



# Atıkların Değerlendirmesi: Fındık (*Corylus avellana* L.) ve Antep Fıstığı (*Pistacia vera* L.) İç Zarlarından Elde Edilen Fenolikçe Zengin Ekstraktlara Lipozomal Taşıma Sistemlerinin Uygulanabilirliği

Mine Gültekin-Özgülven<sup>1\*</sup>, Bahar Beyde<sup>2</sup>, Beraat Özçelik<sup>3</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-2073-8075)

<sup>2</sup> Münih Teknik Üniversitesi, Yönetim Okulu, Yönetim ve Teknoloji Bölümü, Münih, Almanya (ORCID: 0000-0001-7770-3431)

<sup>3</sup> İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-1810-8154)

(İlk Geliş Tarihi 17 Nisan 2020 ve Kabul Tarihi 23 Mayıs 2020)

(DOI: 10.31590/ejosat.722037)

**ATIF/REFERENCE:** Gültekin-Özgülven, M., Beyde, B. & Özçelik, B. (2020). Atıkların Değerlendirmesi: Fındık (*Corylus avellana* L.) ve Antep Fıstığı (*Pistacia vera* L.) İç Zarlarından Elde Edilen Fenolikçe Zengin Ekstraktlara Lipozomal Taşıma Sistemlerinin Uygulanabilirliği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 241-246.

## Öz

Fenolik maddeler kanser, kalp hastalıkları, diyabet gibi hastalıkların oluşma riski azaltıcı sağlık etkileri bulunan güçlü antioksidanlardır. Ülke ekonomisi ve çevre kirliliği için önemli bir husus olan atık değerlendirilmesi kapsamında, ülkemiz için çok değerli ürünler olan fındık ve Antepfıstığı yağlı tohumlarının gıda sanayinde ayrılan iç zarlarından fenoliklerce zengin ekstraktlarının elde edilip katma değer eklenmiş farklı ürünlere dönüştürülmesi mümkündür. Ancak, söz konusu fenolik bileşiklerin çevresel koşullardaki stabiliteyi düşük, çözünürlükleri ve biyoyararlılıkları zayıf, diğer gıda bileşenleriyle etkileşime girme kabiliyetleri yüksektir. Bu özelliklerini bertaraf etmek için uygun yöntemler kullanılarak enkapsüle edilmeleri önerilmektedir. Bu noktada lipozomlar fenolik bileşikler için uygun taşıma sistemleridir. Bu çalışmada yüksek basınçlı homojenizatör kullanılarak önce birincil (kitosan kaplı olmayan) lipozomlar üretilmiştir. Daha sonra birincil lipozomların %0.4'lük kitosan çözeltisi ile tabaka tabaka kaplama yöntemiyle kaplanarak kinetik stabiliteyi artırılmış ve böylece ikincil lipozomlar (kitosanla kaplanmış) elde edilmiştir. Elde edilen birincil ve ikincil lipozomlar partikül boyutu ve zeta potansiyelleri ölçülerek karakterize edilmiştir. Buna göre birincil lipozomların partikül boyutu 146 nm iken içine konulan ekstrakt konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunun arttığı görülmüştür. Kitosanla kaplandığında lipozomların elektrik yükünün negatiften pozitifte dönüştüğü görülmüştür. Aynı zamanda kitosanla kaplamak partikül boyutunu da büyütüştür. Enkapsülasyon verimi dikkate alındığında en yüksek verimin her iki ekstrakt için de %0.1 konsantrasyonda elde edildiği anlaşılmıştır. Fındık iç zar ekstraktı için bu konsantrasyonda enkapsülasyon verimi %79 iken Antep fıstığı iç zar ekstraktı için bu değer %88 olarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon veriminin konsantrasyon arttıkça düştüğü görülmüştür. Elde edilen sıvı formadaki kinetik stabiliteyi artırılmış ikincil lipozomların özellikle katı formdaki gıda ürünlerine eklenebilmesi veya besin takviyesi olarak değerlendirilebilmesi ve raf ömürlerinin artırılması için toz haline getirilmesi üzerine çalışmalarımız devam etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Fenolik bileşikler, Lipozom, Kitosanla kaplı lipozomlar, Enkapsülasyon

