Birincil ve İkincil Homojenizasyon Yöntemlerinin Belirlenmesi.....	12
4.1.2 Farklı Değişkenlerin Lipozom Sistemlerinin Parçacık Boyutu Üzerine Etkileri.....	15

4.1.3 Lipozomların Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	29
4.1.4 Mikroskop ile Görüntüleme.....	31
4.1.5 Lipozomların Hidroperoksit Ölçümleri.....	36
4.1.6 NMR Relaksometre Ölçümleri.....	43
4.2 Dolu (Yüklenmiş) Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	53
4.2.1 Yeşil Çay Özütünün Toplam Fenolik Miktarı ve Antioksidan Aktivitesi.....	53
4.2.2 Lipozomların Yeşil Çay Özütü ile Doldurulması.....	55
4.2.3 Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli Analizi.....	55
4.2.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	59
4.2.5 Antioksidan Aktivitesi.....	62
4.2.6 Transmisyon Elektron Mikroskobu.....	64
4.2.7. NMR Relaksometre Ölçümleri.....	66
4.2.8 Lipozomların Katmanlı Depozisyon Yöntemi ile Polimer Kullanarak Kaplanması. .	74
4.2.9 Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	83
4.2.10 Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	86
4.2.11 Antioksidan Aktiviteleri.....	87
4.2.12 Transmisyon Elektron Mikroskobu.....	89
4.3 Dolu (Yüklenmiş) Lipozom sistemlerinden salınımın matematiksel modellemesi.....	91
4.4 Tasarlanan Lipozom Sistemlerinin Spreylenerek Gıdalara Uygulanması.....	91
5. SONUÇ.....	95

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1. Distile suda hazırlanan, farklı ön homojenizasyon şiddetlerine 2 dakika boyunca maruz kalmış; daha sonrasında 750 barda 5 tekrarlı mikroakışkanlaştırma işleminden geçmiş 'ticari lesitin' kullanılarak hazırlanan lipozomların parçacık boyutları.....14
- Tablo 2. pH 3.8 asetat tamponunda Lipoid S75, soya lesitini kullanarak hazırlanan 20,000 rpm'de 2 dakika boyunca Ultra Turrax ile ön homojenizasyona maruz kalıp farklı ultrasonik yöntemlerle homojenize edilen lipozomların parçacık boyutları.....15
- Tablo 3. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde ultrasonikasyon (USK) uygulanarak hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda bekletilmiş S75 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.....23
- Tablo 4. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 4 °C'de bekletilmiş S75 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.....24
- Tablo 5. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 25 °C'de bekletilmiş S75 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.....25
- Tablo 6. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 4 °C'de bekletilmiş E80 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.....26
- Tablo 7. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 25 °C'de bekletilmiş E80 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.....27
- Tablo 8. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) ile hazırlanan E80 ve S75 lipozomlarının 3 yönlü ANOVA ile analizi.....46

Tablo 9. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 400 bar basınçlanarak farklı sıcaklıklarda bekletilen E80 ve S75 lipozomlarının ortalama T_2 değerleri. İstatistiksel analiz her bir fosfolipid-çözücü kombinasyonu ve sıcaklık için ayrı ayrı yapılmıştır. 47

Tablo 10. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 900 bar basınçlanarak farklı sıcaklıklarda bekletilen E80 ve S75 lipozomlarının ortalama T_2 değerleri. İstatistiksel analiz her bir fosfolipid-çözücü kombinasyonu ve sıcaklık için ayrı ayrı yapılmıştır. 48

Tablo 11. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 1300 bar basınçlanarak farklı sıcaklıklarda bekletilen E80 ve S75 lipozomlarının ortalama T_2 değerleri. İstatistiksel analiz her bir fosfolipid-çözücü kombinasyonu ve sıcaklık için ayrı ayrı yapılmıştır. 49

Tablo 12. Mikroakışkanlaştırma ve ultrasonikasyon ile hazırlanan lipozomların T_2 değerleri: A) Asetat Tampon Çözeltisinde Hazırlanmış Yeşil Çay Ekstraktı Yüklü Lipozomlar; B: Distile Suda Hazırlanmış Yeşil Çay Ekstraktı Yüklü Lipozomlar; C: Asetat Tampon Çözeltisinde Hazırlanmış Boş Lipozomlar; D: Distile Suda Hazırlanmış Boş Lipozomlar..... 72

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Küçük tek lamelli keseciklerin şematik görüntüsü (Taylor vd., 2005).....3
- Şekil 2. Fosfatidilkolin'in (FK) kimyasal yapısı.....3
- Şekil 3. Lipoid E80 yumurta lesitini kullanarak distile suda hazırlanmış, farklı ön homojenizasyon güçleri kullanılarak elde edilen lipozomların parçacık boyut ölçümleri*.....13
- Şekil 4. Farklı lesitin tipleri kullanarak asetat tampon çözeltilerinde hazırlanmış lipozomların farklı ön homojenizasyon teknikleri ile 900 bar + 5 tekrar mikroakışkanlaştırma koşulundaki parçacık boyut ölçümleri*..... 13
- Şekil 5. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış S75 lipozomlarının mikroakışkanlaştırıcı (MA) basıncı ile artan transparanlığı gösterilmiştir. UT kısaltması, yalnızca önhomjenizasyona maruz bırakılmış örneği temsil etmektedir.....16
- Şekil 6. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 2, 5 ve 8 dakika ultrasonikasyon (USK) uygulanarak hazırlanmış S75 lipozomlarının ilk gün parçacık boyutları*.....18
- Şekil 7. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) içerisinde farklı işlem düzeylerinde hazırlanmış S75 lipozomlarının ilk gün parçacık boyutları*.....18
- Şekil 8. Ultrasonikasyon (USK) ile hazırlanan S75 lipozomlarının farklı asetat tampon çözeltisi (ATÇ), fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) ve distile su (DS)'deki zeta potansiyel değerleri*..... 30
- Şekil 9. Mikroakışkanlaştırıcı (MA) ile hazırlanan S75 lipozomlarının asetat tampon çözeltisi (ATÇ), fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) ve distile su (DS)'deki zeta potansiyel değerleri*.....31
- Şekil 10. 5 dk ultrasonikasyon (USK) ile distile su (DS) içerisinde hazırlanarak 4 °C'de bekletilmiş S75 lipozomlarının birinci (a) ve onbeşinci (b) gün transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.....32

Şekil 11. Soldan sağa ışın hasarı sonucu oluşan kabarcıklanma (a) ve genişlemesi (b) gösterilmiştir. Görüntüler distile su (DS)'de 1300 bar basınçla hazırlanmış E80 lipozomlarından ilk gün, peşpeşe alınmıştır.....	33
Şekil 12. Distile su (DS) içerisinde 1300 bar basınçlanarak 4 °C'de 15 gün saklanmış S75 lipozomlarında görülen hegzagonal katlanmalar (a) ve açısız görüntüler (b). Beyaz oklar dalgamsı hegzagonal katlanmaları işaret etmektedir.....	34
Şekil 13. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ)'de hazırlanarak 2 ay boyunca 4 °C'de bekletilen E80 lipozomlarının çok odaklı görüntüsü.....	36
Şekil 14. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ)'de hazırlanarak 2 ay boyunca 4 °C'de bekletilen S75 lipozomlarının çok odaklı görüntüsü.....	36
Şekil 15. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) içerisinde hazırlanarak 4 °C'de saklanmış farklı lipozomların zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomojenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.....	38
Şekil 16. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) içerisinde hazırlanarak 25 °C'de saklanmış farklı lipozomların zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomojenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.....	39
Şekil 17. Distile su (DS)'de hazırlanmış S75 lipozomlarının zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomojenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.....	41
Şekil 18. Distile su (DS)'de hazırlanmış E80 lipozomlarının zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomojenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.....	42
Şekil 19. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 1300 bar basınçlanarak 25 °C'de saklanmış S75 lipozomlarının parçacık boyutu (■) ve T ₂ değerleri (—○—) değişimi.....	53
Şekil 20. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 400 bar basınçlanmış E80 lipozomlarının 4 °C (—●—) ve 25 °C (—●—) T ₂ değişimleri.....	55

Şekil 21. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 900 bar basınçlanmış E80 lipozomlarının 4 ° C (—●—) ve 25 ° C (—●—) T ₂ değişimleri.....	55
Şekil 22. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 1300 bar basınçlanmış E80 lipozomlarının 4 ° C (—●—) ve 25 ° C (—●—) T ₂ değişimleri.....	56
Şekil 23. %0.1 yeşil çay içeren asetat tampon çözeltisi ve saf su çözeltilerinin 0, 7 ve 14. günlerinde toplam fenolik madde miktarı.....	57
Şekil 25. Asetat tampon çözeltisinde mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların hacimsel oran ile hesaplanmış parçacık boyutu dağılımı.....	59
Şekil 26. Saf suda ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; □ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▣ boş lipozomlar.....	60
Şekil 27. Asetat tampon çözeltisinde ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; □ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▣ boş lipozomlar.....	60
Şekil 28. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; ■ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▣ boş lipozomlar....	61
Şekil 29. Asetat tampon çözeltisinde mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; ■ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▣ boş lipozomlar.....	61
Şekil 30. Mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0 ve 14. günlerdeki zeta potansiyeli değerleri; A; asetat tampon çözeltisinde hazırlanan yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, B; saf suda hazırlanan yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, C; asetat tampon çözeltisinde hazırlanan boş lipozomlar, D; saf suda hazırlanan boş lipozomlar.....	62
Şekil 31. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki toplam fenolik madde miktarları; ▣ ultrasonikasyon tekniği ile ▣ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile.....	65
Şekil 32. Saf suda hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki toplam fenolik madde miktarları; ▣ ultrasonikasyon tekniği ile ▣ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile.....	65

Şekil 33. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki DPPH metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri; ☒ ultrasonikasyon tekniği ile ☐ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile.....	67
Şekil 34. Saf suda hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki DPPH metodu ile hesaplanan antioksidan aktivitesi; ☒ ultrasonikasyon tekniği ile ☐ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile.....	67
Şekil 35. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki FRAP metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri; (●) ultrasonikasyon tekniği ile (◆) mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile.....	68
Şekil 36. Saf suda hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki FRAP metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri; (■) ultrasonikasyon tekniği ile (▲) mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile.....	68
Şekil 37. Saf suda ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanan lipozomların transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. (a) Depolama sürecinin ilk gününde (b) Depolama sürecinin son gününde.....	69
Şekil 38. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. (a) Depolama sürecinin ilk gününde (b) Depolama sürecinin son gününde.....	70
Şekil 39. Mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomların T_2 değerleri A: Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren lipozomlar; B: Saf suda hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren lipozomlar; C: Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış boş lipozomlar; D: Saf suda hazırlanmış boş lipozomlar.....	72
Şekil 40. Ultrasonikasyon ile hazırlanan lipozomların T_2 değerleri A: Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren lipozomlar; B: Saf suda hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren lipozomlar; C: Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış boş lipozomlar; D: Saf suda hazırlanmış boş lipozomlar.....	73
Şekil 41. Asetat tampon çözeltisinde mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik kitozan çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri.....	80

Şekil 42. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik lizozom çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri.....	80
Şekil 43. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik balık jelatini çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri...	81
Şekil 44. Kitozan ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik arap zımkı çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri.....	82
Şekil 45. Kitozan ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik peynir altı suyu proteini (PASP) çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri.....	83
Şekil 46. Balık jelatini ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik arap zımkı çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri.....	84
Şekil 47. Balık jelatini ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik peynir altı suyu proteini (PASP) çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri.....	85
Şekil 48. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik arap zımkı çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri....	87
Şekil 49. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik peynir altı suyu proteini (PASP) çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri.....	87
Şekil 50. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları. Kontrol; saf suda hazırlanmış kaplanmamış, A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zımkı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomlar.....	89
Şekil 51. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları. Kontrol; asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış kaplanmamış D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar.....	90
Şekil 52. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki zeta potansiyelleri. A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zımkı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomlar.....	91

Şekil 53. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki zeta potansiyelleri. D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar.....	92
Şekil 54. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki toplam fenolik madde miktarları. Kontrol I; Saf suda hazırlanmış kaplanmamış, A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zamkı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış, Kontrol II; asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış kaplanmamış, D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar..	94
Şekil 55. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki antioksidan aktiviteleri. Kontrol I; Saf suda hazırlanmış kaplanmamış, A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zamkı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış, Kontrol II; asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış kaplanmamış, D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar..	96
Şekil 56. Lizozom ile kaplanmış lipozomların TEM görüntüleri; (a):Depolama süresinin ilk günündeki, (b):Depolama süresinin son günündeki.....	97
Şekil 57. Arap zamkı ile kaplanmış lipozomların TEM görüntüleri; (a):Depolama süresinin ilk günündeki, (b):Depolama süresinin son günündeki.....	98
Şekil 58. Peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomların TEM görüntüleri; (a):Depolama süresinin ilk günündeki, (b):Depolama süresinin son günündeki.....	98
Şekil 59. Farklı lipozom çözeltilerinin fındık üzerine spreyleneceği sonrası (1.saat) hidroperoksit ölçümü sonuçları. (A: Distile su ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, B: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, C: Distile su ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, D: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, F: Spreylenmemiş fındık numuneleri).....	100
Şekil 60. Farklı lipozom çözeltilerinin fındık üzerine spreyleneceği sonrasında zamana bağlı hidroperoksit ölçümü sonuçları. (A: Distile su ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; B: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; C: Distile su ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; D: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; F: Spreylenmemiş fındık numuneleri).....	101

Şekil 61. (A) Duyusal analiz için hazırlanan fındıkların spreylenemeden önceki fotoğrafı; soldan sağa kontrol, yeşil çay yüklenmiş lipozom spreylenecek ve boş lipozom spreylenecek fındıklar görülmektedir. (B) İlk gün yeşil çay özütü yüklü lipozom spreylenecek duyusal analizde kullanılmak üzere oda koşullarında 40 gün saklanan fındıklar ve kontrol (control) numuneleri; (C) İlk gün boş lipozom spreylenecek duyusal analizde kullanılmak üzere oda koşullarında 40 gün saklanan fındıklar ve kontrol (control) numuneleri.....102

ÖZET

Lipozomlar hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşiklerin kapsüle edilmesi amaçlı farmasötik, kişisel bakım, kimya ve gıda endüstrisinde kullanılan, polar yapılar içeren iki tabakalı küresel yağ kesecikleridir. Bu yapılardan oluşan enkapsülasyon sistemlerinin biyo-uyumlu, biyo-bozunur olmaları, toksik etkilerinin olmaması ve istenildiğinde kapsüllenmiş maddeyi salabilmesi özellikleri bu sistemleri birçok yönden avantajlı kılmaktadır. Ayrıca, polimer bazlı enkapsülasyon sistemleri ile karşılaştırıldığında, kullanıldığı ortamın viskozite değerini ve tekstürel özelliklerini fazla değiştirmemesi de diğer avantajlarıdır. Lipozom elde etmek için kullanılan polar yağların doğadaki başlıca kaynakları; yumurta ve soya lesitindir. Bu çalışmada, bu iki kaynaktan elde edilen lesitinlerden hazırlanan lipozomlar hazırlanmış, soya lesiti ile hazırlananların dayanıklılıkları fazla olduğundan bu lipozomların içerisine antioksidan aktivite gösteren fenolik bileşikler kapsüle edilerek, yağ oksidasyonunu engellemek üzere kullanılacak sprey bir ürün elde edilmiştir. Sprey uygulama için oksidasyona hassas bir gıda olan fındık seçilmiştir. Elde edilen ürün, tamamen doğal kaynaklar kullanılarak üretildiği için uygulandığı gıdaya herhangi bir kimyasal eklenti söz konusu olmamıştır. Sprey ürün geliştirme çalışmaları çerçevesinde öncelikli olarak lipozom sistemlerinin karakterizasyonu yapılmış ve ürünün dayanıklılığı incelenmiştir. Son aşamada elde edilen ürünler fındık üzerine uygulanarak, fındıkların duyuşal özellikleri incelenmiştir. Ürünün karakterizasyonu ve fiziksel dayanıklılığın ölçülmesi için tahribatsız bir ölçme tekniğı olan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) , NMR Relaksometre başlıca metotlar olarak kullanılmış ancak NMR Relaksometre tekniğinin fiziksel özelliklerle daha iyi bir şekilde ilişkilendirildiğı görülmüştür. Aynı zamanda karakterizasyon amaçlı, parçacık boyu analizi, zeta potansiyel, ışık mikroskopu teknikleri de kullanılmıştır. Lipozom sistemlerinin kimyasal dayanıklılık testleri için içsel oksidasyonunu ölçmek amacıyla hidroperoksit ölçümleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiş, yeşil çay özütülü lipozomlar için antioksidan, fenolik madde miktarı tayinleri de yapılmıştır. Lipozomların dayanıklılıklarını güçlendirmek için biyopolimer kullanarak kaplama da yapılmış ancak kaplamasız lipozomlara göre dayanıklılıkta ciddi bir fark gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: lipozom, antioksidan, enkapsülasyon, yeşil çay özütü, NMR relaksometre

ABSTRACT

Liposomes are double-layered spherical vesicles made up of polar lipids and could be used in pharmaceutical, personal care, chemical and food industries to encapsulate both hydrophobic and hydrophilic compounds. Being biodegradable, biocompatible not having any toxic effects and having the ability to release the active agents when desired makes these systems advantageous for many applications. Moreover, when compared with polymer based encapsulation systems, not causing any significant changes on the medium's viscosity and not affecting the textural properties are other advantages of these systems. The main natural sources used for liposomes are egg and soy lecithin. In this study, liposomes prepared from these two sources were prepared and the soy lecithin ones being more stable were further loaded with green tea extract that is known to have antimicrobial activity. The loaded liposome system was aimed to be used as a spray product for a high oil containing food and that is known to be susceptible to oxidation. Since the spray product is made up only from natural compounds, the food product exposed to spraying will not have any chemical exposure. Throughout the product development process, liposomes were characterized and the stability of the systems were examined. At the last stage, the spray products were tested on hazelnut samples and some sensory analysis were conducted. For characterization of the liposome-based system, the nondestructive techniques Magnetic Resonance Imaging (MRI) and NMR Relaxometry were used and NMR Relaxation results were found more correlated with physico chemical properties of the liposomes. For characterization purposes zeta potential, particle size analysis, light microscopy techniques were also used. For chemical instability to test the internal oxidation of liposomes, hydrogen peroxide content was measured with spectrophotometric methods. To increase the stability of liposomes, polymer coating was also used but results showed that stability did not improve in the presence of polymers.

Keywords: liposome, antioxidant, encapsulation, green tea extract, NMR Relaxometry

1. GİRİŞ

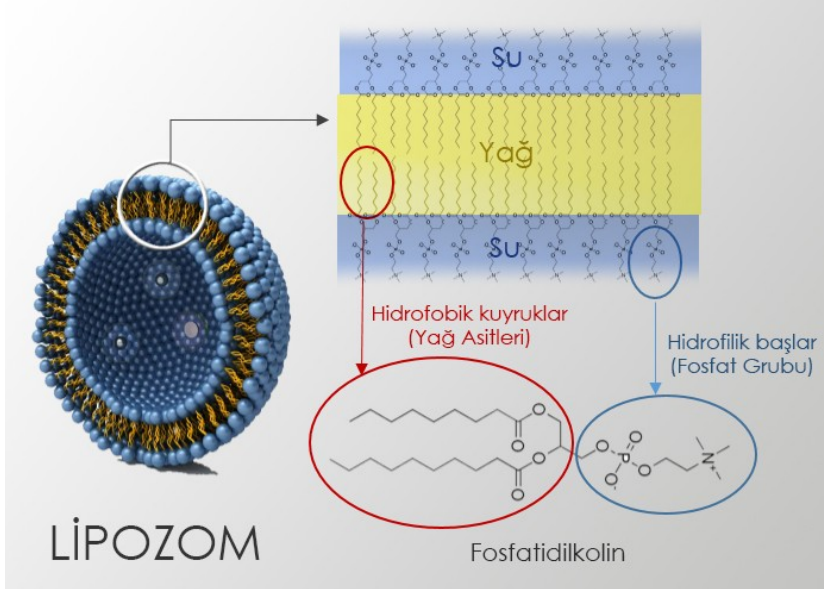
Bu projede doğal fosfolipidler kullanılarak lipozom adı verilen ve küre şeklinde oluşan nanoboyutta enkapsülasyon sistemleri tasarlanmıştır. Küreciklerin içerisi yeşil çay özütü ile doldurulmuş, hem boş hem dolu lipozomların karakterizasyonu farklı teknikler kullanılarak yapılmıştır. Farklı koşullarda farklı teknikler ve ve bileşenler kullanarak hazırlanan lipozomların antioksidan özelliği bilindiğinden gıdalarda koruma amaçlı kullanımı üzerine fındık numunelerinde sprey ürün olarak denemeleri yapılmıştır.

Sonuç raporunda lipozomlar ve kullanılan teknikler hakkında detaylı bilgiler, proje sürecinde kullanılan yöntemler ve proje sonunda elde edilen sonuçlar tüm detaylarıyla anlatılmış ve tartışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

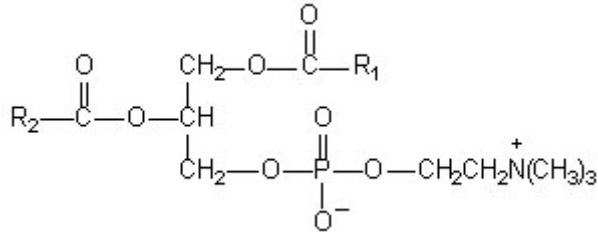
Lipozomlar hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşiklerin enkapsüle edilmesi amaçlı farmasötik, kişisel bakım, kimya ve gıda endüstrisinde kullanılan; polar yağlardan oluşan iki tabakalı küresel lipit kesecikleridir. Polar yağların polar bir ortamda (su gibi) dağılımları (dispers edilmeleri) sonucunda oluşur (Taylor vd., 2005; Gibis vd., 2011). Polar lipitlerin doğadaki başlıca kaynakları; yumurta ve soya lesitindir. Bu lesitinler, yıllardır gıdalarda emülgatör veya tekstür değiştirici olarak kullanılmaktadır ve **A.B.D Food and Drug Administration** tebliğlerine göre '**Genel olarak güvenilir kabul edilir ürün**' (GRAS) kategorisindedir (Laye vd., 2008). Lesitinlerin çift katmanlı küresel bir yapı oluşturacak şekilde bir araya gelmesiyle oluşan lipozomlar içlerine hem su hem de yağda çözünebilen fonksiyonel bileşenleri enkapsüle edilebilmeleri açısından önemlidir (Taylor vd., 2005; Laye vd., 2008). Fonksiyonel bileşenlerin lipozomlar içine hapsedilmesinin, kapsüllenen maddenin dayanıklılığını artırdığı, ortamla etkileşimini ortadan kaldırdığı, böylece normalde bozulmasına neden olacak ortamlarda daha uzun süre aktivitesini koruyabildiği görülmüştür (Chun vd., 2013). Lipozomlar, çapı 20 nm'den 20 µm'ye kadar değişen boyutlarda olabilirler (Taylor ve Morris, 1995). Kesecikler bir veya birden fazla çift tabakalı membranlar halinde bulunabilirler. Bu çift katmanlı polar yağ yapılarıyla membranlarının yağ fraksiyonuna benzerlik gösterirler. Bu nedenle önceleri, lipozomların birincil incelenme nedeni hücre membranları için model bir sistem özelliği taşımalarıydı. Hücre membranı davranışını simüle edebilme özelliği, lipozomların farmasötik uygulamalarda, (tümörlü hücreler gibi) hedefe özel ilaç salınımında kullanımını sağlamıştır. Bu amaçla yıllardır membran dayanıklılığı ve salınım mekanizmaları incelenmiştir. Son yıllarda, biyolojik, biyokimyasal, zirai ve gıda ile ilgili uygulamalarda da lipozomların birçok farklı amaçlı aktif ajanın enkapsüle edilmesi için ideal sistemler olduğu görülmüştür. Enzimler, antimikrobialer, antioksidanlar bunlardan bazılarıdır (Taylor vd., 2005).

Tek bir çift katmanlı yapıdan oluşan lipozomlar boyutlarına göre; **küçük tek lamelli kesecikler** (<30 nm) (KTLK) (**Şekil 1**) ve **büyük tek lamelli kesecikler** (BTLK) (30-100 nm) olarak ikiye ayrılırlar. Birden fazla çift katman içeren lipozomlar ise; eğer tüm çift katmanlar ardarda sıralanmışsa **çok lamelli kesecikler** (ÇLK), ya da farklı boyutlarda birden fazla çift katman başka bir çift katman tarafından kaplanmışsa **çok kesecikli çok lamelli kesecikler** (ÇKÇLK) olarak adlandırılır (Taylor vd., 2005).



Şekil 1. Küçük tek lamelli keseciklerin şematik görüntüsü (Taylor vd., 2005).

Lipozomlar temel olarak fosfolipitlerden oluşur. Fosfolipitler ya spingolipitler ya da fosfogliserit şeklinde bulunur. En yaygın bulunan fosfolipit, lesitin olarak da bilinen fosfatidilkolin'dir (FK) (Taylor vd., 2005).



Şekil 2. Fosfatidilkolin'in (FK) kimyasal yapısı.

Şekil 2'de de görülebileceği gibi, FK yapısında sn-1 ve sn-2 pozisyonlarında gliserol iskeletine ester linkleriyle bağlı hidrokarbon zincirleri varken, sn-3 pozisyonunda kolin gruba bağlı bir fosfat grubu bulunmaktadır. İki hidrokarbon zinciri hidrofobik kuyrukları oluştururken, fosfatidilkolin ise polar başı oluşturur (Taylor vd., 2005). Bu temel yapı, FK'den hazırlanan lipozomların hem hidrofobik hem de hidrofilik maddeleri enkapsüle edebilmesine olanak sağlar. İki hidrokarbon zincirindeki yağ asitleri doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşabilir. Doymamış yağ asitlerinin varlığı bu lesitinlerden hazırlanan lipozomlarda içsel bir oksidasyon olma riskini de artırır. Çalışmalarda yoğun olarak kullanılan doğal fosfolipit kaynakları soya veya yumurta lesitini birden fazla farklı fosfolipitin birleşiminden oluşur;

ancak bu lesitinlerin büyük bir miktarı (yaklaşık %75) fosfatidilkolinden oluşur (Laye vd., 2008; Chun vd., 2013).

Lipozomlar ısı ile karmaşık faz dönüşümleri gösterebilirler. Bu da lipozomların depolanma sıcaklığındaki kalite özelliklerini etkileyen önemli bir faktördür. Sıcaklıkla lipozomların yüzeyler arası reolojik özellikleri dramatik bir değişim gösterir ve lipozomlar mekanik strese (basınç gibi) çok duyarlı olurlar, bu da lipozomlarda dağılmaya ve/veya kapsüllenmiş içeriğin katmanlardan sızmasına veya tamamen salınımına neden olabilir. Bu nedenle lipozom tabanlı enkapsülasyon sistemleri tasarlarken faz dönüşümleri lipozomların stabilitesi için bir gösterge olarak kullanılabilir (Taylor vd., 2005).

Gıda alanında lipozomların kullanımı şu an pek yaygın olmamakla birlikte, konudaki araştırmalar son yıllarda artış göstermiştir. Lipozomların fizikokimyasal , kinetik ve termodinamik özelliklerinin anlaşılmasıyla ve kesintisiz yüksek basınç homojenizasyonu gibi gelişen üretim teknolojileriyle beraber; lipozomların antimikrobiyal, aroma veya sağlığa olumlu etkileri kanıtlanmış aktif ajanların salınımı amaçlı fonksiyonel gıda üretiminde kullanımı daha fizibil bir hale gelmiştir (Taylor vd., 2005).

Lipozomların gıdalarda enkapsülasyon amaçlı kullanımının avantajları ve dezavantajları aşağıda sıralanmıştır.

AVANTAJLARI

- Lipozomların kapsül ajanı olarak tercih edilmelerinin ön önemli nedeni; tamamen biyoyumlu, biyo-bozunur olmaları, toksik etkilerinin olmaması ve istenildiğinde kapsüllenmiş maddeyi salabilmeleriyle açıklanabilir (Laye vd., 2008).
- Lipozomların en büyük avantajlarından biri doğada var olan bileşenlerden yapılabiliyor olmalarıdır. Bu da gıdalarda kullanımında herhangi bir yasal engele takılmasını engeller (Taylor vd., 2005).
- Ayrıca lipozomlar; daha önce de bahsedildiği gibi hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin kapsüle edilmesi için kullanılabilir, hatta aynı anda çift enkapsülasyon sistemi görevi görebilir (Gibis vd., 2011). Antioksidanların da bir kısmının suda bir kısmının yağda çözünmesi lipozom sistemlerini antioksidan enkapsülasyonu için ideal bir araç yapmaktadır.

DEZAVANTAJLARI

- Lipozomlar kırılğan parçacıklardır. Bu fiziksel dayanıksızlık yüzünden içlerinde kapsüle edilmiş olan maddeyi sızdırabilir ve kaybedebilirler (Laye vd., 2008).

- Lipozomlar kıvrımlı olmadıkları zaman en düşük enerji seviyesindedirler; bu nedenle ufak lipozomlar bir araya gelip birleşirler ve kıvrımlarını azaltırlar. Bu da lipozomların parçacık boyutlarının zamanla artmasına ve bir süre sonra lipozomların çökelti oluşturup dispersiyondan ayrılmasına neden olur. Düşük pH'li ortamlarda lipozomların yüzey yükünün azalması ile beraber bu davranışın daha yoğun görüldüğü gözlenmiştir (Chun vd., 2013).

Sıralanan dezavantajlara rağmen lipozomların aktif ajanların enkapsülasyonu için ideal bir ortam sağlaması ve fiziksel dayanıklılık sorununun üretim metodu (Gibis vd., 2011), yüzey yükünün kontrolü (Sulkowski vd., 2005; Laye vd., 2008; Gibis vd., 2011), polimer ile kaplama (Cho vd., 2007; Panya vd., 2010; Chun vd., 2013) gibi basit metotlarla çözülebilir olması bu sistemleri bir çok madde için ideal bir enkapsülasyon aracı yapmaktadır.

Literatürde lipozom sistemlerin antioksidan enkapsülasyonu için kullanılmasıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Panya vd., 2010; Gibis vd., 2011). Ancak bu çalışmalarda lipozom sistemlerinin gıda üzerine uygulanması ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamaktadır. Önerilen bu proje ile bu açığın kapanması hedeflenmektedir.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), canlıların iç yapısını görüntüleme amacıyla daha çok tıpta kullanılan bir yöntemdir. Düşük frekanslı ve az çözünürlüklü, düşük maliyetli, görüntüleme sistemlerinin yaygınlaşmasıyla birlikte bu metot, yüksek nem içerikli biyolojik materyallerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. MRG ile gıdaların iç yapısını inceleyerek kalite parametrelerini tahribatsız bir şekilde belirlemek mümkündür. Fonksiyonel gıdalar için kullanılan mikrokapsüllerin (Wichikut vd., 2013), jel sistemlerinin tasarımında (Oztop vd., 2010) , kontrollü salınımı gerçekleştirecek aktif maddelerin difüzyon katsayısının belirlenmesinde (Oztop vd., 2012) , mikrokapsüllerin dayanıklılığının tespitinde (Wichikut vd., 2013), jel sistemlerinin oluşumunda önemli bir yere sahip olan çapraz bağlaşım mekanizmasının incelenmesinde (Williams vd., 2011 ; Oztop vd., 2012), MRG kullanımı ciddi bir kolaylık sağlamıştır. Lipozom sistemlerinde lipozom parçacıklarının kümelenmesiyle stabilitenin bozulması MR görüntülerinde kolaylıkla incelenebilir ve bu sürece dair kinetik veri elde edilebilir. Bu açıdan önerilen projede uygulanacak teknik bu tarz sistemlerin tasarlanmasında büyük bir avantaj sağlayacaktır ve başka alanlarda oldukça fazla kullanım alanı olan bu teknik için yeni bir uygulama alanı oluşturacaktır.

NMR Relaksometre T_1 ve T_2 zamanlarının ölçülmesine dayanan bir tekniktir. T_1 ve T_2 zamanları NMR için gerekli RF sinyalinin kısa süreli uygulanması sonucunda oluşan sinyalin farklı düzlemlerdeki azalış (T_2) ve artışını (T_1) karakterize eden zaman sabitleridir. T_1 :

longitudinal salınım T_2 ise transverse salınım zamanı olarak bilinir. T_1 zamanı eksponansiyel olarak artan bir sinyal ile karakterize edilirken T_2 zamanı eksponansiyel olarak azalan bir sinyal eğrisinden elde edilir. NMR Relaksometre deneyinin çıktısı olan NMR Relaksasyon spektrası bu sinyal eğrilerine Ters Laplas yönteminin uygulanmasıyla elde edilir. NMR Relaksasyon spektrası numunelerdeki proton havuzları hakkında bilgi verir (Hills, 1998 ; Ersus vd., 2010; Oztop vd, 2010 , 2012 ; Wichikut vd., 2013,) Bu teknikle, jel sistemlerinde çapraz bağlaşım kinetiğinin takibi, meyve sebze numunelerinde ise hücresel yapının bütünlüğü hakkında (Gonzalez vd., 2010; Ersus vd., 2010) bilgi elde edilebilir. Bu teknik özellikle petrol endüstrisinde taş analizlerinde sıvının rezerve içerisinde nasıl dağıldığını gözlemlemek için yoğun bir biçimde kullanılır (Hamada vd., 2001). Belirtilen proton havuzları lipozom sistemlerindeki dayanıklılığın değişikliğini tespit etmek için kullanılabilir. Bu da numunenin mikroyapısı ile doğrudan ilişkilendirilebilir. Bu tekniğin lipozom tabanlı sistemlerinin karakterizasyonu ve dayanıklılık tespiti için kullanılması tahribatsız ve kolay bir teknik olması yönünden büyük avantaj sağlayacaktır.

MRG, literatürde lipozom kullanarak hazırlanmış ilaç sistemlerindeki salınımın takibi amacıyla canlı içi çalışmalarda kullanılmıştır. Literatürde henüz, gıdalar için lipozom sistemleri tasarlamak amacıyla MRG ve NMR relaksometre tekniklerinin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Önerilen proje, bu tekniklerin tıp, biyokimya, farmasötik gibi alanların yanı sıra gıdalar için de kullanılabileceğini göstermek açısından literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Boş (Yüklenmemiş) Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Boş lipozom hazırlamak için aslen iki farklı lesitin kaynağı kullanılmıştır. Bunlar Lipoid GmbH'den tedarik edilen %80 saflıktaki yumurta lesitini (E80) ve %75 saflıktaki soya lesitini (S75)'dir. Lesitinlerden lipozom elde etmek için uygulanan basamaklar aşağıda belirtilmiştir.

- Ağırlıkça %1'lik lesitin karışımlarının hazırlanması (bu konsantrasyon literatürde lipozom üretmek için kullanılan ve yeterli olduğu bilinen bir konsantrasyon olması sebebiyle seçilmiştir) (Laye vd., 2008; Gibis vd., 2011; Chun vd., 2013).
- Lesitinlerin çözülebilmesi için ilk aşamada homojenizator kullanarak karıştırma işlemi gerçekleştirilecektir. Bu işlem için gerekli hız ve karıştırma süresi deney tasarımı kapsamında incelenmiştir. Önhomogenizasyon için silent crusher (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Germany) ve ultraturrax (IKA T25 dijital Ultra-Turrax, Selangor, Malezya) olmak üzere iki farklı yöntemin parçacık boyutuna etkisine bakılmıştır.
- Homojenizator ile elde edilecek karışım çok büyük parçacık boyutunda lipozomlar üreteceğinden dolayı bu karışımın bir homojenizasyon işlemi daha görmesi gerekmektedir. Aksi takdirde lipozom sistemlerinin raf ömrü bir haftayı geçmeyecektir (ön denemeler ile tespit edilmiştir).

İkinci homojenizasyon işlemi lipozomların dayanaklılığı açısından önem taşıdığından uygulanacak farklı yöntemler deney tasarımında etken olarak incelenmiştir. Bu çalışmada denenmesi hedeflenen homojenizasyon yöntemleri aşağıda sıralanmıştır. Tüm deneyler en az 3 tekerrür olacak şekilde yapılmıştır.

3.1.1 Yüksek Şiddetli Ultrasonikasyon

Yöntem, frekansı 16-500 kHz arasında değişen ses dalgalarının numuneye uygulanması sonucunda sistemde ufak oyuklar oluşturulması fikrine dayanır. Ses dalgaları ile oluşup tekrar dağılan bu küresel oyuklar, her dağılmada yakın çevresinde yüksek basınç ve sıcaklık artışlarına ve beraberinde de yüksek hızda bir türbülans akışa neden olur. Bu ufak ve geçici türbülans akışın çevresine uyguladığı kayma sonucunda büyük boyutlu lipozomlar parçalanır (Taylor vd., 2005). Lipozomlar ultrasonikasyon kullanarak iki şekilde hazırlanabilir:

- **Ultrasonik su banyosu**
- **Direk tip sonikasyon dediğimiz problu ultra sonikasyon**

Direk tip homojenizasyon için bütün numuneler 20 kHz uç tipi ultrasonikasyon aleti ile (Sonoplus Ultrasonic Homogenizer, BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlin,

Almanya), % 100 amplitüdde TT13 düz prob kullanılarak 2, 5, ve 8 dakikalarda ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır.

Su banyosu deneyleri için ise en yüksek güç seviyesinde 30 dakika boyunca, 53 KHz frekansta çalışan bir ultrasonik su banyosuna, 100 ml'lik beherde 50 ml'lik numuneler tek tek her seferinde aynı yere denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve lipozom üretimi bu şekilde de gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Yüksek Basınçla Homojenizasyon

Ön homojenizatörden geçirilmiş lipozomlar yüksek basınç altında yeniden homojenize edilecektir. Parçacık boyutunun küçülmesi için lipozomların arka arkaya bir kaç kere (pas) homojenize edilmesi gerekecektir. Kullanılacak mikroakışkanlaştırma tekniğinde numunelere 400, 900 ve 1300 barlarda 5 pas basınç uygulanmıştır.

Boş lipozomlar hazırlandıktan sonra karakterizasyonu ve dayanıklılık tespiti için aşağıda listelenen metotlar uygulanmıştır.

3.1.3 Parçacık Boyut Analizi

Lipozomların ortalama parçacık boyutları hem üretimin hemen sonrasında hem de depolama sırasında periyodik olarak ODTÜ Merkezi Laboratuvarındaki Malvern Zetasizer (Nano-ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) aleti aracılığıyla ölçülmüştür. Kümülatif parçacık boyutu partiküllerin Brownian Hareketi'nden, Stokes-Einstein denklemi kullanılarak, hesaplanmıştır. Numuneler ölçüm öncesinde 1/10 oranında seyreltilmiştir. Bu metot, içinde toplanarak çökelti oluşturmuş parçacıklar bulunduran sistemler için doğru sonuç vermez. Bu nedenle metodun uygulanacağı sistemler hem gözle hem de ışık mikroskop yardımı ile çökelti kontrolünden geçecektir.

3.1.4 Transmisyon Elektron ve Işık Mikroskopları Deneyleri

Lipozom sistemlerinin termodinamik olarak dayanıklı olmamaları sebebiyle zamanla parçacıkların birleşip sistemin dayanıklılığının azalması beklenen bir süreçtir. Lipozomların potansiyel toplarıklığını çabukça görüntülemek için bir ışık mikroskobu kullanılmıştır. Numuneler lama damlatılıp 4, 10, 20 ve 40 kat büyütme altında incelenmiştir. Bu çözünürlükte çapı 500 nm'den büyük parçacıkları gözlemlenmek mümkündür (Gibis vd., 2011). Dijital görüntüler laboratuvarımızda mevcut olan mikroskoba bağlanmış AmScope, 10 MP (U.S.A) kamera ile elde edilmiştir.

Küçük boyuttaki parçacıkların görsel analizi için O.D.T.Ü Merkez Laboratuvarında 120 kV Lantanhexaborid (LaB₆) elektron tabancası ile çalışan Transmisyon Elektron Mikroskobu analizleri (Tecnai G² Spirit Biotwin, FEI Company) yapılmıştır.

3.1.5 Zeta Potansiyel Ölçümleri

Lipozomların zeta potansiyelleri foton korelasyon spektroskopisi yöntemi ile O.D.T.Ü Merkez Laboratuvarında bulunan Malvern Zetasizer aleti (Malvern Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) kullanılarak ölçülmüştür. Numuneler ölçüm öncesinde 1/10 oranında seyreltilmiştir.

3.1.6 NMR Relaksometre Deneyleri

NMR deneyleri 0.5 T (22.40 MHz) gücündeki düşük frekanslı manyetik ekipman ile (SpinCore Technologies, Inc., Gainesville, USA) 10 mm r.f. sargısı kullanılarak yürütülmüştür. Spin-spin relaksasyon süreleri (T₂) Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sekansı ile elde edilmiştir. Ürünler ölçüme 1 ml'lik porsiyonlarda alınmıştır.

3.1.7 Boş lipozom sistemlerinin kimyasal dayanaklılığının incelenmesi

Hazırlanan lipozom sistemlerinin içsel oksidasyonun belirlenebilmesi için hidroperoksit ölçümü yapılmıştır. İzlenen prosedür ayrıntıları ile aşağıda anlatılmıştır.

Hidroperoksit ölçümü için Alamed ve arkadaşları'nın metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre, 0.3 ml'lik lipozom numuneleri 5 ml izooktan/2-propanol (3:1 hacimsel oranda) ile karıştırılır ve vortekslenir (10 s, 3 defa). 1000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra, organik çözücü fazının 200 mikrolitresi alınarak 2.8 ml metanol/1-butanol (2:1 hacimsel oranda) ile karıştırılır. Bu karışıma 15 mikrolitre 3.94 M amonyum tiyosiyanat ve (0.132 M BaCl₂ ve 0.144 M FeSO₄ ün eşit miktarlarının karıştırılması ile oluşturulmuş) 15 mikrolitre ferrik demir çözeltisi eklenmesi ile hidroperoksit ölçümü başlar. 20 dakika oda sıcaklığındaki inkübasyon sonrası, absorbans 510 nm de UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Hidroperoksit konsantrasyonları, saf hidroperoksitin kullanımı ile hazırlanan standart eğri sayesinde hesaplanmıştır.

3.2 Dolu (Yüklenmiş) Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Ağırlıkça % 0.1'lik kuru yeşil çay ekstraktı asetat tampon çözeltisi ve saf suda 400 rpm'de 30 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra selüloz kağıdı yardımıyla filtre edilmiştir. Lesitinler hazırlanan bu çözeltiliye ağırlıkça %1 oranında eklenerek homojenizatör yardımıyla çözdürülmüştür. Ön homojenizasyon diye adlandırdığımız bu aşamanın gücü 20000 rpm ve

süresi 2 dk olarak belirlenmiştir. Ön homojenizatör ile elde edilen lipozomların parçacık boyutu çok büyük olduğundan bu karışımlara ek bir homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. Homojenizasyon teknikleri olarak direk tip sonikasyon dediğimiz problu ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı (yüksek basınçla homojenizasyon) kullanılmıştır. Problu ultrasonikasyon kullanılarak lipozom oluşturma için %75 güç ve 5 dk parametreleri kullanılırken, mikroakışkanlaştırıcı tekniğinde 1300 bar ve 5 pas parametreleri kullanılmıştır. Yeşil çay içinde bulunan ve antioksidan özellik gösteren fenolik maddeler ışıktan etkilendiği için tüm hazırlanan lipozomlar alüminyum folyoya sarılmıştır. Hazırlanan lipozomlar karakterize edilmek ve dayanıklılık tespiti yapılmak için 4 hafta boyunca buzdolabında (4°C'de) depo edilmiştir. Yeşil çay ekstraktı ile dolu lipozomların karakterizasyonu için 3.1 kısmında anlatılan parçacık boyutu, zeta potansiyeli, transmisyon elektron mikroskobu, manyetik rezonans görüntüleme ve NMR relaksometre deneylerine ek olarak toplam fenolik madde miktarı ölçümü ve antioksidan aktivite ölçüm deneyleri yapılmıştır.