## Waste Valorization: Applicability of Liposomal Delivery Systems for Phenolic Rich Extracts Obtained from Skins of Hazelnut and Pistachio Nut

### Abstract

Phenolic substances are powerful antioxidants with health effects that reduce the risk of diseases such as cancer, heart disease and diabetes. Within the scope of waste assessment, which is an important issue for the country's economy and environmental pollution, it

\* Sorumlu Yazar: İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye, ORCID: 0000-0002-2073-8075, [gultekinmi@itu.edu.tr](mailto:gultekinmi@itu.edu.tr)

is possible to obtain phenolics rich extracts from the skins of the hazelnut and Antep pistachio removed in the food industry, which are very valuable products, and to be converted into different products with added value. However, these phenolic substances have low stability, low solubility and poor bioavailability and high ability to interact with other food substances. Hence, it is recommended to encapsulate phenolics using appropriate methods to eliminate these properties. At this point, liposomes are suitable delivery systems for phenolic substances. In this study, primary (non-chitosan coated) liposomes were first produced using a high pressure homogenizer. Afterwards, the kinetic stability of the primary liposomes was enhanced by layer-by-layer method with 0.4% chitosan solution to obtain secondary liposomes (covered with chitosan). The primary and secondary liposomes obtained were characterized by measuring particle size and zeta potentials. Accordingly, while the particle size of the primary liposomes was 146 nm, the particle size increased with the increasing extract concentration. It was observed that the liposomes' electrical charge changed from negative to positive when coated with chitosan. Coating with chitosan also increased the particle size. Considering the encapsulation efficiency, it was understood that the highest yield was obtained at a concentration of 0.1% for both extracts. The encapsulation efficiency at this concentration was 79% for hazelnut skin extract, while this value was 88% for Pistachio skin extract. It was found that the encapsulation efficiency decreased with increasing extract concentration. Our studies are ongoing to add secondary liposomes with increased kinetic stability in the liquid form, especially in food products in the solid form, or to be used as a dietary supplements and to convert these dispersions into powder form to increase their shelf life.

**Keywords:** Phenolics, Liposomes, Chitosan coated liposomes, Encapsulation.

## 1. Giriş

Gıda üretim sanayide, gıda işleme sonucunda yan ürün olarak büyük miktarlarda gıda atıkları oluşur ve bu atıklar çoğunlukla imha edilir veya hayvan yemi olarak kullanılır. Oysa ki, gıda sanayinde oluşan atıklar, yüksek besin değeri içeriğine sahiptir. Gıda işleme sırasında ortaya çıkan atıkların etkili bir şekilde değerlendirilmesi; çevre kirliliğinin önlenmesinin yanı sıra katma değerli yeni gıda ürünlerin üretilmesi ve çeşitlendirilmesi açılarından önemlidir (Yağcı ve diğ., 2006). Ülkemiz, dünyanın önemli fındık (*Corylus avellana* L.) ve Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) üreticilerindedir. Ziraat Mühendisleri Odasının Fındık Raporuna (2018) göre Türkiye dünyada fındık üretiminde %70'lik pay ile birinci sırada yer almaktadır. Fındık zarı iç fındığı ince bir tabaka şeklinde çevreleyen kahverenkli perkiarp bir dokudur. Fındıkların kavrulması sırasında bu zarlar ayrılıp hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir. Bu haliye oldukça ucuz bir yan ürün olarak fındık iç zarı toplam fındık ağırlığının ağırlıkça %2.5'üğünü oluşturmaktadır (Şahin ve diğ., 2019). Benzer şekilde ülkemiz Antep fıstığı üretiminde ABD ve İran'ın peşinden üçüncü sırada yer almaktadır. Çiğ ya da kavrulmuş olarak tüketilen Antepfıstığı tek bir tohum (çekirdek), tohumun etrafı yenilebilir ince ve yumuşak tohum kabuğu (testa) ile kaplı, çekirdek ve zarı da kaplayan sert yenilmeyen kabuğu bulunan ve en dışta etli, yenilmeyen kabukla örtülü bir meyvedir (Seeram ve diğ., 2008). Antepfıstığı da fındık gibi endüstriyel olarak iç zarından ayrılarak kullanılır. Fıstıktan ayrılan bu zarlar soyulmuş Antepfıstığının toplam ağırlığının %10'unu oluşturur ve atık olarak çevreyi kirlenme potansiyeline sahiptir (Tomaino ve diğ., 2010).