3.2.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Ölçümü

Hazırlanan yeşil çay özütü içeren lipozomların toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metodu (Singleton ve Rossi, 1965) kullanılarak ölçülmüştür. İzlenen prosedür aşağıda detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Lipozom örnekleri 50:42:8 oranında hazırlanmış ethanol:saf su:asetik asit karışımı ile 1:4 oranında seyreltilip 0.45 µm'lik mikrofiltreden geçirilmiştir. 1:9 oranında saf su ile seyreltilen Folin-Ciocalteu reaktifinden 2.5 ml, 0.5 ml seyreltilmiş lipozoma eklenmiştir. Karışım vortekslenip, 5 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Bekletilen bu karışıma 0.75 gram/litre olarak hazırlanan sodyum karbonattan 2 ml eklenerek vortekslenip 1 saat boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Bir saatin sonunda numunenin absorbansı 760 nm'de Optizen Bio-Pop UV-VIS spektrofotometre (Mecasys Ltd. Şti, Kore) kullanılarak ölçülmüştür. Lipozomların toplam fenolik madde miktarı gallik asit eş değeri (mg GAE/ L örnek) olarak verilmiştir.

3.2.2 Antioksidan Aktivite Ölçümü

Özütlerin antioksidan aktivitesi DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ve FRAP (demir(III) indirgenme antioksidan gücü) metodları kullanılarak ölçülmüştür (Yen ve Duh, 1994).

DPPH metoduna göre, lipozomlar 50:42:8 oranında hazırlanmış ethanol:saf su:asetik asit karışımı ile 1:4 oranında seyreltilip, 0.45 µm'lik mikrofiltreden geçirilmiştir. Seyreltilmiş numuneden 0,1 ml alınarak üzerine 3,9 ml DPPH (0,025 mg DPPH/ml metanolde çözülmüş) ilave edildikten sonra vortekste karıştırılıp oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat bekletilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin absorbansı, spektrofotometrede 517 nm'de metanole

karşı okunmuştur. Lipozomların antioksidan aktiviteleri (mg DPPH/ L örnek) olarak verilmiştir. DPPH metoduna ilave olarak kaplanmamış yeşil çay özütü içeren lipozomların antioksidan aktivitesi FRAP (demir(III) indirgenme antioksidan gücü) metodu ile de ölçülmüştür. Metod için ilk olarak aşağıdaki karışımlar hazırlanmıştır.

Karışım A: Asetat tampon çözeltisi (300mM, pH:3.6): 16 ml asetik asit 3.1 g sodyum asetat trihidrat ile karıştırılıp, hacim 1 litreye tamamlanacak şekilde saf su eklenir.

Karışım B: TPTZ karışımı. 0.031 g TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) 10 ml 40 mM HCl'e eklenip, 50 °C de çözülmesi için karıştırılır.

Karışım C: 0.054 g Demir (III) Klor Hekzahidrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 10 ml saf suda çözülür.

FRAP karışımı 3.5 ml karışım B, 2.5 ml karışım C ve 25 ml karışım A nın karıştırılması ile hazırlanıp, 37 °C'deki su banyosunda 10 dk bekletilir.

Lipozom numuneleri 50:42:8 oranında hazırlanmış etanol:saf su:asetik asit karışımı ile 1:10 oranında seyreltilip, 0.45 µm'lik mikrofiltrelerden geçirilir. 0.5 ml seyreltilmiş lipozom örneğine 2.5 ml FRAP karışımı eklenmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin absorbansı, UV/VIS Spektrofotometre ile 593 nm'de okunmuştur.

3.2.3 İstatistiksel Analiz

Sonuçların değerlendirilmesinde ve analizinde çoklu ve tekli Varyans Analizi kullanılmış ve gerekli görüldüğü durumlarda karşılaştırmalı test olarak Tukey-Çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır ($\alpha = 0.05$). Analizler için MINITAB yazılımı kullanılmıştır.

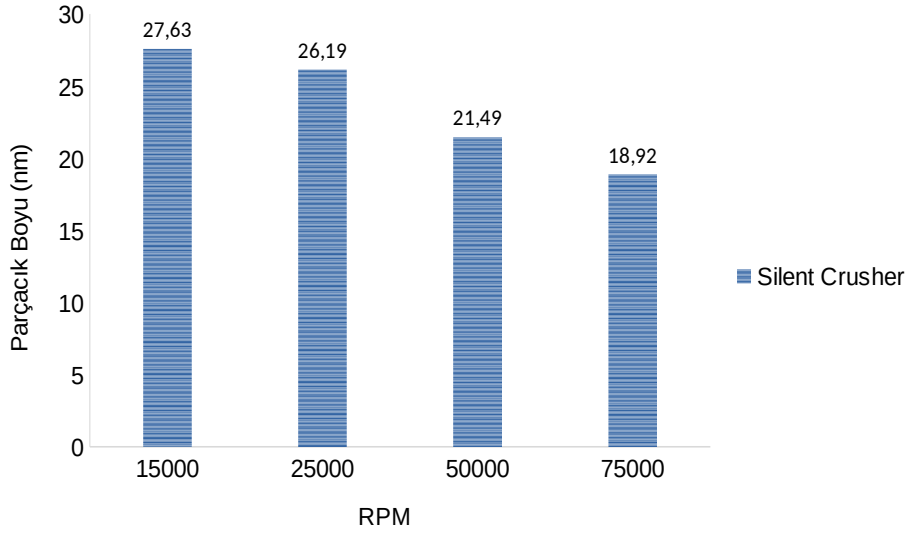
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Boş (Yüklenmemiş) Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.1.1 Birincil ve İkincil Homojenizasyon Yöntemlerinin Belirlenmesi

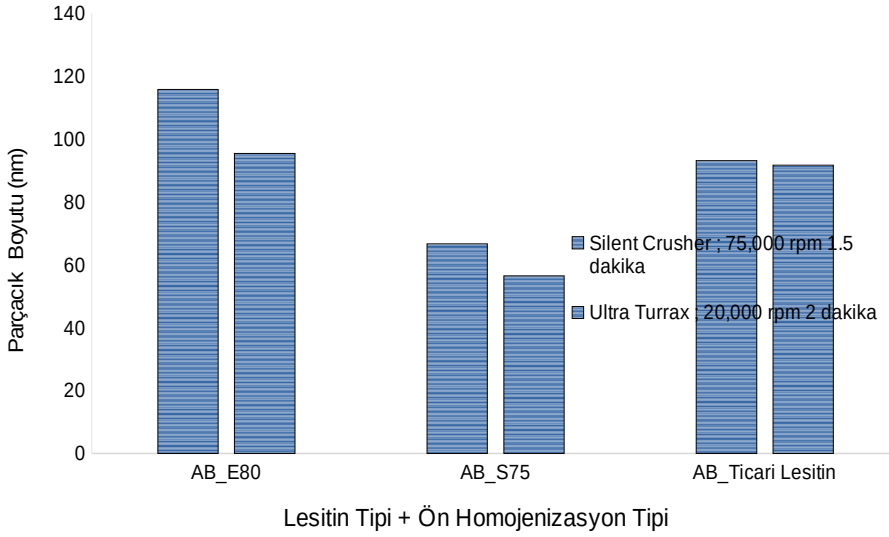
Projenin bu kısmında yapılan denemeler 3 çeşit lesitin üzerine odaklanmıştır. Yapılan deneylerde, yağı tamamen alınmış ve Almanya'dan ithal edilen Lipoid Marka S75 soya ile E80 yumurta lesitinleri ve Türkiye'den alınarak daha ucuz fiyata temin edilebilen ticari lesitin (www.hamaddeler.com adresinden satın alınan) kullanılarak lipozom üretilmiştir.

Lesitinlerin çözülebilmesi için ilk aşamada homojenizator kullanılarak karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için gerekli yöntem, hız ve karıştırma süresi deney tasarımında incelenen parametreler arasındadır. Projede ön homojenizasyon için 2 tip ekipman kullanılmıştır. %1'lik lesitin çözeltisi için farklı rpm'lerde 2 dakika süresince Heidolph marka Silent Crusher ile karıştırılan numunelerin parçacık boyutları Şekil 3'de gösterilmiştir. Burada lipozom üretimi için Lipoid marka E80 yumurta lesitini kullanılmıştır. Tablodan da görüldüğü üzere karıştırma hızının parçacık boyutu üzerinde etkisi vardır. Diğer homojenizatörü (**Ultra Turrax**) kullanarak da lipozomlar hazırlanmıştır. Bu denemelerde ön homojenizasyon sonrası mikroakışkanlaştırma işlemi yapıldıktan sonra dinamik ışık saçılımı yöntemi ve eşdeğer küre teorisi ile parçacık boyutu ölçülmüştür (Patil & Jadhav, 2014; Rawle, 2012). Farklı koşullarda ön homojenizasyona maruz kalan ve daha sonradan mikroakışkanlaştırıcı ile homojenize edilen lipozomların parçacık boyutuna bakıldığında, ön işlemde Ultra Turrax kullanılarak elde edilen lipozomların (S75 ve E80 için) parçacık boyutlarının daha küçük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). Silent Crusher ile işlem sırasında siyah parçacıkların lesitin çözeltisine geçtiği ve çözeltinin dibinde siyah bir çökelti olarak oturduğu gözlemlenmiştir. Nitekim Silent Crusher ile parçacık boyutunun daha yüksek olması bu nedenle de açıklanabilir. Bu sonuçları dikkate alarak, projenin bundan sonraki asıl deneylerinde ön homojenizasyon yöntemi olarak Ultra Turrax kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3. Lipoid E80 yumurta lesitini kullanarak distile suda hazırlanmış, farklı ön homojenizasyon güçleri kullanılarak elde edilen lipozomların parçacık boyut ölçümleri*

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre



Şekil 4. Farklı lesitin tipleri kullanarak asetat tampon çözeltilerinde hazırlanmış lipozomların farklı ön homojenizasyon teknikleri ile 900 bar + 5 tekrar mikroakışkanlaştırma koşulundaki parçacık boyut ölçümleri*

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre

Ultra Turrax homojenizatörünün çalışma koşullarını belirlemek için 2 farklı rpm'de mikroakışkanlaştırma işlemi sonucunda parçacık boyutu ölçülmüştür. Tablo 1'de görüldüğü üzere **20,000** ve **24,000** rpm arasında istatikselsel olarak bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Bu nedenle bundan sonraki lipozom üretiminde 20,000 rpm; 2 dakika ön homojenizasyon parametreleri olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Distile suda hazırlanan, farklı ön homojenizasyon şiddetlerine 2 dakika boyunca maruz kalmış; daha sonrasında 750 barda 5 tekrarlı mikroakışkanlaştırma işleminden geçmiş 'ticari lesitin' lipozomlarının parçacık boyutları

Ön Homojenizasyon Şiddeti	Ortalama Parçacık Boyutu (nm) (Z_{av})*
20,000 rpm	82,64 ^a
24,000 rpm	79.1 ^a

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre

Proje kapsamında lipozom yapmak için 3 adet ikincil homojenizasyon metodu kullanılması hedeflenmiştir:

1. Direk uç tipi Ultrasonik Homojenizatör
2. Ultrasonik su banyosu
3. Mikroakışkanlaştırıcı

Direk uç tipi homojenizasyon prob tipini göz önüne alarak 100 ml'lik numune için yapılmış ve bu koşulda aletin çalışabildiği maksimum güç %70 olarak belirlenmiştir. En yüksek güç seviyesinde 30 dakika boyunca, 53 KHz frekansta çalışan bir ultrasonik su banyosuna, 100 ml'lik beherde 50 ml'lik numuneler tek tek her seferinde aynı yere denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve lipozom üretimi bu şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucu ölçülen parçacık boyutu sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. pH 3.8 asetat tamponunda Lipoid S75, soya lesitini kullanarak hazırlanan 20,000 rpm'de 2 dakika boyunca Ultra Turrax ile ön homojenizasyona maruz kalıp farklı ultrasonik yöntemlerle homojenize edilen lipozomların parçacık boyutları

Uygulanan Homojenizasyon Tipi	Parçacık Boyutu (μm)	Standard Hata
Ön Homojenizasyon: 20,000 rpm, 2 dakika	9.82 ^{a*}	0.220
Ultrasonik Su Banyosu: Maksimum Güç, 30 dakika	10.51 ^a	0.298
Ultrasonik Prob Tipi Homojenizatör ; % 50 Güç 15 Dakika	1.26 ^b	0.005
Ultrasonik Prob Tipi Homojenizatör ; % 60 Güç 15 Dakika	1.31 ^b	0.006
Ultrasonik Prob Tipi Homojenizatör ; % 70 Güç 15 Dakika	0.74 ^c	0.004
Ultrasonik Prob Tipi Homojenizatör ; % 70 Güç 30 Dakika	0.68 ^d	0.006

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre

Tablo 2'de de görüldüğü üzere parçacık boyutu ancak 680 nm'ye düşürülebilmüş, kullanılan ultrasonik su banyosunun ise Ultra Turrax üzerine ek bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu sonuç üzerine ultrasonik su banyosunun ileriki aşamalarda amaçlanan parçacık boyutuna ulaşmak için etkin bir yöntem olmadığına karar verilmiştir. Ultrasonik uç tipi homojenizasyon parçacık boyutlarını önemli miktarda etkilese dahi yeterli olmadığına kanaat getirilmiş ve yeni alınan, parçacık boyutu üzerinde daha çok etki eden Sonoplus Ultrasonic Homojenizatörü ile denemeler tekrarlanmıştır. Projenin devamında lipozom karakterizasyonu yapılırken mikroakışkanlaştırıcı ile bu homojenizatör kullanarak yapılan deneyler karşılaştırılmıştır. Bu homojenizatör %100 güçte çalıştırılmış ve küçük parçacık elde edebilmek amacıyla küçük hacimlerde çalışılmıştır.

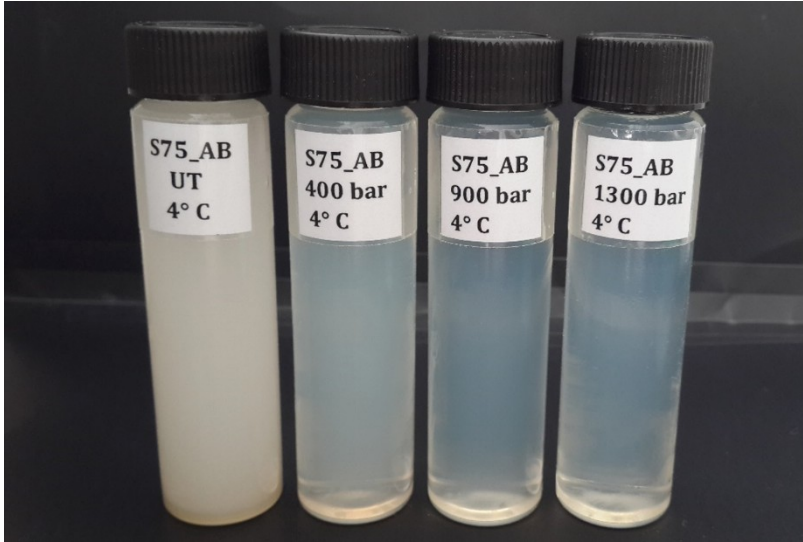
4.1.2 Farklı Değişkenlerin Lipozom Sistemlerinin Parçacık Boyutu Üzerine Etkileri

Farklı değişkenlerin lipozom stabilitesine etkisi parçacık boyutu, polidispersite indeksi, enkapsülasyon verimi, zeta potansiyel, diferansiyel taramalı kalorimetri ve gaz kromatografisi ile ölçülebilir (Laouini vd., 2012). Büyük ve çok katmanlı lipozom formları; homojen olmaması ve sistemin tanımlanması ile kontrol edilmesini zorlaştırması nedeniyle karakterizasyon çalışmalarında çok tercih edilmemektedir (Hope vd., 1986). Bu yüzden lipidlerin ve biyolojik membranların çift katmanlı yapılarının karakterizasyonu çalışmalarında lipozomların küçük tek katmanlı kesecikli halleri kullanılmaktadır (Woodle & Papahadjopoulos, 1989). Bu projede ise boş lipozomlara homojenizasyon uygulamanın temel amacı parçacık boyutunu en ufak

haline getirmek olarak tanımlanabilir. Bu bölümde uygulanan ikincil homojenizasyon yöntemlerinin (mikroakışkanlaştırıcı ve uç tipi ultrasonikasyon), depolama sıcaklığı (4 ve 25 °C) ve süresi (35 gün) ile kullanılan lesitin tipi (E80, yumurta; S75, soya lesitinleri) ve çözeltilerin (distile su, asetat ve fosfat tampon çözeltileri) parçacık boyutu üzerine etkileri anlatılmıştır.

4.1.2.1 Mikroakışkanlaştırıcının Lipozomların Ortalama Parçacık Büyüklüğü Üzerine Etkisi

Mikroakışkanlaştırıcı (MA), bu projede küçük tek katmanlı kesecikler oluşturmak için kullanılan iki ana yöntemden birisidir. Alet basıncında düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı basınç kademesini temsil etmesi amacıyla 400, 900, 1300 bar kullanılmıştır (Torchilin & Weissig, 2003). Yapılan deneylerle MA basıncının parçacık boyutu üzerinde kayda değer etkisinin olduğu ($p \leq 0.05$) ve bu etkinin basınçla ters orantılı şekilde değiştiği doğrulanmıştır. Bu parçacık boyutu farkı transparanlık farkı sayesinde görsel analiz ile de kolayca anlaşılabilir düzeyde olmuştur. Çözelti ve lesitin tipine bağlı olmaksızın bütün numunelerin transparanlığı MA basıncı arttıkça artmıştır (Şekil 5). Ortalama parçacık boyutu basınçla düşürüldüğünde ışık ürünlere daha kolay nüfuz edebilmiş ve bulanık görüntü dağılmıştır (Düzgüneş, 2005).

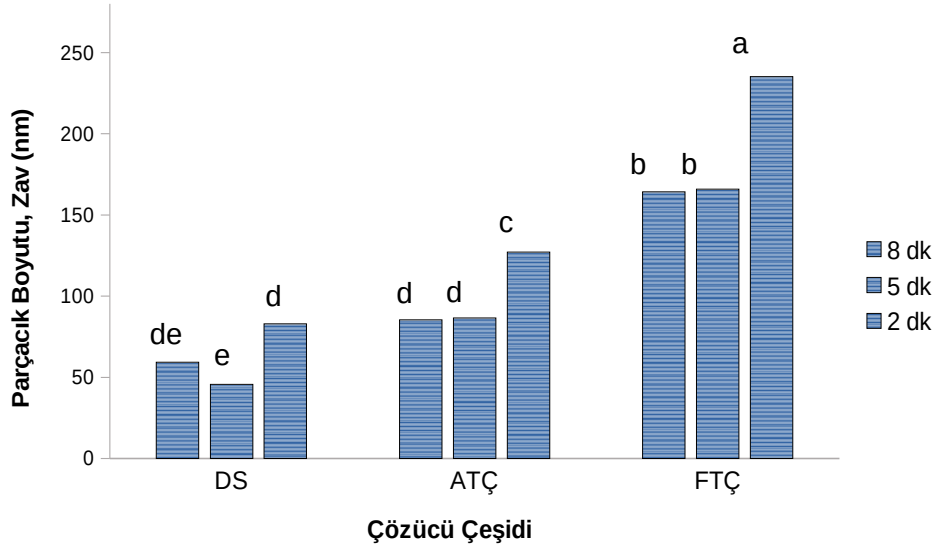


Şekil 5. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış S75 lipozomlarının mikroakışkanlaştırıcı (MA) basıncı ile artan transparanlığı gösterilmiştir. UT kısaltması, yalnızca önhomjenizasyona maruz bırakılmış örneği temsil etmektedir.

MA uygulanmış soya ve yumurta lesitinleri karşılaştırıldığında, yumurta lesitininden hazırlanan lipozomların parçacık boyutları çözelti ve basınç farketmeksizin tutarlı bir şekilde daha yüksek çıkmıştır. Örnek vermek gerekirse sadece ön homojenizasyona tabii tutulmuş asetat tampon çözeltisi içerisindeki S75 (soya) ve E80 (yumurta) lesitinlerinin parçacık boyutları sırasıyla 272 ve 1072 nm olarak ölçülmüştür. Operasyonların optimum düzey ve koşullarının belirlenmeye çalışıldığı projenin bu kısmında, parçacık boyutu olarak daha küçük ve görsel analizlerde daha kabul edilebilir özellik gösteren S75 numuneleri ile denemeler yapılmış, E80 numuneleri yalnızca verimin daha yüksek bulunduğu MA için kullanılmıştır.

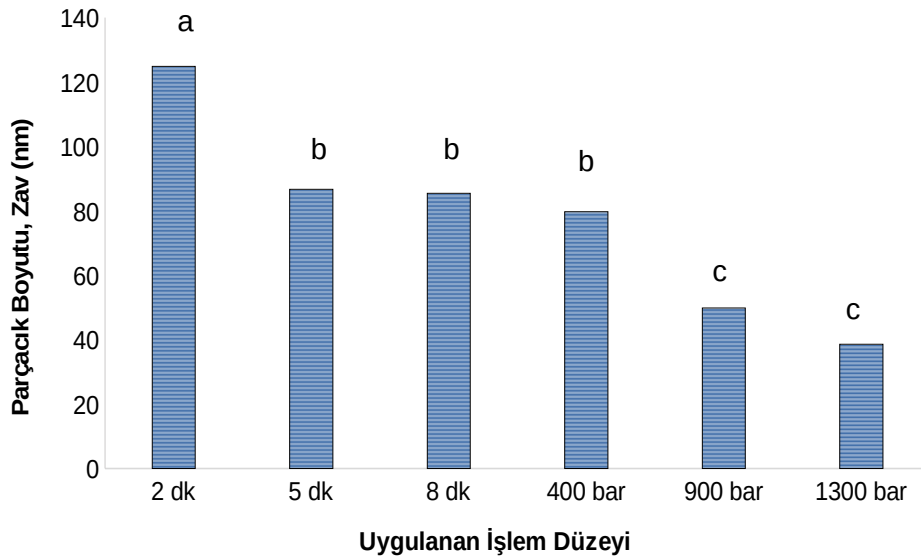
4.1.2.2 Uç Tipi Ultrasonikasyonun Lipozomların Ortalama Parçacık Büyüklüğü Üzerine Etkisi

Bütün numuneler 20 kHz uç tipi ultrasonikasyon (USK) aleti ile (Sonoplus Ultrasonic Homogenizer, BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Almanya) %100 amplitüde TT13 düz prob kullanılarak 2, 5 ve 8 dakikalarda ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır. 5 dakikadan sonra USK zamanının ortalama parçacık boyutu üzerinde kayda değer etkisinin bulunmadığı görülmüştür ($p>0.05$) (Şekil 8). Teorik olarak, USK bir emülsiyonu hem olumlu hem de olumsuz şekilde etkileyebilir. Büyük parçacıkları daha küçük parçalara bölebilir veya su ile lipid ara yüzeyi arasında etkileşime girerek istikrarsızlığa neden olabilir (Li & Fogler, 1978). Bizim durumumuzda olumsuz bir etki görülmemesine karşın, USK süresinin 5 dakikadan fazla olmasının ortalama hidrodinamik çapı etkilemediği bulunmuştur ($p> 0.05$). Emülsiyon sistemlerinde, USK ile elde edilebilen minimum parçacık boyutu dispersiyonun sürfaktan miktarına bağlıdır (Kentish & Feng, 2014). Hem hidrofobik varlık hem de emülgatör etki eden fosfolipidin konsantrasyonu bu eğilimin bir nedeni olabilir. Buradan hareketle yürütülen deney koşullarında (20 kHz frekansta tam güç ve %1 fosfolipid oranında) üretilebilecek minimum parçacık boyutu için gerekli USK zamanı yaklaşık 5 dakikadır. 5 dakikadan sonra USK süresinin uzatılmasının parçacık boyutuna kayda değer miktarda etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır ($p>0.05$).



Şekil 6. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 2, 5 ve 8 dakika ultrasonikasyon (USK) uygulanarak hazırlanmış S75 lipozomlarının ilk gün parçacık boyutları*.

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre



Şekil 7. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) içerisinde farklı işlem düzeylerinde hazırlanmış S75 lipozomlarının ilk gün parçacık boyutları*.

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre

4.1.2.3 Mikroakışkanlaştırıcı ve Ultrasonikasyonun Lipozomların Ortalama Parçacık Boyutuna Etkisinin Karşılaştırılması

MA ve USK yöntemlerinin ikisi de lipozom emülsiyonlarının parçacık boyutunu azaltmada etkili olmuştur. MA yöntemi için daha önce de belirtildiği üzere parçacık boyutu basınç arttıkça azaltılmıştır. Bu yöntemle daha geniş parçacık boyutu aralığında, basınç değişimi ile ayarlanabilecek bir düzende daha küçük boyutlu lipozomlar oluşturulabilmiştir. Diğer yandan USK yöntemi küçük tek katmanlı lipozom kesecikleri oluşturmada başarılı olmuş fakat zaman arttırılmasına rağmen belirli bir değerden sonra parçacık boyutu daha fazla küçültülememiştir.

Bu iki yöntemle elde edilen parçacık boyutları farklı çözücüler için karşılaştırıldığında, MA'nın ortalama parçacık boyutunu azaltmada çok daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 7'de asetat tampon çözeltisi (ATÇ) için örneklenen bu durum, distile su (DS) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) örnekleri için de benzer eğilim göstermiştir.

4.1.2.4 Saklama süresi ve Sıcaklığın Lipozomların Ortalama Parçacık Büyüklüğü Üzerine Etkisi

Soya ve yumurta lesitinleri kullanılarak hazırlanan lipozom numuneleri iki farklı sıcaklıkta depolanmış ve numunelerin stabilitesi ortalama parçacık büyüklüğü yöntemi ile 1, 7, 14 ve 30. günlerde ölçülmüştür.

USK ile hazırlanan numuneler için depolama süresi ve sıcaklık verilerinin istatistiksel analizi, bu iki parametrenin numunelerin çoğunun parçacık boyutu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur (sonuçlar Tablo 3'te özetlenmiştir). Literatürde benzer bir gözlem, buzdolabı sıcaklığında 30 gün boyunca depolanan allisin yüklü lipozom örnekleri için de tespit edilmiştir (Lu et al., 2014). Bununla birlikte, 2 dakika USK uygulanarak FTÇ'de hazırlanan örneklerde düzensiz bir eğilim gözlenmiştir. Ortalama parçacık boyutları depolama süresiyle birlikte artan bir eğilim göstermiş, bu durum sisteme yetersiz enerji verilmesi sonucu oluşan bir kararsızlık olarak açıklanmıştır. FTÇ'nin neden olduğu bu kararsızlık, başka bir bölümde daha ayrıntılı olarak tartışılacaktır (bkz. "4.1.2.5 Kullanılan Çözelti Tipinin Lipozomların Ortalama Parçacık Büyüklüğü Üzerine Etkisi").

Diğer yandan, MA numunelerinde de tüm numuneler aynı eğilimi takip etmemiştir. Farklı zaman aralıklarında keskin artışlar sergileyen bazı istisnalar tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları Tablo 4-7'de özetlenmiştir. Parçacık boyutu ölçüm cihazının teknik kısıtları

sonucu aynı ekipmanla ölçümü yapılamayan, sınır değerinden çok daha büyük parçacıklara sahip yalnızca ön homojenizasyon uygulanmış numunelerin sonuçları, karşılaştırmaları ve istatistiği yanlış yönlendirmemesi açısından tabloya eklenmemiştir.

Parçacık boyutlarındaki bu değişiklikler, emülsiyon kinetiği ile açıklanabilir. Lipozomlar, sürekli olan sulu fazda dağılmış kesecikli parçacıklar taşıyan bir sistem olması sebebiyle emülsiyonlara benzediğinden, emülsiyon sistemi gibi yorumlanabilir. Bu çalışmada, USK ve MA uygulamaları sonucunda elde edilen lipozomların boyutları 30-300 nm arasında değişmiştir. Açıklanacak birkaç nedenden de anlaşıldığı üzere sistemin doğası, mikroemülsiyonlardan ziyade nanoemülsiyonlar olarak kategorize edilmeye uygundur. Bu nedenlerden ilki, lipozom parçacık boyutlarının seyreltme ile değişmemesidir (Anton & Vandamme, 2011). İkinci sebep, karışımda kullanılan fosfolipid konsantrasyonudur. Deney tasarımında kararlaştırıldığı üzere %1 oranında hazırlan numunelerimizin konsantrasyonu mikroemülsiyon oluşturmak için çok düşüktür (Zhong vd., 2009).

Hazırlanan çözeltinin, nanoemülsiyon veya mikroemülsiyon olarak sınıflandırılacağını belirleyen diğer göstergeler, parçacıkların şekli ve polidispersite indeksidir (PDI) (Anton & Vandamme, 2011; McClements, 2012). Başka bir bölüm altında daha ayrıntılı olarak tartışılacak olan TEM görüntüleri de, oluşan lipozomların nanoemülsiyona uygun olarak çoğunlukla küresel şekle sahip olduğunu ortaya koymuştur. Birkaç istisna dışında 0,2 ile 0,5 arasında dalgalanan PDI değerleri ise mikroemülsiyon kıstasları için çok yüksektir. Projede oluşturulan dispersiyonların nanoemülsiyon olduğuna dair en önemli gösterge ise sisteme sırasıyla yüksek basınç ve yüksek ultrasonik enerji vererek etki eden MA ve USK mekanik yöntemleridir. Nitekim oluşum için yüksek enerji ihtiyacı, yalnızca kinetik olarak kararlı nanoemülsiyon oluşumunun en önemli belirtilerinden biridir. Bahsedilen faktörlerin de işaret ettiği üzere, bu çalışmada ele alınan sistemin yalnızca kinetik olarak kararlı bir yapısı vardır. Bu açıdan parçacıkların zamanla kinetik kararlılıklarından vazgeçip büyüyerek enerji olarak daha elverişli bir hale ulaşmaya çalıştıklarını düşünmek mantıklı olur.

Tablo 4-7'de listelenen istisnai durumlar için, bu durumlarda üstesinden gelinmesi gereken enerji bariyerinin yüksek depolama sıcaklığının sağladığı enerji ile aşıldığı söylenebilir. Buzdolabı sıcaklığında depolanan, zaman ve sıcaklık ile değişim göstermeyen eşdeğer örnekleri ile karşılaştırıldığında, bahsi geçen numunelerin serbest enerjilerini en aza indirmek için gereken enerjyi toplamış olduğu söylenebilir. Bunun sonucu ise ani parçacık boyutu değişimi olarak karşımıza çıkmıştır. Aynı eğilim, DS ile hazırlanan ve 25 °C'de saklanan 400 bar basınçlanmış S75 lesitini için de geçerlidir. Parçacık boyutlarındaki bu belirgin artışın her üç numunede de ilk haftada gözlemlenmesi, lipozomların hazırlanmasını

takip eden günlerde bozulduğu anlamına gelmiştir. Kararsızlık göstergesi olan bu durum, sisteme yeterli enerji verilmemesinden kaynaklanmıştır.

Öte yandan, buzdolabı sıcaklığında depolanan ve parçacık boyutunda zamanla azalma tespit edilen bazı örnekler de rastlanmıştır. Bu eğilim tüm örneklerde gözlenmediğinden, benzerlik gösteren numunelerin ortak yanları saptanmaya çalışılmış ve bu özelliğin yalnızca düşük basınç uygulanan örneklerde görüldüğü farkedilmiştir. Normalde MA numuneleri için, fosfolipitlerin uygulanan basınç arttıkça daha küçük, daha kararlı parçacıklar oluşturma kabiliyeti artar. Lesitinler, düşük enerjiye maruz bırakıldıklarında büyük kesecikler oluşturur ve E80, büyük çok katmanlı kesecikler oluşturmaya daha yatkındır (Laouini vd., 2012). DS'de hazırlanarak 4 °C'de saklanan E80 numunelerinin basınçlanmamış ve 400 bar basınçlanmış numuneleri de aynı şekilde deforme olmuş ve birinci haftadaki ölçümleri parçacık boyutunda belirgin bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). Bu durum, çoklu kesecikli yani iç içe geçmiş keseciklerden oluşmuş sistemin dış tabakasının dağılması ile ilişkilendirilebilir. Dış katmanını kaybeden bu örnekler sonrasında parçacık boyutlarını ve kararlılıklarını korumuşlardır.

Diğer yandan, yalnızca ön homojenizasyon ile hazırlanmış ve 25 °C'de saklanmış E80 örneği, ilk haftada ani değişim gösteren buzdolabındaki eşdeğerine göre daha kademeli bir düşüş göstermiştir. Böyle bir durum ise yine dış katmanın kaybolması ile açıklanabilir fakat bu durumda nedeninin enerji dengesi yerine oksidasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. 25 °C'de saklanan bu E80 numunelerinin renklerdeki bariz değişim de bu de bu yorumun yapılmasında etkili olmuştur.

Daha önce de bahsedildiği üzere normal koşullarda MA numuneleri için, sisteme uygulanan basınç arttıkça kinetik olarak kararlılık sağlayacak enerjiye ulaşarak fosfolipid parçacıklarının daha küçük, daha kararlı ürün oluşturma kabiliyeti artar. Şüpheli özellik gösteren bu sistemlere muhtemelen uygulanan enerji yeterli olmamış ve hali hazırda enerji anlamında elverişli bir halde bulunmayan parçacıklar uygulanan en ufak mekanik enerjide parçacık boyutunda bir azalmaya gitme meyilinde olmuşlardır. Bu şüpheli olanlar da dâhil olmak üzere düşük basınçlı örneklerin görsellerinin çoğunda bir krem tabakası veya aglomerasyon oluşumu tespit edilmiştir. Böyle bir durumda, deplesyon flokülasyonu kavramı dağılımların parçacık boyutuna etki etmiş olabilir. Deplesyon flokülasyonu, çözeltide mevcut olan küçük boyutlu nanoparçacıkların makromoleküller arasından kalkması sonucu emülsiyon veya köpük parçacıklarının üzerinde etki eder. Bu küçük boyutlu nanopartiküllere depletant adı verilir ve bu depletantlar polimer veya misel şeklinde olabilirler (Trokhymchuk & Henderson, 2015). Bu etkileşimin başlıca nedeni iyonik olan veya olmayan misellerin osmotik basıncındaki değişimdir (Kralchevsky, Danov, & Anachkov, 2015). Deplesyon

flokülasyonunun mekanik karıştırma ile kolaylıkla yok edildiği bilinmektedir (Chang & McClements, 2015). Ölçüm için numune alma öncesinde deplesyon flokülasyonundan dolayı oluşmuş krem tabakasının vortex veya el ile karıştırılması sonucu kırılmasıyla dilüsyona uğrayan parçacıklar tekrar oluşarak ışığın krem tabakasından farklı dağılmasına neden olurlar, bu da ölçümlerde değişiklik saptanamamasıyla sonuçlanmış olabilir.

Tablo 3. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde ultrasonikasyon (USK) uygulanarak hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda bekletilmiş S75 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.

Solvent_USK Süresi	Sıcaklık	ORTALAMA PARÇACIK BOYUTU*, Z _{av} (nm)			
		1. gün	7. gün	14. gün	30. gün
ATÇ_2 dk	4 °C	124.80 ^a ± 10.61	124.20 ^a ± 5.67	125.60 ^a ± 6.30	123.20 ^a ± 8.58
	25 °C	128.40 ^a ± 3.80	12360 ^a ± 5.89	125.20 ^a ± 9.17	128.40 ^a ± 5.02
ATÇ_5 dk	4 °C	86.70 ^a ± 4.11	8500 ^a ± 7.47	85.90 ^a ± 3.81	91.60 ^a ± 3.36
	25 °C	85.00 ^a ± 2.32	92.00 ^a ± 6.93	88.50 ^a ± 5.98	94.00 ^a ± 3.75
ATÇ_8 dk	4 °C	85.40 ^a ± 4.41	83.20 ^a ± 7.90	85.70 ^a ± 1.12	85.60 ^a ± 2.97
	25 °C	84.70 ^a ± 8.41	90.20 ^a ± 3.91	89.30 ^a ± 3.91	91.40 ^a ± 6.63
DS_2 dk	4 °C	83.60 ^a ± 8.49	76.00 ^a ± 2.39	80.80 ^a ± 5.40	76.00 ^a ± 1.06
	25 °C	83.60 ^a ± 3.50	81.50 ^a ± 6.33	79.80 ^a ± 4.66	74.70 ^a ± 4.37
DS_5 dk	4 °C	45.50 ^b ± 3.52	56.60 ^{ab} ± 5.07	55.10 ^{ab} ± 6.43	55.30 ^{ab} ± 2.14
	25 °C	46.10 ^{ab} ± 3.33	58.00 ^{ab} ± 6.64	59.60 ^a ± 5.96	55.70 ^{ab} ± 4.31
DS_8 dk	4 °C	59.30 ^a ± 8.19	54.60 ^a ± 4.16	57.10 ^a ± 6.44	55.40 ^a ± 3.71
	25 °C	59.30 ^a ± 8.20	64.50 ^a ± 8.24	61.80 ^a ± 3.90	57.10 ^a ± 1.43
FTÇ_2 dk	4 °C	234.40 ^b ± 26.38	292.90 ^{ab} ± 27.04	291.60 ^{ab} ± 28.04	295.90 ^a ± 5.96
	25 °C	233.70 ^b ± 30.50	299.80 ^a ± 9.53	303.40 ^a ± 8.69	306.20 ^a ± 10.17
FTÇ_5 dk	4 °C	164.00 ^a ± 9.46	173.20 ^a ± 9.48	173.00 ^a ± 10.10	175.10 ^a ± 2.86
	25 °C	166.60 ^a ± 18.31	179.20 ^a ± 13.53	183.60 ^a ± 13.10	185.90 ^a ± 9.89
FTÇ_8 dk	4 °C	164.40 ^a ± 9.46	158.60 ^a ± 9.52	170.60 ^a ± 3.95	169.00 ^a ± 7.02
	25 °C	166.40 ^a ± 31.99	166.30 ^a ± 12.25	172.50 ^a ± 7.32	184.90 ^a ± 11.55

*Her bir numuneye kendi içerisinde sıcaklığa ve zamana bağlı olarak %95 güven aralığında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve varyans analizi uygulanarak oluşturulmuştur.

Tablo 4. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 4 °C'de bekletilmiş S75 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.

Solvent_ MA Basıncı	ORTALAMA PARÇACIK BOYUTU*, Z _{av} (nm)			
	1. gün	7. gün	14. gün	30. gün
ATÇ_1300 bar	38.59 ^a ± 3.85	48.86 ^b ± 0.39	46.90 ^b ± 3.85	65.26 ^a ± 10.84
ATÇ_900 bar	49.82 ^b ± 5.74	70.64 ^a ± 2.59	53.16 ^b ± 4.47	54.09 ^b ± 3.30
ATÇ_400 bar	79.71 ^a ± 7.27	86.67 ^a ± 2.07	84.51 ^a ± 5.78	86.70 ^a ± 4.68
FTÇ_1300 bar	76.44 ^a ± 6.92	84.09 ^a ± 4.17	83.00 ^a ± 4.06	80.71 ^a ± 6.77
FTÇ_900 bar	106.83 ^a ± 5.05	111.02 ^a ± 3.88	113.19 ^a ± 3.17	114.76 ^a ± 5.05
FTÇ_400 bar	169.17 ^a ± 9.99	177.36 ^a ± 4.57	174.08 ^a ± 8.07	160.16 ^a ± 9.55
DS_1300 bar	31.44 ^a ± 0.82	31.80 ^a ± 0.98	34.47 ^a ± 3.36	31.64 ^a ± 1.95
DS_400 bar	86.70 ^a ± 5.35	76.55 ^a ± 8.03	81.55 ^a ± 6.43	74.35 ^a ± 6.64
DS_0 bar	355.19 ^a ± 23.51	340.12 ^{ab} ± 13.73	297.66 ^b ± 11.99	295.37 ^b ± 23.45

*Her bir numuneye kendi içerisinde zamana bağlı olarak %95 güven aralığında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve varyans analizi uygulanarak oluşturulmuştur.

Tablo 5. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 25 °C'de bekletilmiş S75 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.

Solvent_MA Basıncı	ORTALAMA PARÇACIK BOYUTU*, Z _{av} (nm)			
	1. gün	7. gün	14. gün	30. gün
ATÇ_1300 bar	38.59 ^a ± 3.85	47.96 ^a ± 2.28	46.49 ^a ± 2.36	47.12 ^a ± 5.24
ATÇ_900 bar	49.82 ^b ± 5.74	51.36 ^b ± 1.23	50.18 ^b ± 0.65	212.69 ^a ± 34.43
ATÇ_400 bar	79.71 ^a ± 7.27	88.26 ^a ± 2.27	81.19 ^a ± 4.73	87.58 ^a ± 2.53
FTÇ_1300 bar	76.44 ^b ± 6.92	120.32 ^a ± 13.00	118.5 ^a ± 7.13	119.38 ^a ± 9.33
FTÇ_900 bar	106.83 ^b ± 5.05	136.54 ^a ± 5.77	138.05 ^a ± 3.48	137.89 ^a ± 3.46
FTÇ_400 bar	169.17 ^a ± 9.99	162.93 ^a ± 9.72	165.56 ^a ± 6.99	164.40 ^a ± 7.89
DS_1300 bar	31.44 ^b ± 0.82	44.97 ^a ± 3.40	45.92 ^a ± 1.30	46.13 ^a ± 5.59
DS_400 bar	86.70 ^a ± 5.35	85.74 ^a ± 5.51	86.43 ^a ± 6.15	81.33 ^a ± 5.64
DS_0 bar	355.19 ^c ± 23.51	343.97 ^c ± 13.50	757.56 ^a ± 11.35	564.63 ^b ± 38.63

*Her bir numuneye kendi içerisinde zamana bağlı olarak %95 güven aralığında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve varyans analizi uygulanarak oluşturulmuştur.

Tablo 6. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 4 °C'de bekletilmiş E80 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.

Solvent_MA Basıncı	ORTALAMA PARÇACIK BOYUTU*, Z _{av} (nm)			
	1. gün	7. gün	14. gün	30. gün
ATÇ_1300 bar	60.06 ^b ± 1.66	64.83 ^{ab} ± 3.05	67.52 ^a ± 2.78	66.11 ^{ab} ± 1.30
ATÇ_900 bar	93.65 ^a ± 1.57	99.94 ^a ± 9.98	91.38 ^a ± 2.37	94.12 ^a ± 5.45
ATÇ_400 bar	154.75 ^a ± 3.14	162.82 ^a ± 15.22	159.25 ^a ± 1.60	152.17 ^a ± 5.83
FTÇ_1300 bar	81.75 ^a ± 2.63	87.07 ^a ± 8.02	78.70 ^a ± 2.84	86.09 ^a ± 9.68
FTÇ_900 bar	112.47 ^a ± 4.61	118.75 ^a ± 6.57	115.22 ^a ± 15.66	113.48 ^a ± 3.86
FTÇ_400 bar	185.04 ^a ± 11.07	179.60 ^a ± 10.51	184.87 ^a ± 12.67	178.89 ^a ± 10.49
DS_1300 bar	45.97 ^a ± 5.23	45.69 ^a ± 4.88	36.55 ^a ± 1.61	42.99 ^a ± 6.23
DS_400 bar	103.63 ^a ± 9.50	85.88 ^b ± 5.50	86.90 ^{ab} ± 7.48	82.02 ^b ± 3.48
DS_0 bar	677.94 ^a ± 26.77	335.41 ^b ± 4.94	333.55 ^b ± 8.97	328.18 ^b ± 19.13

*Her bir numuneye kendi içerisinde zamana bağlı olarak %95 güven aralığında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve varyans analizi uygulanarak oluşturulmuştur.