Fındık ve Antepfıstığının değerli tohumlara sahip olmasının yanı sıra yenilebilir iç zarlarının da zengin fenolik bileşikler içeren atık potansiyeli yüksek olan yan ürünler olduğu anlaşılmaktadır. Fenolik bileşikler, gösterdiği antioksidan aktiviteleri sayesinde serbest radikallerin zararlı etkisinden korur ve ayrıca kanser, kronik kalp hastalıkları, felç, katarakt, osteoporoz, tip-2 diyabet, inflamasyon, ülser, ani ölüm, insülin direnci ve yüksek tansiyon gibi hastalıkların riskini azaltır (Alsavar ve diğ., 2006). Continia ve diğ. (2012) fındık iç zarı ekstraktının ucuz ve iyi bir fenolik kaynağı olduğunu ve in vivo çalışmalara göre sıçanlarda kahveden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Fakat fenolik bileşiklerin proteinler gibi diğer gıda bileşenleriyle kolayca etkileşime girebilme yeteneklerinden dolayı birçok gıda sistemiyle uygulanması ve bu nedenle de uygun taşıma sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Gibis ve diğ., 2012). Ayrıca bu maddeler; ışık, pH, yüksek sıcaklık, çeşitli enzimler (glikozidaz, galaktosidaz, peroksidaz and fenolaz gibi), sülfid gibi maddelerin ortamdaki varlığına dayanıksızdırlar ve kolayca bozulabilirler (Santos ve diğ., 2013). Ayrıca, polifenollerin insan vücudunda yetersiz sindirilme süresi, düşük emilim ve düşük çözünürlük özelliği yüzünden biyoyararlılıkları oldukça düşüktür (Munin and Edwards, 2011). Tüm bunların yanısıra polifenoller istenmeyen acı bir tat ve kokuya sahiptir ve gıda bileşeni olarak ya da ilaç sanayiide kullanılmadan önce bu özelliklerinin maskelenmesi gerekir. Fenolik bileşiklerin tüm bu olumsuz yanlarını ortadan kaldırmak, sindirilmeden önce kararlı bir yapıda olmasını sağlamak, sudaki çözünürlüğünü ve biyoyararlılığını arttırmak ve hedefe ulaştırmak için en uygun taşıma sistemi lipozomlardır (Gibis ve diğ., 2013). Lipozomlar; küresel, tek veya çok katmanlı lipid keseciklerdir. Şekil 1'de de görüldüğü üzere lipozomlar bir veya daha çok eş merkezli çift tabakalı yağdan oluşan ve sulu bölgeyle ayrılan keseciklerdir (Munin and Edwards, 2011). Ekonomik, doğal, toksik olmayan, biyobozunur, GRAS statüsünde, hem hidrofilik hem de lipofilik bileşikler en kapsüle edilebilir maddelerdir. Lipozomlar; bileşikler ışık, pH ya da enzim gibi zarar verici dış etkilere karşı sulu iç dolgusunda ya da iki katmanlı zarı içinde koruyabilmektedirler ve tasarlanan hedefe yayılmalarına izin vermektedirler (Gibis ve diğ., 2014). Ayrıca, yapılan çalışmalarda lipozomun fenolik bileşiklerin biyoyararlılığını arttırdığı saptanmıştır. Fakat lipozomlar kırılabilir moleküllerdir ve zamanla sızma yapıp kaplanmış maddenin kaybına yol açabilirler. Bu nedenle; negatif elektrik yüklü lipozomların ve zıt yüklü kitosan gibi bir biyopolimerle elektrostatik kaplama yöntemiyle kaplanması kinetik kararlılığını arttırabilir.

Bu çalışmada, Antepfıstığı ve fındık iç zarlarından elde edilen fenolik bileşiklerce zengin ekstraktların kitosanla kaplanmış lipozomal taşıma sistemlerine en kapsüle edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın amaçları i) önemli bir atık kaynağı olan fındık ve Antepfıstığı iç zarlarının değerlendirilmesi ii) lipozomal taşıma sistemlerinin fenolik bileşikler için uygunluğunun araştırılması olarak sıralanabilir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

Kullanılan Antepfıstığı ve fındık iç zırları Elit Çikolata ve Şekerleme Sanayi'nden sağlanmıştır. Lesitin (Soya fosfolipitleri, %100) Rotel, Türkiye tarafından sağlanmıştır. Kitosan (deasetilasyon derecesi %80) Primex (Sighufjordur, Iceland) tarafından hediye edilmiştir. Sephadex G50 GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Sweden) firmasından satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA)'ten satın alınmıştır.