Tablo 7. Distile su (DS), asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde mikroakışkanlaştırıcı (MA) uygulanarak hazırlanmış ve 25 °C'de bekletilmiş E80 örneklerinin ortalama parçacık boyutları.

Solvent_MA Basıncı	ORTALAMA PARÇACIK BOYUTU*, Z _{av} (nm)			
	1. gün	7. gün	14. gün	30. gün
ATÇ_1300 bar	60.06 ^{ab} ± 1.66	64.18 ^a ± 4.55	61.81 ^{ab} ± 2.01	55.82 ^b ± 1.40
ATÇ_900 bar	93.65 ^a ± 1.57	103.70 ^a ± 12.71	89.84 ^a ± 8.53	89.25 ^a ± 1.91
ATÇ_400 bar	154.75 ^a ± 3.14	154.62 ^a ± 7.30	143.92 ^{ab} ± 3.14	131.28 ^b ± 8.51
FTÇ_1300 bar	81.75 ^a ± 2.63	76.55 ^a ± 6.40	79.04 ^a ± 11.37	88.99 ^a ± 6.13
FTÇ_900 bar	112.47 ^a ± 4.61	112.89 ^a ± 12.96	110.78 ^a ± 4.68	110.26 ^a ± 8.92
FTÇ_400 bar	185.04 ^a ± 11.07	185.04 ^a ± 11.07	186.92 ^a ± 11.44	181.44 ^a ± 10.87
DS_1300 bar	45.97 ^a ± 5.23	48.24 ^a ± 4.88	48.72 ^a ± 1.61	48.95 ^a ± 6.23
DS_400 bar	103.63 ^a ± 9.50	103.08 ^a ± 5.50	109.96 ^a ± 7.48	109.25 ^a ± 3.48
DS_0 bar	677.94 ^a ± 26.77	642.88 ^a ± 4.94	556.61 ^b ± 8.97	379.23 ^c ± 19.13

*Her bir numuneye kendi içerisinde zamana bağlı olarak %95 güven aralığında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve varyans analizi uygulanarak oluşturulmuştur.

4.1.2.5 Kullanılan Çözelti Tipinin Lipozomların Ortalama Parçacık Büyüklüğü Üzerine Etkisi

USK yöntemi ile ATÇ, FTÇ ve DS çözeltilerinde hazırlanan S75 dispersiyonlarının parçacık boyutundaki değişimler, Şekil 6'da gösterilmiştir. Çözeltilerin nihai parçacık boyutu, solvent çeşidinden önemli ölçüde etkilenmiştir ($p < 0.05$). En büyük parçacık boyutuna FTÇ örneklerinde rastlanırken onları sırasıyla ATÇ ve DS lipozomları takip etmiştir. MA numuneleri için de aynı sıralama geçerlidir. Parçacık boyutundaki artışın kararlılığın bozulması olduğu düşünüldüğünde, FTÇ'nin kararlılığının ATÇ ve DS'ye yetişemediği söylenebilir. Dahası, ATÇ numuneleri parçacık boyutu sıralamasında diğer ikisinin arasında bulunmasına karşın, FTÇ'den ziyade parçacık boyutu değerlerinin en küçük olduğu DS'ye daha yakın değerler göstermiştir.

Çözücü tiplerine bağlı olarak meydana gelen bu fark, elektrostatik çift katmanın hidrodinamik çapa katkısı ile açıklanmıştır. Foton Korelasyon Spektroskopisi (FKS) ölçümleri, tanecik boyutunu hidrodinamik çap (Z_{av}) olarak rapor eder. Bu değer, partikülün gerçek çapını yüzeyine tutunan elektriksel ikinci bir tabaka ile birlikte ölçer. Yani Z_{av} her zaman mikroskopik tekniklerle gözlemlenebilecek olan gerçek parçacık boyutunu vermez. Fakat yüklü bir parçacığın solüsyon içerisindeki kararlılığının göstergesi de normal parçacık boyutu değil, Z_{av} yani hidrodinamik çapıdır. Çünkü bu değer, parçacığın süspansiyon içerisindeki serbest hareketinde etrafında kendisiyle birlikte sürüklediği iyonları da gösterir, yani parçacığın ortamda nasıl davranmayı seçtiğinin bir göstergesidir. Bu özelliği ile de uygulamalarda kararlılık kistası olarak kullanılmaktadır. Buradan hareketle farklı çözücüler için ortamdaki iyonların varlığı bahsi geçen elektriksel çift tabakanın kalınlığını belirgin bir şekilde etkilediğinden, ATÇ ve FTÇ'deki iyonların negatif yüklü lipozomları çevreleyebileceği ve hidrodinamik çapı arttırabileceği sonucuna varılmıştır. Bu eğilim aynı zamanda zeta potansiyeli ölçümleri ile de ilişkilendirilebilir. Yüklü bileşiklerin varlığında zeta potansiyel değerleri sıfıra yaklaşan lipozomlar kararlılıklarını kaybederler. Daha sonra açıklanıp gösterileceği gibi, FTÇ ile hazırlanan lipozomların toplam yükü sıfıra ulaşmış ve doğrudan instabiliteye yol açmıştır. Benzer bir girişim ATÇ ile hazırlanan örnekler için de geçerlidir, ancak zeta potansiyellerindeki azalma FTÇ örneklerinden çok daha az olmuştur ve bu sayede ATÇ içindeki lipozomlar kimyasal olarak daha dirençli kalabilmişlerdir. En düşük ortalama parçacık boyutu sonuçlarının DS numunelerinde görülmesi de iyonik katkının parçacık boyutunu arttırdığı hipotezi ile tutarlıdır. Bu fark detaylı olarak ileri mikroskopik teknikleri ile saptanabilir, ancak lipozomları gözlemlemek için en uygun yöntem olan

Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) yüksek iyonik kuvvetlerde tercih edilmediğinden bu çalışmada uygulanmamıştır.

Genel sonuçlar gözden geçirildiğinde FTÇ örneklerinin hem zeta potansiyeli hem de partikül boyutu bakımından her daim uç sonuçlar verdiği saptanmıştır. Bu aykırılığın daha kapsamlı açıklaması FTÇ'nin yüksek iyonik gücü yoluyla yapılabilir. Salting out olarak bilinen tuzla çıkartma yöntemi yaygın olarak proteinler için kullanılıyor olsa da sulu ortamın iyonik kuvvetinin, fosfolipid yapısındaki hidrofilik başlar ve su arasındaki etkileşimi azaltarak ayrılmasına neden olduğu düşünülmektedir.

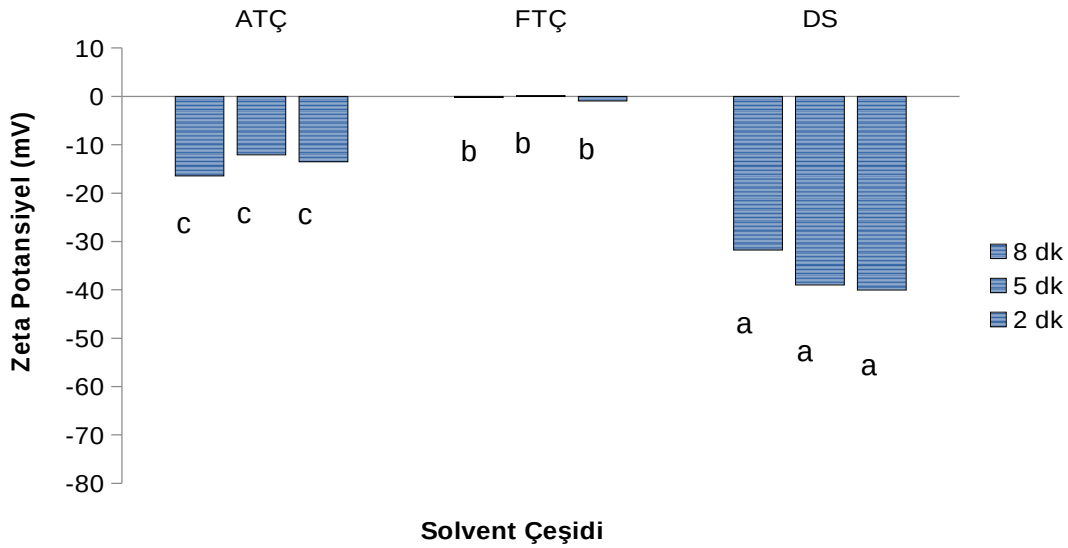
4.1.3 Lipozomların Zeta Potansiyel Ölçümleri

Zeta potansiyel, koloidal süspansiyonların stabilitesini incelemek için önemli bir parametredir. Bu çalışmada FTÇ (pH: 7.2), DS (pH: 6.5) ve ATÇ (pH: 3.8) çözücülerinde hazırlanarak mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonikasyona maruz bırakılmış soya lesitini numunelerinin zeta potansiyelleri ölçülmüştür. İyon katkısı olmaksızın orijinal hallerinde, kullanılan fosfolipidler negatif yüklüdür. MA basıncına ve solvent türüne göre zeta potansiyel değişimleri Şekil 8 ve 9'da verilmiştir. İyonların varlığı, çözeltideki parçacıkların kararlılığını etkileyen zeta potansiyeli değiştirir. FTÇ numuneleri için önceki bölümlerde de belirtildiği üzere kararlılık yani stabilite ile aglomerasyon veya herhangi bir fiziksel değişim kast edilmektedir.

Parçacık yükünün kararlılığı nasıl etkilediği, parçacıkların çözelti içerisindeki rastgele hareketine bağlıdır. Bir çözeltideki parçacıklar birbirlerine karşı yüksek itici kuvvete sahip ise bu parçacıklar rastgele Brownian hareketinden dolayı yakınlaştıklarında aglomere olma ve çökme eğilimi göstermezler. Fakat bu varsayımdaki parçacıklar birbirlerini itecek yeterli net yüke sahip olmadıklarında durum tersine döner. Bu itiş kuvveti 61 mV ve üzeri için çok iyi, 31-40 mV arası için orta ve 10-30 mV arası için kararsızlığı temsil etmektedir (Duplessis vd., 1996). Sonuçlar, pH 7.2'ye ayarlandığında partiküllerin yüzey yükünün azaldığını göstermiştir. -30 ile +30 mV arasındaki zeta potansiyel değeri bir emülsiyon için dengesizliği belirtir ve değer sifıra yaklaştıkça instabilitenin derecesi artar. Şekil 8-9'da de açıkça görülebileceği üzere FTÇ'de hazırlanan örneklerin zeta potansiyeli sıfır civarındadır ve son derece dengesiz oldukları söylenebilir. Bu sonuçlar ayrıca parçacık boyutu bulgularını da doğrulamaktadır.

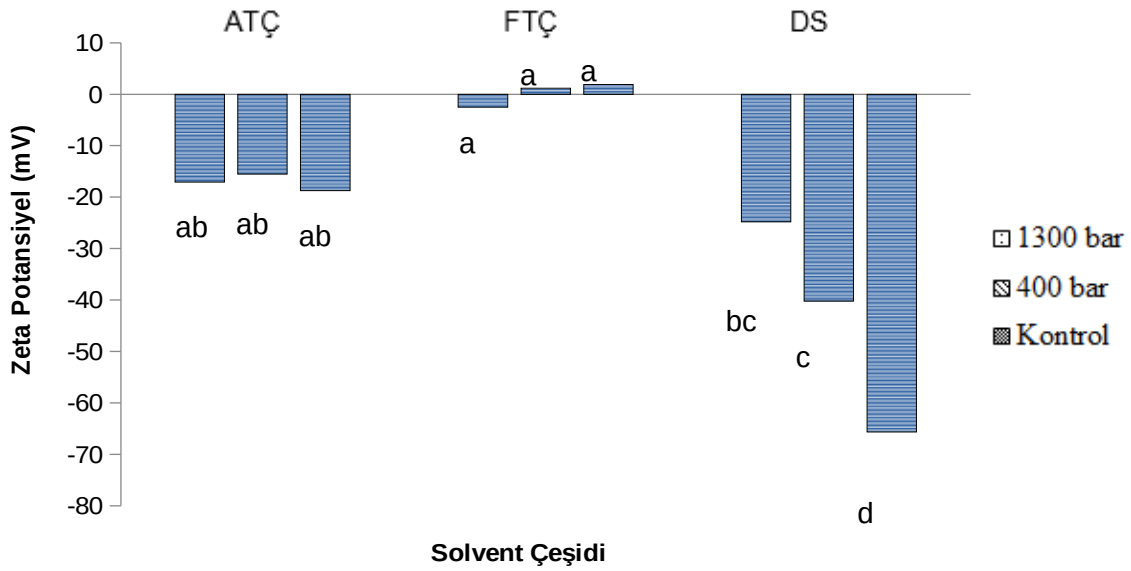
Teorik olarak bir sistemin zeta potansiyelinin parçacık boyutu ile değişmesi beklenmez. Bu durum, basınçla ters orantılı olarak bulunan parçacık boyutu ve zeta potansiyel sonuçlarının karşılaştırılmasıyla da teyit edilmiştir. Zeta potansiyel, değişen basınç ile kayda değer bir fark

göstermemiştir ($p \geq 0.05$). Ultrasonikasyon numunelerinin çözücü tipine göre zeta potansiyel değişimi Şekil 8'de gösterilmektedir. Ultrasonikasyon süresindeki artış ile değişen parçacık boyutunun da zeta potansiyel üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı sonuçlarda açıkça görülmektedir ($p \geq 0.05$). Ultrasonikasyon işlemi ile farklı solventlerde hazırlanan S75 numunelerinin parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri arasındaki Pearson korelasyonu 0.812 bulunmuştur. Öte yandan, MA örnekleri için bu tür bir korelasyon tespit edilmemiştir. Bunun nedeninin 5 tekrarlı MA uygulaması sırasında sisteme ışık ve havanın daha çok dâhil olmasıyla tetiklenebilecek olan lipid oksidasyonu vb. kimyasal değişiklikler olduğu tahmin edilmektedir. Bu tarz bir etki parçacık boyutu ile ölçülemezken zeta potansiyelin lipid oksidasyonu ile ilişkilendirilebileceği bir önceki raporda tartışılmıştı.



Şekil 8. Ultrasonikasyon (USK) ile hazırlanan S75 lipozomlarının farklı asetat tampon çözeltisi (ATÇ), fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) ve distile su (DS)'deki zeta potansiyel değerleri*.

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre



Şekil 9. Mikroakışkanlaştırıcı (MA) ile hazırlanan S75 lipozomlarının asetat tampon çözeltisi (ATÇ), fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) ve distile su (DS)'deki zeta potansiyel değerleri*.

*% 95 güven aralığında test edilmiş Varyans Analizi ve Tukey's çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre

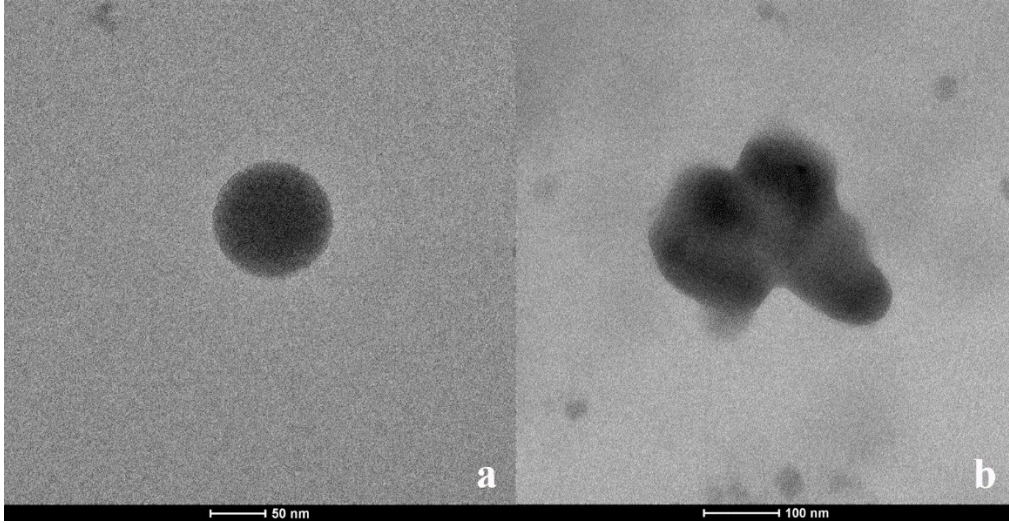
4.1.4 Mikroskop ile Görüntüleme

4.1.4.1 Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM)

TEM analizi, FKS ile ölçülen tanecik boyutunun doğruluğunu kontrol etmek ve depolama süresince lipozomların olası morfolojik değişiklikleri hakkında bilgi edinmek amacıyla çalışmaya dâhil edilmiştir. TEM ile görüntüleme tüm örnekler için yapılmamıştır. İyonların görsele müdahalesini önlemek için sadece DS ile hazırlanan ve işlem gördüğü koşulda optimum parçacık boyutuna sahip olduğu bulunan numuneler (1300 bar MA ve 5 dakika USK uygulanmış S75 ve E80 numuneleri) görüntülenmiştir. 30 gün süresince 1, 15 ve 30. günlerde yapılan gözlemlerde lipozom keseciklerinin küresel biçimleri, her iki fosfolipid için de teyit edilmiştir.

DS'de hazırlanarak 5 dakika USK işlemine tabi tutulan S75 lipozomları için zamanla oluşan morfolojik bozukluk Şekil 10'da gösterilmiştir. Bu birleşme, 25 °C'de 14 gün depolama sonrası görülen parçacık boyutu artışının nedeni olarak gösterilebilir (Tablo 3). TEM ölçümü teknik olarak çok küçük numune kapasitesi ile çalıştığından, bu ufak örneklerde alınan görüntüler numunenin genel halini yansıtmayabilir, ancak morfoloji hakkında bilgi vereceği

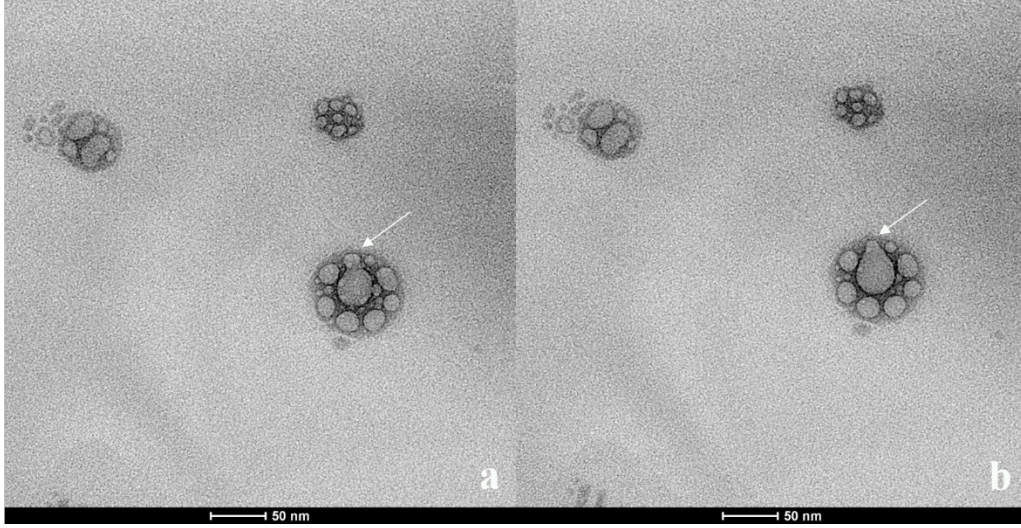
muhtemeldir. Buradan hareketle 4 °C'de saklanan numunede saptanan bu birleşme şeklindeki bozukluğun, aynı numunenin 25 °C'deki replikesinde artış göstereceği ve parçacık boyutunu etkileyeceği öngörülebilir.



Şekil 10. 5 dk ultrasonikasyon (USK) ile distile su (DS) içerisinde hazırlanarak 4 °C'de bekletilmiş S75 lipozomlarının birinci (a) ve onbeşinci (b) gün transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.

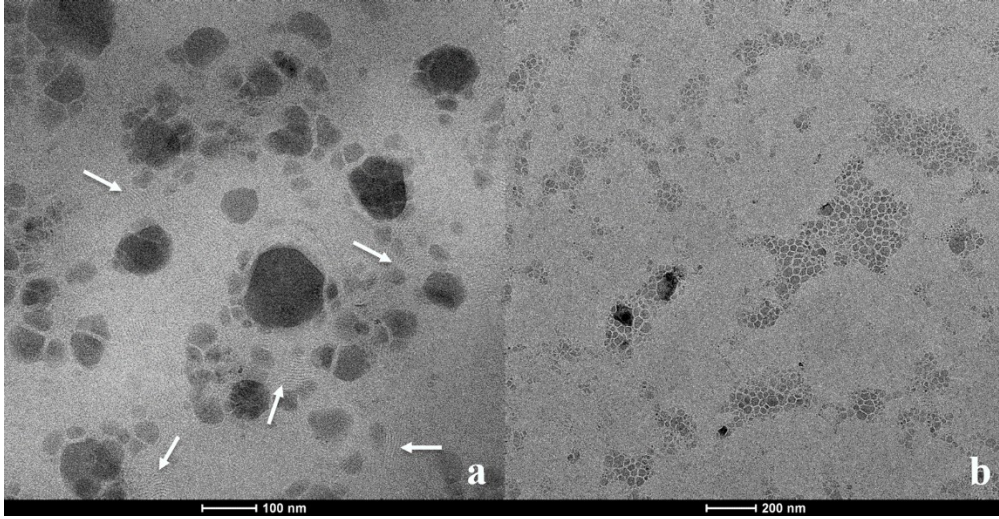
E80 lesitininin hassaslığı ve dış etmenlerden etkilenme eğilimi, ölçüm sırasında elektron ışınlarına maruz bırakıldığında gösterdiği kabarcıklanma hasarı şeklinde TEM görüntülerine yansımıştır (Kuntsche, Horst, & Bunjes, 2011) (Şekil 11).

Diğer yandan S75 lesitininin 15. gün TEM ölçümünde parmak izi benzeri ilginç bulgulara rastlanmıştır (Şekil 12(a)). Bu davranış, numunenin genelinde görülmemekle beraber düzenli bir model sergilemesi dikkat çekmiştir. Literatür araştırması sonucu fosfatidiletanolamin (FE) maddesinin Donduruculu TEM görüntülemesinde benzer sonuçlar elde edildiği bilgisine ulaşılmıştır (Siegel & Epan, 1997).



Şekil 11. Soldan sağa ışın hasarı sonucu oluşan kabarcıklanma (a) ve genişlemesi (b) gösterilmiştir. Görüntüler distile su (DS)'de 1300 bar basınçla hazırlanmış E80 lipozomlarından ilk gün, peşpeşe alınmıştır.

FE, denge faz değişim sıcaklığında (T_H) L_α fazından H_{II} fazına geçebilen, yüksüz bir fosfolipittir. Bu denge faz değişim sıcaklığı Siegel ve Epanand (1997) tarafından aynı makalede 43 °C olarak bulunmuştur. Burada L_α ve H_{II} fazları sırasıyla lamellar ve ters altıgen fazları belirtmektedir. T_H sıcaklığında, FE'ler lamellar yapıdan ters altıgen faza dönüşme özelliği gösterebilirler. Bu ön bilgilere ek olarak sözü geçen makaledeki görsellerin de bu çalışmanın depolama sıcaklığına çok yakın olan 5 °C'de saklanan örneklerden alınmış olduğunu belirtmekte fayda vardır.



Şekil 12. Distile su (DS) içerisinde 1300 bar basınçlanarak 4 °C'de 15 gün saklanmış S75 lipozomlarında görülen hegzagonal katlanmalar (a) ve açısız görüntüler (b). Beyaz oklar dalgamsı hegzagonal katlanmaları işaret etmektedir.

S75, soya lesitini için üreticinin ürün bilgilendirme föyüne bakıldığında, %7 ile %14 FE ihtiva ettiği görülmüştür. Bu bilgiyle görseller birlikte düşünüldüğünde FE'nin kendisini altıgen fazdaki parçacıkların bağlantı noktalarında gösterdiği düşünülebilir. Bu durumda akıllara bu davranışa neden olması için sıcaklık seviyesinin buzdolabı sıcaklığından 43 °C'ye nasıl yükselmiş olabileceği sorusu gelmektedir. Bunun nedeni, görüntüleme öncesi numuneye uygulanan ön işlemlerle açıklanabilir; zira lipid morfolojilerinin uygulanan farklı işlemler nedeniyle değişebileceği bilinmektedir (Siegel & Eppard, 1997). TEM, vakum altında çalışır ve bu amaçla numuneler görüntüleme öncesi kurutulmaktadır. FE morfolojisini etkileyebilecek nedenlerden ilki ışık odaklanarak hızlandırılan bu kurutma işlemi olarak gösterilebilir. Bir diğer durumda yani örneğin tam kurutulmadan ekipmana alındığı durumda ise ani vakuma maruz kalması da faz dönüşümüne neden olabilecek etkenlerden biridir. Kontrollü koşullarda oluşan faz değişimlerinin normalde lipozom çevresinde durgun suya düşen damla etkisi benzeri dairesel bir patern oluşturması beklenir. Bu dalga benzeri desenin görüntülerimizde düzensiz oluşu da faz geçişinin T_H 'den farklı sıcaklıkta, bir zorlama sonucu gerçekleştiğinin göstergesidir (Siegel & Eppard, 1997).

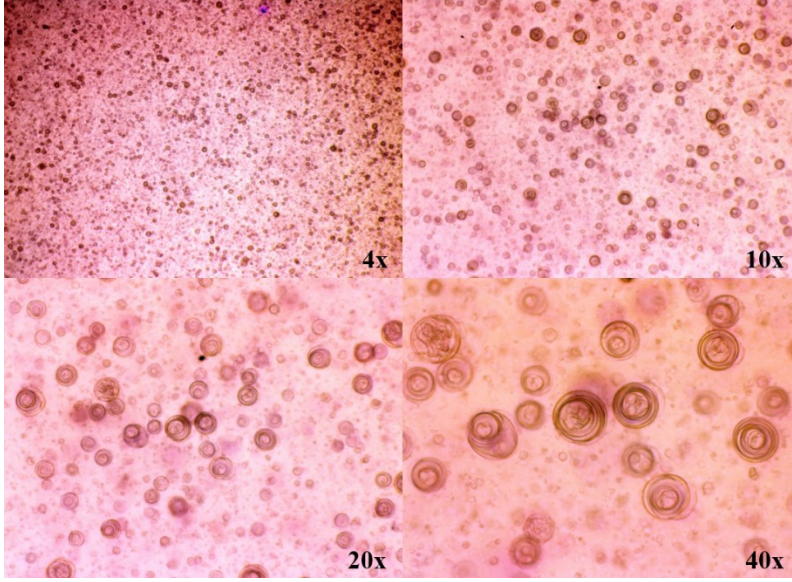
S75 örneklerinin görüntülerinde açılı ve tekrarlanan başka bir model daha dikkatleri çekmiştir (Şekil 12(b)). Bu davranış literatürdeki katı çift katlı lipidlerin boyutu ile açıklanmıştır.

Parçacıklar küçük boyutlu olduklarında mikroskopta açılı şekiller halinde görülebilmektedir (Chiu ve diğerleri, 2005; Kuntsche ve diğerleri, 2011).

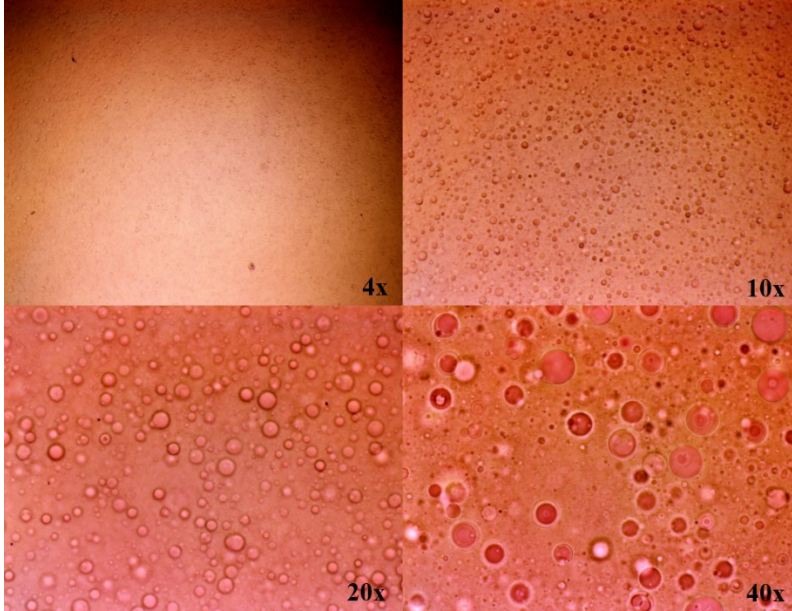
Özetlenecek olursa, TEM görüntüleri FKS yöntemiyle gerçekleştirilen parçacık büyüklüğü sonuçlarının güvenilir olduğunu doğrulamış ve beklendiği üzere lipozomların hazırlandıkları gün küresel yapıda olduğunu göstermiştir. Özellikle E80 olmak üzere iki fosfolipid de görüntüleme sırasında elektron ışınlarından etkilenmiş bu yüzden takip eden görüntülemeler olabilecek en kısa sürede tamamlanmaya çalışılmıştır. İnstabilitenin kesin göstergesi olmamakla beraber TEM görüntülerinde saptanan birleşme gibi eğilimler lipozomların zamana bağlı uğrayabilecekleri değişimler hakkında fikir vermiştir.

4.1.4.2 Işık Mikroskobu Deneyleri

Depolama süresince fiziksel özelliklerde meydana gelen değişiklikleri saptayabilmek için MA örneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Yalnız 1300 ve 900 bar basınçla homojenize edilen numunelerin parçacık boyutları mikroskop altında gözlemlenebilmek için çok küçük kalmıştır. Sadece birincil homojenizasyon uygulanmış E80 ve S75 lipozomlarının çok odaklı görüntüleri sırasıyla Şekil 13 ve 14'te gösterilmiştir. Bu görüntülerde çoklu keseciklerin iç içe geçmiş yapısı artan büyütme ile kolayca tespit edilebilmektedir. Genel olarak lipozomlar küresel şekillerini korumuş fakat yer yer keseciklerin çekirdeğinde veya bulanıklaşan çevre ortamda deformasyonlar gözlemlenmiştir. ATÇ ile hazırlanan örneklerin stabilitesi önceki bölümlerde FTÇ örneklerine nazaran daha üstün bulunmuştu. Bu kıyaslama aynı zamanda optik görüntülerle de yapılabilmektedir. Lipozomların yapısal bütünlüğünün yine muhtemel olarak iyonlar tarafından engellendiği açıkça görülmüştür. Kesecikli yapı açılmaya zorlanarak küresel morfoloji kaybedilmiştir. En düşük basınçta homojenleştirilmiş FTÇ numunelerinde ise gözle tespit edilebilecek düzeylerde faz ayrımı olmuştur.



Şekil 13. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ)'de hazırlanarak 2 ay boyunca 4 °C'de bekletilen E80 lipozomlarının çok odaklı görüntüsü.



Şekil 14. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ)'de hazırlanarak 2 ay boyunca 4 °C'de bekletilen S75 lipozomlarının çok odaklı görüntüsü.

4.1.5 Lipozomların Hidroperoksit Ölçümleri

Oksidasyon gıda bozulmasının en önemli nedenlerinden biridir ve gıdaların doğal bileşenlerinin bir parçası olmasıyla lipid oksidasyonuna bağlı kalite değişikliklerinden diyet

lipidleri sorumludur. Lipid oksidasyonu, ortamdaki oksijen, su aktivitesi, antioksidan maddelerin varlığı, ışınlama, lipid kompozisyonu, sıcaklık ve pH'dan etkilenir (Decker & McClements, 2000; Wang & Wang, 2008). Farklı fosfolipid türlerinin hidroperoksit oluşumu üzerine etkisi ve bunların çözücüler içindeki duyarlılıkları bu bölümde ayrı ayrı ele alınacaktır.

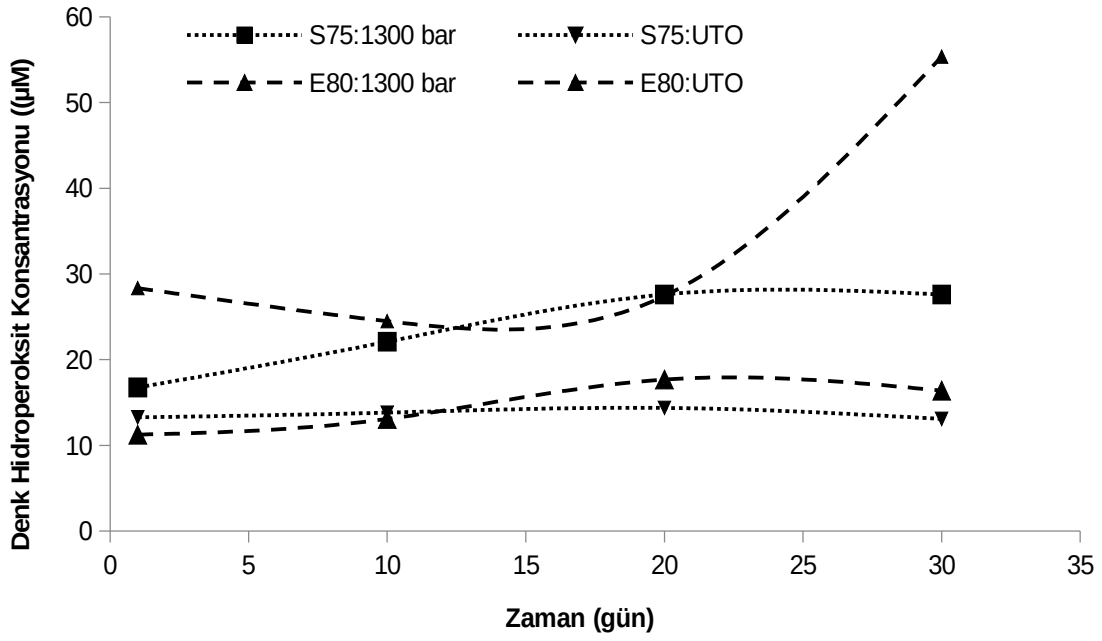
4.1.5.1 Fosfolipit Kaynağının Hidroperoksit Oluşumu Üzerindeki Etkisi

MA ile hazırlanan E80 ve S75 lipozomlarının oksidasyon seviyeleri birbirinden önemli derecede farklı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Fosfolipidin yağ asidi zincirlerinde bulunan toplam çift bağların sayısı, oksidasyon seviyesinin en temel göstergelerinden biridir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, ürün bilgilendirme föyünde rapor edilen iyodin değeri 65-69 aralığında olan E80 fosfolipidinin iyodin değeri 85-95 olan S75'e nazaran daha az okside olması; dolayısıyla genel hidroperoksit oluşumunun soya lesitini numunelerinde daha yüksek olması beklenmiştir.

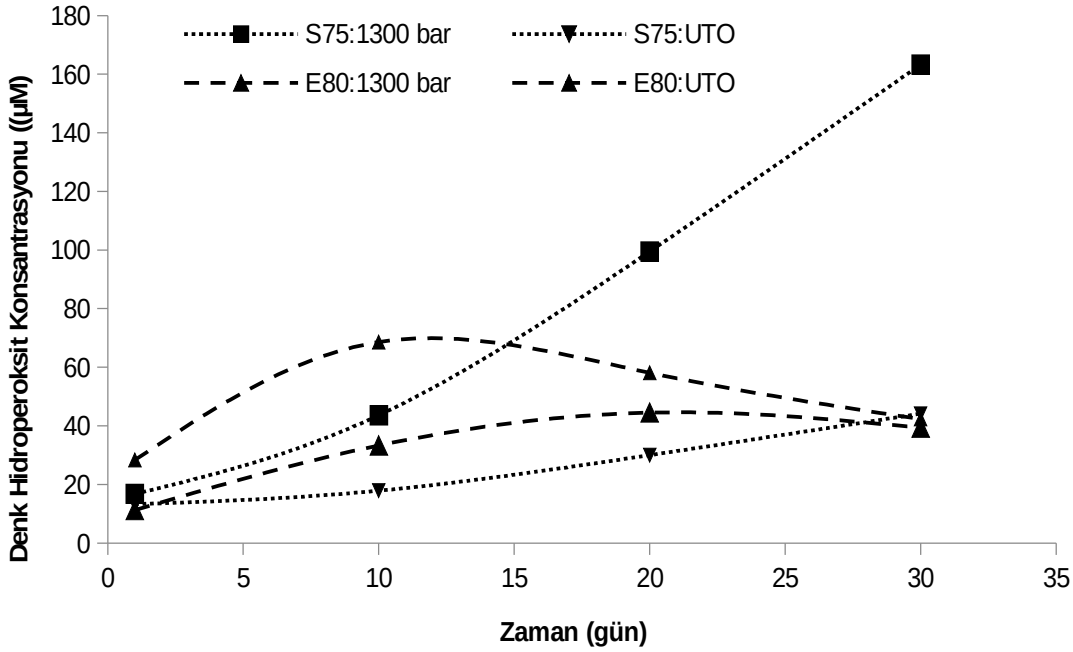
3 farklı çözücü için yapılan analizler, beklendiği gibi 25 °C'de oksidasyon oranının daha yüksek olduğu fakat sıcaklıktaki değişimin S75 lipozomlarını E80 lipozomlarından daha fazla etkilediği sonucuna varılmasını sağlamıştır. DS ve ATÇ örnekleri için, oksidasyon oranları farklı olmasına rağmen değişkenler istatistiksel farklılık açısından aynı eğilimi göstermiştir. Depolama sırasında hidroperoksit oluşumunun önemli ölçüde arttığı bu iki çözücü için 3-yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları, oksidasyon derecesinin büyükten küçüğe S75 (25 °C); E80 (25 °C); E80 (4 °C); S75 (4 °C) olarak sıralanabilmesine olanak sağlamıştır.

Bu sonuçtan hareketle S75'e oranla oda sıcaklığında daha az ancak buzdolabı sıcaklığında daha fazla oksitlenen E80 lipozomlarının sıcaklık değişimiyle oksidasyona karşı daha dirençli olduğu söylenebilmektedir. Fakat düşük sıcaklıkta depolama çalışmaları için (≈ 4 °C) S75 lesitinin oksidasyon açısından daha uygun olduğu görülmektedir (Şekil 15 ve 16).

Diğer yandan, her iki fosfolipid için de FTÇ'de hazırlanan lipozomların oksidasyona karşı güçlü biçimde direnç gösterdiği ve hidroperoksit ölçümlerinin düşük seviyelerde kaldığı tespit edilmiştir. Diğer çözeltiler için kayda değer oksidasyon seviyesine 10 gün sonra ulaşılırken bu değişim FTÇ numunelerinde ancak 20 gün sonra görülebilmektedir. Bu farklılığın da yine iyon konsantrasyonu ve özellikle FTÇ'de bulunan dihidrojen fosfat ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Literatürde benzer durumda dihidrojen fosfat iyonlarının morina fosfolipidi lipozomlarında oksidasyonu azalttığına belirtilmesi de bu düşüncüyü doğrulamaktadır (Mozuraityte, Rustad, & Storrø, 2006). Ayrıca zeta potansiyel ölçüm raporlarında öntanımlı olarak verilen iletkenlik değerlerinin FTÇ örnekleri için çok daha yüksek değerler vermesi (≈ 30 mS/cm) de durumu destekleyici niteliktedir.



Şekil 15. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) içerisinde hazırlanarak 4 °C'de saklanmış farklı lipozomların zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomojenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.



Şekil 16. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) içerisinde hazırlanarak 25 °C'de saklanmış farklı lipozomların zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomojenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.

Bu farklılık dikkate alınarak FTÇ ile hazırlanan örneklerin hidroperoksit ölçümleri detaylıca incelenmiş ve E80 örneklerinde 4 °C'de 25 °C'ye göre daha fazla oksitlenme görülmesi gibi şaşırtıcı bir durum ile karşılaşmıştır. Bu tuhaflığın S75 örneklerinde görülmemesi, E80 tipi fosfolipid, FTÇ ve sıcaklık arasında öngörülemez bir etkileşim olması gerektiğinin göstergesidir. Daha önce de belirtildiği üzere E80 lipozomlarının buzdolabı sıcaklığında oda sıcaklığına nazaran oksidasyona bir şekilde daha duyarlı olduğu görülmüştü. Bu durum, oksijenin bahsi geçen solventte çözünürlüğü ile ilişkilendirilebilir. Çözeltideki tuzluluk oranının artışı sulu çözeltideki oksijen çözünürlüğünü azaltır (Battino vd., 1983) bu durum FTÇ örneklerindeki oksidasyon gecikmesinin en büyük nedeni olarak gösterilebilir. 4 °C'de daha fazla hidroperoksit oluşumu görülmesi durumu ise daha önce de bahsi geçen, sıcaklıkla hem artış hem de azalma gösterebilen tuzla çökeltme (salting out) mekanizması ile ilişkilendirilmiştir. Bizim durumumuzda tuzla çökeltme etkisinin E80 varlığında sıcaklıkla azalması, yani oksijen çözünürlüğünü arttırması söz konusudur.