### 2.2. Metot

#### 2.2.1. Fenoliklerin Ekstraksiyonu

Fındık ve Antepfıstığının iç zırları sıvı azot uygulamasıyla dondurulduktan sonra öğütücüde 30 saniye tutularak öğütülmüştür. Ekstraksiyon işlemi Monagas ve diğ. (2009)'a göre yapılmıştır. Öğütülen zırlara 1:10 oranında olacak şekilde %80'lik 100 ml aseton çözeltisi eklenerek 15 dakika 40°C'de ultrasonik banyoda (VWR®, USC100T) fenolik maddelerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. 4°C'de, 5000 rpm/dk hızla 5 dk santrifüj (Labnet Spectrafuge 16M, Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, USA) işlemi takiben üst sıvı faz ayrılıp iç zırlar tekrar ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. 3 kere tekrarlanan ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen üst fazlar birleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlardaki aseton, döner buharlaştırıcıda (Bibby Sterilin RE-100, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) 40°C'de uçurulduktan sonra kalan sulu kısma dondurarak kurutucu (Christ Alpha 1-2LDplus, Osterode am Harz, Germany) kullanılarak kurutma işlemi kullanılarak uygulanmıştır.

#### 2.2.2. Birincil (Kitosan Kaplı Olmayan) ve İkincil (Kitosan Kaplı) Lipozomların Hazırlanması

Birincil ve ikincil lipozomlar Gültekin-Özgüven ve diğ. (2016) ile Akgün ve diğ. (2020) tarafından tarif edildiği gibi hazırlanmıştır. Birincil boş lipozomlar, soya lesitininin (%2) 0.25 M asetat tampon çözeltisinde (pH 3.5) çözündürüldükten sonra oluşan dispersiyonun yüksek hızlı karıştırıcı (Ultraturrax, DI-25 Yellowline, IKA) ile homojenize edilip yüksek basınçlı homojenizatörden (Microfluidizer Processor, M-110L, Microfluidics, Newton, USA) 25.000 psi basınç altında 5 kere geçirilmesiyle elde edilmiştir. Birincil ekstraktlı lipozomlar ise soya lesitini ile ekstraktın (%0.1, %0.2, %0.3) birlikte asetat tampon çözeltisinde (pH 3.5) çözünmesinden sonra boş lipozomlar gibi hazırlanmıştır. Ekstraktlar öncesinde filtre edilerek yüksek basınçlı homojenizatörün tıkanması önlenmiştir. Yüksek basınçlı homojenizatörün ısınmasını engellemek için buz uygulaması yapılmıştır.

İkincil lipozomlar tabaka tabaka kaplama yöntemine göre kitosanla kaplanmıştır. İkincil boş ve ekstrakt içeren birincil lipozomlar önceki çalışmalarımızda belirlediğimiz optimum kitosan konsantrasyonu (%0.4) kullanılarak asetat tampon çözeltisinde (pH 3.5) hazırlanan kitosan çözeltisi üzerine ağırlıkça 1:1 oranında olacak şekilde eklenir ve gece boyunca magnetik karıştırıcıda karıştırılır.

#### 2.2.3. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi

Örneklerin Ortalama partikül çapı hesaplanabilmesi statik ışık saçma cihazı (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, UK), örneklerin elektrik yükü ise zeta ölçerle (Zetasizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, UK) ölçülmüştür. Her analiz en az 3 kere tekrarlanmıştır. Ölçümlerden önce lipozom örneklerine uygun seyreltmeler yapılmıştır.

#### 2.2.4. Toplam Fenolik Madde İçeriği

Örneklerin toplam fenolik madde içeriği Gibis ve diğ. (2013)'ün tarifine göre Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. 200 µl seyreltilmiş örneğin üzerine 1.5 ml 10 kat seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi ve 1.2 ml %7.5'lük sodyumkarbonat çözeltisi eklendikten sonra karışım karanlıkta 45 dak. bekletilir ve oluşan mavi renk spektrofotometrede 720 nm.'de okunur. Sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri/L olarak verilmiştir. Her analiz en az 3 kere tekrarlanmıştır.