Genel olarak S75 ve E80 lipozomlarının hidroperoksit bulguları değerlendirildiğinde soya lesitini olan S75'in düşük sıcaklıklarda saklama koşullarında depolama çalışmalarına

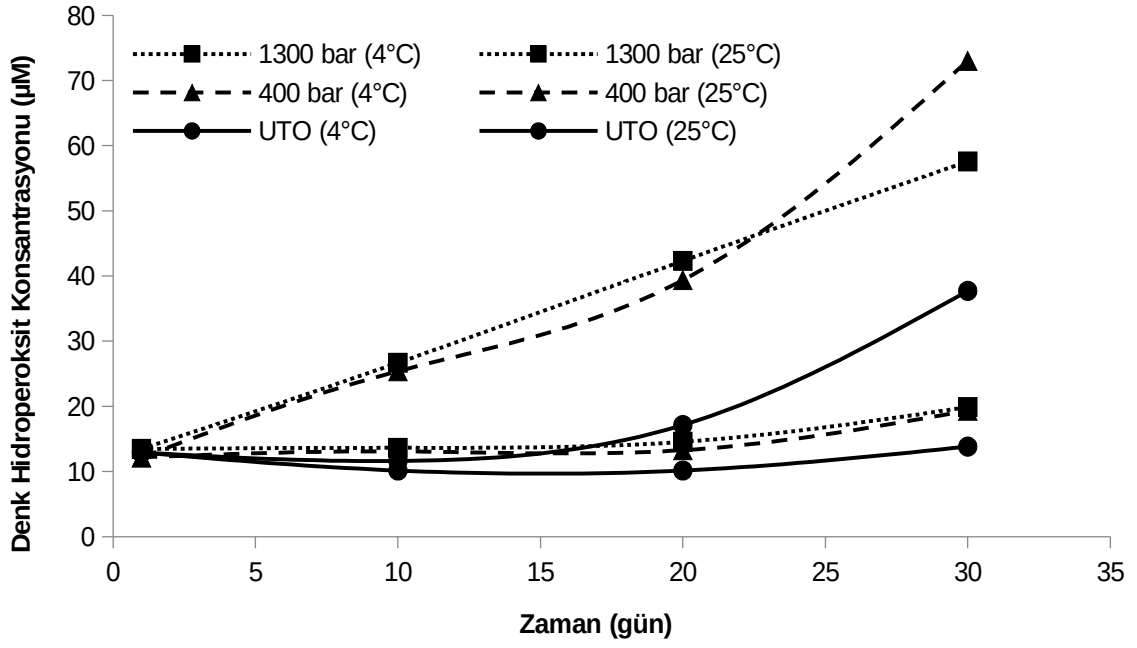
uygunken daha yüksek sıcaklıkta depolama sıcaklıklarında yumurta lesitini E80'in daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.1.5.2 Parçacık Boyutunun Hidroperoksit Oluşumu Üzerindeki Etkisi

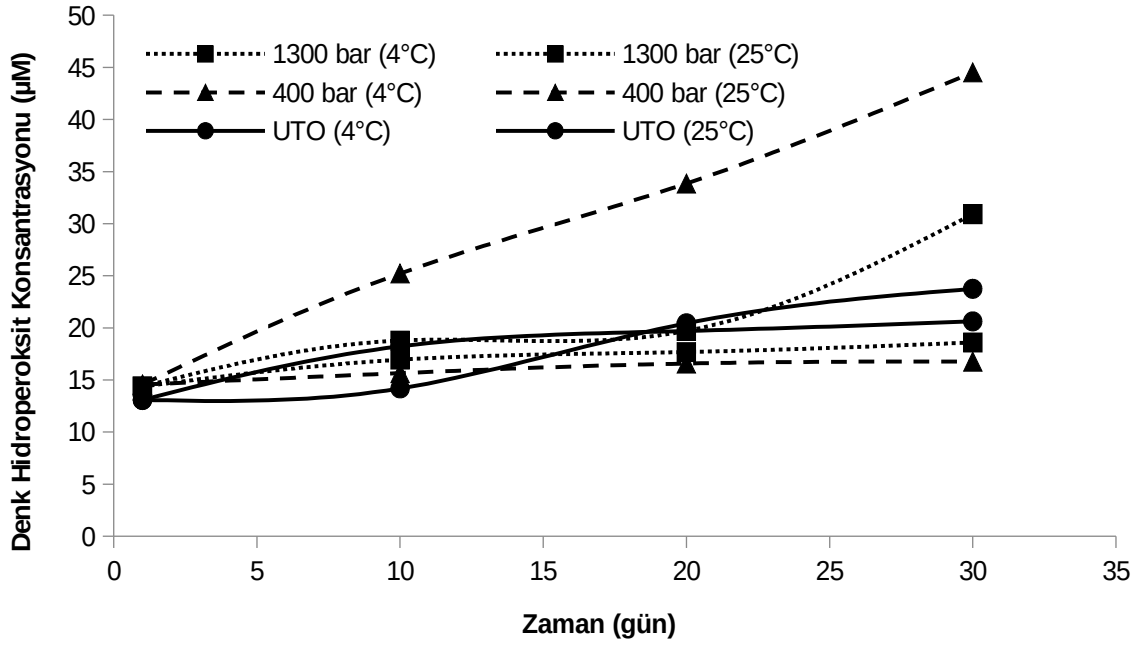
Genel olarak en büyük parçacık boyutları FTÇ örneklerinde görülmüştür. Bu durum direkt olarak pH ile değil, yük ve iyon konsantrasyonu ile bağlantılıdır. pH ile direkt korelasyon beklememekle birlikte küçülen parçacık boyutu ile artan yüzey alanının oksidasyona etkisinin araştırmaya değer olduğu düşünülmüştür. Ancak genellenebilecek bir bulgu elde edilememiştir. Bunun nedeninin parçacık boyutu ölçüm tekniği ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Ölçülen hidrodinamik parçacık boyutunun gerçek parçacık boyutu olmamasının oksidasyon ile bağlantı kurabilecek doğru ANOVA analizini bozmuş olması muhtemeldir. Saklama sonunda oksidasyonun en az görüldüğü numunelerin yalnızca önhomogenizasyon uygulanmış olanlar olduğu tespitine dikkat edilmelidir.

Bizim sistemimizde, parçacık boyutu ile oksidasyonun bir korelasyonu olması halinde bu durumun daha küçük parçacık boyutlu ve daha fazla yüzey alanına sahip olan yüksek basınçlılarda daha fazla olması beklenir. 1300 bar basınçlanmış numunelerde bu beklenti çoğunlukla karşılanmıştır. Fakat çift katmanlı yapılar söz konusu olduğunda, oksidasyonun çoğunlukla yağ asidi zincirlerine bağlı olduğu bilinmektedir (Schnitzer, Pinchuk, & Lichtenberg, 2007). Buradan hareketle, lipozomların bütünlükleri bozulduğunda ve hidrofobik kuyruklar ortama maruz kaldığında oksidasyonun tetiklenmesi beklenir. Şekil 17 incelendiğinde, 20 gün depolama sonrasında DS'de hazırlanan 400 bar basınçlanmış S75 numunelerinin şaşırtıcı derecede yüksek hidroperoksit oluşumu gösterdiği fark edilmektedir. Bu durumun, 14-30 günleri arasında azaldığı görülen parçacık boyutu ile muhtemel bir ilişkisi olduğu söylenebilir.

Diğer yandan, 400 bar basınçla DS'de hazırlanan E80 numunelerinde 10 gün depolama sonrasında bu hipotezin tersini doğrular bir davranış farkedilmiştir (Şekil 18). Fakat 10. günü izleyen zamanlarda hidroperoksit eğiminin azalarak devam ettiği bu örnekler için ilk günlerde hızlı oksitlenme görülmesinin nedeninin MA uygulaması sırasında 400 bar örneklerinin diğerlerine nazaran daha fazla oksijene maruz kalmaları olduğu düşünülmektedir. Çünkü MA ekipmanında uygulanan basınç arttıkça ürünlerin işlem görme hızı artmakta ve bu da doğrudan oksijen ile temas süresini etkilemektedir (azaltmaktadır).



Şekil 17. Distile su (DS)'de hazırlanmış S75 lipozomlarının zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomojenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.



Şekil 18. Distile su (DS)'de hazırlanmış E80 lipozomlarının zamana bağlı hidroperoksit oluşumları. UTO gösterimi, yalnızca önhomjenizasyon uygulanmış numuneler için kullanılmıştır.

4.1.5.3 Çözelti Tipinin ve Hazırlama Yönteminin Hidroperoksit Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Çözücünün pH'sı ve lipozomların oksidasyonu arasında şüphesiz bir bağlantı vardır. Çözücü türüne göre karşılaştırmayı daha kolay tespit edebilmek amacıyla zaman değişkeni bu bölümdeki istatistiksel analize dâhil edilmemiş ve farkın en bariz olması beklenen 30 gün bekletilmiş 25 °C numuneleri ANOVA ile incelenmiştir. Sonuçlara göre farklı solventlerde hazırlanan lipozomların farklı homjenizasyon tekniği ve düzeylerinden farklı etkilendikleri görülmüştür.

Özellikle belirtmek gerekirse ATÇ için, 5 ve 8 dakika USK uygulanan numuneler en fazla oksidasyona uğrarken onları sırasıyla 2 dakika ve 1300 bar işlemleri ve son olarak da 400 bar numuneleri takip etmiştir. ATÇ gibi asidik bir ortamda MA'ya kıyasla daha fazla bulunan USK etkisi, USK uygulaması sırasında geçiş metali olan titanyum probdan numuneye metal geçişinden kaynaklı olabilir. Çift katmanlı sistemlerde oksidasyon çoğunlukla yağ asidi zincirlerine bağlı olmasına rağmen hidrofilik grupların da geçiş metalleri veya pro-oksidadantların mevcudiyetinde oksidasyona katkıda bulunabileceği bilinmektedir (Schnitzer

vd., 2007). Bu durumda, düşük pH ile tetiklenerek geçiş metalinin numuneyle doğrudan temas halindeki probdan numuneye geçişi oksidasyona katkıda bulunmuş olabilir.

Hazırlama teknikleri karşılaştırıldığında, MA prosesinin doğası gereği numuneyle havanın daha çok temasını gerektirmesi, MA için daha yüksek oksidasyon beklentisi yaratmaktadır. Hazırlama tekniği nedeniyle meydana gelen değişiklikleri gözlemleyebilmek için veriler, depolamanın yalnızca ilk günü için tüm homojenizasyon seviyeleri dikkate alınarak 1-yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Oksidasyon derecesi, her iki homojenizasyon tekniği için de sadece önhomjenizasyon uygulanmış olan kontrollerden önemli ölçüde yüksek çıkmıştır ($p < 0.05$). Fosfat ve asetat tampon çözeltileri içinde hazırlanan lipozomlar için MA, USK'dan daha yüksek oksidasyon değerleri verirken, DS örneklerinin ikincil homojenizasyondan eşit derecede etkilendiği görülmüştür. Yani tampon çözeltiler içinde hazırlanan analogları MA'da USK'ya oranla istatistiksel olarak farkedilecek kadar daha fazla oksitlenmiştir ($p < 0.05$). Bu da DS'de hazırlanan lipozomların USK işlemine karşı daha hassas olduğunu gösterir. USK sırasında oluşan kaviteler bu hassasiyetin nedeni olabilir. Yüksek sonikasyon ile açığa çıkan yoğun enerji, suyu hidroksil radikallerine ayırır ve bu radikaller oksidasyonu tetikler (Pingret vd., 2012). Tampon çözücüler ile DS arasında oluşan böyle bir fark, tampondaki iyonik bileşenlerin su moleküllerini bağlamasıyla kavite olacak daha az serbest su ve aktif bileşik kalması ile ilgilidir.

4.1.6 NMR Relaksometre Ölçümleri

Nükleer Manyetik Rezonans, moleküler düzeyde hem yapısal hem de dinamik bilgi kazanmak için koloidal bilimde giderek daha fazla kullanılan, invaziv olmayan, tahribatsız bir analiz yöntemidir (Leal, Rögnvaldsson, Fossheim, Nilssen & Topgaard, 2008). Yöntem; numune başka bir harici manyetik alan etkisi altındayken bir anlık sinüsoidal manyetik titreşim ile rahatsız edilmesi sonucu numuneden gelen manyetik sinyalin geri kazanımı (veya bozulması) ölçümüne dayanır (Hashemi, Bradley, & Lisanti, 2010). Düşük çözünürlüklü, zaman-bazlı NMR Relaksometri cihazlarının örneklerdeki yağ/su içeriği, dağılık faz oranı, parçacık boyutu dağılımı, W/O/W emülsiyonlarında hapsedilmiş su hacmi ve diğer koloidal sistemlerde polimer jelleşmesi ve agregasyonu tayinlerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Mariette, 2009; Vermeir, Sabatino, Balcaen, Van Ranst, & Van der Meeren, 2014). Tipik olarak 25 MHz'den daha düşük frekanslarda çalışan bu tezgah üstü NMR cihazları, boylamsal (geri kazanım eğrisi zaman sabiti, T_1) ve transversal (azalım eğrisi zaman sabiti, T_2) relaksasyon sürelerini ölçmek için kullanılırlar (Kirtil vd., 2014; Mariette, 2009; Marigheto vd., 2007). Ölçülen bu relaksasyon zamanları, karmaşık gıda sistemlerindeki her farklı gıda

bileşeni için ve hatta farklı proton ortamlarına sahip aynı bileşenler için dahi farklılık gösterir. Özellikle, koloidal sistem analizinde T_2 relaksasyon zamanları ve spektrumları, su ve yağın durumu ve hareketliliği hakkında detaylı bilgi vermek için sayısız şekilde kullanılmıştır. Yöntemin invaziv olmayan doğası sayesinde aynı örnek üzerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilen bu yöntem, zamana bağlı emülsiyon sistemi dinamiklerinin izlenmesi için özellikle uygundur (Bernewitz, Dalitz, Köhler, Schuchmann, & Guthausen, 2013; Hashemi vd., 2010).

Bu çalışmada, değişik çözücülerde (ATÇ ve FTÇ) farklı fosfolipid tiplerinden (E80 & S75) hazırlanan lipozomların zamana göre (1, 4, 7, 10, 14, 28 ve 35. günlerde) farklı depolama sıcaklıklarındaki (4 & 25 °C) değişimlerini izlemek için kullanılmıştır. NMR relaksometri deneylerinden kasıt T_2 relaksasyon süresi ölçümleridir. Sıcaklık, T_2 ölçümlerini etkileyecek bir faktör olduğu için her bir ölçümden önce analizi yapılacak numune yeterli süre oda sıcaklığında bekletilerek dengeye gelmesi sağlanmıştır. Projeye NMR relaksometri dâhil edilmesinin amacı, bu yöntemi lipozomların karakterizasyonu için kullanmanın mümkün olup olmadığını araştırmaktır. Bu yüzden detaylı karakterizasyon amaçlı NMR deneyleri yalnızca USK'ya göre çok daha gelecek vaad ettiği bulunan MA numuneleri için yapılmıştır. NMR T_2 relaksasyon süreleri, transversal NMR sinyalinin tek veya ikili üssel modele uydurulması ile elde edilmiştir. Transversal relaksasyonun uygulandığı tek üslü model Denklem 1'de verilmiştir.

$$M_{xy} = M_0 e^{-TE/T^2} (1)$$

Burada M_{xy} , xy eksenindeki manyetik sinyalin büyüklüğü; M_0 , ilk net manyetizasyon ve TE , eko zamanı (anlık manyetik titreşim gönderildikten sonra sinyalin kaydedilmesine kadar geçen süre)'dir (Hashemi vd., 2010). Zamana bağlı transversal relaksasyonu ölçülen tüm lipozom örneklerinin hazırlandıktan hemen sonraki (1. gündeki) ölçümleri, tek üssel davranış sergilediklerini göstermiştir (Tablo 9-11). Bu durum, uygulanan homojenizasyonun yeterli olduğu anlamına gelmektedir. Yani lipozomlar, ilkin tampon çözeltiler içerisinde eşit şekilde dağılmıştır. Fakat numunelerin bir kısmı için takip eden günlerdeki ölçümler, tüplerde faz ayrımı veya katı partikül oluşumunu belirginleştirmiş; bu da ikinci derece T_2 relaksasyon bileşenleri oluşumu olarak sonuçlara yansımıştır. Bu yaklaşım, emülsiyonları konu alan önceki çalışmaların yorumlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Onuki vd. (2016), NMR T_2 verileri ile etkili bir şekilde krema oluşumu sürecini izlemiştir. Araştırmacılar, instabilite belirtisi (flokülasyon, kremleşme ve agregasyon gibi) görülmeyen ve kinetik olarak

stabil olan emülsiyonlardan gelen sinyalin tek üssel relaksasyon davranışına uygunluğunu göstermişlerdir. Diğer yandan santrifüjlenen örneklerin T_2 relaksasyonu, ikili üssel davranışla daha uygun bir şekilde açıklanabilmiştir (Onuki, Kida, Funatani, Hayashi ve Takayama, 2016). Bu bulgu, T_2 relaksasyon sinyallerini etkileyen farklı kompartmanlar arasındaki suyun difüzyonuyla ilgilidir. Suyun relaksasyon davranışının T_{21} ve T_{22} ile tanımlandığı iki farklı A ve B proton ortamı için difüzyon katsayısı (D_{AB} (m^2/s)) relaksasyon hızındaki farka (ΔR_2 ; $R_2 = 1/T_2$) kıyasla daha hızlıysa; su relaksasyonundan tekli üssel sinyal elde edilecektir. Belirli su gruplarının relaksasyon hızları arasındaki fark arttıkça çok sayıda pik ortaya çıkar (Mariette, 2009). Bu mekanizma, NMR Relaxometri kullanılarak emülsiyon ve kolloidal sistem stabilitesi hakkında bilgi elde etmek için kullanılmıştır.

1H NMR, numunenin protonlarından gelen tüm manyetik relaksasyon sinyali ölçer. Bununla birlikte, değiştirilebilir olmayan protonların (örneğin katılarda değiştirilemez CH bağları gibi) manyetik relaksasyonu, düşük alanlı NMR sistemlerinin ölçüm gecikmesinin sınırlandırılı olması nedeniyle toplam sinyale katkıda bulunmaz. Bizim olgumuz için sıvılardan ve değiştirilebilir katılardan (örneğin $\sim OH$ grupları) gelen sinyallerde lipid ve su baskındır. Dolayısıyla, bu çalışma için hemen hemen tüm açıklamalar çözeltideki lipid ve suyun durumu ile ilgilidir (Kirtil & Oztop, 2015; Mariette, 2009; Marigheto vd., 2007).

Basınç, çözücü tipi ve fosfolipid kaynakları arasında herhangi bir fark tespit edilemediğini görebilmek amacıyla yapılan ANOVA analizi Tablo 8'de verilmiştir. Farklı basınçlar ve depolama sıcaklıkları için ayrı ayrı yapılan zamana bağlı istatistiksel analiz sonuçları da tablo 9-11'de ayrıca gösterilmiştir. Depolama süresinin 4. faktör olarak getirilmesi ANOVA sonuçlarını zorlaştırdığından ve yorumlamayı daha zor hale getireceğinden, analiz her lesitin tipi-solvent kombinasyonu için belirli bir sıcaklık ve MA basıncında yapılmıştır.

E80 ve S75 lesitinleri için ilk gün ölçülen parçacık boyutu ve T_2 süreleri arasındaki korelasyon sırasıyla ATÇ için -0.985 ve -0.958; FTÇ için -0.861 ve -0.955 bulunmuştur. Negatif korelasyon, partikül boyutu azaldıkça artacak olan serbest su miktarı ile açıklanmıştır.

Taze hazırlanmış lipozomların T_2 değerlerinde yapılan 3-Yönlü ANOVA sonuçları; çözücü, lesitin tipi ve MA basıncı değişkenlerinin hepsinin birbirinden önemli derecede farklı olduğunu açığa çıkarmıştır ($p < 0.05$). T_2 değerleri artan basınç dolayısıyla azalan parçacık boyutu ile artmıştır. Lipozomların parçacık büyüklüğü yüksek basınçla küçültüldüğünde kapsüllenmiş hacim azalmış, bu şekilde küçük kesecikler oluşturan lipozomlar içindeki su miktarı azalarak daha çok su ortamda serbest halde kalmıştır. Suyun lipozom merkezlerinden dışarı

atılmasıyla ortamda kapsüllenmemiş, yığın halindeki su miktarı artmış ve bu da T_2 zamanında artışa neden olmuştur.

Daha önce de bahsedildiği üzere solvent ve lesitin tiplerinin de T_2 analizleri birbirinden kayda değer derecede farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). ATÇ lipozomlarının T_2 süreleri FTÇ'ye göre daha küçük parçacıklı olmaları ile de uyumlu şekilde—ortamdaki serbest suyun varlığının T_2 süresini uzatması beklenir—daha uzun bulunmuştur.

Öte yandan, hemen hemen tüm tampon çözelti, homojenizasyon tipi ve basınç kombinasyonları için; E80 örneklerinin relaksasyon süreleri daha yüksek çıkmıştır. T_2 relaksasyonu, 1H içeren moleküllerin moleküler hareketliliğinden oldukça etkilenir. Boş lipozomlar % 90'dan fazla su içerdiğinden, sinyal değişiklikleri büyük oranda suyun hali ve hareketliliğindeki değişimlerden etkilenecektir. Daha büyük bir bölmenin içinde hapsedilen su, daha az sınırlandırılmış olur. Bu durum, 1H protonlarının serbestçe hareket etmek ve rotasyonu için yeterli alanı sağlar ve daha yavaş bir relaksasyon hızı ile sonuçlanır. Dolayısıyla daha serbest olan 1H protonları daha yüksek T_2 relaksasyon sürelerine sahip olduğu söylenebilir. Daha sınırlı ortamdaki su, arayüzünü çevreleyen katı yüzeyleri tarafından kısıtlanmış olacağından T_2 süreleri çok daha kısa olacaktır (Kirtil & Oztop, 2016; Liu vd., 2016; Miklos vd., 2014a). E80 örneklerinde daha düşük relaksasyon hızının elde edilmesi, suyun yüksek hareket kabiliyetine işaret etmektedir. Bu, doğrudan hapsedilen suyun hacmi ile ilişkilidir. S75 daha küçük lipozomlara sahip olduğundan, bu örneklerde lipozom merkezine hapsedilen su miktarının daha az olması beklenir, yani E80 lipozomları genel olarak daha fazla suyu hapsedmiştir. E80 numunelerindeki serbest suyun daha fazla sınırlandırılmış olması, S75 lipozomlarına kıyasla su molekülleri için daha serbestçe hareket etmek ve rotasyon için yeterli alan temin ettiğini göstermiştir.

Bununla birlikte, T_2 sürelerinin parçacık boyutu ile mükemmel korelasyon göstermemesinin bir diğer nedeni ise parçacık boyutlarındaki yüksek farkın zaman zaman T_2 relaksasyon zamanına benzer şekilde yansıyamamasıdır. Bunun nedeni, E80'in bileşimi ile açıklanabilmiştir. Ürün bilgilendirme föyünde gösterildiği üzere E80 lesitini % 80 (a/a) fosfatidilkolin içerirken, S75 lesitini %70 (a/a) fosfatidilkolin içermektedir. Fosfatidilkolin, amfifilik bir moleküldür ve bu haliyle emülsiyon yapıcı özelliğe sahiptir. Emülgatörlerin bir dispersiyona eklenmesi T_2 relaksasyon süresini azaltır (Kirtil & Oztop, 2016; Onuki vd., 2016; Zhang vd., 2016). Bu, lipozomların hem iç hem dış kısımlarında emülgatör ile temas ederek hareketi kısıtlanan suyla ilişkilidir. Yoğun nüfuslu arayüz, su protonlarının çevresindeki moleküllerle yakın etkileşime girerek daha hızlı manyetik enerji alışverişine yol açacak uygun bir ortam yaratır. Bu olay birçok çalışmada gözlenmiştir (Kirtil & Oztop, 2016; Mariette, 2009;

Onuki vd., 2016; Zhang vd., 2016). E80 örneklerindeki emülgatör oranının çokluğu, T_2 zamanını azaltmada büyük olasılıkla etkili olmuştur ancak yine de E80 örnekleri için parçacık boyutunun daha yüksek olması toplam T_2 süresinin daha uzun olmasını açıklamada daha baskındır.

Boş lipozomlarda ve özellikle ATÇ numuneleri için daha belirgin olmak üzere, basınç ve T_2 zamanı arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir. Daha yüksek mikroakışkanlaştırma basınçlarının daha düşük ortalama parçacık boyutları ile sonuçlandığı bilindiğinden bu beklenen bir durumdur. Yalnızca birincil homojenizasyon ile muamele edilen numunelerle karşılaştırıldığında mikroakışkanlaştırma ile parçacık boyutlarını % 85'lere kadar (örneğin S75 numuneleri için 272 nm'den 35 nm'ye kadar) düşürmek mümkün olmuştur. Parçacık boyutlarındaki bu azalma ile ortalama T_2 relaksasyon sürelerinde artış olduğu gözlenmiştir. Azalan parçacık boyutlarıyla birlikte lipozomlar küçük ama fazla sayıda kesecik oluşturarak daha yoğun bir şekilde dağılmıştır ve lipozomlar suda daha iyi dağıldığında hapsedilen su hacmi azalır. Ufak kesecikler içindeki su lipozomun merkezinden kurtulduğunda harici su miktarı artar ve bu da su moleküllerinin hareketliliğini artırır. Hareketlilik artışı yaşayan su molekülleri daha yüksek intermoleküler boşluklara sahiptir ve bu da manyetik relaksasyon hızını sönmeler ve T_2 relaksasyon zamanının artmasına neden olur (Kirtil vd., 2014). Bu eğilim ATÇ numunelerinde FTÇ'lere göre daha belirgindir. FTÇ numunelerinin T_2 relaksasyon zamanları asetatlara göre daha yavaş bir azalma göstermiştir. Bu, farklı çözücüler tarafından tanımlanan arayüzey etkileşimindeki değişikliklerle ilişkili olabilir. Zeta potansiyeli sonuçlarında belirtildiği üzere ATÇ numuneleri yaklaşık -20 mV'lik bir zeta potansiyele sahipken; FTÇ numunelerinin zeta potansiyeli sıfır civarı tutum sergilemekteydi (bu durum, solventin instabilitesinin güçlü bir göstergesi idi). Yüzey yükü ne kadar yüksek olursa arayüzey tabakası da o kadar yoğun ve kompakt bir şekilde iyonla dolar. Ortalama sıfır mV'lik yüzey yükü ile lipozomlar parçacık boyutu artmasına neden olabilecek flokülasyona oldukça duyarlı olacaktır. Ek olarak, FTÇ lipozomlarını çevreleyen belirsiz ve daha düzensiz iyon bulutu ile karşılaştırıldığında, ATÇ solüsyonlarındaki daha sıkı istiflenmiş iyonların su moleküllerinin hareketi üzerinde daha kısıtlayıcı olması beklenebilir. Bu da iki çözücünün T_2 sürelerinin daha da farklı olmasına neden olmuştur.

T_2 süreleri ayrıca zamana bağlı da ölçülmüş ve parçacık boyutu ile relaksasyon arasında bir ilişki aranmıştır. FKS ile parçacık boyutu ölçümleri karakterizasyon amaçlı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın en önemli bulgularından birisi FKS ile ölçülen

parçacık boyutlarının NMR relaksometre değerleri ile doğrulanmış olmasıdır. İstatistiksel analiz sonuçları MA basıncı ile oluşan herhangi bir parçacık boyutu değişimini açığa çıkan su miktarı sayesinde tespit edebilmiştir. FTÇ'de hazırlanarak 25 °C'de saklanmış S75 numuneleri için hem parçacık hem T_2 ölçümleri ilk hafta civarında benzer bir yükseliş göstermiştir (Şekil 19). Parçacık boyutundaki değişim parçacıkların zamanla serbest enerjilerini azaltmak için birleşme yönündeki kinetik stabilite dengeleri ile açıklanmıştır. T_2 değişimleri de benzer bir şekilde yorumlanabilir çünkü NMR relaksometri kısım kısım bölmeli yapılardaki proton dağılımı değişimlerini moleküler düzeyde algılayabilmektedir.

Lipozomların birleşmesi parçacık boyutunda artışa neden olurken aynı zamanda da ortama salınan suyun miktarını artırır. Nanokapsüllerin bozulması hapsedilmiş suyu serbest bırakır ve bu da toplam T_2 süresini yükseltir. Su ile karşılaştırıldığında, lipidlerin T_2 değerleri çok daha düşüktür, bu nedenle lipidlerin sulu bir sisteme eklenmesinin toplam T_2 zamanını azaltması beklenen bir sonuçtur.

Tablo 8. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) ile hazırlanan E80 ve S75 lipozomlarının 3 yönlü ANOVA ile analizi.

	ATÇ			FTÇ		
	400 BAR	900 BAR	1300 BAR	400 BAR	900 BAR	1300 BAR
E80	1227.05 ^g ± 1.78	1593.28 ^b ± 27.99	1741.83 ^a ± 56.73	1318.67 ^f ± 16.96	1572.94 ^b ± 39.05	1523.95 ^{bc} ± 15.32
S75	960.37 ^h ± 11.55	1399.67 ^e ± 3.85	1694.40 ^a ± 19.86	1165.17 ^g ± 17.95	1416.79 ^{de} ± 19.52	1479.94 ^{cd} ± 21.39

400 BAR	Zaman (gün)	T ₂ (ms)			
		S75_ATÇ	S75_FTÇ	E80_ATÇ	E80_FTÇ
4 °C	1	960,37 ^d ± 11,55	1165,17 ^e ± 17,95	1227,05 ^{bc} ± 1,78	1318,67 ^d ± 16,96
	4	1019,8 ^c ± 16,01	1210,10 ^{de} ± 17,70	1251,65 ^b ± 30,82	1365,72 ^{cd} ± 35,75
	7	1046,27 ^c ± 15,64	1292,12 ^{cd} ± 8,46	1260,50 ^b ± 5,06	1499,27 ^{abc} ± 15,11
	10	1038,23 ^c ± 9,14	1338,28 ^c ± 47,34	1253,14 ^b ± 3,80	1471,72 ^{bcd} ± 27,78
	14	1089,93 ^b ± 13,9	1715,06 ^a ± 64,61	1372,13 ^a ± 23,55	1662,59 ^a ± 157,19
	21	1111,2 ^b ± 7,68	1468,65 ^b ± 11,68	1193,31 ^{cd} ± 23,09	1541,52 ^{ab} ± 45,47
	28	1109,55 ^b ± 2,72	1384,74 ^{bc} ± 13,16	1156,11 ^{de} ± 10,59	1436,81 ^{bcd} ± 23,48
	35	1173,56 ^a ± 13,1	1359,38 ^c ± 38,54	1134,67 ^e ± 17,96	1429,42 ^{bcd} ± 3,83
25 °C	1	1133,39 ^c ± 6,76	1234,39 ^d ± 15,40	930,15 ^a ± 3,80	1225,83 ^c ± 17,40
	4	1234,93 ^{ab} ± 7,31	1443,41 ^{abc} ± 22,92	953,85 ^a ± 14,77	1446,93 ^{bc} ± 28,16
	7	1244,02 ^{ab} ± 6,71	1535,55 ^a ± 69,65	950,52 ^a ± 28,24	1694,41 ^{ab} ± 72,05
	10	1260,62 ^a ± 7,93	1426,25 ^{bc} ± 26,21	878,57 ^b ± 11,41	1610,21 ^{ab} ± 161,75
	14	1269,67 ^a ± 9,67	1520,08 ^{ab} ± 26,12	876,91 ^b ± 4,86	1763,66 ^a ± 146,56
	21	1220,56 ^b ± 3,85	1377,92 ^c ± 32,14	775,83 ^c ± 6,95	1598,57 ^{ab} ± 124,59
	28	1221,49 ^b ± 15,36	1379,01 ^c ± 25,68	771,39 ^c ± 3,89	1432,87 ^{bc} ± 20,53
	35	1156,71 ^c ± 27,77	1478,83 ^{ab} ± 25,96	784,62 ^c ± 14,61	1447,87 ^{bc} ± 18,23

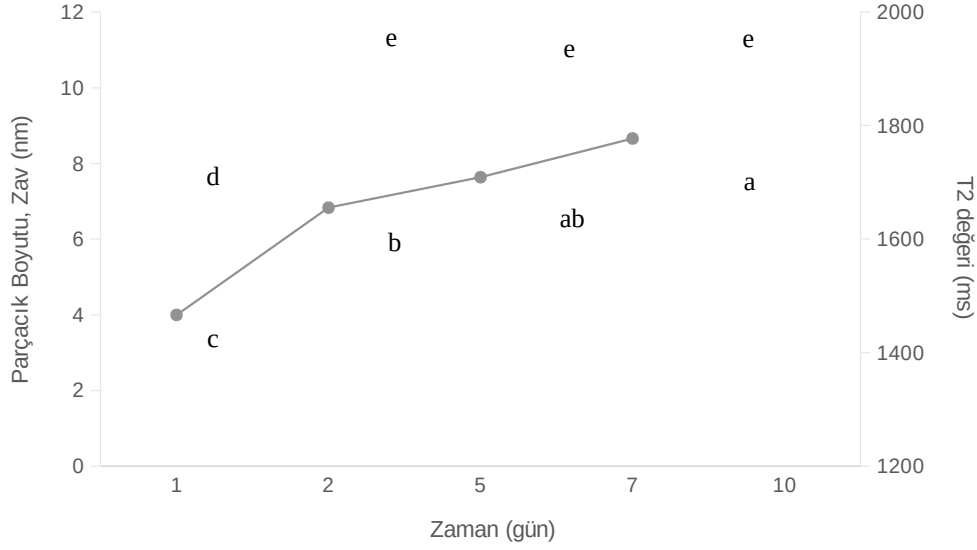
Tablo 9. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 400 bar basınçlanarak farklı sıcaklıklarda bekletilen E80 ve S75 lipozomlarının ortalama T₂ değerleri. İstatistiksel analiz her bir fosfolipid-çözücü kombinasyonu ve sıcaklık için ayrı ayrı yapılmıştır.

900 BAR	Zaman (gün)	T ₂ (ms)			
		S75_ATÇ	S75_FTÇ	E80_ATÇ	E80_FTÇ
4 °C	1	1399,67 ^b ± 3,85	1416,79 ^d ± 19,52	1593,28 ^b ± 27,99	1572,94 ^d ± 39,05
	4	1408,15 ^b ± 21,97	1405,33 ^d ± 12,62	1743,21 ^a ± 8,06	1560,41 ^d ± 11,04
	7	1422,52 ^{ab} ± 7,04	1454,62 ^{cd} ± 14,22	1695,37 ^{ab} ± 23,70	1616,63 ^{cd} ± 14,46
	10	1426,41 ^{ab} ± 7,76	1507,88 ^{bc} ± 9,30	1719,5 ^a ± 50,96	1620,44 ^{cd} ± 15,69
	14	1401,39 ^b ± 27,32	1523,57 ^b ± 33,68	1678,71 ^{ab} ± 30,07	1713,58 ^{bc} ± 59,37
	21	1441,05 ^{ab} ± 7,78	1684,41 ^a ± 29,43	1747,93 ^a ± 73,19	1773,68 ^{ab} ± 47,88
	28	1460,24 ^a ± 18,46	1666,57 ^a ± 7,32	1758,09 ^a ± 35,02	1852,64 ^a ± 53,91
	35	1404,41 ^b ± 10,10	1522,56 ^b ± 5,83	1663,35 ^{ab} ± 45,16	1632,84 ^{cd} ± 10,11
25 °C	1	1412,69 ^e ± 10,16	1544,02 ^b ± 26,24	1601,56 ^{de} ± 27,76	1562,71 ^b ± 27,91
	4	1519,09 ^{cd} ± 31,23	1539,42 ^b ± 48,88	1699,53 ^{abc} ± 17,33	1824,68 ^a ± 56,97
	7	1573,56 ^{bc} ± 18,81	1642,37 ^{ab} ± 74,02	1712,11 ^{ab} ± 11,05	1863,96 ^a ± 15,86
	10	1622,31 ^{ab} ± 25,80	1699,39 ^a ± 26,87	1740,36 ^a ± 54,82	1832,95 ^a ± 26,56
	14	1607,92 ^b ± 9,95	1658,08 ^{ab} ± 52,70	1676,05 ^{abc} ± 20,08	1808,11 ^a ± 41,75
	21	1629,98 ^{ab} ± 19,37	1709,91 ^a ± 15,91	1656,14 ^{bcd} ± 20,58	1877,47 ^a ± 7,28
	28	1671,39 ^a ± 10,48	1745,69 ^a ± 84,55	1637,22 ^{cd} ± 15,97	1773,01 ^a ± 152,71
	35	1507,98 ^d ± 25,98	1611,69 ^{ab} ± 48,96	1540,36 ^e ± 11,39	1781,71 ^a ± 36,58

Tablo 10. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 900 bar basınçlanarak farklı sıcaklıklarda bekletilen E80 ve S75 lipozomlarının ortalama T₂ değerleri. İstatistiksel analiz her bir fosfolipid-çözücü kombinasyonu ve sıcaklık için ayrı ayrı yapılmıştır.

Tablo 11. Asetat tampon çözeltisi (ATÇ) ve fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 1300 bar basınçlanarak farklı sıcaklıklarda bekletilen E80 ve S75 lipozomlarının ortalama T_2 değerleri. İstatistiksel analiz her bir fosfolipid-çözücü kombinasyonu ve sıcaklık için ayrı ayrı yapılmıştır.

1300 BAR	Zaman (gün)	T_2 (ms)			
		S75_ATÇ	S75_FTÇ	E80_ATÇ	E80_FTÇ
4 °C	1	1694,4 ^a ± 19,86	1479,94 ^d ± 21,39	1741,83 ^b ± 56,73	1523,95 ^c ± 15,32
	4	1720,55 ^a ± 48,25	1499,23 ^{cd} ± 19,12	1798,63 ^b ± 27,13	1607,87 ^{bc} ± 28,65
	7	1651,83 ^a ± 12,91	1504,61 ^{cd} ± 24,14	1734,04 ^b ± 9,31	1543,96 ^{bc} ± 32,34
	10	1684,41 ^a ± 38,21	1563,37 ^{bcd} ± 17,08	1796,42 ^b ± 55,21	1651,99 ^b ± 20,12
	14	1709,81 ^a ± 28,37	1658,40 ^b ± 84,55	1802,84 ^b ± 12,27	1874,59 ^a ± 27,05
	21	1680,20 ^a ± 14,52	1808,58 ^a ± 70,49	2051,67 ^a ± 67,31	1843,19 ^a ± 95,78
	28	1711,37 ^a ± 36,05	1823,79 ^a ± 41,47	1989,06 ^a ± 52,95	1870,53 ^a ± 42,57
	35	1723,37 ^a ± 10,94	1626,93 ^{bc} ± 53,17	1821,96 ^b ± 56,73	1799,01 ^a ± 38,64
25 °C	1	1698,67 ^a ± 9,21	1466,50 ^c ± 17,53	1728,24 ^d ± 39,24	1506,14 ^b ± 24,57
	4	1708,42 ^a ± 136,35	1685,58 ^{ab} ± 45,01	1939,88 ^{abc} ± 51,87	1873,78 ^a ± 41,00
	7	1721,34 ^a ± 21,10	1655,47 ^b ± 28,40	1960,44 ^{ab} ± 63,38	1812,23 ^a ± 38,49
	10	1769,48 ^a ± 21,37	1678,11 ^{ab} ± 35,96	1991,25 ^a ± 78,44	1864,61 ^a ± 62,25
	14	1727,44 ^a ± 29,02	1709,06 ^{ab} ± 49,35	1853,65 ^{bcd} ± 12,61	1797,93 ^a ± 9,05
	21	1830,36 ^a ± 20,83	1711,03 ^{ab} ± 31,05	1931,03 ^{abc} ± 37,69	1834,23 ^a ± 124,33
	28	1761,60 ^a ± 1,13	1777,18 ^a ± 63,73	1830,27 ^{cd} ± 5,37	1870,87 ^a ± 40,88
	35	1794,93 ^a ± 35,89	1657,24 ^b ± 32,31	1955,08 ^{abc} ± 15,48	1806,45 ^a ± 60,01



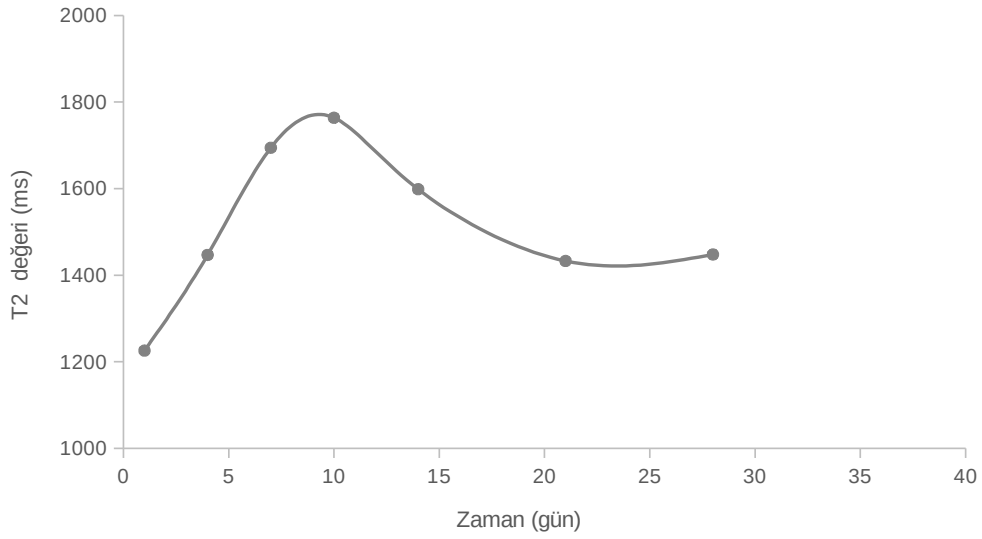
Şekil 19. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 1300 bar basınçlanarak 25 °C'de saklanmış S75 lipozomlarının parçacık boyutu (■) ve T₂ değerleri (—○—) değişimi.

Sonuçlarımıza göre NMR relaksometri ölçümlerinin bir diğer önemli bulgusu, lipozomlardaki ufak değişikliklerin T₂ değerleriyle izlenebilecek olmasıdır. Daha önce de bahsi geçen Şekil 19, FTÇ'de hazırlanan S75 lipozomlarının zamanla parçacık büyüklüğü ve T₂ değişimini göstermektedir. T₂ değerleri, karakteristik değişimin en belirgin olduğu depolamanın ilk günlerindeki parçacık boyutu değişimini benzer bir şekilde izlemiştir. Daha sonrasında eğilim çoğunlukla benzer bir yönde ilerlemiş, ancak parçacık boyutu sonuçları depolamanın ilerleyen günlerinde parçacıklarda bir değişim tespit edememiştir. T₂ sonuçları ise—ilk haftadaki düzeyde olmamakla birlikte— sabit kalan parçacık boyutuna kıyasla zamanla yavaş yavaş artışa neden olan bir değişim göstermiş ve bu değişim bir ay sonrasında belirgin şekilde farklılığa ulaşmıştır (p<0.05). Bu değişimin, lipozomların zamanla bozulmasının ve/veya lipid oksidasyonu gibi yavaşlatılabilecek fakat önlenemeyecek kimyasal değişimlerin bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Bu açıdan düşünüldüğünde numunelerde değişim görülmesi daha beklendiği bir sonuç olmakta ve NMR analizini parçacık boyutuna göre daha tercih edilir kılmaktadır. MA basıncının sistemde oluşturduğu ve FKS ile bulunabilen tüm değişikliklerde NMR relaksometrinin de aynı tespitleri yapabildiğini söylemek bu bağlamda önemli bir destekleyicidir.

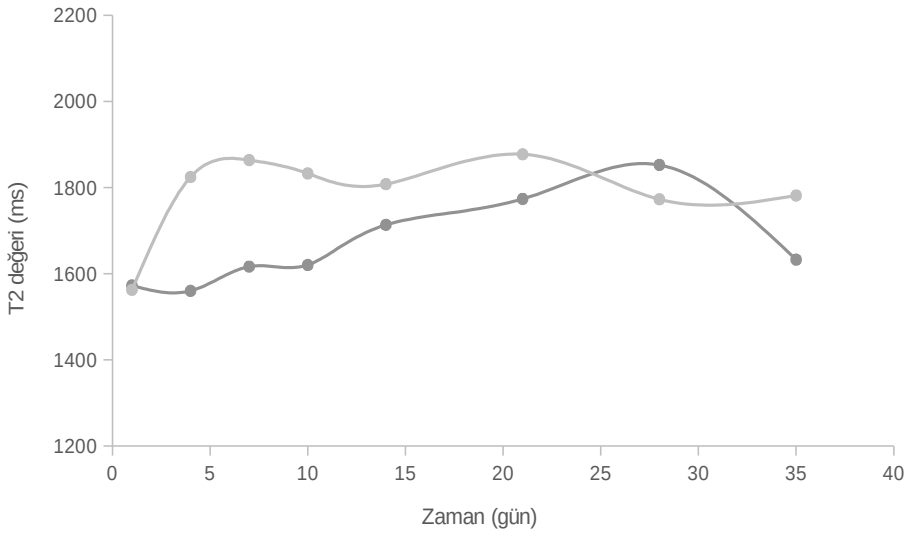
FTÇ'de hazırlanan lipozomların zamanla bozulduğu belirtilmişti ve bu durum örneklerin görsellerinden de tespit edilebilmişti. Bununla birlikte, parçacık boyutları herhangi bir değişiklik tespit edememişti. Bu noktada NMR'ın sistemin tam temsili karakterini

açıklayabileceği önerilebilir. Şekil 20, 400 bar basınçlanmış E80 örneklerinin 4 °C ve 25 °C'de depolama sırasındaki T₂ zamanı değişimlerini göstermektedir. T₂ verilerindeki sürekli artış, daha önce de tarif edildiği üzere lipozomların kırılmasından kaynaklanmaktadır. İlginç olan, depolama sıcaklığının bozulma eğilimini etkilememiş olmasıdır. Her ikisi de aynı aralıkta 10 gün boyunca artmış ve daha sonra bir şekilde azalmıştır.