#### 2.2.5. Jel Filtrasyonu Uygulanması ile Enkapsüle Olmayan Ekstraktın Uzaklaştırılması

Sephadex jel filtrasyonu uygulanarak ekstraktlı birincil lipozomlardan enkapsüle olmayan ekstraktın uzaklaştırılması sağlanmıştır. %5'lik Sephadex G50 çözeltisi asetat tamponda (pH 3.5) çözündürülerek kaynar su banyosunda tutulur ve jel haline getirilir. Daha sonra oluan jel 10 ml'lik enjektörlere 3 cm kalınlığında jel olacak şekilde doldurularak kolonlar oluşturulur. Oluşturulan kolonlar 15 ml'lik falkon tüplerine yerleştirilir. Hazırlanan birincil lipozomlar hazırlanan jel kolonlara 1.5 ml beslenir. İçinde kolonlar bulunan falkon tüpleri 15.000 rpm hızla 10 dak. boyunca santrifüj edilir. Falkon tüplerinde toplanan ekstraktlı lipozomlar %0.15 Triton X100 ile parçalanır. Jel filtrasyonu uygulanan lipozomlar, Tritonla parçalanmış lipozomlar ve hiçbir işlem uygulanmadan Tritonla parçalanmış lipozomların fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle tespit edilir (Altın ve diğ., 2018b; Gibis ve diğ., 2012).

#### 2.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS software (21.0, Chicago, IL, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler en az 3 kere tekrarlanmıştır. Sonuçlar ortalama değerler ve standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir. Farklılıklar Tukey testi ile P değeri <0.05'e göre değerlendirilmiştir.

### 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

#### 3.1. Ekstrakt İçeren ve İçermeyen Birincil ve İkincil Lipozomların Karakterizasyonu

Tablo 1’de görüldüğü üzere ekstrakt içermeyen birincil lipozomların ortalama partikül boyutu 146 nm bulunmuştur. Fındık iç zar ekstraktı %0.1 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde partikül boyutu 209 nm’ye, %0.2 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde 261 nm’ye ve %0.3 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde ise 323 nm’ye yükselmiştir. Benzer şekilde Antepfıstığı iç zarı ekstraktı %0.1 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde partikül boyutu 169 nm’ye, %0.2 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde 229 nm’ye ve %0.3 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde 246 nm’ye yükselmiştir. Bu sonuçlara göre ekstrakt konsantrasyonu arttıkça partikül boyutu artmaktadır. Sonuçların daha önce yaptığımız çalışmada (Gültekin-Özgüven ve diğ., 2016) bulduğumuz sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmada %0.05-0.4 konsantrasyonlu kara dut ekstraktları lipozoma enkapsüle edildiğinde partikül boyutunun büyüdüğü gözlenmiştir. Başka bir atık değerlendirme çalışmamızda (Altın ve diğ., 2018a) benzer şekilde fenolikçe zengin kavrulmamış kakao çekirdeği zarı ekstraktının konsantrasyonu arttıkça partikül boyutu yaklaşık olarak 150 nm’lerden 250 nm’lere yükselmiştir.

Yine Tablo 1’de görüldüğü üzere ekstrakt içeren veya içermeyen tüm birincil lipozomlar negatif yüzey yüküne sahiptir. Ekstrakt içermeyen lipozomların zeta potansiyeli -23.4 mV iken, yine negatif yüklü fenolik ekstraktın yüklenmesinden dolayı negatiflik artmıştır. Fındık iç zar ekstraktı %0.1 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde zeta potansiyeli -29.6 mV’a, %0.2 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde -35.4 mV’a ve %0.3 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde ise -42.2 mV’a yükselmiştir. Benzer şekilde, Antepfıstığı iç zarı ekstraktı %0.1 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde zeta potansiyeli -46.7 mV’a, %0.2 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde -47.4 mV’a ve %0.3 konsantrasyonunda enkapsüle edildiğinde ise -48.8 mV’a yükselmiştir. Bu sonuçlara göre ekstrakt konsantrasyonu arttıkça zeta potansiyeli artmaktadır. Sonuçların Altın ve diğ. (2018a)’in bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Yazarların çalışmasında kavrulmamış kakao çekirdeği zarı ekstraktının konsantrasyonunun arttıkça zeta potansiyelinin yükseldiği görülmüştür. %0.1-0.4 ekstrakt konsantrasyonları için zeta potansiyelinin yaklaşık olarak -25 mV ile -35 mV arasında arttığı rapor edilmiştir.