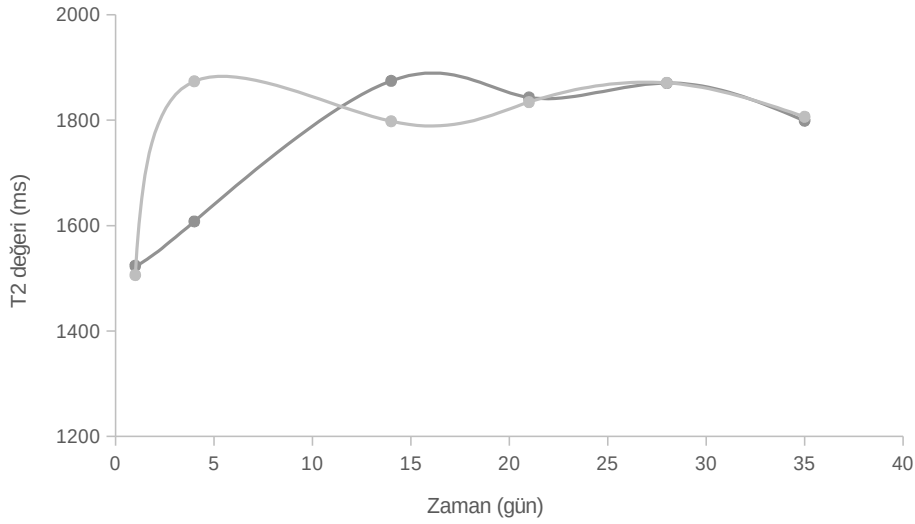
Diğer bir muhtemel instabilite yine FTÇ'de hazırlanan 900 bar basınçlı E80 numunelerinde gözlenmiştir. Sıcaklığın etkisi bu verilerde kayda değer farklılık göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 21). 4 °C numuneleri zamanla yavaş yavaş bozulurken, 25 °C numunelerindeki bozulma ilk üç günde ve keskin bir şekilde T₂ artışı göstermiştir. Bu değişiklikler, kendini parçacık boyutu değişimi ile gösteremeyen kimyasal değişiklikler için bir işaret olabilir. Böyle bir değişikliğe neden olabilecek en muhtemel kimyasal reaksiyonlardan biri, 25 °C'de daha hızlı olması beklenen lipid oksidasyonudur. Şekil 22, 1300 bar basınçlandırılmış E80 numunelerinin T₂ değişimi için benzer eğilimi göstermektedir. 4 °C'deki T₂ artışının, 900 bar basınçlanan numunenin maksimum hidroperoksit düzeyine ulaşma süresi, örneğin 1300 bar basınçlanarak aynı koşullarda saklanan eşdeğerine göre daha uzun sürmesi dikkat çekmiştir. Bu durum, 1300 bar basınçlı numunede daha hızlı olan kimyasal değişimin bir göstergesidir. Muhtemel bir sebep, artan basınç ile azalan parçacık boyutunun yüzey alanını arttırması ve oksidasyonda artışa neden olması olabilir. Benzer şekilde 400 bar numunelerindeki değişimin daha kısa sürüyor gibi görünmesine rağmen daha düşük seviyelerde kalması da bu hipotez ile çelişmemektedir.



Şekil 20. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 400 bar basınçlanmış E80 lipozomlarının 4 °C (●) ve 25 °C (●) T₂ değişimleri.



Şekil 21. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 900 bar basınçlanmış E80 lipozomlarının 4 °C (●) ve 25 °C (●) T₂ değişimleri.



Şekil 22. Fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) içerisinde 1300 bar basınçlanmış E80 lipozomlarının 4 ° C (—●—) ve 25 ° C (—●—) T₂ değişimleri.

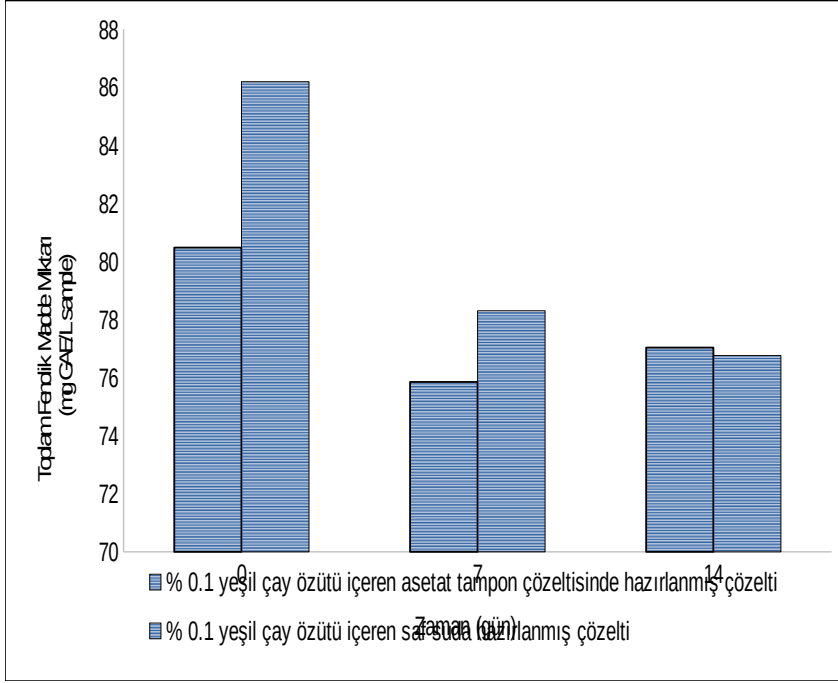
4.2 Dolu (Yüklenmiş) Lipozom Sistemlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bu kısımda lipozomlar projenin 1. kısmında belirlenen lipozom hazırlama parametreleri doğrultusunda, antioksidan içeriği yüksek olan yeşil çay özütü ile doldurulmuştur. Lipozomlar hem asetat tampon çözeltisi hem de saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği (1300 bar, 5 pass) ve ultrasonikasyon tekniği (%75 amplitüd, 5 dk) ile hazırlanmıştır. Yeşil çay özütü içeren lipozomlara ek olarak kontrol amaçlı yeşil çay özütü içermeyen lipozomlar da hazırlanıp, 4 hafta boyunca karakterizasyonları yapılmıştır. Lipozomların karakterizasyonu için parçacık boyutu ve zeta potansiyeli analizi, toplam fenolik madde analizi, antioksidan aktivitenin tayini ve NMR relaksometre deneyleri ve transmisyon elektron mikroskobu ile görüntü alma deneyleri yapılmıştır.

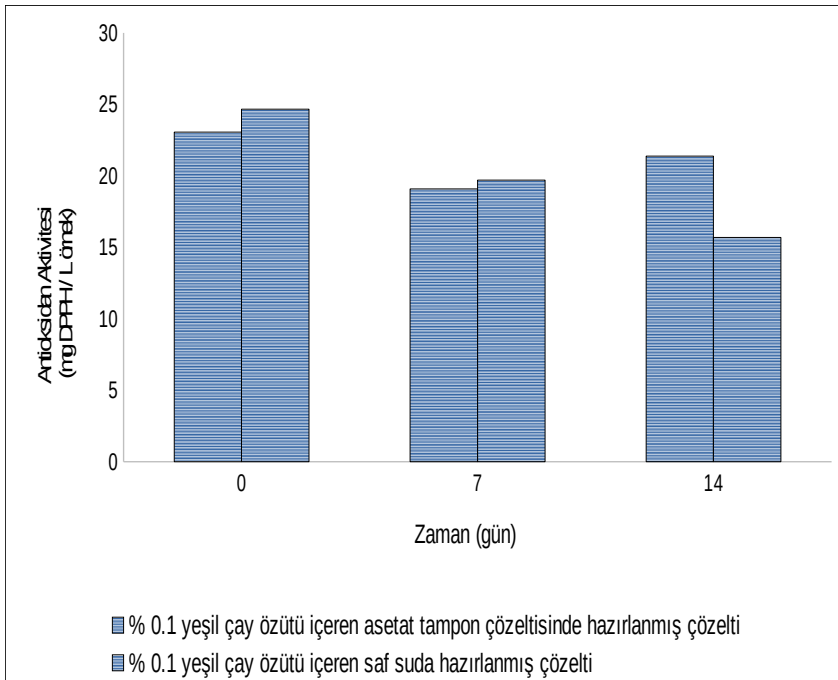
4.2.1 Yeşil Çay Özütünün Toplam Fenolik Miktarı ve Antioksidan Aktivitesi

Yeşil çay özütü hazır olarak alınmıştır. Özütlerin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Özütlerin toplam fenolik miktarı için Folin-Ciocalteu metodu antioksidan aktivitesi için DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metodu kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda yeşil çay özütünün toplam fenolik miktarı 82.357 ± 1.15 mg gallik asit denkliği / g yeşil çay özütü bulunurken antioksidan aktivitesi 25.365 ± 0.50 mg DPPH / g yeşil çay özütü olarak bulunmuştur. Proje kapsamında %0.1 yeşil çay içeren lipozomlar hazırlanacağı için, %0.1 yeşil çay içeren asetat tampon çözeltisi ve saf su ile hazırlanmış

yeşil çay çözeltilerinin de 0, 7 ve 14. günlerinde toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitelerine bakılmıştır (Şekil 23 ve Şekil 24). % 0.1 yeşil çay içeren çözeltilerin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitelerinde 14. gün sonunda azalma görülmüştür. Zamana karşı toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesinde azalma görülen yeşil çay özütündeki bu düşüşü ertelemek ve stabilitesini arttırmak amacıyla lipozom içine enkapsüle edilmesi çözüm olarak görülmüştür.



Şekil 23. %0.1 yeşil çay içeren asetat tampon çözeltisi ve saf su çözeltilerinin 0, 7 ve 14. günlerinde toplam fenolik madde miktarı



Şekil 24. %0.1 yeşil çay içeren asetat tampon çözeltisi ve saf su çözeltilerinin 0, 7 ve 14. günlerindeki antioksidan aktivitesi

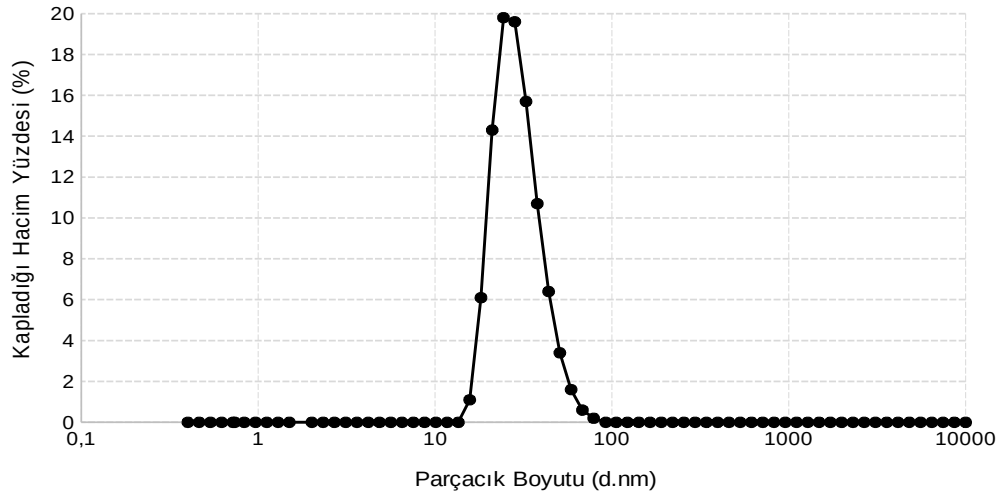
4.2.2 Lipozomların Yeşil Çay Özütü ile Doldurulması

Ağırlıkça % 0.1'lik kuru yeşil çay ekstraktı asetat tampon çözeltisi ve saf suda mikroakışkanlaştırıcı (1300 bar ve 5 pas) ve direk tip sonikasyon dediğimiz problu ultrasonikasyon (75 % güç ve 5 dk) ile hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozomlar karakterize edilmek ve dayanıklılık tespiti yapılmak için 4 hafta boyunca buzdolabında (4°C'de) depo edilmiştir.

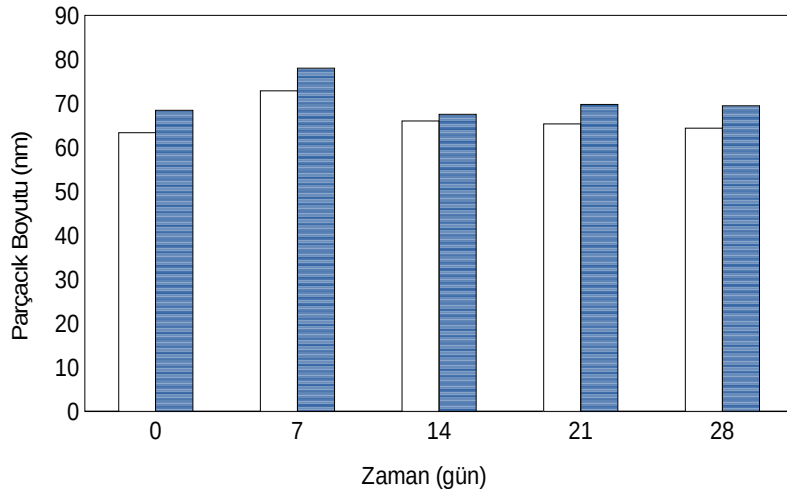
4.2.3 Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli Analizi

Mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanmış yeşil çay özü yüklü lipozomların parçacık boyutu, sistemlerin bir ay depolama sürecinde dayanıklılığını gözlemlenmek için ölçülmüştür. Daha önceki literatür çalışmaları lipozomların bileşiminin parçacık boyutunu önemli bir şekilde etkilediğini göstermektedir. Gibis vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, lipozomların parçacık boyutunun lipozomların içine enkapsüle edilmiş malzemeye bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada üzüm çekirdeği özütü içeren lipozomların boş lipozomlara göre daha büyük parçacık boyutuna sahip olduğu gözlemlenmiştir. Benzer bir şekilde, bu projede yeşil çay özütü yüklü lipozomların parçacık boyutunun boş lipozomların parçacık boyutundan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç, yeşil çayda bulunan fenolik bileşiklerin lipozomların iç kısmına enkapsüle edilmesinin yanında lipid çift katmanına dâhil olabileceği ve/veya lipozomların yüzeyine tutanabileceğini göstermektedir.

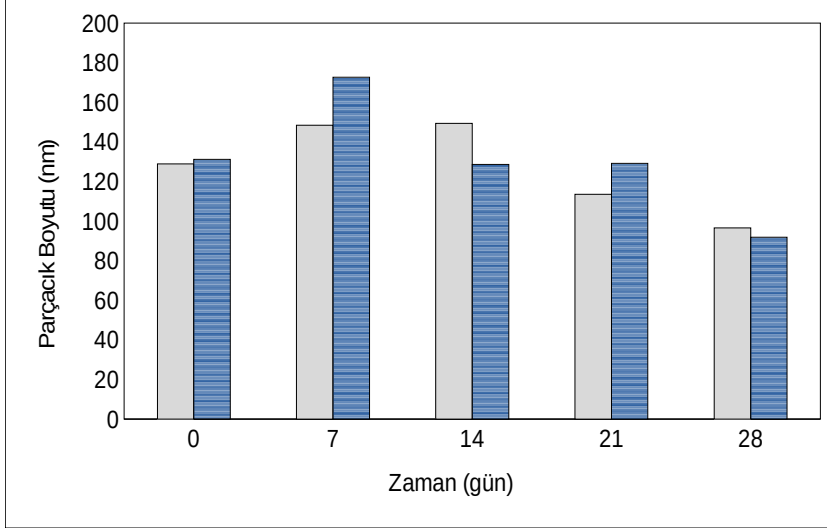
Şekil 25'te de görüldüğü üzere parçacık boyutu sonuçlarında çoğunlukla monomodul bir dağılım görülmüştür. Ultrasonikasyon yöntemi ile saf suda hazırlanmış lipozomların parçacık boyutu 70 nm iken (Şekil 26) ultrasonikasyon ile asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların parçacık boyutu 130 nm civarlarında görülmüştür (Şekil 27). Öte yandan, mikroakışkanlaştırıcı yöntemi ile saf suda hazırlanmış lipozomların parçacık boyutu 40 nm iken (Şekil 28) mikroakışkanlaştırıcı ile asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların parçacık boyutu 46 nm civarlarında görülmüştür (Şekil 29). Genel olarak, ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların parçacık boyutunun mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Literatürdeki çalışmalar, mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile daha küçük parçacık boyutunda lipozom elde edilirken, ultrasonikasyon tekniği ile daha büyük parçacık boyutuna sahip lipozomların elde edilebileceğini doğrulamaktadır (Jafari vd., 2007; Gibis vd., 2012).



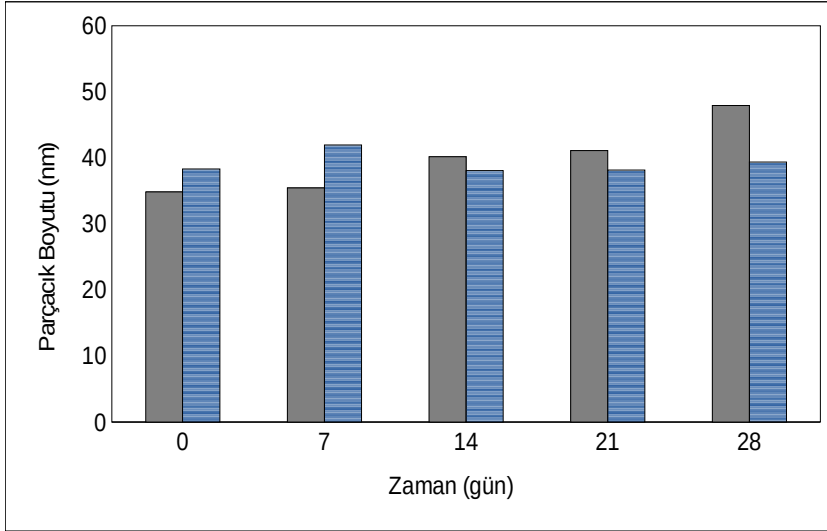
Şekil 25. Asetat tampon çözeltisinde mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların hacimsel oran ile hesaplanmış parçacık boyutu dağılımı



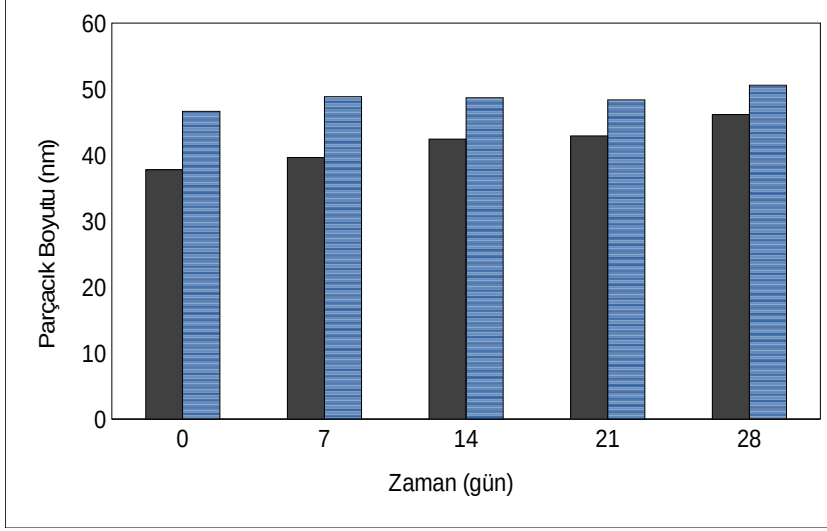
Şekil 26. Saf suda ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; □ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▨ boş lipozomlar



Şekil 27. Asetat tampon çözeltisinde ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; □ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▨ boş lipozomlar



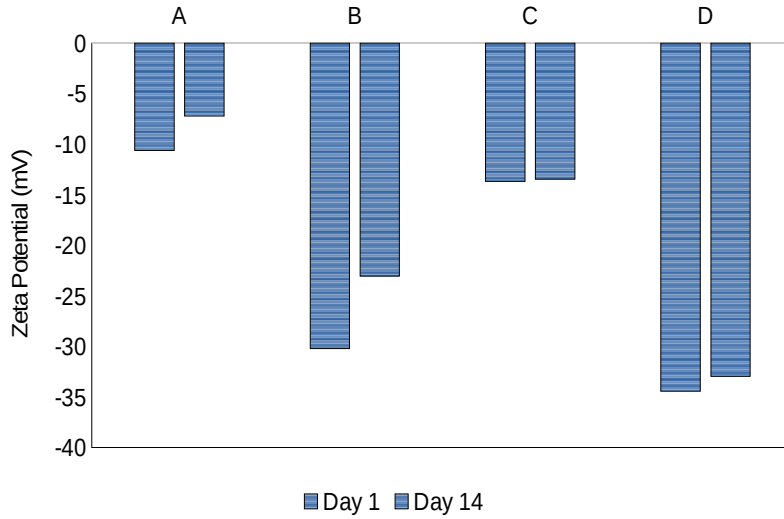
Şekil 28. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; ■ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▨ boş lipozomlar



Şekil 29. Asetat tampon çözeltisinde mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları; ■ yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, ▨ boş lipozomlar

Asetat tampon çözeltisinde ultrasonikasyon metodu ile hazırlanan lipozomların parçacık boyutunda bir ay depolama sürecinin 7. gününde bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış, ultrasonikasyon ile oluşan küçük veziküllerin çoğunlukla metastabil olması ve sahip oldukları enerjiyi azaltmak için süreç içinde büyüyebileceği ile açıklanabilir. Mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların parçacık boyutundaki fark, ultrasonikasyon sırasında çözelti içindeki enerji dağılımının homojen olmaması ile açıklanabilmektedir (Taylor vd., 2005). Bu yüzden, ultrasonikasyon ile hazırlanan lipozomların parçacık dağılımında homojen bir dağılım görülmemiştir. ANOVA sonuçları, mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonikasyon ile saf suda hazırlanmış yeşil çay özütü yüklü lipozomların bir aylık depolama süreci sonunda parçacık boyutunda önemli bir fark olmadığını göstermiştir ($p > 0.05$). Öte yandan, mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonikasyon ile asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış yeşil çay özütü yüklü lipozomların bir aylık depolama süreci sonunda parçacık boyutunda belirgin fark ($p \leq 0.05$) gözlemlenmiştir. Bu sonuç, lipozomların değişik pH'lardaki ortamlarda değişik özellikler göstermesi ile açıklanabilir. Enkapsüle edilmiş maddenin asidik koşullarda bazik ortamlara oranla daha hızlı bir şekilde serbest bırakıldığı bilinmektedir (Janeiro ve Oliveira Brett, 2004). Bu açıklama, lipozomların asidik koşullarda kısa sürede dayanıklılığını yitirmesi anlamına gelmektedir. Lipozomların genel dayanıklılığı ve fizikokimyasal özelliklerinin bir göstergesi olan zeta potansiyel

ölçümleri, 1. ve 14. gün mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomlar için yapılmıştır (Şekil 30).



Şekil 30. Mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanmış lipozomların 0 ve 14. günlerdeki zeta potansiyeli değerleri; A; asetat tampon çözeltisinde hazırlanan yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, B; saf suda hazırlanan yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar, C; asetat tampon çözeltisinde hazırlanan boş lipozomlar, D; saf suda hazırlanan boş lipozomlar

Yeşil çay özütü ile yüklenmiş ve boş lipozomların negatif zeta potansiyel değerine sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca, yeşil çay özütünün eklenmesinin lipozomların zeta potansiyelinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Bu sonuç literatürdeki bazı çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda enkapsüle edilen maddenin lipozomların zeta potansiyelinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı sonucuna varılmıştır (Gibis vd., 2012; Rashidinejad vd., 2014). Zeta potansiyelinin mutlak değeri, lipozom stabilitesinin bir ölçüsü olarak kullanılabilir. Sonuçlar incelendiğinde, saf suda hazırlanmış lipozomların asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomlara göre daha dayanıklı bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca sonuçlarda, sadece saf suda hazırlanmış yeşil çay yüklü lipozom örneklerinde 14 gün sonunda zeta potansiyelinde düşme olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). 14 gün sonunda yüzeydeki yükte gözlemlenen değişikliklerin, lipozomların yapısında bazı değişikliklere sebep olduğu ileri sürülmüştür. Lipozomların 14.

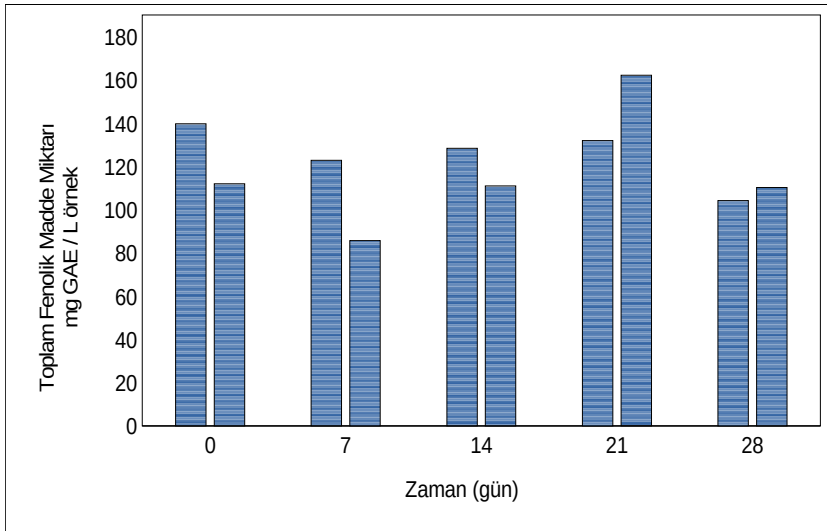
günündeki bu değişiklik ilerleyen bölümlerdeki toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivite ve transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri ile desteklenmiştir.

4.2.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı

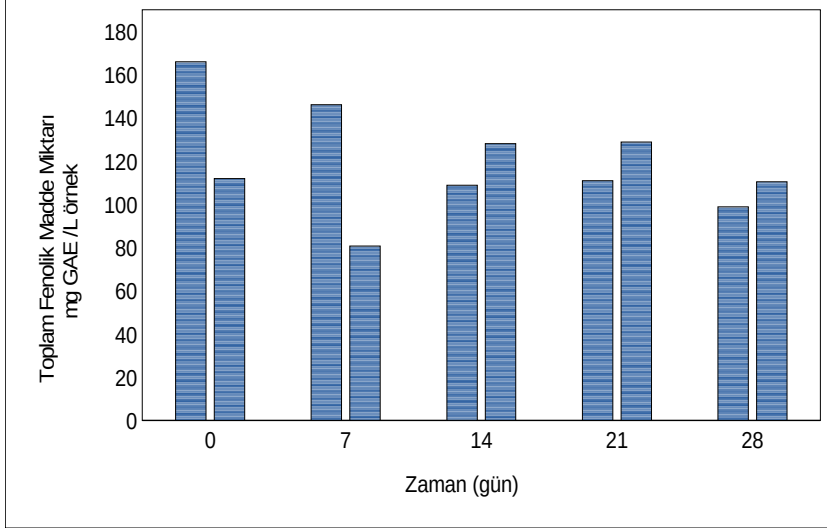
Saf su ve asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış % 0.1 yeşil çay özütü çözeltisinin toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 86.195 ve 80.481 mg GAE/L numune olarak hesaplanmıştır. Asetat tampon çözeltisinde ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı teknikleri ile hazırlanan kontrol numunelerinin toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 78.795 ve 62.340 mg GAE/L numune olarak hesaplanırken; saf suda sırasıyla 87.163 ve 56.687 mg GAE/L numune olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, asetat tampon çözeltisinde ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanmış yeşil çay özütü ile dolu lipozomların toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 139.612 ve 117.306 mg GAE/L numune iken; saf suda sırasıyla 165.837 ve 111.864 mg GAE/L numune olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar % 0.1 yeşil çay ekstraktı içeren çözeltiler ile karşılaştırıldığında her iki homojenizasyon tekniğinin de toplam fenolik madde miktarını arttırdığı görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda da ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı tekniğinin toplam fenolik madde miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bhat vd. (2011) tarafından yürütülen çalışmada ultrasonikasyon tekniği ile kalomondin suyunun fenolik içeriğinin artırıldığı görülürken Karacam vd. (2015) tarafından yürütülen çalışmada ise uygulanan yüksek basınç ile fenolik bileşenlerin aktivitelerinin artırıldığı görülmüştür. Ek olarak, şekil 31 ve 32'de görüldüğü üzere, hem asetat tampon çözeltisi hem de saf suda hazırlanmış yeşil çay özütü yüklü lipozomlarda ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanan lipozomlar mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozom numunelerine göre daha yüksek fenolik madde miktarına sahip olmuştur.

ANOVA sonuçlarına göre, ultrasonikasyon ile hazırlanan lipozomların toplam fenolik madde miktarında depolama süresinin birinci ve son günü arasında önemli bir fark ($p \leq 0.05$) gözlemlenmiştir. Öte yandan, mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomların toplam fenolik madde miktarında bir aylık depolamanın ilk ve son günü arasında önemli bir farklılık olmamıştır ($p > 0.05$). Mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile ultrasonikasyon tekniğine göre daha dayanıklı lipozomlar oluşturulmasına rağmen, toplam fenolik madde miktarının artmasında mikroakışkanlaştırıcı tekniğinin daha az etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer bir şekilde Thompson ve Singh (2006) tarafından yürütülen çalışmada mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile oluşturulmuş lipozomların daha dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Saf suda ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanmış lipozomlar dışındaki tüm lipozom numunelerinde bir aylık depolama süresinin 14. gününde toplam fenolik madde miktarında bir düşüş görülmüştür. Bu sonuç depolama süresinin 14. gününde lipozomların yapısal bütünlüğünü kaybetmeye başladığının göstergesi olarak düşünülebilir. Lipozomların zamanla yapısal bütünlüğünü kaybederek enkapsüle edilmiş maddeyi dışarıya salma eğiliminde oluşu Gibis vd. (2012) tarafından yürütülen çalışmada bahsedilmiştir. Lipozomların 14. günde kaybettiği yapısal bütünlük daha sonraki kısımlarda detaylı olarak açıklanacak olan TEM görüntüleri ile de desteklenmiştir. Toplam fenolik madde miktarının 14. gündeki artışı lipozomlara enkapsüle edilmiş yeşil çayın ortama salınıp toplam fenolik madde miktarını artırması ile açıklanmıştır. Öte yandan, saf suda ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanmış lipozomların toplam fenolik madde miktarında kademeli bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu sonuç, kullanılan ultrasonikasyon parametrelerinin dayanıklı lipozom hazırlamak için yeterli olmadığını göstermektedir. TEM görüntülerinde de aynı lipozom sisteminin şekillerinde ve boyutlarında düzensizlik görülmesi ultrasonikasyon ile stabil lipozomlar oluşturulamadığını desteklemektedir.



Şekil 31. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki toplam fenolik madde miktarları; ▨ ultrasonikasyon tekniği ile ▤ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile

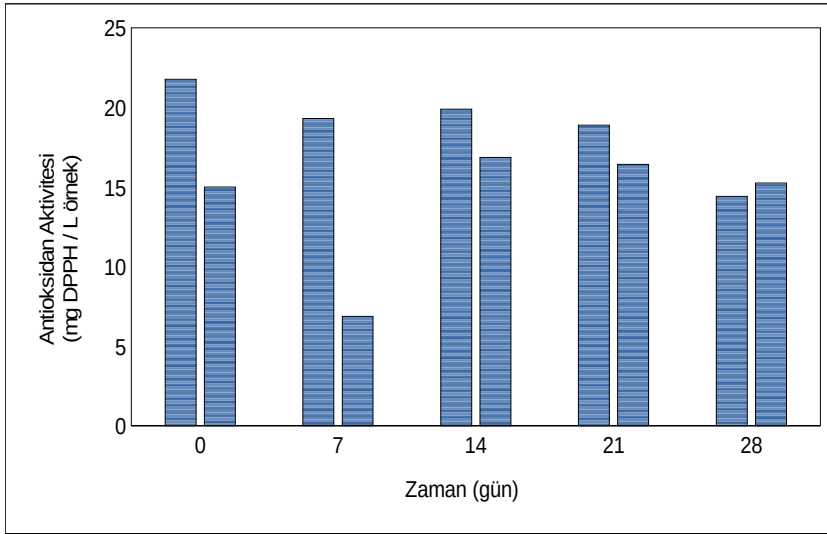


Şekil 32. Saf suda hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki toplam fenolik madde miktarları; ▨ ultrasonikasyon tekniği ile ▨ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile

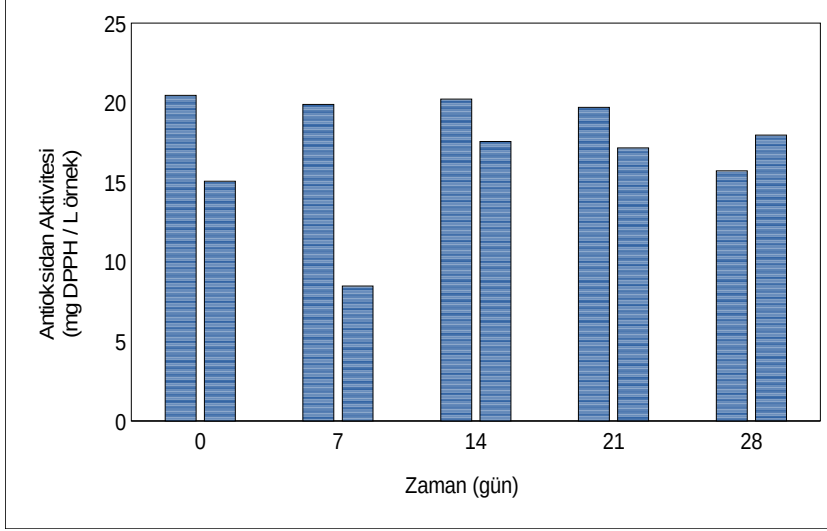
4.2.5 Antioksidan Aktivitesi

Yeşil çay özütü yüklü lipozomların antioksidan aktivitesi iki farklı yöntem (DPPH ve FRAP) ile hesaplanmıştır. Yeşil çay özütünün antioksidan aktivitesi DPPH metodu ile 25.969 mg DPPH/g yeşil çay özütü iken, saf su ve asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış %0.1 yeşil çay özütü içeren çözeltilerin antioksidan aktivitesi sırasıyla 24.664 ve 24.447 mg DPPH/L numune olarak hesaplanmıştır. Asetat tampon çözeltisinde ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanmış kontrol numunelerinin antioksidan aktivitesi sırasıyla 1.149 ve 0.167 mg DPPH/L numune iken saf suda hazırlanan lipozom örneklerinin antioksidan aktivitesi sırasıyla 1.521 ve 0.105 mg DPPH/L numune olarak hesaplanmıştır. Öte yandan, ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanmış yeşil çay özütü yüklü lipozomların antioksidan aktivitesi asetat tampon çözeltisinde sırasıyla 21.753 ve 14.989 mg DPPH/L numune (Şekil 33) iken saf suda 20.451 ve 15.051 mg DPPH/L numune (Şekil 34) olarak hesaplanmıştır. Ek olarak, asetat tampon çözeltisinde ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan kontrol numunelerinin FRAP metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri sırasıyla 4.689 ve 1.037 mM demir sülfat/L numune iken saf suda 4.827 ve 1.547 mM demir sülfat/L numune olarak bulunmuştur. Ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanmış yeşil çay özütü yüklü lipozomların FRAP metodu kullanılarak hesaplanan antioksidan aktivitesi asetat tampon çözeltisinde sırasıyla 18.923 and 13.491 mM demir sülfat/L numune (Şekil 35) iken saf suda 16.688 and 13.909 mM demir

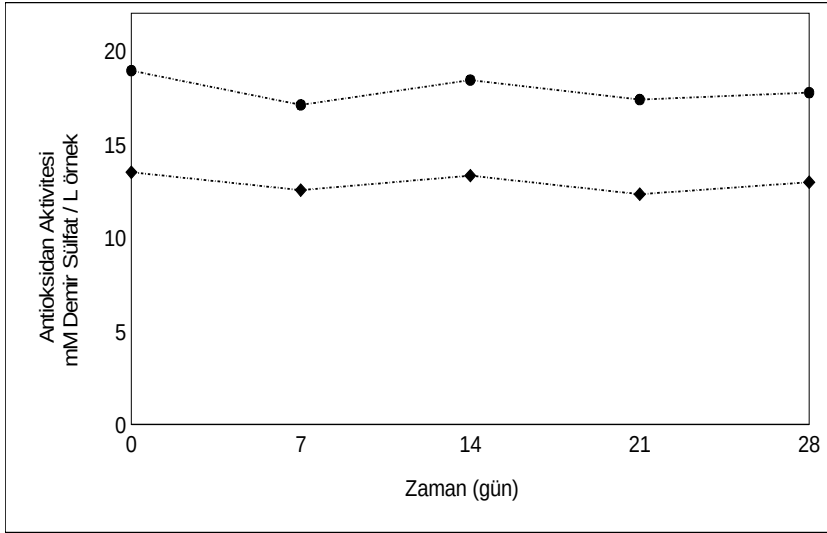
sülfat/L numune (Şekil 36) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlardan, ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan yeşil çay yüklü lipozomların antioksidan aktivitesinin %0.1 yeşil çay özütü çözeltisine göre daha düşük olduğu gözlemlenmektedir. Benzer bir şekilde Sun vd. (2015) tarafından yürütülen çalışmada elma suyunun antioksidan aktivitesinin ultrasonikasyon işlemiyle azaldığı görülmüştür. Öte yandan, mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile antioksidan aktivitesinin azalmasının sebebi işlem esnasında örneklerin aşırı ısınması ile açıklanabilir. Réblová (2012) tarafından yürütülen çalışma sıcaklık yükseldikçe antioksidan aktivitenin düştüğünü belirtmektedir. Toplam fenolik madde miktarı sonuçlara benzer bir şekilde; ultrasonikasyon ile hazırlanmış yeşil çay yüklü lipozomların antioksidan aktivitelerinde önemli bir fark ($p \leq 0.05$) görülürken, mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomların bir aylık depolama sürecinin ilk ve son günlerdeki antioksidan aktiviteleri arasında önemli bir fark ($p > 0.05$) görülmemiştir.



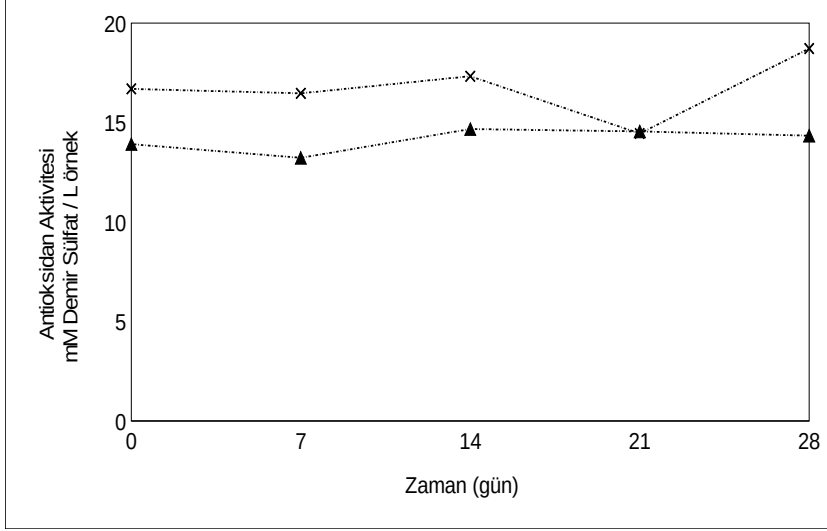
Şekil 33. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki DPPH metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri; ▨ ultrasonikasyon tekniği ile □ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile



Şekil 34. Saf suda hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki DPPH metodu ile hesaplanan antioksidan aktivitesi; ▨ ultrasonikasyon tekniği ile ■ mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile



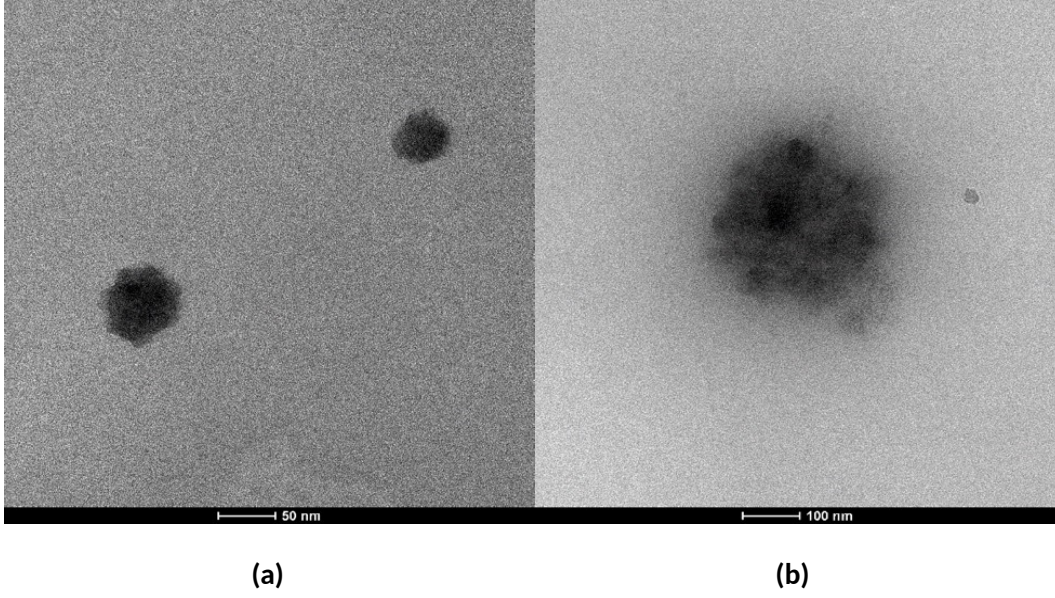
Şekil 35. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki FRAP metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri; (●) ultrasonikasyon tekniği ile (◆) mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile



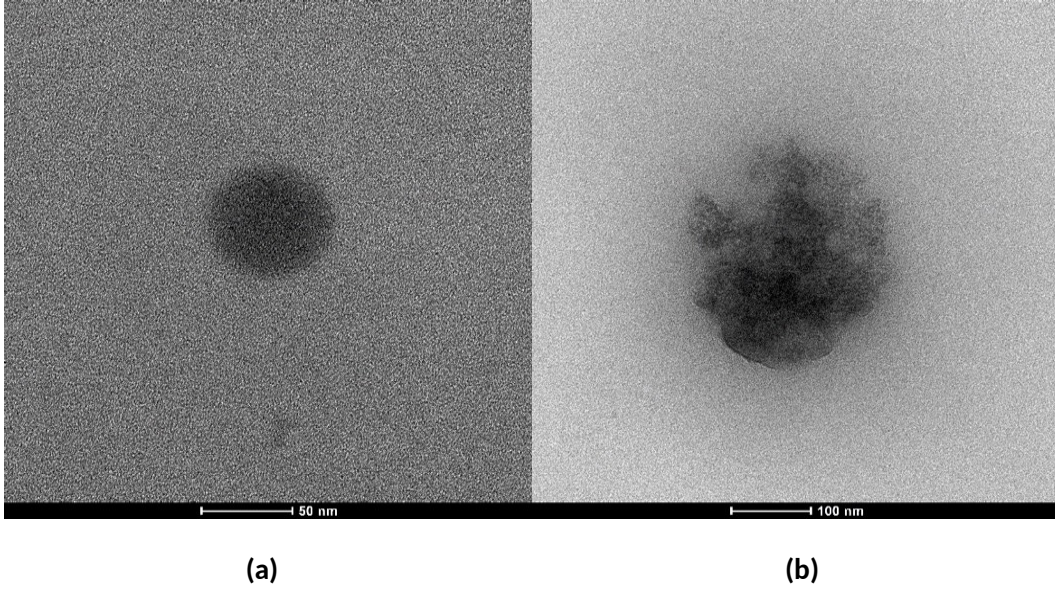
Şekil 36. Saf suda hazırlanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki FRAP metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri; (■) ultrasonikasyon tekniği ile (▲) mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile

4.2.6 Transmisyon Elektron Mikroskobu

Yeşil çay özü yüklü lipozomların morfolojisi hakkında bilgi edinmek ve parçacık boyutu dağılım sonuçlarını teyit etmek amacıyla lipozomların transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Lipozomların Thompson ve Singh (2006) çalışmasına benzer bir şekilde küresel bir şekle sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanan yeşil çay yüklü lipozomların (Şekil 37) mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomlarla (Şekil 38) karşılaştırıldığında daha büyük parçacık boyutuna sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuç daha önceden bahsedilen parçacık boyutu sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanmış lipozomların yapısı daha düzgün görülürken ultrasonikasyon ile hazırlanan lipozomların şekilleri ve parçacık boyutları değişkenlik göstermiştir. 14. günde görülen bu yapısal bozulmanın bir sebebi kırılabilir yapıya sahip olan lipozomların enkapsüle edilmiş maddeyi sızdırma eğilimi olabilir.



Şekil 37. Saf suda ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanan lipozomların transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. (a) Depolama sürecinin ilk gününde (b) Depolama sürecinin son gününde



Şekil 38. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. (a) Depolama sürecinin ilk gününde (b) Depolama sürecinin son gününde

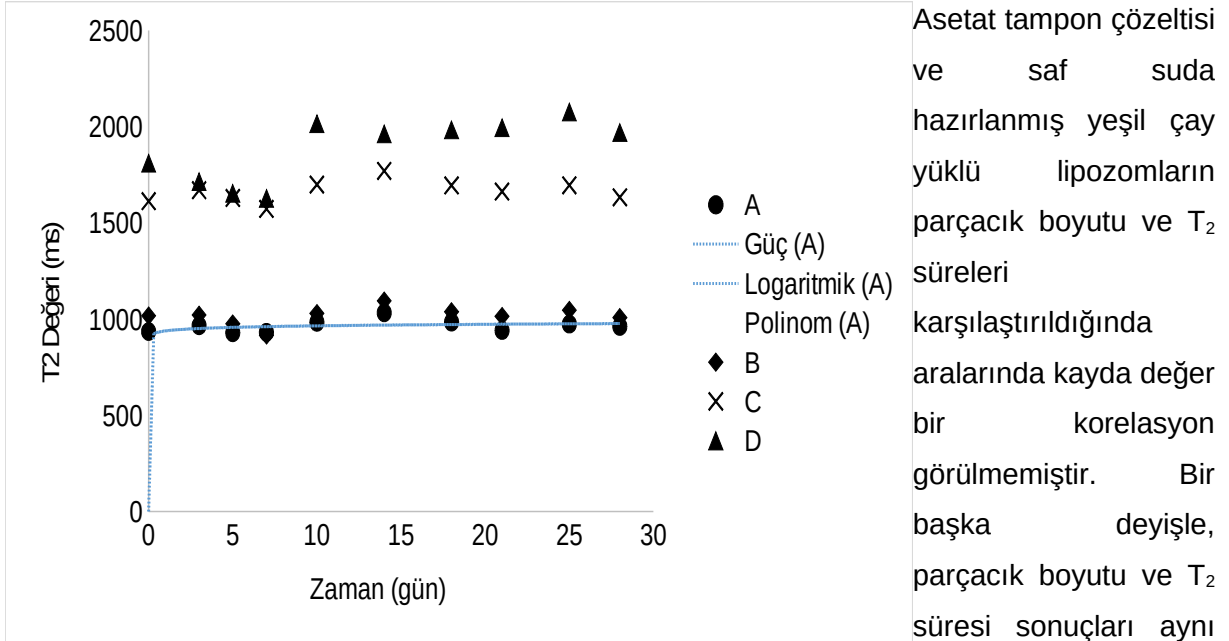
4.2.7. NMR Relaksometre Ölçümleri

Yeşil çay ekstraktının transvers relaksasyon süresi üzerindeki etkisini gözlemlemek için asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren numunelerin zamana göre (1, 4, 7, 10, 14, 28 ve 35. günlerde) NMR Relaksometre ölçümleri yapılmıştır. Tablo 12 ve Şekil 39-40, ATÇ ya da DS ile hazırlanmış ve mikroakışkanlaştırma (Şekil 39) ya da ultrasonikasyon (Şekil 40) ile homojenleştirilen yeşil çay özütü yüklü lipozomların T_2 relaksasyon sürelerini göstermektedir. Parçacık boyutlarındaki büyük farklılığa rağmen hem ultrasonikasyon hem de mikroakışkanlaştırma uygulanmış numunelerin T_2 değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırma ile muamele edilen örneklerin ortalama T_2 süresi ilk gün için sırasıyla; 1,200 ve 1,000 ms idi. Diğer yandan ultrasonikasyon ve mikroakışkanlaştırma ile hazırlanan ATÇ'deki yüklü lipozom numunelerinin ilk gün parçacık boyutları sırasıyla 130 nm ve 35 nm ölçülmüştür. Parçacık boyutunun T_2 üzerindeki etkisinin numunelerin ultrasonikasyonu ile ortaya çıkan başka bir mekanizma ile baskılandığı düşünülmektedir. TEM incelemelerindeki ultrasonikasyon görüntüleri, mikroakışkanlaştırma sonucu elde edilen kusursuz küresellikteki numuneler ile karşılaştırıldığında çok daha düzensiz ve dağınık şekilli lipozomlara işaret etmiştir. Yapıdaki bu düzensizlik, ultrasonikasyon ile sisteme verilen aşırı enerjinin lipozom bütünlüğünü bozması ile açıklanmıştır (Vermeir, Sabatino vd., 2014). Ultrasonikasyon ile parçacık boyutunun küçültülmesi, lesitin konsantrasyonu ile sınırlıdır ve belirli bir eşiğe ulaşıldıktan sonra fazladan uygulanan ultrasonikasyon örneklerin morfolojisini bozabilir (Kentish & Feng, 2014). Yeşil çay özütünün bir kısmı lipozomların dışına sızmış ve suyla doğrudan etkileşime giren bu serbestleşmiş moleküller kitle halindeki sürekli fazın T_2 'sini azaltmış olabilir. Bu gözlemin diğer bir nedeni ise düzensizleşen parçacık şekilleri olabilir. Bernewitz vd., (2013)'nin yaptığı bir çalışmada, NMR relaksasyon verilerinin parçacığın boyutunda olduğu kadar geometrisindeki değişikliklere de duyarlı olduğu vurgulanmıştır (Bernewitz vd., 2013).

Ultrasonikasyon ile hazırlanan yüklü lipozomlarda bir başka ilginç etki gözlemlenmiştir. ATÇ ile hazırlanan numuneler, DS örneklerinden daha büyük parçacık boyutuna sahip olmasına rağmen (ATÇ için 130 nm ve DS için 65 nm) T_2 değerlerinde bu etki gözlenmemiştir. Bu etki, manyetik enerji transferini kolaylaştıracak olan çevredeki yüksek H^+ ve CH_3COO^- konsantrasyonu ile proton değişim hızının artmasına atfedilmiştir.

Boş lipozomların ortalama T_2 süresi 1711 ms iken, yeşil çay ekstraktı ile dolu lipozomların ortalama T_2 süresi 976 ms bulunmuştur. Şekil 39'da mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomların T_2 değerleri verilirken; Şekil 40'da ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanan

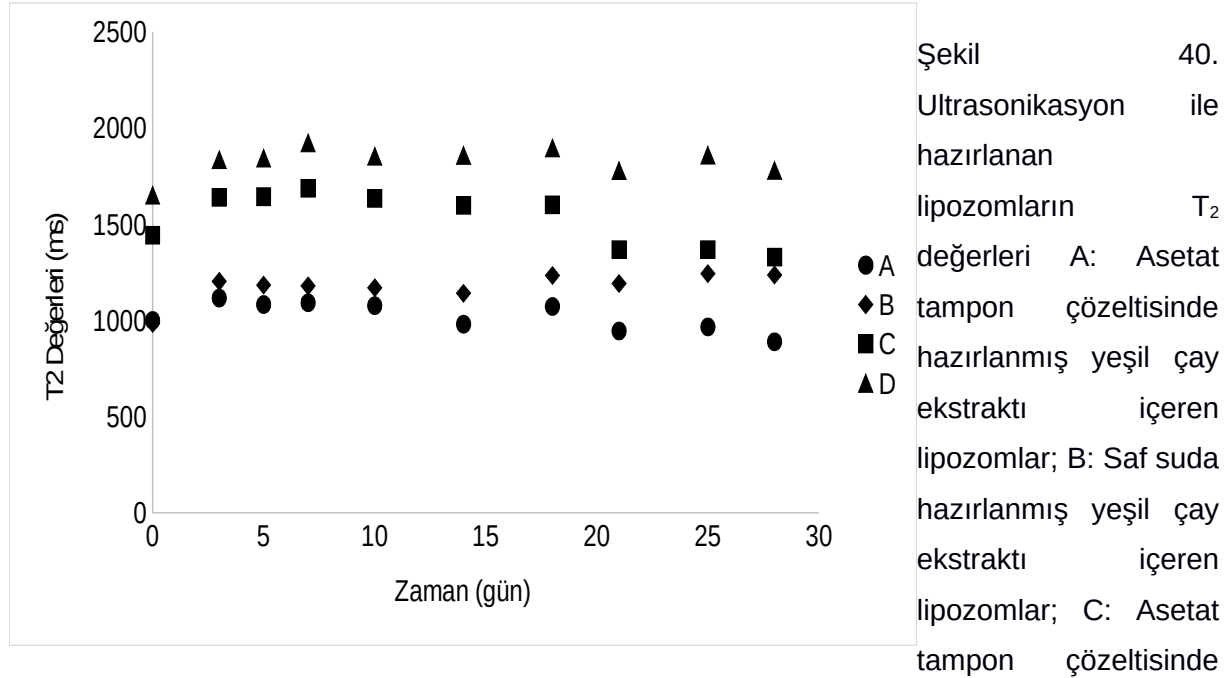
lipozomların T_2 değerleri verilmiştir. Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi boş ve dolu lipozomların ortalama parçacık boyutu sırasıyla 38 ve 47 nm olup, parçacık boyutunun T_2 süresi üzerine etkisi daha önceki bölümlerde bahsedilmiştir. Parçacık boyutunun yanı sıra bazı başka etmenlerin de T_2 süresini etkileyebileceği düşünülmektedir. Yeşil çay ekstraktının yüksek miktarda kateşin ve diğer polifenol maddelerini içerdiği bilinmektedir. Bu bioaktif maddeler polar molekül olan su ile etkileşime girmektedir (Ananingsih vd., 2013; Chacko vd., 2010; Hosseini vd., 2015). Yapılan NMR Relaksometre ölçümlerinin sonuçları yeşil çay özütünün %100 verim ile lipozomlara enkapsüle edilemediğini göstermektedir. Ortamda lipozomlara enkapsüle edilmemiş yeşil çay özütünün su ile bağlanıp ortalama T_2 değerini düşürdüğü ön görülmüştür. Bu sonuç, NMR relaksometrenin lipozomların enkapsülasyon verimliliğini tahmin etmede ya da ölçmede kullanılabileceğini göstermesi açısından umut verici bir sonuçtur. Bir çok çalışmada, dağılık faz oranının hesaplanması için NMR kullanılmıştır (Di Bari vd., 2016; Fridjonsson vd., 2014; Ling vd., 2016). NMR Relaksometre ölçümlerinde kullanılan eko ve gecikme zamanı gibi parametrelerin değiştirilmesi ile, T_2 sinyalinin yalnızca çevreye salınan aktif madde miktarından etkilenmek üzere izole edilmesi gelecek çalışmalar için mümkün olabilir.



trende sahip değildir. Beklenildiği gibi T_2 değerlerinde ani bir artış ya da azalış görülmemektedir. Yeşil çay özütünün lipozomlardan sızması sonucunda, ortama yayılan yeşil çay özütünün ortamdaki su fazında çözülmesinden dolayı T_2 değerinde küçük dalgalanmalar görülmüştür. Benzer bir şekilde, toplam fenolik madde miktarı deneylerinde 1 aylık depolama

sürecinin 14. gününde lipozomlarda dağılımlardan dolayı ani bir fenolik madde artışı görülmüştür.

Şekil 39. Mikroakışkanlaştırıcı ile hazırlanan lipozomların T_2 değerleri A: Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren lipozomlar; B: Saf suda hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren lipozomlar; C: Asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış boş lipozomlar; D: Saf suda hazırlanmış boş lipozomlar



hazırlanmış boş lipozomlar; D: Saf suda hazırlanmış boş lipozomlar

NMR Relaksometre deneyinin çıktısı olan NMR Relaksasyon spektrası bu sinyal eğrilerine Ters Laplas yönteminin uygulanmasıyla elde edilmiştir. Elde edilen NMR Relaksasyon spektrası lipozomlardaki proton havuzları hakkında bilgi verir. Bu yüzden, NMR Relaksasyon spektrası, T_2 değerlerinin daha ayrıntılı analizi için kullanılmıştır. Belirtilen proton havuzları lipozom sistemlerindeki dayanıklılığın değişimini tespit etmek için kullanılabilir. Bu da numunenin mikroyapısı ile doğrudan ilişkilendirilebilir. Bu tekniğin lipozom tabanlı sistemlerinin karakterizasyonu ve dayanıklılık tespiti için kullanılması tahribatsız ve kolay bir teknik olması yönünden büyük avantaj sağlamaktadır. Bu yöntem; dondurma, kek, peynir vb. gibi çok unsurlu yapıya sahip kompleks ürünlerden gelen NMR sinyallerinin kantitatif analizi için oldukça uygundur (Mariette, 2009). Yöntem, birçok kez emülsiyonların analizi için uygulanmış olup su ve yağ içeriğinin belirlenmesinde, katı yağ indeksinin ölçülmesinde, parçacık boyutu ölçümünde, katı ve sıvı fazın miktar analizinde, polimorfiklerin

tanımlanmasında etkili olduğu ispatlanmıştır. Ters laplas yöntemi, lipozom oluşturmada en dayanıklı bulunan parametreler (1300 bar, mikroakışkanlaştırıcı tekniği) kullanılarak oluşturulan lipozomlar için uygulanmıştır. Mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile oluşturulan lipozomların T_2 relaksasyon verileri Tablo 12'de görüldüğü gibidir. Örnekler, her biri değişken 1H relaksasyon oranlarına sahip bileşenlere ait olan 3 tane pikten oluşmaktadır. Piklerin sayısının 30 gün depolama süresi boyunca değişmediği görülmektedir. NMR cihazının CPMG puls aralığından daha düşük T_2 değerine sahip pikler matematiksel modelleme sırasındaki problemlerden dolayı oluştuğu için, analize alınmamıştır. Numunenin bileşimine göre, katı sinyal (sinyalin Gauss relaksasyon bileşeni) katı yağ, protein ve polisakaritlerin değiştirilemeyen protonları olarak düşünülebilir. Sıvı sinyali ise sıvı su, yağ ve katı maddelerin değiştirilebilir protonları olarak görülebilir. Değiştirilebilir katı protonlar, sıvılara kıyasla çok hızlı proton relaksasyonuna sahiptir (Mariette, 2009). Eko gecikmesinin 1000 μs 'ye ayarlanması ile sinyalin yalnızca numunedeki sıvı bileşenlerden gelmesi sağlanmıştır. Böylece, sıvı sinyal üzerinde doğrudan etkiye sahip olmasına rağmen yeşil çay özü moleküllerinin NMR sinyalinin kendisine katkıda bulunmayacağını biliyoruz. Yeşil çay özü yüklü lipozomların sıvı bileşenleri sıvı yağ ve sudur. Bununla birlikte, çevresindeki matris büyük ölçüde su ve yağ piklerinin konumunu etkiler. Sudan gelen pik 10-3000 ms arasında görülürken, yağdan gelen pik (30 °C'lik sıcaklıkta) 0.2-20 ms arasında görülmektedir (Allsopp vd., 2005). Su ve yağın relaksasyonu birçok faktörden etkilenebilir. Bu yüksek bilgi içeriği, numunenin karakterizasyonu için birçok yarar sağlar. Fakat aynı zamanda özellikle lipozomlarda olduğu gibi, örnek hakkında önceden bilgi mevcut olmadığında pikleri belirli proton havuzlarına atamak oldukça zordur. Bildiğimiz kadarıyla, NMR T_2 gevşetme spektrumu ile lipozomal karakterizasyon daha önce yapılmamıştır. Bununla birlikte, lipozomların emülsiyonlara benzemesi sebebiyle, yorumlama kısmında emülsiyon çalışmalarından yararlanmak açıklamaları kolaylaştırmıştır.

Pik 1 için T_2 değerleri 9-20 ms arasında değişmiştir. En küçük T_2 değerine ve bağlı alana sahip bu pik iki katmanlı yağdaki 1H protonları ile bağdaştırılmıştır. Bir çok emülsiyon çalışmasında benzer T_2 'lere sahip bir pikin sıvı yağa ait olduğundan bahsedilmiştir (Jones ve Taylor, 2015; Miklos vd., 2014b; Vermeir vd., 2014; Zhang vd., 2016). En yüksek T_2 değerine (1000-1800 ms) ve bağlı alana (87-95%) sahip olan pik 3 ortamda serbest halde bulunan suya aittir. Daha önceki emülsiyon çalışmalarında benzer T_2 aralıklarına sahip bileşenin ortamdaki serbest suya ait olduğu belirtilmiştir. T_2 değeri pik 1 ve pik 3'ün T_2 değerleri arasında olan pik 2, çok büyük bir olasılıkla lipozomların içindeki su protonlarıyla ilişkilidir. Lipozomların içindeki bu su, bağlı su kavramı ile karıştırılmamalıdır. Bağlı su, suyun

hidrojen bağlarının bir polimerin polar gruplarına bağlanması ile açıklanabilir. Serbest su ise herhangi bir polimere bağlı olmayan sudur ve bu nedenle herhangi bir açıdan suyun hareketliliği kısıtlanmamıştır. Su bu iki hal arasında bir çok halde de bulunur. Bu hallerde, su direkt olarak bir polimere yapışık olmasa da, birinci hidratasyon katmanı ile hidrojen bağlanması yoluyla sınırlanabilir (Liu vd., 2016). Lipozomların içindeki suyun hacmi, bu bakımdan, birkaç yüz ms aralığındaki T_2 değerlerini açıklayan lipozomal katmanlar tarafından hem fiziksel hem de kimyasal olarak sınırlandırılmıştır. Emulsiyonlarda yapılan çalışmalarda, hapsedilmiş suyun pikinin 100 ms'lerde görüldüğü bildirilmiştir. Ek olarak, emulsiyonlardaki hapsedilmiş suyun bağlı sudan farklı olduğu ve T_2 değerinin serbest suyun T_2 değerinden sadece çok az düşük olduğu belirtilmiştir (Mariette, 2009). Yeşil çay ekstraktı dolu ve boş lipozomların içindeki su ve ortamdaki suyun pikleri karşılaştırıldığında T_2 değerlerinde önemli bir fark olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Öte yandan, asetat tampon çözeltisi ve saf suyun T_2 üstünde önemli bir farka sebep olmadığı görülmüştür. Lipozomların yeşil çay ile yüklenmesi, T_2 değerlerinin düşmesine sebep olmuştur. Lipozomların yeşil çay ekstraktı ile yüklenmesinin lipozomların içindeki suyun T_2 'sini düşürmesi beklenirken, ortamda bulunan suyun T_2 'sini önemli biçimde azalttığı görülmüştür. Bu yeşil çay ekstraktının tamamının lipozomlara kaplanmaması ve bazı yeşil çay ekstraktının ortamdaki suda çözünüp T_2 'sini azaltması ile açıklanmaktadır. Yeşil çay ekstraktı dolu lipozomların pik 1 ve pik 2'deki T_2 değerlerinde önemli bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Bu sonuç, lipozomların depolama süresi boyunca stabil olması ile açıklanır. Önceki kısımlarda anlatılan fiziksel dayanıklılık deneyleri (parçacık boyutu, zeta potansiyeli analizi, TEM görüntüleme) lipozomların 1 aylık depolama süresince yapılarını koruduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, kimyasal dayanıklılık (hidroperoksit oluşumu deneyi ile takip edildi) açısından, yüklü ve boş numuneler çok farklı sonuçlar vermiştir. Yeşil çay özütü ile doldurulmuş lipozomların oldukça iyi bir kimyasal stabilite gösterdiği görülmektedir. Bu sonuç T_2 relaksasyon spektrumunda, lipozomların içindeki suyun T_2 değerlerindeki dalgalanmaların sebebi olarak düşünülmektedir. Lipozomların içindeki hidroperoksit ve oksidasyon ürünlerinin birikimi ile, iç suyun T_2 sayısı ilk haftalarda azalmış gibi görünürken, lipozomların içindeki moleküler yoğunluğun artması, muhtemelen dışardan lipozomlara su transferi için bir ozmotik basınca neden olan itici kuvveti yarattı. Bu da, T_2 değerinin sonraki günlerdeki artışının sebebi olabilir. Devam eden oksidasyon da T_2 değerlerinin azalmasına ve dalgalanmanın ilerleyen günlerde de tekrarlanmasına yol açmıştır. Bu konuda yapılan diğer araştırmalarda, araştırmacılar iç suya ait T_2 değerlerinin stabilitesini emulsiyonların dayanıklılığı ile ilişkilendirmiştir (Onuki vd., 2016; Zhang vd., 2016).

Dikkat çeken bir diğerk bulgu, ortamdaki suya ait olan pik 3'ün 7 ve 14 günler civarında artmış olmasıdır. Bu sonuç daha önceki kısımlarda da bahsedilen sonucu destek niteliktedir. Daha önce de bahsedildiği gibi bu zaman aralığında iç suyun lipozomdan çevreye sızması toplam fenolik madde miktarı ölçümleri ile teyit edilmişti. T_2 zamanındaki artış, suyun lipid çift katmanlarının kısıtlamalarından kurtulup ortamdaki serbest suyun miktarının arttırması ile açıklanmaktadır. Bu, T_2 değeri 3000 ms olan suyun T_2 değerini 2000 ms'ye düşürmüştür. Bunun nedeni, fosfolipidlerin polar başları ile su molekülleri arasındaki yüksek arayüzey temas alanıdır. Bu durum, yağ damlacıklarına yakın olan suyun moleküler hareketliliğinin, serbest suyunkine göre daha kısıtlı olmasına neden olmuştur (Onuki vd., 2016).

Tablo 12. Mikroakışkanlaştırma ve ultrasonikasyon ile hazırlanan lipozomların T2 değerleri: A) Asetat Tampon Çözeltisinde Hazırlanmış Yeşil Çay Ekstraktı Yüklü Lipozomlar; B: Distile Suda Hazırlanmış Yeşil Çay Ekstraktı Yüklü Lipozomlar; C: Asetat Tampon Çözeltisinde Hazırlanmış Boş Lipozomlar; D: Distile Suda Hazırlanmış Boş Lipozomlar

Zaman (gün)	T ₂ (ms)				
		A	B	C	D
Mikroakışkanlaştırma	1	935.82 ^{bc} ± 4.39	1017.09 ^{bc} ± 9.37	1612.86 ^{bc} ± 20.50	1810.06 ^b ± 9.24
	3	965.78 ^{bc} ± 3.37	1021.53 ^{abc} ± 6.22	1670.11 ^{bc} ± 5.44	1714.34 ^{bc} ± 5.27
	5	929.27 ^c ± 6.38	975.84 ^{bc} ± 5.58	1629.56 ^c ± 13.62	1653.59 ^c ± 8.99
	7	931.70 ^c ± 4.59	916.35 ^c ± 21.79	1573.04 ^d ± 54.77	1627.16 ^c ± 30.41
	10	983.49 ^{ab} ± 0.32	1030.11 ^{ab} ± 3.52	1699.43 ^b ± 8.09	2015.29 ^a ± 33.16
	14	1033.01 ^a ± 9.69	1095.27 ^a ± 0.97	1770.80 ^a ± 11.09	1963.09 ^a ± 19.63
	18	984.47 ^{ab} ± 0.52	1038.97 ^{ab} ± 13.23	1695.14 ^b ± 7.19	1983.80 ^a ± 30.10
	21	940.96 ^{bc} ± 3.17	1015.31 ^{abc} ± 12.42	1663.32 ^{bc} ± 18.78	1994.64 ^a ± 24.48
	25	974.18 ^{bc} ± 12.13	1046.75 ^{ab} ± 7.76	1695.67 ^{ab} ± 21.97	2076.39 ^a ± 17.04
	28	962.06 ^{bc} ± 10.41	1008.66 ^{bc} ± 3.15	1633.36 ^{bc} ± 17.04	1969.67 ^a ± 41.98

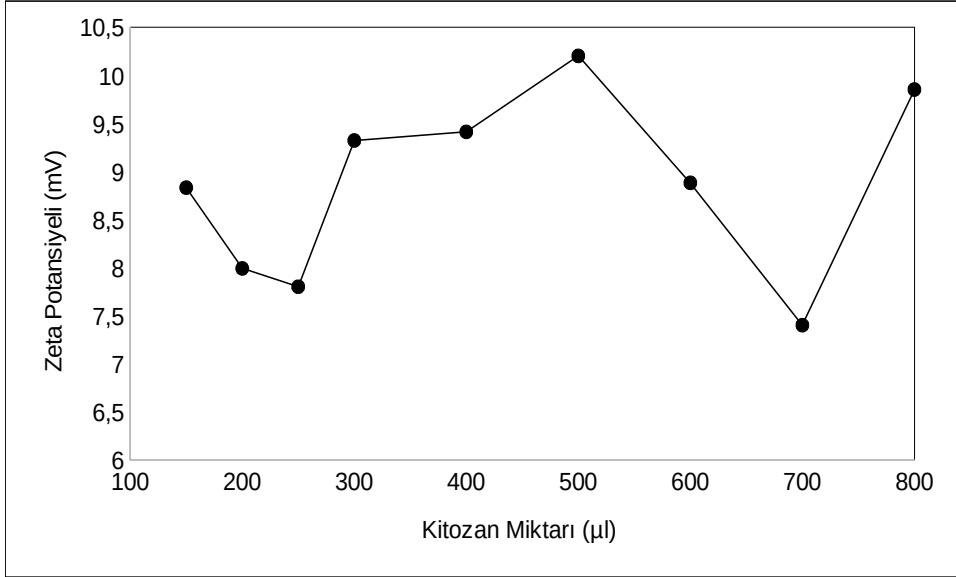
Tablo 12 (Devamı). Mikroakışkanlaştırma ve ultrasonikasyon ile hazırlanan lipozomların T2 değerleri: A) Asetat Tampon Çözeltisinde Hazırlanmış Yeşil Çay Ekstraktı Yüklü Lipozomlar; B: Distile Suda Hazırlanmış Yeşil Çay Ekstraktı Yüklü Lipozomlar; C: Asetat Tampon Çözeltisinde Hazırlanmış Boş Lipozomlar; D: Distile Suda Hazırlanmış Boş Lipozomlar

Ultrasonikasyon	1	1000.29 ^{bc} ± 0.54	984.14 ^b ± 71.87	1442.78 ^b ± 25.96	1651.38 ^b ± 31.06
	3	1116.59 ^a ± 8.44	1202.94 ^a ± 9.74	1640.51 ^{ab} ± 8.18	1835.62 ^{ab} ± 14.90
	5	1082.85 ^{ab} ± 24.10	1183.48 ^a ± 14.92	1643.28 ^{ab} ± 21.70	1844.03 ^{ab} ± 40.55
	7	1092.25 ^a ± 23.86	1180.04 ^a ± 4.97	1686.79 ^{ab} ± 29.98	1922.59 ^a ± 19.92
	10	1077.07 ^{ab} ± 5.05	1169.64 ^a ± 10.08	1634.89 ^{ab} ± 11.65	1853.61 ^{ab} ± 5.49
	14	980.68 ^c ± 14.29	1141.62 ^a ± 54.85	1598.75 ^{ab} ± 12.26	1858.25 ^{ab} ± 34.13
	18	1072.77 ^{ab} ± 30.13	1233.92 ^a ± 43.92	1601.68 ^a ± 72.54	1896.95 ^a ± 33.03
	21	945.42 ^{cd} ± 10.53	1192.05 ^b ± 62.72	1368.49 ^{ab} ± 11.42	1778.31 ^{ab} ± 48.10
	25	966.59 ^{cd} ± 14.71	1243.41 ^b ± 48.32	1367.81 ^a ± 24.76	1858.44 ^{ab} ± 53.38
	28	889.31 ^d ± 19.79	1236.49 ^b ± 57.51	1329.25 ^a ± 0.88	1780.21 ^{ab} ± 98.60

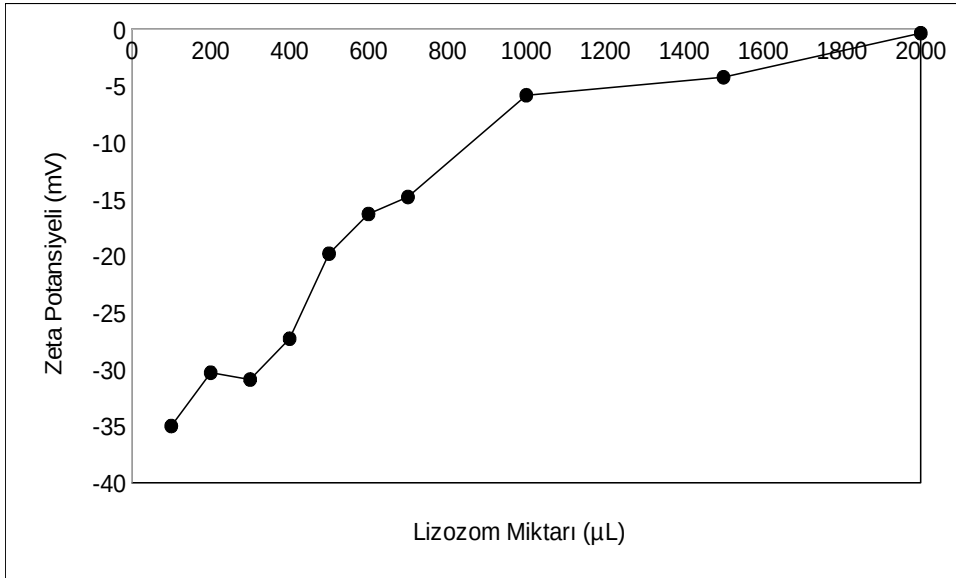
4.2.8 Lipozomların Katmanlı Depozisyon Yöntemi ile Polimer Kullanarak Kaplanması

Yaygın olarak kullanılan soya lesitini negatif yüklü olduğu için soya lesitini ile hazırlanmış yeşil çay özütü yüklü ve boş lipozomlar eksi yüklüdür. Kırılgan bir yapıya sahip lipozomların içerdikleri biyoaktif maddeleri sızdırma riskini azaltmak/ortadan kaldırmak için lipozomların dayanıklılığını arttırmak adına lipozomlar polimerler ile kaplanabilir. Yapılan bir araştırmada lipozom-kitozan-pektin katmanları ile kaplanmış üzüm çekirdeği özütünün çevresiyle olan temasının tamamen koparıldığı ve böylelikle ulaşılabilir özütün her katmanla azaldığı ve enkapsülasyon veriminin katmanlar arttıkça arttığı gözlemlenmiştir (Laye vd., 2008). Proje kapsamında eksi yüklü lipozomlar artı yüklü polimer olan kitozan ve lizozom ile kaplanmıştır. Kitozan biyo-uyumlu, biyo-bozulabilir olduğu ve toksik etki göstermeyen, antimikrobiyal özellikli bir polimer olduğu için kaplama malzemesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Chun vd., 2013; Laye vd., 2008). Öte yandan, kaplama malzemesi olarak kullanılan lizozom yumurtadan az miktarda elde edilebildiğinden ekonomik açıdan pahalı bir polimerdir. Bu yüzden endüstriyel anlamda fizibilitesi çok yüksek değildir. Ancak fizyolojik pH'da artı yüklü olabilen nadir polimerdendir ve güçlü bir antimikrobiyal etkisi vardır.

Bu kısımda ilk olarak 10 ml (yeşil çay özütü ile dolu) lipozom çözeltisine farklı miktarlarda %1'lik kitozan (150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 µl) ve %1'lik lizozom (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 1500, 2000 µl) çözeltileri eklenmiştir. Ardından çözeltiler 700 rpm'de 2 dk boyunca karıştırılmış ve zeta potansiyeli ölçümü yapılmıştır. Elde edilen kitozan ve lizozom kaplanmış lipozomların zeta potansiyellerini gösteren grafikler aşağıda gösterildiği gibidir (Şekil 41 ve Şekil 42). Kitozan asitik koşullarda çözünen bir biyopolimer olduğu için sadece asetat tampon çözeltisinde hazırlanan lipozomları kaplamak için kullanılırken, lizozom ise sadece saf su ile hazırlanan lipozom örneklerinde hazırlanmıştır.



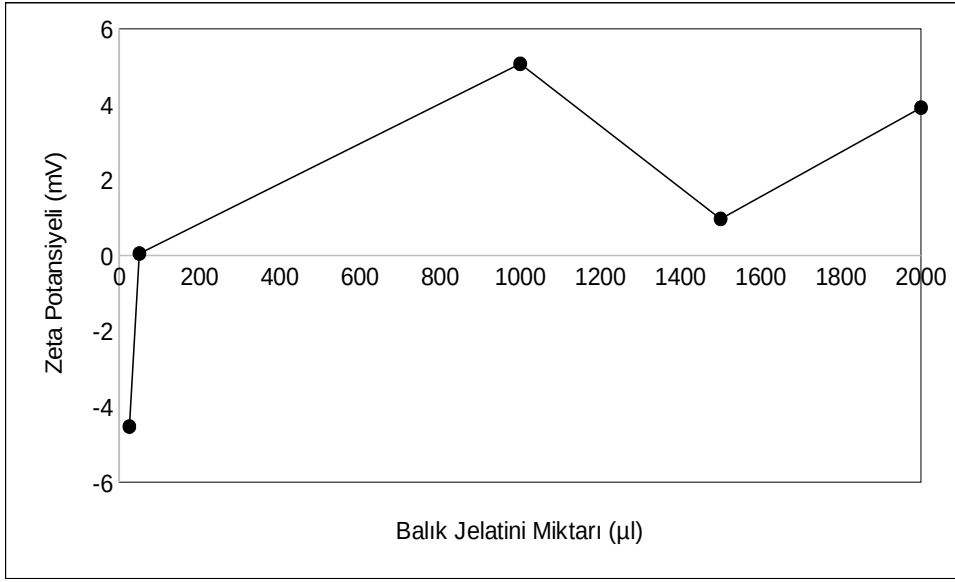
Şekil 41. Asetat tampon çözeltisinde mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik kitozan çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri



Şekil 42. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik lizozom çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri

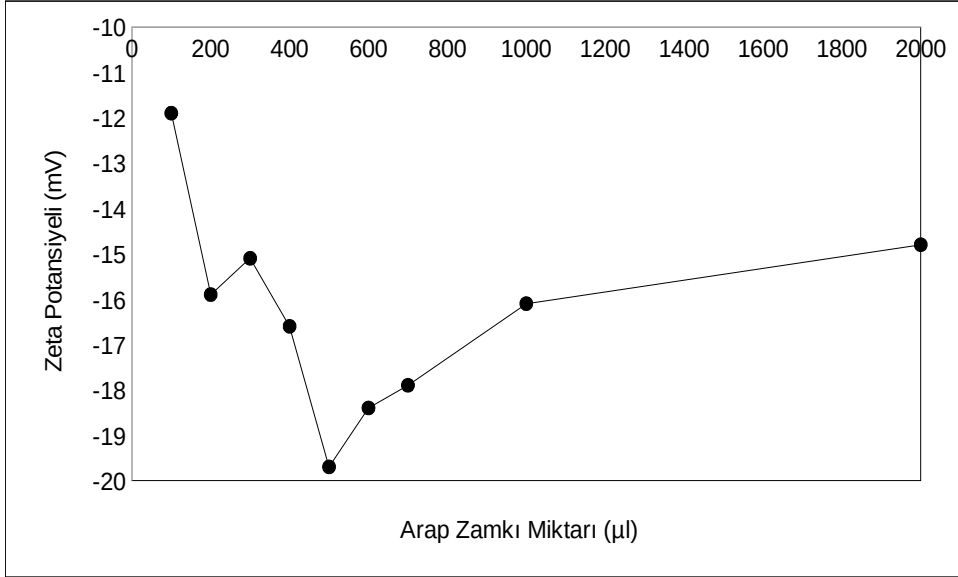
Şekil 42'de görüldüğü üzere 10 ml lipozoma %1'lik lizozomun 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 1500 ve 2000 µl eklenmesi eksi yüklü lipozomların yükünün artmasına yetmemiştir. Lizozom pahalı bir polimer olduğu için konsantrasyonu veya eklenen miktarı

endüstriyel anlamda fizibil olmayacağından dolayı arttırılmamıştır. Öte yandan, 500 µl %1'lik kitozanın 10 ml asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomlara eklenmesi ile optimum zeta potansiyeli (+10.2 mV) elde edilmiştir. Lizozom ile artı yüklü sistemler elde edilemediği için lizozom yerine artı yüklü polimer olan balık jelatini denenmiştir. 10 ml saf suda hazırlanmış yeşil çay yüklü lipozomlara %1'lik balık jelatini karışımından 25, 50, 1000, 1500 ve 2000 µl eklenerek kaplama yapılmıştır. Balık jelatini ile kaplanan lipozomların zeta potansiyeli Şekil 43'te gösterilmiştir. 1000 µl %1'lik balık jelatininin 10 ml saf suda hazırlanmış lipozomlara eklenmesi ile optimum zeta potansiyeli (+5.07 mV) elde edilmiştir.



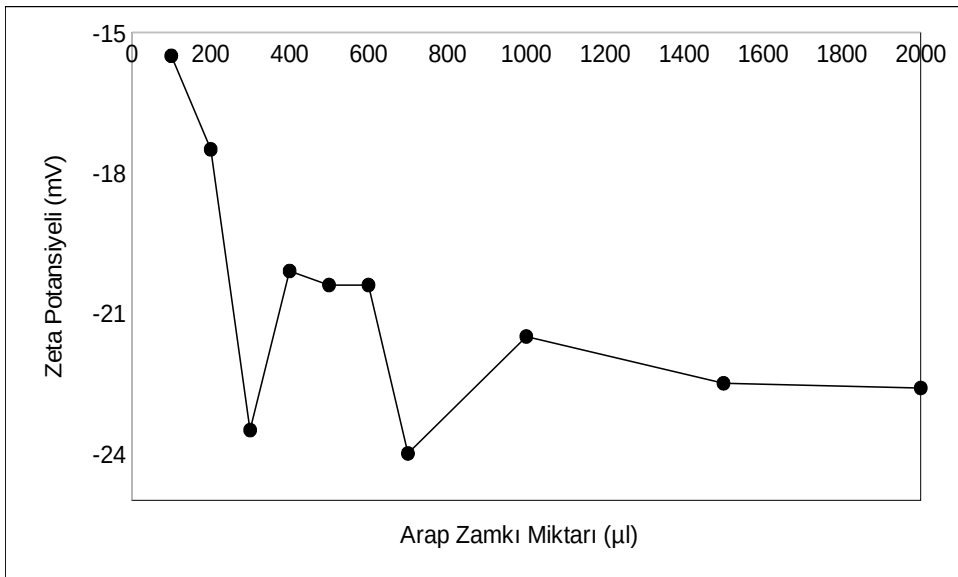
Şekil 43. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik balık jelatini çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri

Lipozomlar artı yüklü bir polimerle kaplandıktan sonra sistemin dayanıklılığını daha da arttırmak amaçlı negatif yüklü ikinci polimerle kaplanmıştır. 500 µl %1'lik kitozanın 10 ml asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomlara eklenmesi sonucunda +10.2 mV yüke gelmiş lipozoma ikinci bir katman olarak %1'lik arap zamkı farklı miktarlarda (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 2000 µl) eklenmiştir. Eklenen arap zamkı miktarına karar vermek için zeta potansiyeli ölçümü yapılmıştır (Şekil 44). 500 µl %1'lik arap zamkının 10 ml kitozan ile kaplanmış lipozomlara eklenmesi ile en yüksek zeta potansiyeli (-19.7 mV) elde edilmiştir.



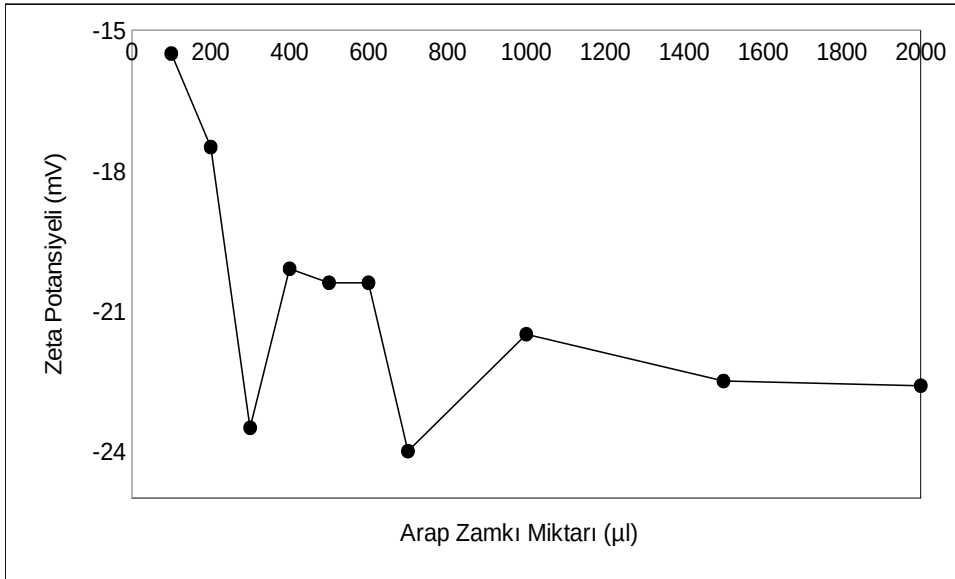
Şekil 44. Kitozan ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik arap zamkı çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri

Ek olarak, kitozan ile kaplanmış lipozomlar ikinci bir katman olarak arap zamkının yanı sıra ikinci bir polimer, peynir altı suyu proteini (PASP) ile de kaplanmıştır. Aynı şekilde, 500 µl %1'lik kitozanın 10 ml asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış lipozomlara eklenmesi sonucunda +10.2 mV yüke gelmiş lipozoma ikinci bir katman olarak %1'lik PASP farklı miktarlarda (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 2000 µl) eklenmiştir. Eklenen PASP miktarına karar vermek için yapılan zeta potansiyeli ölçümü Şekil 45'te verilmiştir. PASP kullanılarak ikinci bir katman olarak kaplanan lipozomların yükü eksi olamamıştır. Bunun nedeni PASP'ın izoelektrik noktasının pH:4.5 civarlarında olmasıdır. Bir başka deyişle, PASP asidik koşullarda neredeyse yüksüzdür.