Tablo 1. Birincil ve İkincil Lipozomların Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli Sonuçları\*.

Lipozomal Örnekler	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
Ekstrakt içermeyen boş birincil lipozom	146 ± 6 <sup>a</sup>	-23.4 ± 1.2 <sup>a</sup>
Ekstrakt içermeyen boş ikincil lipozom	300 ± 15 <sup>e</sup>	+35.0 ± 1.3 <sup>e</sup>
<i>Fındık iç zar ekstraktlı örnekler</i>		
Ekstraktlı (%0.1) birincil lipozom	209 ± 11 <sup>b</sup>	-29.6 ± 1.2 <sup>b</sup>
Ekstraktlı (%0.2) birincil lipozom	261 ± 10 <sup>c</sup>	-35.4 ± 1.3 <sup>c</sup>
Ekstraktlı (%0.3) birincil lipozom	323 ± 20 <sup>d</sup>	-42.2 ± 1.3 <sup>d</sup>
Ekstraktlı (%0.1) ikincil lipozom	330 ± 20 <sup>f</sup>	+35.5 ± 1.4 <sup>f</sup>
Ekstraktlı (%0.2) ikincil lipozom	380 ± 10 <sup>g</sup>	+35.8 ± 1.4 <sup>f</sup>
Ekstraktlı (%0.3) ikincil lipozom	400 ± 12 <sup>h</sup>	+35.9 ± 1.3 <sup>f</sup>
<i>Antepfıstığı iç zar ekstraktlı örnekler</i>		
Ekstraktlı (%0.1) birincil lipozom	169 ± 21 <sup>b</sup>	-46.7 ± 1.3 <sup>b</sup>
Ekstraktlı (%0.2) birincil lipozom	229 ± 2 <sup>c</sup>	-47.4 ± 1.3 <sup>c</sup>
Ekstraktlı (%0.3) birincil lipozom	246 ± 20 <sup>d</sup>	-48.8 ± 1.3 <sup>d</sup>
Ekstraktlı (%0.1) ikincil lipozom	320 ± 20 <sup>f</sup>	+35.2 ± 1.3 <sup>f</sup>
Ekstraktlı (%0.2) ikincil lipozom	355 ± 23 <sup>g</sup>	+35.4 ± 1.5 <sup>f</sup>
Ekstraktlı (%0.3) ikincil lipozom	385 ± 14 <sup>h</sup>	+35.6 ± 1.5 <sup>f</sup>

\*Birincil ve ikincil boş lipozomlar fındık iç zarı ekstraktı içeren lipozomlar ve Antep fıstığı iç zarı ekstraktı içeren birincil ve lipozomlarla ayrı ayrı istatistik analizlerine tabi tutulmuştur. Her kolondaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir.

Birincil lipozomlar kitosanla kaplanarak ikincil lipozomlar haline getirildiğinde ise partikül boyutunun arttığı görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Kitosanla kaplandıktan sonra boş lipozomun partikül boyutu 146 nm’den 300 nm’ye yükselirken ekstrakt içeren lipozomların partikül boyutları da artarak fındık iç zarı ekstraktları için 35.5-35.9 nm arasında değişirken, Antepfıstığı iç zarı ekstraktları içinse bu değer 35.2-35.6 nm arasında değişmiştir. Tablo 1’de ikincil lipozomlara ait partikül boyutu sonuçları görülmektedir.