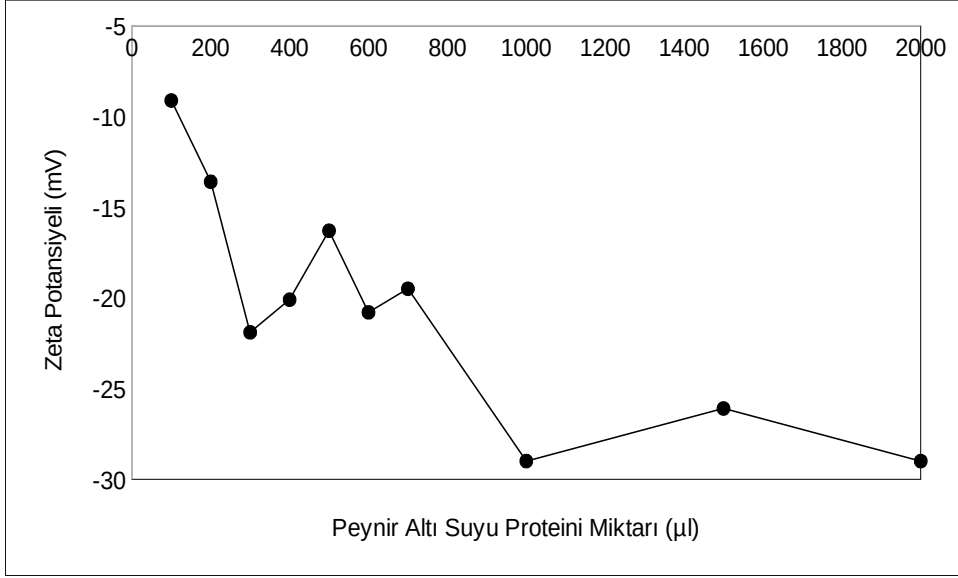
Şekil 45. Kitozan ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik peynir altı suyu proteini (PASP) çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri

Öte yandan benzer bir şekilde, 1000 µl %1'lik balık jelatininin 10 ml saf suda hazırlanmış lipozomlara eklenmesi sonucunda +5.07 mV yüke gelmiş lipozoma ikinci bir katman olarak %1'lik arap zamkı farklı miktarlarda (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 1500, 2000 µl) eklenmiştir. Eklenen arap zamkı miktarına karar vermek için zeta potansiyeli ölçümü yapılmıştır (Şekil 46). 300 µl %1'lik arap zamkının 10 ml balık jelatini ile kaplanmış lipozomlara eklenmesi ile en yüksek zeta potansiyeli (-23.5 mV) elde edilmiştir.



Şekil 46. Balık jelatini ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik arap zamkı çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri

Son olarak, 1000 µl %1'lik balık jelatininin 10 ml saf suda hazırlanmış lipozomlara eklenmesi sonucunda +5.07 mV yüke gelmiş lipozoma ikinci bir katman olarak %1'lik PASP farklı miktarlarda (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 1500, 2000 µl) eklenmiştir. Eklenen PASP miktarına karar vermek için zeta potansiyeli ölçümü yapılmıştır (Şekil 47). 1000 µl %1'lik PASP'ın 10 ml balık jelatini ile kaplanmış lipozomlara eklenmesi ile en yüksek zeta potansiyeli (-29 mV) elde edilmiştir.



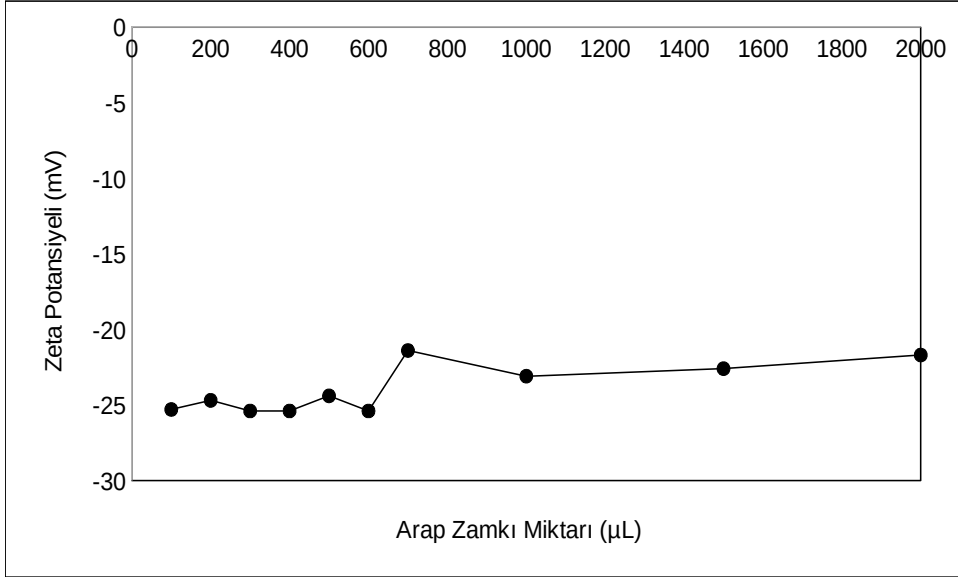
Şekil 47. Balık jelatini ile kaplanmış lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik peynir altı suyu proteini (PASP) çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri

Sonuç olarak, 4 katmanlı olacak şekilde aşağıdaki kombinasyonlarda kaplama yapılmıştır;

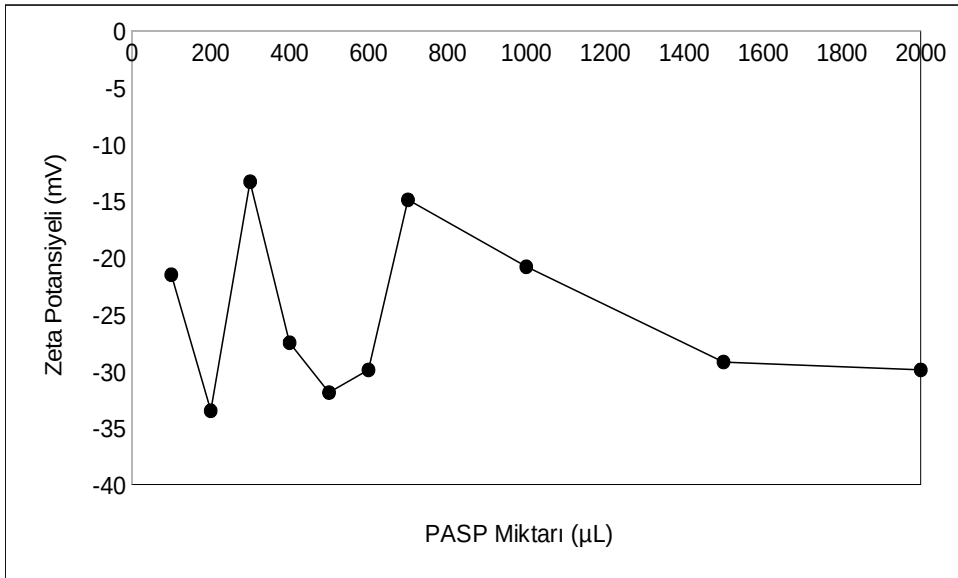
- Kitozan-Arap Zamkı-Kitozan-Arap Zamkı
- Balık Jelatini-Arap Zamkı-Balık Jelatini-Arap Zamkı
- Balık Jelatini-PASP-Balık Jelatini-PASP

Yukarıda anlatılmış metot takip edilerek lipozomlara üçüncü ve dördüncü katman da eklenmiştir. Lipozomlara bağlanmamış olan polimerleri Laye vd. (2008) tarafından kullanılan Sephadex jel filtrasyon tekniği ile ayırmak için çeşitli deneyler yapılmıştır. Ek olarak bu teknik ortamdaki fazla yeşil çay özütü lipozomlardan ayırmak için de kullanılabilir. İlk olarak, kütlece %10 sephadex jel çözeltisi saf suda hazırlanıp 24 saat boyunca jelin şişmesi için bekletilmiştir. Sonrasında sephadex jel 5ml'lik şırıngalara yavaşça konulmuştur. Sephadex jelin santrifüj işleminde numuneyle birlikte aşağıdaki tüpe akmasını önlemek için şırınganın alt kısmına selüloz filtre kağıdı konulmuştur. Şırınga plastik santrifüj tüplerine sabitlenip 2000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. İşlem sonucunda sephadex gel'den hızlıca geçen numunenin kaplanmış lipozomlar olduğu düşünülmüştür. Yapılan denemelerde sephadex jel

filtrasyonu yöntemi ile ortamda bulunan fazla polimer ve yeşil çay özütünün uzaklaştırılmadığı görülmüştür. 4 kat kaplanmış lipozomların sephadex jel filtrasyondan geçirilmeden önceki ve geçirildikten sonraki hallerinin parçacık boyutuna bakıldığında, sephadex jel filtrasyonunun polimer uzaklaştırmada kullanılamayacağı anlaşılmıştır. Lipozom numunelerinin içinde az miktarda sephadex jel kalıntısına rastlanmıştır. Sephadex jel filtrasyonunun kullanılamayacağı anlaşıldığında başka bir filtrasyon çeşidi olan ultrafiltrasyon denemeye karar verilmiştir. 1 mL lipozom ultrafiltrasyon tüpüne yerleştirildikten sonra üstüne ucunda 100 kDa'luk filtre bulunan bir başka tüp konmuştur. Ultrafiltrasyon tüpünün kapağı kapatıldıktan sonra 4000 rpm'de yaklaşık 30 dk santrifüj edilmiştir. Lipozomların 100 kDa'luk filtreden geçip, ortamdaki polimerlerin filtreden geçemeyeceği varsayılmıştır. Santrifüj sonrasında filtreden geçen kısım toplanıp, parçacık boyutu ve toplam fenolik madde miktarı analizi yapılmıştır. Elde edilen numune oldukça berrak ve saf suya yakın bir görüntüye kavuşmuştur. Toplam fenolik madde tayininde numune en az oranda seyreltilmesine rağmen ortamdaki fenolik bileşenlerin azlığından dolayı hesaplanamamıştır. Bu sonucun sebebi lipozomların 100 kDa'dan daha büyük olduğundan filtreden geçemediği, bu yüzden de ortamda fenolik madde içeren bir yapı olmadığı ile açıklanabilir. Proje kapsamında yapılan yoğun çalışmalar sonucunda sephadex jel filtrasyon ve ultrasonikasyon tekniği kullanarak ortamdaki serbest polimerlerin sistemden uzaklaştırılmadığı görülmüştür. Bu sebepten dolayı, hazırlanan lipozomların dayanıklılığını arttırmak adına lipozomlar tek bir katman ile kaplanmıştır. Asetat tampon çözeltisinde hazırlanan lipozomlar kitozan ile tek katman olacak şekilde kaplanırken, saf suda hazırlanan lipozomlar arap zamkı, PASP ve lizozom ile kaplanmıştır. Daha önceki kısımlarda dayanıklı lipozomlar hazırlamak için gereken kitozan ve lizozom konsantrasyonları zeta potansiyeli ölçümleri ile belirlenmiştir. Ek olarak saf suda hazırlanmış lipozomların kaplamasında kullanılan arap zamkı ve PASP'ın konsantrasyonunu belirlemek için farklı miktarlardaki %1'lik arap zamkı ve PASP çözeltileri 10 ml lipozomlara eklenip, zeta potansiyeli ölçümü yapılmıştır. 10 ml saf suda hazırlanmış yeşil çay yüklü lipozomlara % 1'lik arap zamkı karışımından 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 1500, 2000 µl eklenerek kaplama yapılmıştır. Arap zamkı ile kaplanan lipozomların zeta potansiyeli Şekil 48'de gösterilmiştir. 300 µl %1'lik arap zamkının 10 ml saf suda hazırlanmış lipozomlara eklenmesi ile optimum zeta potansiyeli (-25.4 mV) elde edilmiştir. Aynı şekilde, 10 ml saf suda hazırlanmış yeşil çay yüklü lipozomlara %1'lik PASP karışımından 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 1500, 2000 µl eklenerek sistemlerin zeta potansiyeline bakılmıştır (Şekil 49). 200 µl %1'lik PASP'ın 10 ml saf suda hazırlanmış lipozomlara eklenmesi ile optimum zeta potansiyeli (-33.5 mV) elde edilmiştir.



Şekil 48. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik arap zamkı çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri



Şekil 49. Saf suda mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile hazırlanan lipozomların farklı miktarlardaki %1'lik peynir altı suyu proteini (PASP) çözeltisi eklenmesiyle kaplanmasından elde edilen zeta potansiyelleri

4.2.9 Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

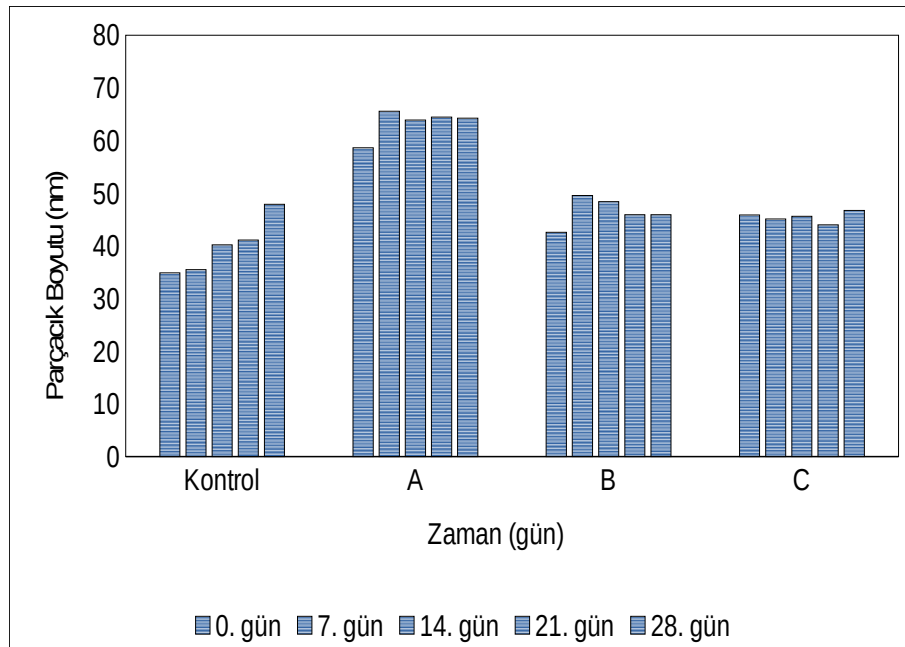
Saf suda hazırlanmış yeşil çay ekstraktı içeren ve kaplanmamış kontrol numunelerinin parçacık boyutu, 1 aylık depolama süresinin ilk gününde 34.83 nm iken; lizozom, arap zımkı ve peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomların parçacık boyutu sırasıyla 58.6, 42.55 ve 45.86 nm civarında olmuştur (Şekil 50). İstatiksel analiz yapıldığında, lipozomların lizozom, arap zımkı ve peynir altı suyu proteini ile kaplanmasının lipozomların parçacık boyutunu önemli bir şekilde arttırdığı görülmüştür ($p \leq 0.05$). Benzer şekilde, Şekil 51'de görüldüğü gibi asetat tampon çözeltisinde hazırlanan yeşil çay ekstraktı ile yüklenmiş lipozomların kitozan ile kaplanması sonucunda parçacık boyutu 37.75 nm'den 356.03 nm'ye artmıştır.

Lipozomların kitozan ile kaplanması lipozomların lizozom, arap zımkı ve peynir altı suyu proteini ile kaplanmasına göre parçacık boyutunda daha büyük bir artışa sebep olmuştur. Bunun sebebi lipozomların, kitozan ile elektrostatik etkileşimlere dayalı depozisyon yöntemi ile kaplanmış olmasıdır (Laye vd., 2008; Madrigal-Carballo vd., 2010). İçerdiği soya lesitinindeki eksi yüklü fosfolipitlerin etkisiyle eksi yüklü olan lipozomların, artı yüklü olan kitozanlar ile kaplandığında elektrostatik etkileşimler sonucu parçacık boyutunun ciddi bir şekilde arttığı Kailaku vd. (2014), Madrigal-Carballo vd. (2010), Mady ve Darwish (2010) gibi birçok çalışmada gözlemlenmiştir. Lizozom artı yüklü bir biyopolimer olmasına rağmen, eklenen konsantrasyonlarda eksi yüklü lipozomların yükünü artı yüke getirememiştir. Ekonomik açıdan pahalı olan lizozomun konsantrasyonunun arttırılması endüstriyel anlamda fizibil olmayacağından en yüksek zeta potansiyel veren konsantrasyonu ile projeye devam edilmiştir. Öte yandan, arap zımkı ve peynir altı suyu proteininin ortamın viskozitesini arttıran özellikleri göz önünde bulundurularak lipozomların dayanıklılığını arttırıp arttırılmadığı incelenmiştir. Ayrıca, lipozomlar lizozom, arap zımkı ve peynir altı suyu proteini ile kaplandığında biyopolimerlerin elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf olan Van der Waals bağları ve sterik etkileşimler ile lipozomlara bağlanacağı öngörülmüştür (Chun vd., 2013).

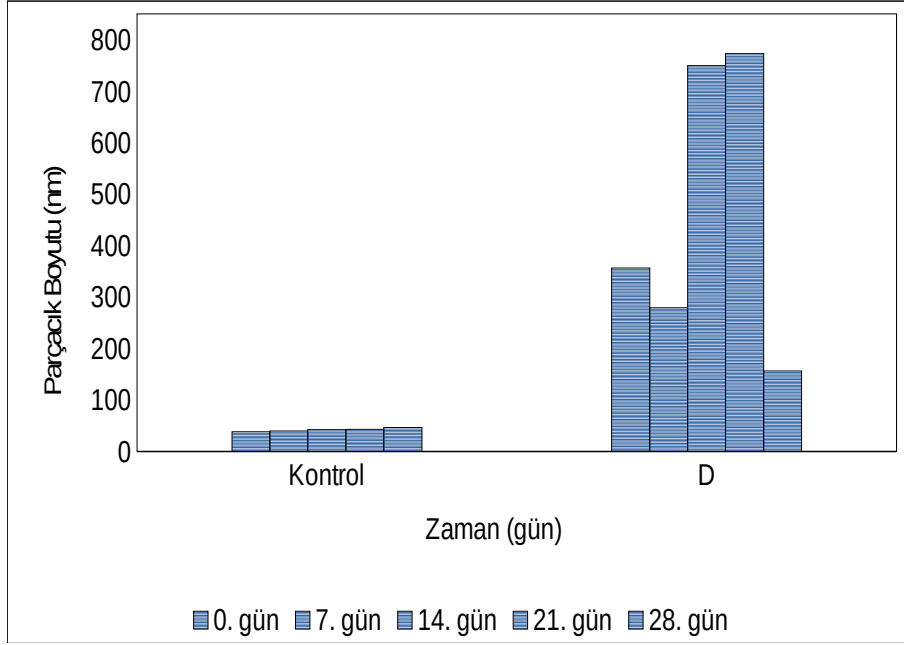
ANOVA sonuçlarına göre, lizozom, arap zımkı, peynir altı suyu proteini ve kitozan ile kaplanmış lipozomların parçacık boyutunda bir aylık depolama süresi boyunca önemli bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Kitozan ile kaplanmış numunelerin 14. günündeki artışı ; 1 aylık depolama süresinin 14. gününde kitozan kaplı lipozomlar birbirlerine yakınlaşıp birleşmeye başlaması ile açıklanmıştır. Bu nedenle, parçacık boyutunun 28. gündeki azalışı birleşen lipozomların parçalanmaya başlaması ile açıklanabilir.

Daha önce birçok çalışmada, lipozomların artı yüklü bir biyopolimer olan kitozan ile elektrostatik etkileşimler ile kaplanması, lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilitesinin artırılabilirliği gösterilmiştir (Gibis, Rahn, ve Weiss, 2013; Gibis, Vogt, ve Weiss, 2012; Laya vd., 2008; Madrigal-Carballo vd., 2010). Öte yandan, günümüzde, lipozomların eksi yüklü biopolimerler ile kaplanmasını inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Lopes, Pinilla, ve Brandelli (2017)'nin çalışmasında, eksi yüklü polisakkaritler, nisin yüklü lipozomların kaplanmasında bir kaplama malzemesi olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, oda sıcaklığında 28 gün depolama süresi boyunca pektin ve poligalakturonik asit kaplanmış nisin içeren lipozomların stabilitesinin arttığını göstermiştir.

Bu bağlamda, bu projede, lizozom, arap zımkı ve peynir altı suyu proteini gibi eksi yüklü biyopolimerlerin, yeşil çay özütü içeren lipozomların dayanıklılığını arttırmada kitozana bir alternatif olup olamayacağı araştırılmıştır.



Şekil 50. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları. Kontrol; saf suda hazırlanmış kaplanmamış, A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zımkı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomlar

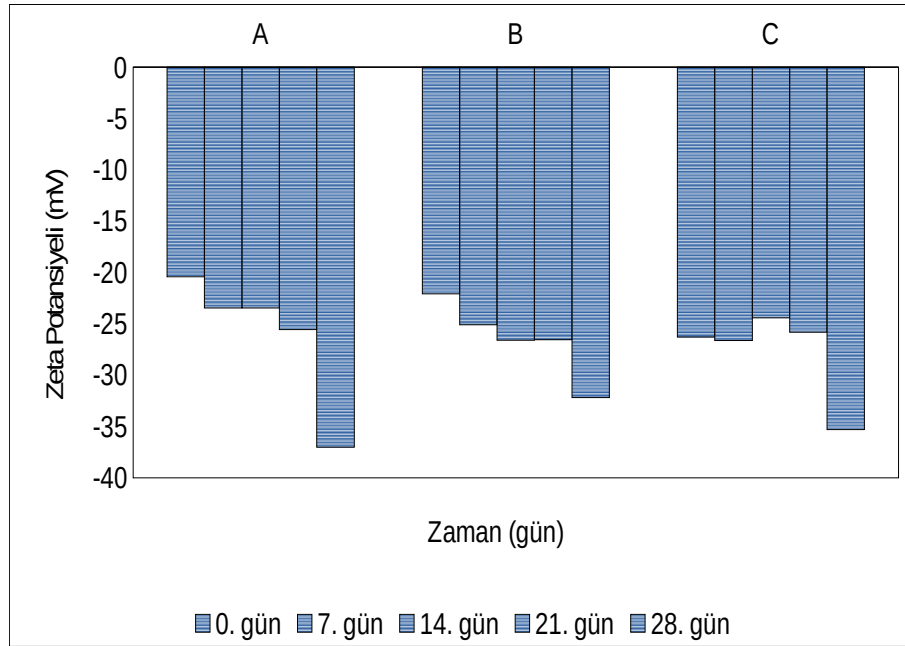


Şekil 51. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki parçacık boyutları. Kontrol; asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış kaplanmamış D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar

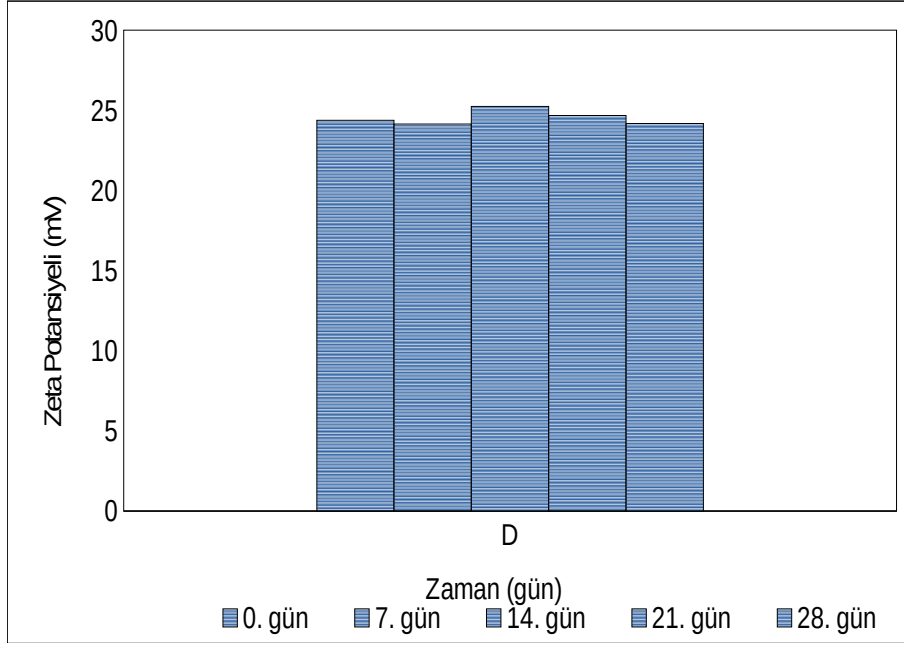
Lizozom, arap zımkı, peynir altı suyu proteini ve kitozan ile kaplanmış lipozomların zeta potansiyeli ölçümü 1 aylık depolama süresince incelenmiştir. Zeta potansiyeli partiküllerin yüzeyindeki elektriksel yüklerinin ölçülmesidir ve koloidal sistemlerin karakterize edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Zeta potansiyelinin büyüklüğü koloidal sistemlerin potansiyel stabilitesinin göstergesidir. Sistemin zeta potansiyeli yükseldikçe parçacıkların birbirini itmesi de bir o kadar artacak ve bu itme kuvveti partiküllerin bir araya gelmelerini engelleyip daha stabil bir koloidal sisteme sahip oluşmasını sağlayacaktır (Mady ve Darwish, 2010).

Bu çalışmada, lesitindeki negatif yüklü fosfolipidler nedeniyle lipozomlar başlangıçta negatif yüklüdür. Saf su ve asetat tampon çözeltisinde hazırlanan kaplanmamış lipozomların zeta potansiyelleri, ilk gününde sırasıyla -30.2 ve -10.6 mV ve 28 günün sonunda -20.2 ve -9.48 mV olarak ölçülmüştür. Saf su ve asetat tampon çözeltisinde hazırlanan lipozomların zeta potansiyelindeki farkın, lipozomal yüzeylerin elektrik yükünün, ortamın pH'ından ve farklı lipozomların birbirleri arasındaki ve lipozomlar ile fenolik bileşiklerin arasındaki elektrostatik etkileşimlerin büyüklüğünden etkilendiğini göstermiştir (Gibis vd., 2012). Kaplanmamış lipozomların zeta potansiyelinin 28 gün sonunda düşüşü lipozomların zaman içinde bozulup dayanıklılığını yitirdiğine bir işaret olarak görülmektedir.

Lizozom, arap zımkı, peynir altı suyu proteini ve kitozan ile kaplanmış lipozomların zeta potansiyeli sonuçları sırasıyla; -20.43, -22.1, -26.3 ve 24.36 mV olarak bulunmuştur. Sonuçlardan da görüldüğü gibi kitozanın yüksek yük yoğunluğu; kitozan ile kaplanan lipozomların pozitif yüklü olmasına sebep olmuştur (Şekil 52 ve 53). Biyopolimer kaplanmış lipozomların zeta potansiyel değerlerinde, depolama süresinin sonunda bir azalma gözlemlenmemiştir. Bu sonuç, kaplanmamış lipozomların fiziksel dayanıklılığının biyopolimer kaplama yoluyla arttırılabileceğinin bir göstergesidir. Lizozom, arap zımkı ve peynir altı suyu proteini ile kaplı lipozomlar daha önce çalışılmamış olmasına rağmen, lipozomların dayanıklılığının, kitozan, pektin ve poligalakturonik asit gibi diğer biyopolimerler ile kaplanmasının lipozomların fiziksel ve kimyasal korunmasını sağladığını gösteren çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Gibis vd., 2012b; Laye vd., 2008; Lopes vd., 2017; Madrigal-Carballo vd., 2010).



Şekil 52. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki zeta potansiyelleri. A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zımkı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomlar



Şekil 53. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki zeta potansiyelleri. D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar

4.2.10 Toplam Fenolik Madde Miktarı

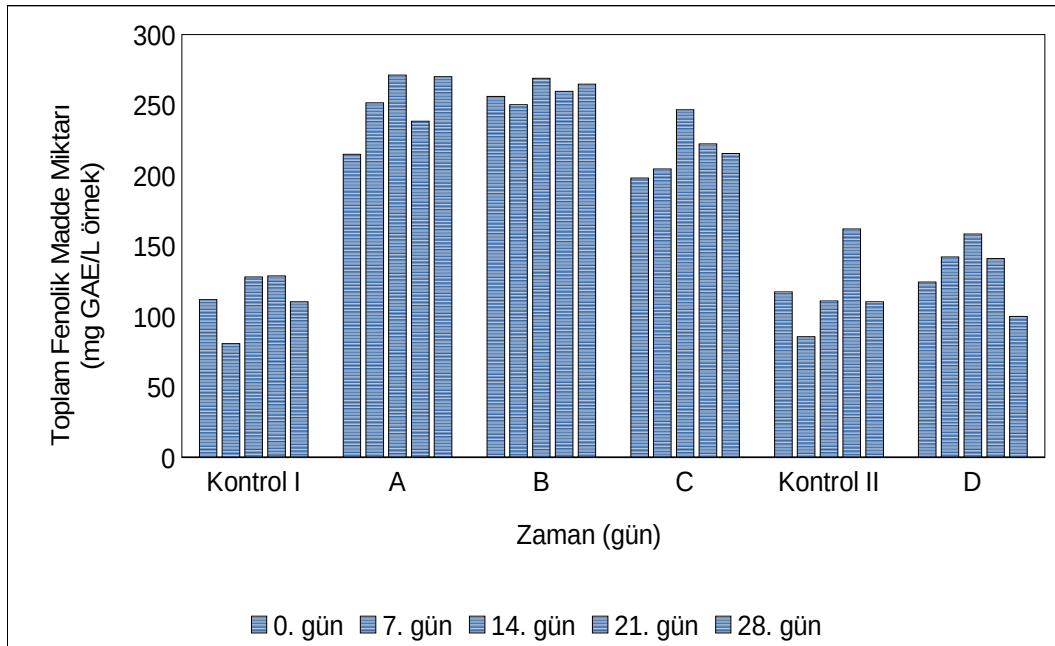
Lizozom, arap zıncığı, peynir altı suyu proteini ve kitozan ile kaplanmış lipozomların toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metodu ile 1 aylık depolama süresi boyunca ölçülmüştür. Sonuçlar mg gallik asit denkliği/ L örnek olarak verilmiştir. Kontrol ve biyopolimer ile kaplanmış numunelerin 1 ay depolama süresinceki toplam fenolik madde miktarı Şekil 54'te gösterildiği gibidir. Lizozom, arap zıncığı, peynir altı suyu proteini ve kitozan ile kaplanmış lipozomların toplam fenolik madde miktarı kontrol numunelerinin sonucu ile karşılaştırıldığında, biyopolimer kaplı lipozomların toplam fenolik madde miktarının daha fazla olduğu görülmüştür. Kitozan kaplanmış lipozomların toplam fenolik madde miktarının lizozom, arap zıncığı ve peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomlara göre çok daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç yeşil çay ekstraktının içerdiği fenolik maddelerin kitozan ile etkileşimi sonucu erişilebilirliğinin azalması ile açıklanabilir.

1 aylık depolama süresinin ilk ve son günlerindeki toplam fenolik madde miktarı karşılaştırıldığında arap zıncığı, peynir altı suyu proteini ve kitozan kaplı lipozomların fenolik madde miktarında önemli bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Öte yandan, lizozom ile kaplanmış lipozomların depolama süresinin ilk ve son günlerindeki fenolik madde miktarlarında önemli

bir fark olduğu gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Depolama süresi boyunca her hafta yapılmış olan toplam fenolik madde miktarı deneylerinin sonucunda dalgalanmalar görülmesi, biyopolimer kaplanmış lipozomların bulunduğu ortamda serbest halde bulunan biyopolimerlerin toplam fenolik madde miktarı deneyinde bulunan Folin-Ciocalteu reaksiyon maddesi ile etkileşimi ile açıklanabilir.

Bu dalgalanmalar kaplamasız lipozomlar için, 7. gününde TPC sonuçlarında belirgin düşüş ve 14. günde önemli bir artış olarak gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar, Klimczak, Małecka, Szlachta, vd. Gliszczyńska-Świąto (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, portakal suyunun 4 ay depolanmasından sonra TPC'de bir düşüş ve ardından 6 ay sonunda belirgin bir artış olarak gözlemlenmiştir. Kaplamasız lipozomların TPC sonuçlarına benzer şekilde, depolama süresinin 14. gününe kadar TPC değerlerinde artış ve sonraki günlerdeki düşüş arap zamkı ile kaplanan lipozomlar dışındaki tüm biopolimer kaplı lipozomlar için görülmüştür. Bir başka çalışmada, Piljac-Žegarac, Valek, Martinez, vd. Belščak (2009) altı farklı meyve suyunun TPC değerlerinin depolama süresinin ilk günlerinde artıp, ilerleyen günlerde azaldığını belirtmiştir. Fenolik bileşiklerin depolama süresi boyunca bu dalgalanma davranışı, fenolikler ile Folin-Ciocalteu reaktifi arasındaki olası reaksiyondaki değişimlere ve bazı fenolik bileşiklerin depolama süresinde parçalanmasına bağlanmıştır (Piljac-Žegarac vd., 2009).

28 günlük depolamanın sonunda, kaplanmamış ve kaplanmış lipozomların ilk gündeki TPC değerlerinin korunduğu görülmüştür. Sadece, lizozom ile kaplı lipozomların TPC değerinin depolama süresinin sonunda arttığı saptanmıştır. TPC deneylerinin sonucuna göre, lipozomların 28 gün boyunca 4°C'de bekletilmesi lipozomların içindeki yeşil çay fenollerinin TPC değerlerini azaltmadığı görülmüştür. Bu sonuç, Kevers vd. (2007) ve Piljac-Žegarac vd. (2009) tarafından yürütülen deneylerin sonucu ile tutarlılık göstermektedir. Kevers vd. (2007) birçok meyve ve sebzenin, Piljac-Žegarac vd. (2009) ise çalışmasında altı çeşit meyve suyu numunesinin TPC değerlerinin depolama süreci boyunca korunduğunu göstermiştir.



Şekil 54. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki toplam fenolik madde miktarları. Kontrol I; Saf suda hazırlanmış kaplanmamış, A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zamkı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış, Kontrol II; asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış kaplanmamış, D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar

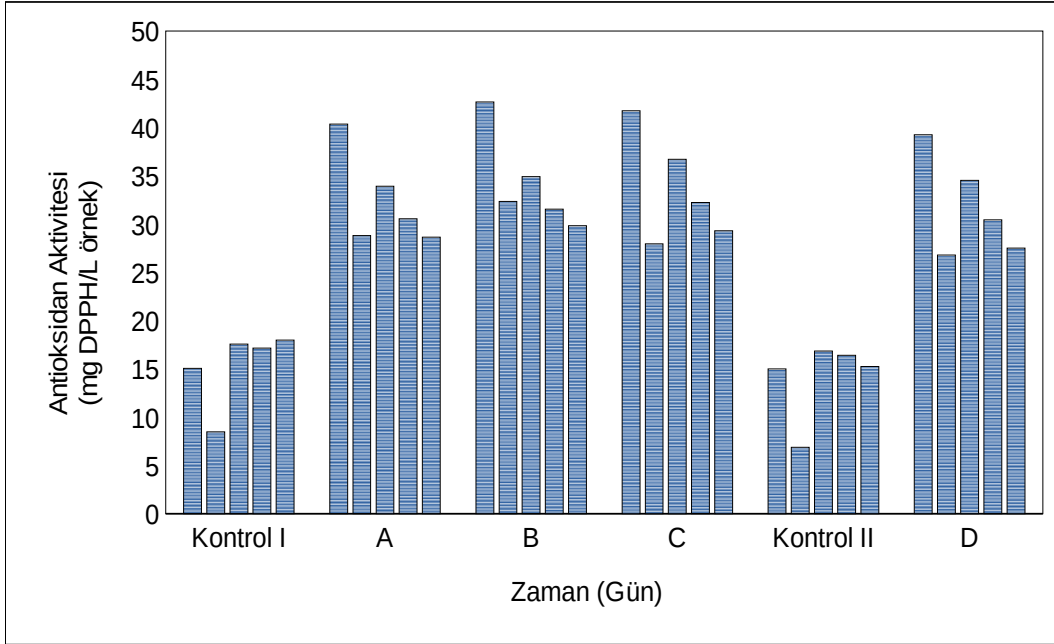
4.2.11 Antioksidan Aktiviteleri

Lizozom, arap zamkı, peynir altı suyu proteini ve kitozan ile kaplanmış lipozomların antioksidan aktiviteleri DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metodu ile 1 aylık depolama süresi boyunca ölçülmüştür. Lipozomların antioksidan aktiviteleri mg DPPH/L örnek olarak verilmiştir. Biyopolimer ile kaplanmış lipozomların ve yeşil çay ekstraktı özütü ile doldurulmuş kontrol numunelerinin 1 ay depolama süresindeki antioksidan aktiviteleri Şekil 55'te gösterilmiştir. Lizozom, arap zamkı, peynir altı suyu proteini ve kitozan ile kaplanmış lipozomların antioksidan değerleri sırasıyla 40.35, 42.65, 41.72 ve 39.24 mg DPPH/L örnek olarak bulunmuştur. Saf su ve asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış kontrol numunelerinin ise antioksidan aktiviteleri sırasıyla 15.05 ve 14.99 mg DPPH/L örnek olarak hesaplanmıştır. Biyopolimerler ile kaplanmış lipozomların antioksidan aktivitelerinin kontrol numunelerine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Biyopolimerler ile kaplanmış lipozomların hem toplam fenolik madde miktarlarının hem de antioksidan aktivitelerinin kontrol

numunelerine göre çok daha fazla oluşu, yapılan enkapsülasyonun yeşil çay özütünde bulunan fenolik maddelerin korunmasında etkili olduğunu göstermektedir. 1 aylık depolama süresinin ilk ve son günlerindeki antioksidan aktivite değerleri karşılaştırıldığında biyopolimerler ile kaplanmış lipozomların antioksidan aktivitelerinde önemli bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Biyopolimerler ile kaplanmış lipozomların antioksidan aktiviteleri 1 aylık depolama sürecinin 28. gününde en düşük değere sahip olmasına rağmen bu değer, kontrol numunelerinin ilk günündeki (en yüksek antioksidan aktivitesi sonucunun hesaplandığı gün) değerine göre çok daha yüksektir. Bu sonuçtan anlaşıldığı gibi biyopolimer kaplamalı lipozomların antioksidan aktivitesi depolama süresi ilerledikçe azalmasına rağmen, kontrol numuneleri ile karşılaştırıldığında yeşil çay özütünün içerdiği fenolik maddelerin antioksidan aktivitelerinin önemli bir şekilde arttırdığı görülmektedir ($p\leq 0.05$).

TPC sonuçlarına benzer şekilde, AA değerlerindeki dalgalanmalar, kaplanmamış ve biyopolimer kaplı lipozomlar için de 4 °C'de 28 gün depolanma sırasında görülmüştür. Şekil 55'te de görüldüğü gibi, 7. günde AA değerindeki azalma, hem kaplanmamış hem de kaplanmış lipozomlar için görülmüştür. Bu azalışı, depolamanın 14. günündeki AA değerindeki bir artış izlemiştir. Depolamanın 14. gününden itibaren biyopolimer kaplı lipozomların AA değerleri sürekli olarak azalmaya başlamıştır. Öte yandan, kaplanmamış lipozomların AA değerleri 14. günden sonra değişmeyip, sabit kalmıştır. Katesin, resveratrol ve üzüm çekirdeğinin (Pinelo, Rubilar, Sineiro, vd. Nuñez, 2005), elma suyunun (Pinelo, Manzocco, Nuñez, vd. Nicoli, 2004), soğutulmuş kerevizin (Vina ve Chaves, 2006) ve siyah havuç, kıvılcık, yaban mersini, nar, çilek ve vişne suyunun (Piljac-Žegarac vd., 2009) antioksidan aktivite değerlendirmeler çalışmaları ile gösterilmiştir. Yeşil çay özütü ile dolu lipozomların antioksidan değerlerinde gözlemlenen artış, yeşil çaydaki polifenollerin muhtemel polimerizasyon tepkimeleri ile açıklanabilir. Polimerizasyon derecesinin belirli bir değeri aşması moleküler kompleksite ve sterik engelde artışa yol açmaktadır. Bu artış, fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarının DPPH radikalleri ile reaksiyona girmesini azaltıp, antioksidan aktivite değerlerinin düşmesine sebep olmaktadır (Hagerman vd., 1998; Piljac-Žegarac vd., 2009). Bu, 14. günde artan kaplanmış lipozomların AA değerlerindeki azalmanın muhtemel bir nedeni olabilir. Ek olarak, Pinelo vd. (2005) ortamın kimyasal özelliklerinin, depolama sıcaklığının ve süresinin polifenollerin serbest radikallere karşı reaktifliğini etkilediğini belirtmiştir. Çalışmada 22, 37, 60 °C depolama sıcaklığının, ortamın kimyasal özelliklerinin (etanol, metanol ve su) katetamin, resveratrol ve üzüm ekstraktının reaksiyon süresi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, düşük sıcaklıklarda maksimum

AA değerinin elde edilmesi için daha uzun inkübasyon süresinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bu açıklama, yeşil çay ekstraktı içeren lipozomların AA değerinin artışının daha önceki çalışmalara kıyasla daha uzun depolama süresinde gerçekleşmesinin sebebini açıklayabilir.



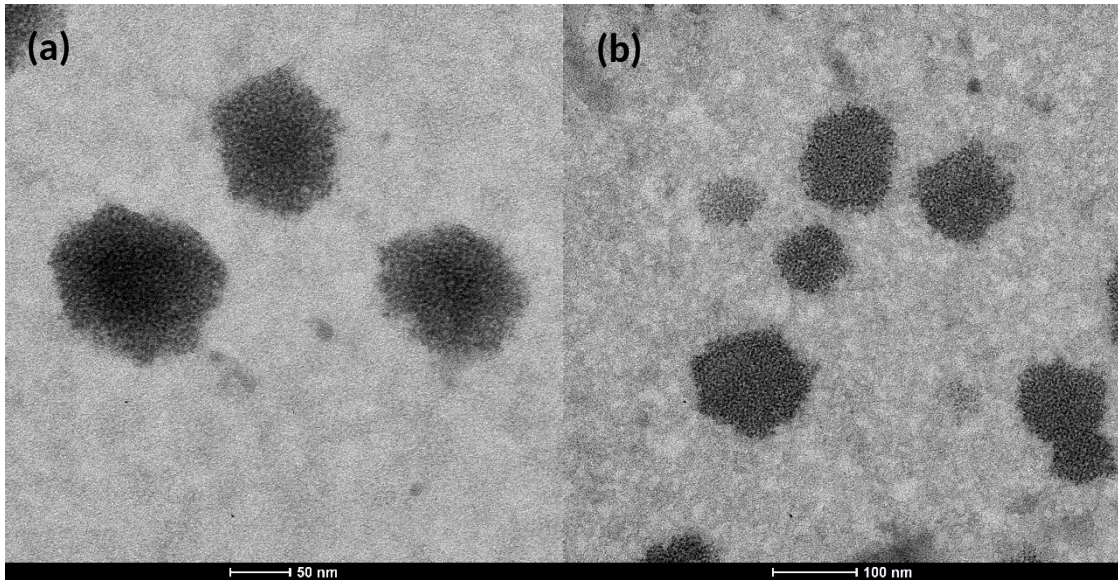
Şekil 55. Farklı biyopolimer çeşitleri ile kaplanmış lipozomların 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerdeki antioksidan aktiviteleri. Kontrol I; Saf suda hazırlanmış kaplanmamış, A; lizozom ile kaplanmış, B; arap zambı ile kaplanmış, C; peynir altı suyu proteini ile kaplanmış, Kontrol II; asetat tampon çözeltisinde hazırlanmış kaplanmamış, D; kitozan ile kaplanmış lipozomlar

4.2.12 Transmisyon Elektron Mikroskobu

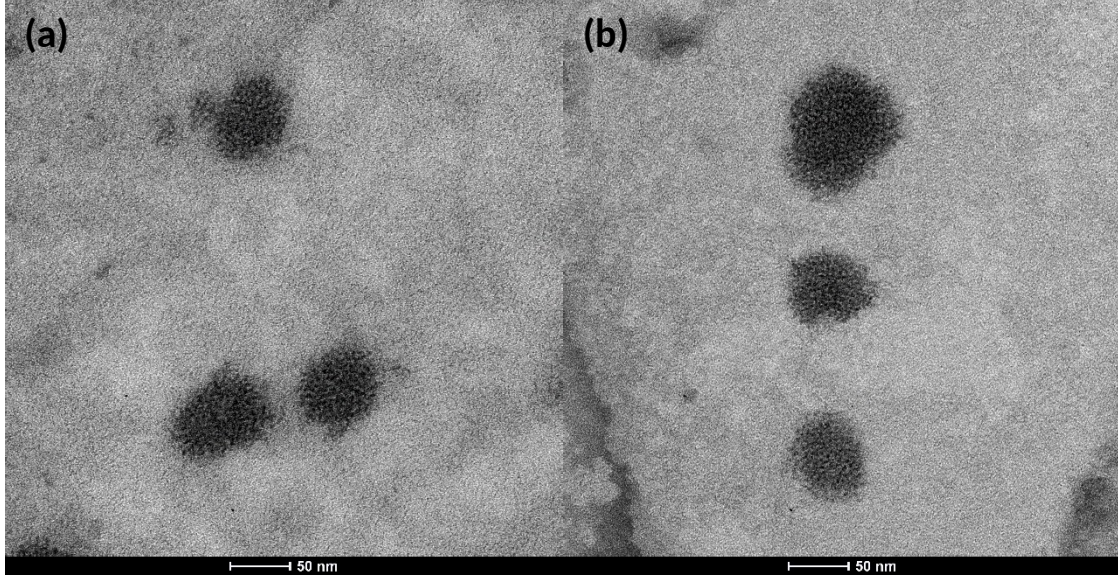
Biyopolimer ile kaplanmış lipozomların morfolojisi hakkında bilgi edinmek ve parçacık boyutu dağılım sonuçlarını teyit etmek amacıyla lipozomların transmisyon elektron mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Biyopolimer kaplı lipozomlar için TEM görüntülerindeki kontrastı artırmak için fosfotungstik asit ile negatif boyamanın yapılması gerekli görülmüştür. Negatif boyama methodu ile, arka plan boyama malzemesi ile boyanmıştır. Bununla birlikte, negatif boyamanın kullanılması, lipozomun yapısında değişikliklere neden olabilir ve boyama için kullanılan madde, koyu ve hafif saçak oluşumuna sebep olabilir. Bu problemlerin, lipozomun katman yapısı yanlış yorumlama yol açacağı belirtilmemiştir. Ayrıca, elektron mikroskop haznesinde gerçekleşen vakumlama, lipozomların dehidrasyonuna neden olabilir ve bu

morfolojide bir değişikliğe sebep olabilmektedir (Bibi vd., 2011; Chen, Zhu, Huang, Wang, ve Yan, 2013).

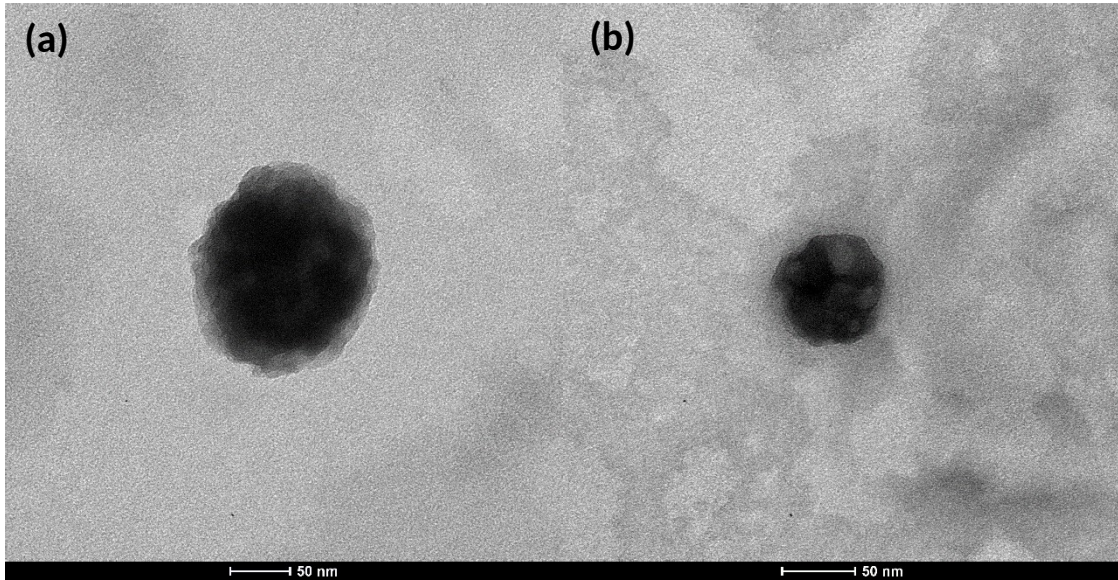
Lizozom, arap zımkı ve peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomların TEM görüntüleri sırasıyla Şekil 56, 57 ve 58'de görölmektedir. Kaplanmış lipozomların bir önceki kısımda açıklanan yeşil çay dolu ve kaplanmamış lipozomlara benzer bir şekilde küresel bir şekle sahip oldukları gözlemlenmiştir. Depolama süresinin ilk gününde oldukça düzgün bir yapıya sahip biyopolimer kaplı lipozomların 28 gün sonunda da yapılarının korunduğu tespit edilmiştir. İlk kısımda 14. günde dağılmaya başlayan kaplanmamış lipozomların dayanıklılığı lipozomların biyopolimer kaplanması ile artırılmıştır. Ek olarak, TEM görüntülerinde lipozomların parçacık boyutlarının, parçacık boyutu analizi deneylerindeki sonuçlarla benzer olduğu görölmüştür. Ayrıca, lipozomların yüzeyinde görülen sıkı arap zımkı, peynir altı suyu proteini ve lizozom tabakasının varlığı parçacık boyutu kısmında bahsedilen biyopolimerlerin Van der Waals ve sterik etkileşimler yoluyla lipozomal yüzeye adsorbe olabileceği hipotezini desteklemektedir.



Şekil 56. Lizozom ile kaplanmış lipozomların TEM görüntüleri; (a):Depolama süresinin ilk günündeki, (b):Depolama süresinin son günündeki



Şekil 57. Arap zımkı ile kaplanmış lipozomların TEM görüntüleri; (a):Depolama süresinin ilk günündeki, (b):Depolama süresinin son günündeki



Şekil 58. Peynir altı suyu proteini ile kaplanmış lipozomların TEM görüntüleri; (a):Depolama süresinin ilk günündeki, (b):Depolama süresinin son günündeki

4.3 Dolu (Yüklenmiş) Lipozom sistemlerinden salınımın matematiksel modellemesi

Projede salınım deneyleri için matematiksel modelleme yapılacağı belirtilmişti. Ancak yeşil çay özütü ile yüklenmiş numunelerin fenolik maddeleri salım davranışı difüzyon modeline uygun bir şekilde ilerlememiştir. Klasik bir difüzyon eğrisi elde edilemediğinden matematiksel modelleme yapılmamıştır.

4.4 Tasarlanan Lipozom Sistemlerinin Spreylenerek Gıdalara Uygulanması

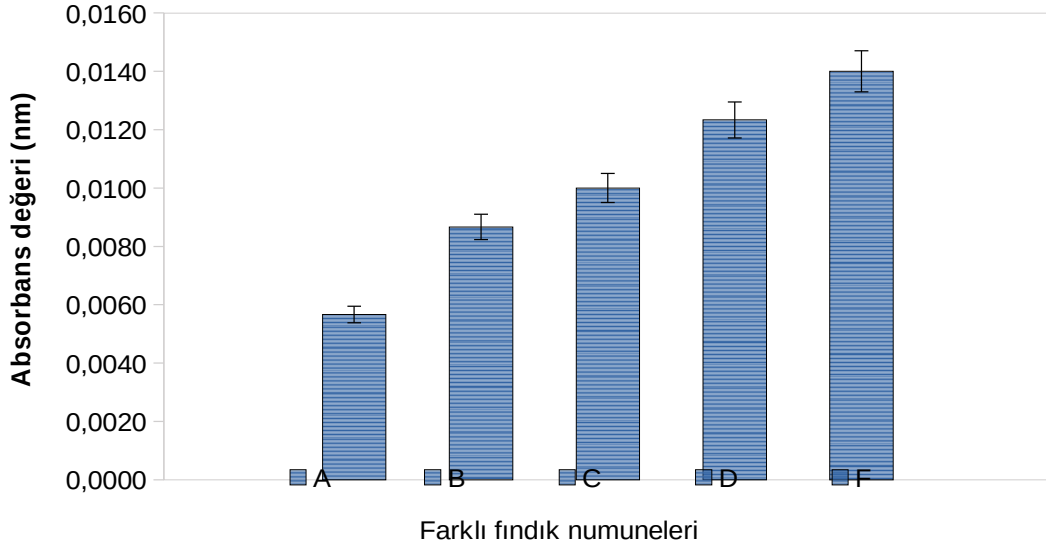
Çalışmanın son kısımda, önceki kısımlarda tasarlanmış farklı lipozom çözeltilerinin kabukları soyulmuş bütün haldeki fındıklara uygulanması planlanmıştır. Ancak yapılan ön denemeler sonucunda fındıktan fındığa oksidasyon seviyelerinin fark ettiği tespit edilmiş, çözeltilerin etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi adına çekilmiş fındık kullanılmıştır.

Fındıklar üzerinde uygulama yapılmadan önce spreyleme işlemini optimize etmek için spreyn farklı mesafelerden ne kadar alana uygulanabildiği tespit edilmiş, farklı sprej tipleri içerisinde mümkün olan en homojen dağılımı sağlayan sprej seçilmiştir. Hazırlanan farklı lipozom çözeltileri için, fark teşkil etmeksizin fındık numunelerine spreyleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak hiç spreyleme yapılmamış fındık numuneleri kullanılmıştır.

Fındık numuneleri halkın saklama ve tüketim eğilimi göz önünde bulundurularak, evdeki saklama koşullarını yansıtması amacıyla, normal saklama koşullarında (oda sıcaklığında) bekletilerek deneyler yapılmıştır. Spreyleme işleminin kontrolünü yapmak amacıyla, kontrol grubu olarak hiç spreyleme yapılmamış fındık numunesi de spreyleme yapılmış fındık numuneleri ile aynı koşullarda saklanmıştır.

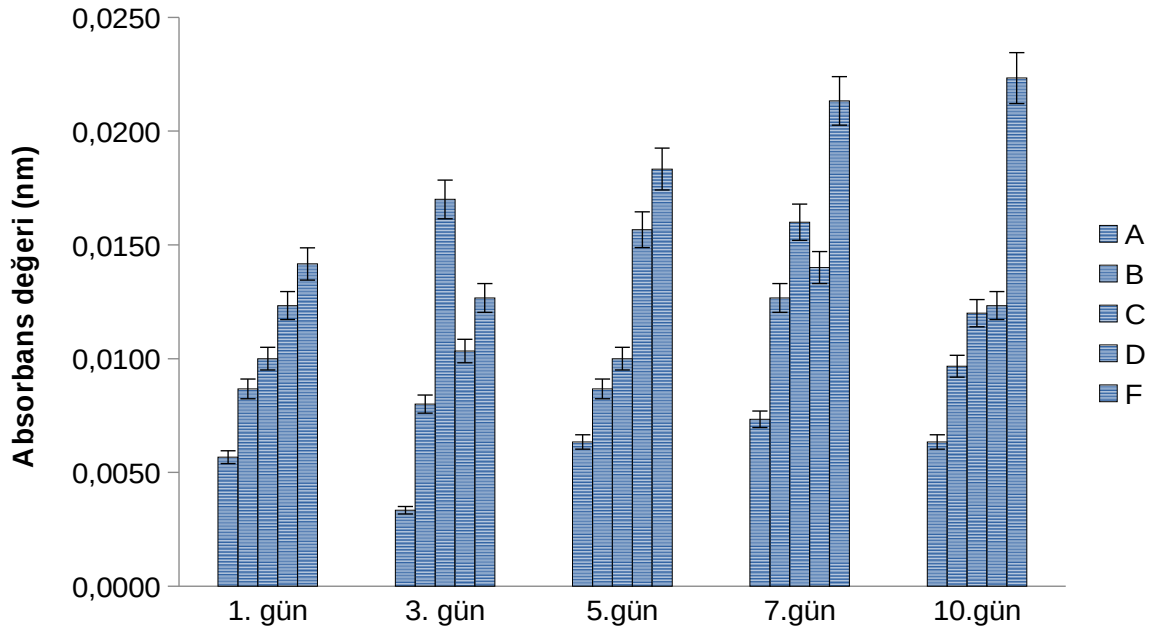
Hazırlanan 4 farklı lipozom çözeltisinin oksidasyonu geciktirme üzerinde etkisini incelemek için deneyler yapılmıştır. Her numune için ayrı ayrı ekstraksiyon ile elde edilen fındık yağı hidroperoksit tayini için kullanılmıştır. Lipit hidroperoksit ölçümü için proje kapsamında belirtildiği gibi Alamed vd.'nin metodu kullanılmıştır.

Spreylenen ürünlerde hidroperoksit ölçümü—model sistemlerde olduğu gibi—ilk gün için spreylemenin hemen öncesinde ve 1 saat sonrasında yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 59'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere antioksidan salınımı gerçekleşmiş olup, yüklemeli lipozom çözeltileri daha az absorbans değerine sahip olduğu ölçülmüştür.



Şekil 59. Farklı lipozom çözeltilerinin fındık üzerine spreyleneceği sonrası (1.saat) hidroperoksit ölçümü sonuçları. (A: Distile su ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, B: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, C: Distile su ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, D: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri, F: Spreyleme yapılmamış fındık numuneleri)

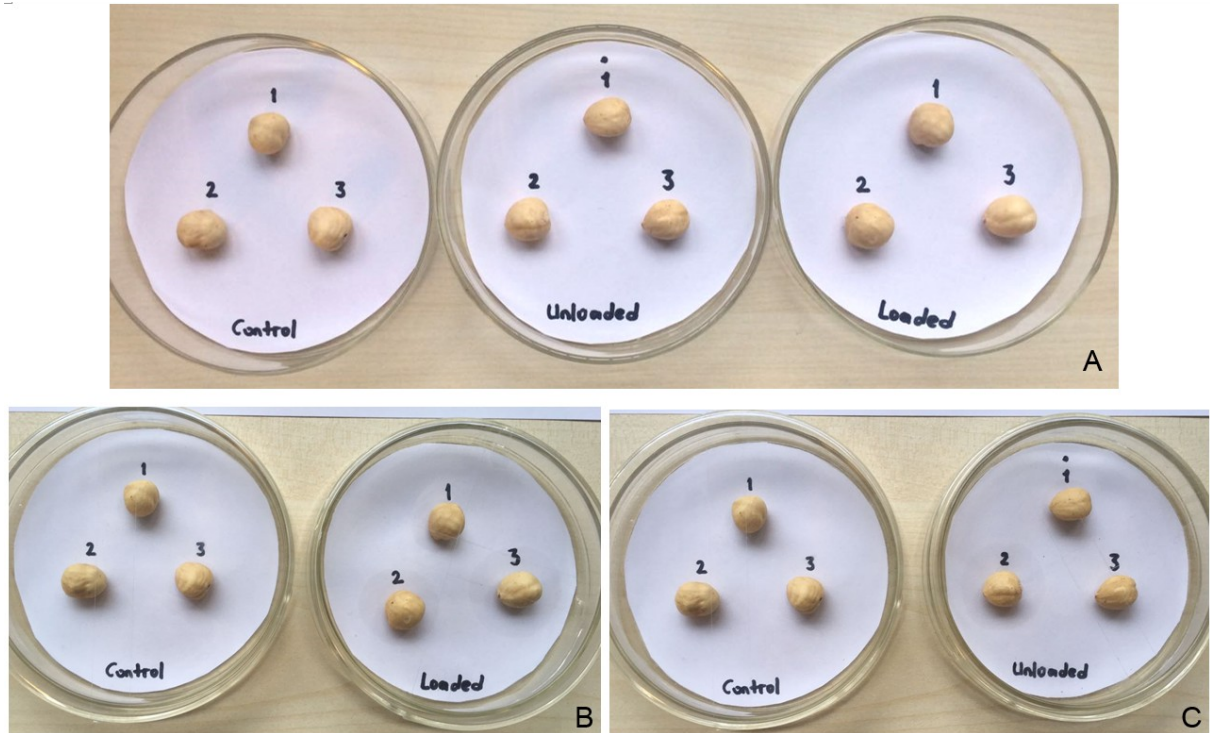
Depolama çalışmasının sonuçları hazırlanan spreylemelerin oksidasyona maruz kaldığında istenmeyen koku ve tatlar oluşturan fındık benzeri gıdalarda kullanılabilirliğini yansıtmaması açısından oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlar Şekil 60'ta verilmektedir. Şekilde de görülebileceği gibi en yüksek absorbans değerine spreyleme yapılmamış fındıklar ulaşırken, distile su ile hazırlanmış yeşil çay yüklemeli lipozom ile spreylemiş fındık numuneleri en az absorbans değerine sahiptir. Bu da göstermektedir ki hazırlanan lipozomal spreylemeler kontrollü salınım gerçekleştirerek birincil lipit oksidasyon ürünlerinin oluşumunu engellemiştir. Hazırlanan yeşil çay yüklemeli lipozom çözeltilerinin fındıklar üzerinde oksidasyonu geciktirmesi diğer gıdalar için uygulanabilirliği için güzel bir emsal teşkil etmektedir.



Şekil 60. Farklı lipozom çözeltilerinin fındık üzerine spreyleneceği sonrasında zamana bağlı hidroperoksit ölçümü sonuçları. (A: Distile su ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; B: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemeli lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; C: Distile su ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; D: Asetat tampon çözeltisi ile hazırlanmış yüklemesiz lipozom püskürtülmüş fındık numuneleri; F: Spreylenmemiş fındık numuneleri)

Spreylenmenin uygulandığı gıdadaki koku değişimlerini anlamak amacıyla duyu analizi* testleri de gerçekleştirilmiştir. Duyusal analiz 40 gün bekletilmiş spreylenecek ve spreylenecek fındık numuneleri için yapılmıştır (Şekil 61). İlk gün birbirine büyüklük, renk ve yapı açısından en çok benzeyen fındıklardan her bir işlem için 3'er örnek alınmıştır. Bütün halinde alınan bu 9 numuneden üçünün üzerine boş lipozom, üçüne yeşil çay özütü ile doldurulmuş lipozom çözeltisi sıkılmış ve son üçlü kontrol olarak herhangi bir işlem uygulanmadan bırakılmıştır. Hazırlanan numuneler replikeler aynı kaptaki üzere toplam 3 cam kaptaki oda koşullarında bekletilmiştir. Panelistlere numuneler hakkında bilgi verilmeden, önceden kodlanmış numuneler gösterilmiş ve "A" ve "B" numunelerini "C" kodlu kontrol numuneleri ile görsel ve kokusal olarak karşılaştırmaları istenmiştir. 34 kişinin katıldığı duyu analizi sonuçları varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüketicilerin fındıkları beğeni sıralamasına koymasına istenilen sorunun analizi sonucu; yeşil çay özütü lipozom sıkılmış numunelerin istatistiksel olarak farklı

çıkmayan kontrol ve boş lipozom sıkılmış numunelere göre daha tercih edilir olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). Görsel değerlendirmenin sonucu yine dolu lipozomların tüketiciye daha cazip geldiğini gösterirken kokusal analizlerde dolu ve boş lipozom sıkılmış fındık numunelerinin birbirinden ve kontrolden kayda değer derecede farklı olmadığı sonucu çıkmıştır. Profesyonel olarak düşünüldüğünde boş lipozomların fındıkta oksidasyonu arttırarak matlaşma ve koyulaşmaya bağlı bir renk değişimine yol açacağı fakat yüklü lipozomlarda bunun önelleneyeceği ve fındığın parlaklığının renk tonunun korunacağı düşünülmektedir. Görsellerde bu olgu ile çelişen bir duruma rastlanmamıştır.



Şekil 61. (A) Duyusal analiz için hazırlanan fındıkların spreylenemeden önceki fotoğrafı; soldan sağa kontrol, yeşil çay yüklenmiş lipozom spreylenecek ve boş lipozom spreylenecek fındıklar görülmektedir. (B) İlk gün yeşil çay özütü yüklü lipozom spreylenecek ve duyusal analizde kullanılmak üzere oda koşullarında 40 gün saklanan fındıklar ve kontrol (control) numuneleri; (C) İlk gün boş lipozom spreylenecek ve duyusal analizde kullanılmak üzere oda koşullarında 40 gün saklanan fındıklar ve kontrol (control) numuneleri.

*Duyusal analiz deneylerinde tat ile ilgili herhangi bir ölçüm yapılamamıştır. Mikroakışkanlaştırıcı temizlenirken propanol kullanıldığından, az bir miktar olsa bile lipozomların propanol içermesi ihtimalinden dolayı tüketicilere tat testleri yapılmamıştır.

5. SONUÇ

Çalışmanın ilk kısmında lipozom hazırlama parametreleri ve yöntemlerine karar verilmesi amaçlanmıştır. Hazırlama yöntemlerinde iki ana metod USK ve MA kullanılmıştır. Bunlardan direkt uç tipi USK sonuçları projede kullanılan lipozom konsantrasyonu (%1) için 5 dakika uygulamayla minimum parçacık boyutunu vermiş ve sürenin artırılması parçacık boyutunu değiştirmemiştir. Bu amaçla diğer bölümlere 5 dakikalık işlem ile devam edilmiştir. Diğer yandan MA uygulaması artan basınçla azalan parçacık boyutları ve artan transparanlık sağlamış, USK'dan daha etkili olduğu saptanan bu yöntem için de optimum basınç 1300 bar 5 pas olarak belirlenmiştir.

Hazırlama parametreleri olarak lesitin tipi ve çözücü tipi ile saklama sıcaklığına karar vermek amacıyla yine parçacık boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Soya lesitini (S75) yumurta lesitinine göre (E80) daha küçük parçacıklar vermiş ve pratik olarak renk değişimi ve kullanım kolaylığı yönlerinin de durumu desteklemesiyle lesitin kaynağı olarak soyanın kullanılması kararlaştırılmıştır. Farklı kaplama maddeleri ve uygulama yöntemleri için eşitlik sağlaması açısından deneylerde kullanılan 3 farklı çözücü arasından DS ve ATÇ daha uygun bulunmuş, fosfolipidlerin zeta potansiyelini sıfıra yaklaştırarak instabilite yaratan FTÇ örneklerinin bu şekilde kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Boş lipozomların karakterizasyonu amaçlı yapılan hidroperoksit ve NMR relaksometre deneyleri yapılmıştır. Lipid doğası sonucu ürünlerin hepsinde oksidasyon seviyeleri zamanla yükselmiş ve beklendiği üzere oda sıcaklığında buzdolabı sıcaklığına göre daha çok hidroperoksit oluşumu görülmüştür. Burada dikkat çeken bir durum, E80 lesitinlerinin oda sıcaklığında daha buzdolabına göre daha çok oksitlenmesine rağmen S75'e göre bu sıcaklık değişiminden daha az etkilendiğinin saptanmış olmasıdır. Bu yönden bakıldığında oda sıcaklığı çalışmaları için E80 seçeneğinin değerlendirilmesinin daha doğru olabileceği önerilmiş, fakat buzdolabında çok daha iyi sonuç veren 4 °C-S75 kombinasyonu ile projeye devam edilmesi uygun görülmüştür.

Burada yürütülen parçacık boyutu ölçümlerinde zamanla genel bir değişiklik eğilimi görülmemiş ve kimyasal değişikliklerin bu şekilde saptanamayacağı durumda NMR relaksometre deneylerinden faydalanılmıştır. Parçacık boyutunun mutlak değişiklik gösterdiği metod parametreleriyle (MA için basınç ve USK için süre) oluşan değişimler yüksek korelasyon (>0.86) ile NMR ile de saptanabilmiştir. Bunun dışında moleküler düzeyde bilgi verebilecek bu deneylerin T₂ karşılaştırmaları, parçacık boyutunun ötesinde oluşabilecek kimyasal değişimlerin tespiti ile ilgili gelecek vaad eden sonuçlar vermiştir.

Projenin sonraki kısmında, yeşil çayın içinde bulunan fenolik bileşenlerin antioksidan aktivitesini korumak için % 0.1 yeşil çay özütü içeren karışım %1 lesitin kullanılarak saf su ve asetat tampon çözeltisinde mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonikasyon teknikleri ile enkapsule edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, homojenizasyon tekniği ve ortamın pH'nın bir aylık depolama sürecinde yeşil çay özütünün stabilitesine etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile saf suda hazırlanan yeşil çay özütü ile dolu lipozomlar depolama sürecinin ilk ve son günlerinde parçacık boyutu, toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivitesinde önemli bir fark göstermediği ($p>0.05$) için daha dayanıklı bir sistem olduğu sonucuna varılmıştır. Ek olarak, bu sonuç transmisyon elektron mikroskopunda aynı lipozom sisteminin daha düzgün bir şekle sahip olmasıyla desteklenmiştir. Mikroakışkanlaştırıcı tekniği ile daha dayanıklı lipozomlar elde edildiği için projenin bir sonraki kısmı olan "Lipozomların katmanlı depozisyon yöntemi ile polimer kullanarak kaplanması" kısmında lipozomları oluşturmak için sadece mikroakışkanlaştırıcı tekniği kullanılmıştır.

"Lipozomların katmanlı depozisyon yöntemi ile polimer kullanarak kaplanması" kısmında, 1 aylık depolama süresinin 14. gününde yapılarında bozulma görülen kaplanmamış lipozomların dayanıklılığı lipozomların biyopolimer kaplanmaları sayesinde artırılmıştır. Biyopolimer kaplanmış lipozomların kontrol numunelerine göre daha yüksek antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarı içerdiği görülmüştür. Kaplanmış lipozomların parçacık boyutunda 1 aylık depolama süresi boyunca önemli bir değişim görülmemiştir. Zeta potansiyelleri göz önünde bulundurulduğunda biyopolimer kaplı lipozomların dayanıklılığının 1 ay boyunca korunduğu gözlemlenmiştir. TEM görüntüleri lipozomların 28 gün sonunda yapılarını koruduğunu göstermiştir. Özetlemek gerekirse, yapılan tek katmanlı biyopolimer kaplaması yeşil çay dolu lipozomların dayanıklılığının korunmasına önemli bir şekilde katkı sağladığı görülmüştür.

Manyetik Rezonans Görüntüleme Deneyleri, Bilkent Üniversitesi Ulusal Manyetik Rezonans (UMRAM) Görüntüleme Merkezi'ndeki 3 Tesla Gücündeki klinik tipi MRG ekipmanının kullanarak gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme deneyleri farklı sekanslar kullanarak denenmiştir ve bir atkım görüntüleri 3. Ara raporda verilmiştir. Lakin klinik tipi MRG sisteminden elde edilen sonuçlar, ekipmanın lipozom numuneleri için küçük bir rf sargısı olmadığından ve bu durum manyetik alanda heterojenite yarattığından elde edilen sonuçlarda tam bir uyum sağlanamamıştır. Özellikle zamana bağlı deneylerde fark pek gözlenmemiştir. Bu neden projede MRG' den çok NMR sonuçlarına odaklanılmış ve sadece NMR Relaksometre deney sonuçlarını içeren bir makale hazırlanmıştır.

Proje sonuçlarından 2 bilimsel makale yayınlanmış, 2 uluslararası bildiri, 3 ulusal poster bildirisi, 1 sözlü bildiri sunulmuştur. Ayrıca Şubat 2016'da bir Yüksek Lisans Tezi tamamlanmıştır. Projenin NMR sonuçlarının birleştirilmesiyle yazılan diğer bir makale *Food Research International* dergisinde değerlendirme sürecindedir. Ayrıca biyopolimer kaplamanın lipozomlar üzerindeki etkisini göstermek amacıyla da bir makale hazırlanma aşamasındadır. En geç Haziran ayı itibarıyla, dolu lipozomların karakterizasyonunun incelendiği 2. bir Yüksek Lisans Tezi tamamlanacaktır.

Proje aynı zamanda FP1405 Cost Aksiyonu kapsamındadır. Bu kapsamda 2 farklı toplantıya katılmıştır. Mart 2017'de proje çalışanlarından Damla Dağ Short Term Scientific Mission programı kapsamında 1 aylığına İsviçre'deki Zurich University of Applied Science (ZHAW) bölümüne ziyaretçi araştırmacı olarak gitmiştir. COST Aksiyonu kapsamında gerçekleşen STSM kapsamında öğrenci gittiği üniversitede lipozomların içerisine *eugenol* enkapsüle etmiş ve bu konuda bir takım analizler yapmıştır. Eugonal yüklü lipozomların geliştirilmesi de bundan sonra denecek başka bir çalışma olacaktır. COST Aksiyonu ile ilgili bilgiler 'COST Aksiyonu Raporu' dosyasında ek olarak sunulmuştur.

6. Kaynaklar

1. Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., Decker, E. A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969–2976. doi:10.1021/jf803436c
2. Allsopp, K., Wright, I. Lastockin, D., Mirotnik, K., Kantzas, A. (2005). Determination of oil and water compositions of oil / water emulsions using low field NMR relaxometry, *Journal of Canadian Petroleum Technology*, 40(7), 58–61. <https://doi.org/10.2118/01-07-05>
3. Ananingsih, V. K., Sharma, A., & Zhou, W. (2013). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, 50(2), 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.004>
4. Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>
5. Bhat, R., Kamaruddin, N. S. B. C., Min-Tze, L., & Karim, A. A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1295–1300. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.04.002>
6. Bibi, S., Kaur, R., Henriksen-Lacey, M., McNeil, S. E., Wilkhu, J., Lattmann, E., ... Perrie, Y. (2011). Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*, 417(1–2), 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.021>
7. Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese Medicine*, 5(13), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-5-13>
8. Chen, C., Zhu, S., Huang, T., Wang, S., & Yan, X. (2013). Analytical Methods Analytical techniques for single-liposome characterization. *Analytical Methods*, 5(2150), 2150–2157. <https://doi.org/10.1039/c3ay40219c>
9. Chun, J. Y., Choi, M. J., Min, S. G., & Weiss, J. (2013). Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.024>
10. Düzgüneş, N. (Ed.). (2005). Liposomes, Part E. In *Methods in Enzymology* (p. 528). Academic Press.
11. Gibis, M., Rahn, N., & Weiss, J. (2013). Physical and oxidative stability of uncoated and

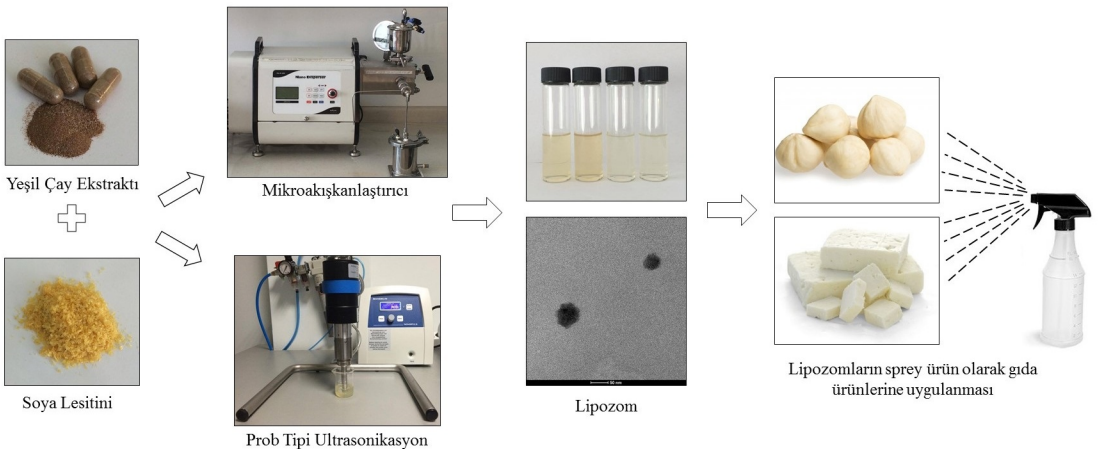
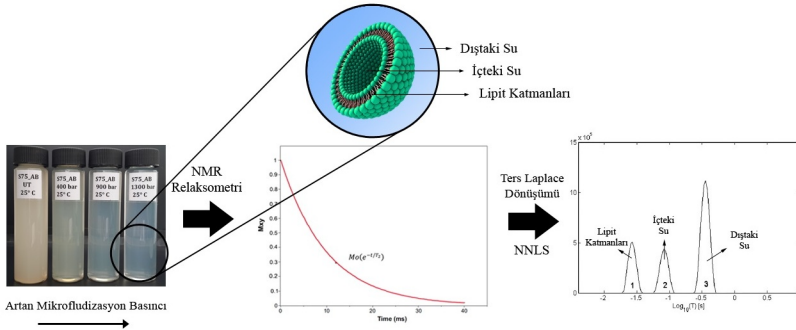
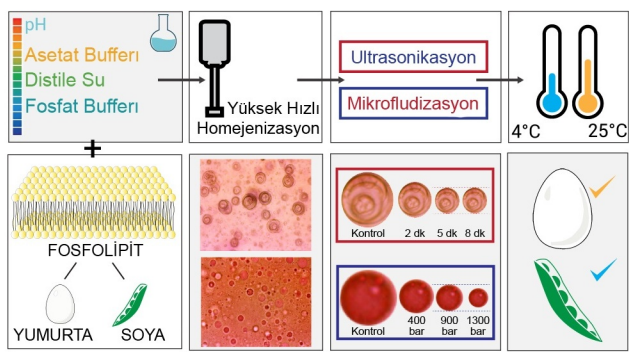
- chitosan-coated liposomes containing grape seed extract. *Pharmaceutics*, 5(3), 421–433. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030421>
12. Gibis, M., Vogt, E., & Weiss, J. (2012). Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food & Function*, 3, 246. <https://doi.org/10.1039/c1fo10181a>
 13. Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887–1892. <https://doi.org/10.1021/jf970975b>
 14. Hashemi, R. H., Bradley, W. G., & Lisanti, C. J. (2010). *MRI: The Basics*. Lippincott Williams & Wilkins.
 15. Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S., & Cullis, P. R. (1986). Generation of Multilamellar and Unilamellar Phospholipid Vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40, 89–107.
 16. Hosseini, S. A., Gorjian, M., Rasouli, L., & Shirali, S. (2015). A comparison between the effect of green tea and Kombucha prepared from green tea on the weight of diabetic rats. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(January), 141–146. <https://doi.org/10.13005/bbra/1616>
 17. Jafari, S. M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.007>
 18. Janeiro, P., & Oliveira Brett, A. M. (2004). Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 518(1–2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.038>
 19. Kailaku, S. I., Mulyawanti, I., & Alamsyah, A. N. (2014). Formulation of Nanoencapsulated Catechin with Chitosan as Encapsulation Material. *Procedia Chemistry*, 9, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.028>
 20. Karacam, C. H., Sahin, S., & Oztop, M. H. (2015). Effect of high pressure homogenization (microfluidization) on the quality of Ottoman Strawberry (F. Ananassa) juice. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 932–937. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.064>
 21. Kentish, S., & Feng, H. (2014). Applications of power ultrasound in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(JANUARY), 263–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182537>

22. Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J. O., Dommès, J., & Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8596–8603. <https://doi.org/10.1021/jf071736j>
23. Kirtil, E., Oztop, M. H., Sirijariyawat, A., Ngamchuachit, P., Barrett, D. M., & McCarthy, M. J. (2014). Effect of pectin methyl esterase (PME) and CaCl₂ infusion on the cell integrity of fresh-cut and frozen-thawed mangoes: An NMR relaxometry study. *Food Research International*, 66(October), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.006>
24. Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012>
25. Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147–168. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>
26. Laye, C., McClements, D. J., & Weiss, J. (2008). Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. *Journal of Food Science*, 73(5), N7-15. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00747.x>
27. Li, M. K., & Fogler, H. S. (1978). Acoustic emulsification Part 2: Breakup of the large primary oil droplets in a water medium. *Journal of Fluid Mechanics*, 88, 513–528.
28. Lopes, N. A., Pinilla, C. M. B., & Brandelli, A. (2017). Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. *Food Hydrocolloids*, 70, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.016>
29. Lu, Q., Lu, P. M., Piao, J. H., Xu, X. L., Chen, J., Zhu, L., & Jiang, J. G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.044>
30. Madrigal-Carballo, S., Lim, S., Rodriguez, G., Vila, A. O., Krueger, C. G., Gunasekaran, S., & Reed, J. D. (2010). Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid. *Journal of Functional Foods*, 2(2), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.002>
31. Mady, M. M., & Darwish, M. M. (2010). Effect of chitosan coating on the characteristics of

- DPPC liposomes. *Journal of Advanced Research*, 1(3), 187–191.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.008>
32. Mariette, F. (2009). Investigations of food colloids by NMR and MRI. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(3), 203–211.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.10.006>
33. Marigheto, N., Venturi, L., Hibberd, D., Wright, K. M., Ferrante, G., & Hills, B. P. (2007). Methods for peak assignment in low-resolution multidimensional NMR cross-correlation relaxometry. *Journal of Magnetic Resonance*, 187(2), 327–342.
<https://doi.org/10.1016/j.jmr.2007.04.016>
34. Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>
35. Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Martinez, S., & Belščak, A. (2009). Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, 113(2), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.048>
36. Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004). Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1177–1180. <https://doi.org/10.1021/jf0350515>
37. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nuñez, M. J. (2005). A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: Catechin, resveratrol and grape extract cases. *European Food Research and Technology*, 221(3–4), 284–290.
<https://doi.org/10.1007/s00217-005-1159-7>
38. Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., & Everett, D. W. (2014). Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chemistry*, 156, 176–183.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.115>
39. Rawle, A. (2012). Basic Principles of Particle Size Analysis, 44(0), 8.
40. Réblová, Z. (2012). Effect of Temperature on the Antioxidant Activity of Phenolic Acids. *Czech Journal of Food Science*, 30(2), 171–177.
41. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). This Week ' s Citation Classic, (16), 144–58.
42. Sun, Y., Zhong, L., Cao, L., Lin, W., & Ye, X. (2015). Sonication inhibited browning but decreased polyphenols contents and antioxidant activity of fresh apple (*malus pumila* mill, cv. Red Fuji) juice. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8336–8342.
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-1896-y>
43. Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M., & Bruce, B. D. (2005). Liposomal

Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7–8), 587–605. <https://doi.org/10.1080/10408390591001135>

44. Thompson, A. K., & Singh, H. (2006). Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 410–419. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72105-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72105-1)
45. Torchilin, V. P., & Weissig, V. (2003). *Liposomes: a practical approach* (2nd ed.). New York: Oxford University Press Inc.
46. Vina, S. Z., & Chaves, A. R. (2006). Antioxidant responses in minimally processed celery during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 94(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.051>
47. Woodle, M. C., & Papahadjopoulos, D. (1989). Liposome Preparation and Size Characterization. *Methods in Enzymology*, 171(1984).
48. Yen, G.-C., & Duh, P.-D. (1994). Chemical and antioxidant properties of broccoli growing in Bangladesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629–632. [https://doi.org/OQ21-0561/9411442-Q629\\$Q4.5Q/O](https://doi.org/OQ21-0561/9411442-Q629$Q4.5Q/O)



TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. HALİL MECİT ÖZTOP
Proje No:	113O442
Proje Başlığı:	Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve NMR Relaksometre Teknikleri Kullanılarak Karakterize Edilen Lipozom Sistemleri İle Yağ Oksidasyonunu Önleyici Sprey Ürün Geliştirilmesi
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/10/2013 - 15/02/2017
Onaylanan Bütçe:	291300.0
Harcanan Bütçe:	271047.42
Öz:	<p>Lipozomlar hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşiklerin kapsüle edilmesi amaçlı farmasötik, kişisel bakım, kimya ve gıda endüstrisinde kullanılan, polar yapılar içeren iki tabakalı küresel yağ kesecikleridir. Bu yapılardan oluşan enkapsülasyon sistemlerinin biyo-uyumlu, biyo-bozunur olmaları, toksik etkilerinin olmaması ve istenildiğinde kapsüllenmiş maddeyi salabilmesi özellikleri bu sistemleri birçok yönden avantajlı kılmaktadır. Ayrıca, polimer bazlı enkapsülasyon sistemleri ile karşılaştırıldığında, kullanıldığı ortamın viskozite değerini ve tekstürel özelliklerini fazla değiştirmemesi de diğer avantajlarıdır. Lipozom elde etmek için kullanılan polar yağların doğadaki başlıca kaynakları; yumurta ve soya lesitindir. Bu çalışmada, bu iki kaynaktan elde edilen lesitinlerden hazırlanan lipozomlar hazırlanmış, soya lesiti ile hazırlananların dayanıklılıkları fazla olduğundan bu lipozomların içerisine antioksidan aktivite gösteren fenolik bileşikler kapsüle edilerek, yağ oksidasyonunu engellemek üzere kullanılacak sprey bir ürün elde edilmiştir. Sprey uygulama için oksidasyona hassas bir gıda olan fındık seçilmiştir. Elde edilen ürün, tamamen doğal kaynaklar kullanılarak üretildiği için uygulandığı gıdaya herhangi bir kimyasal eklenti söz konusu olmamıştır. Sprey ürün geliştirme çalışmaları çerçevesinde öncelikli olarak lipozom sistemlerinin karakterizasyonu yapılmış ve ürününün dayanıklılığı incelenmiştir. Son aşamada elde edilen ürünler fındık üzerine uygulanarak, fındıkların duyuusal özellikleri incelenmiştir. Ürünün karakterizasyonu ve fiziksel dayanıklılığın ölçülmesi için tahribatsız bir ölçme tekniği olan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) , NMR Relaksometre başlıca metotlar olarak kullanılmış ancak NMR Relaksometre tekniğinin fiziksel özelliklerle daha iyi bir şekilde ilişkilendirildiği görülmüştür. Aynı zamanda karakterizasyon amaçlı, parçacık boyu analizi, zeta potansiyel, ışık mikroskopu teknikleri de kullanılmıştır. Lipozom sistemlerinin kimyasal dayanıklılık testleri için içsel oksidasyonunu ölçmek amacıyla hidroperoksit ölçümleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiş, yeşil çay özütülü lipozomlar için antioksidan, fenolik madde miktarı tayinleri de yapılmıştır. Lipozomların dayanıklılıklarını güçlendirmek için biyopolimer kullanarak kaplama da yapılmış ancak kaplamasız lipozomlara göre dayanıklılıkta ciddi bir fark gözlenmemiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	lipozom, antioksidan, enkapsülasyon, yeşil çay özütü, NMR relaksometre
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Proje Yapılan Yayınlar:	<p>1- Effect of high pressure homogenization (microfluidization) on the quality of Ottoman Strawberry (F. Ananassa) juice (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>2- Effect of different homogenization techniques on the particle size of liposomes and storage characterization by NMR Relaxometry (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>3- En iyi Poster Ödülü (Ödül - Uluslararası Ödül - Diğer),</p> <p>4- Formation and Characterization of Green Tea Extract Loaded Liposomes (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>5- Food grade liposome systems: Effect of solvent, homogenization types and storage conditions on oxidative and physical stability (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>6- Yeşil Çay Ekstratı İçeren Lipozomların Farklı Biyopolimer Tipleri ile Kaplanması (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>7- pH, Basınç, Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Soya Lesitini ile Hazırlanmış Lipozomların Fiziksel Stabilitate İndikatörü Olan Zeta Potansiyeli Üzerine Etkisinin İncelenmesi (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>8- Characterization of Green Tea Extract Loaded Liposomes (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>9- Gıdalardaki Fiziksel ve Kimyasal Değişimlerin İzlenmesi, Kalite Tespiti ve Yeni Sistemler Tasarlanması Sürecinde Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve Düşük Rezolüsyonlu NMR Relaksometre'nin Kullanımı (Bildiri - Ulusal Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>10- FORMATION AND CHARACTERIZATION OF FOOD GRADE LIPOSOME SYSTEMS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p>
-------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

TÜBİTAK