İkincil lipozomların zeta potansiyeli incelendiğinde (Tablo 1) negatif yüklü olan ekstrakt içeren ve içermeyen tüm birincil lipozomların zeta potansiyellerinin pozitif döndüğü anlaşılmaktadır. Daha önceki tecrübelerimizden yola çıkılarak seçilen %0.4’lük kitosan çözeltisi konsantrasyonunun tüm lipozom yüzeyini başarıyla kapladığı görülmektedir. Her iki ekstrakt içeren birincil lipozomların kitosanla kaplandığında zeta potansiyelinin neredeyse sabitlendiği istatistiksel olarak da anlaşılmaktadır ( $p > 0.05$ ). Ekstrakt içermeyen boş birincil lipozomların zeta potansiyeli -23.4 mV iken ikincil lipozomların zeta potansiyeli +35.0 mV olmuştur.

Fındık iç zar ekstraktı içeren ikincil lipozomlar için +35.5 ile +35.9 arasında değişirken, Antepfıstığı iç zar ekstraktı içeren ikincil lipozomlarda bu değer +35.2 ile 35.6 arasında değişmiştir.

### 3.2. Fenolik Bileşiklerin Lipozomlardaki Yeri, İçeriği ve Enkapsülasyon Verimi

Lipozomla enkapsülasyon sırasında ekstraktın tamamı lipozomun içinde enkapsüle olmaz, bir kısmı lipozomal zarın yüzeyiyle etkileşim halindedir. Ayrıca, ekstraktın bir kısmı da hiç enkapsüle olmamıştır. Bu nedenle enkapsülasyon verimini hesaplamak için lipozomlardan enkapsüle olmamış ekstraktın uzaklaştırılması amacıyla birincil lipozomlar jel filtrasyon prosesine tabi tutulurlar. Ancak jel filtrasyon uygulanan lipozomların içerdiği fenolik madde içeriğine lipozomun yüzeyindeki ve içindeki fenolikler dahildir. Bu nedenle sadece jel filtrasyonuna maruz kalan lipozomlarda toplam fenolik madde tespiti yapılırsa sadece yüzeydeki fenolikler tespit edilebilecektir. Bu nedenle jel filtrasyon sonrası lipozomlar Triton X-100 uygulamasıyla parçalanarak lipozomun içindeki fenolikler de açığa çıkarılmaktadır. Yani, lipozomun içindeki fenolik miktarı; jel filtrasyona tabi tutulduktan Triton ile parçalanmış lipozom örneğinde tespit edilen fenolik madde miktarından jel filtrasyona tabi tutulan lipozomlarda tespit edilen fenolik madde miktarının çıkarılmasıyla bulunmuştur. Fenolik bileşiklerin lipozomlardaki lokasyonu ve fenolik içerikleri Tablo 2’de verilmiştir. Buna göre lipozomun içinde bulunan ekstraktın fenolik miktarı artan ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak fındık iç zar ekstraktı için 55-79 mg/L arasında değişirken Antepfıstığı iç zar ekstraktı için bu değer 60-88 mg/L arasında kalmıştır. Lipozom yüzeyinde membrana yerleşen fenolik miktarı artan ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak fındık iç zar ekstraktı için 400-503 mg/L arasında iken Antepfıstığı iç zar ekstraktı için bu değer 70-105 mg/L arasında değişmektedir. Ayrıca, jel filtrasyon uygulamasıyla lipozoma kaplanmamış kitosanı da uzaklaştırmak mümkün olduğu bilinmelidir.

Lipozomun içinde bulunan fenolik madde miktarının hiçbir işlem yapılmamış lipozomların fenolik madde içeriğine bölünmesiye enkapsülasyon verimi hesaplanabilmektedir. Enkapsülasyon verimi (Tablo 2.) fındık iç zarı ekstraktı için %0.1 konstantrasyonda %79, %0.2 konstantrasyonda %60 iken %0.3 konstantrasyonda %46’ya düşmüştür. Enkapsülasyon verimi Antep fıstığı iç zarı ekstraktı için %0.1 konstantrasyonda %88, %0.2 konstantrasyonda %71 ve %0.3 konstantrasyonda %60 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlara bakıldığında ekstrakt konsantrasyonunun arttıkça enkapsülasyon veriminin azaldığı anlaşılmaktadır. ( $p < 0.05$ ). Artan ekstrakt konsantrasyonuyla beraber enkapsülasyon veriminin düştüğü Altın ve diğ. (2018a) tarafından rapor edilmiştir. %0.1 ekstrakt konsantrasyonunda %87.5 olan verim %0.3 ekstrakt konsantrasyonunda %53.6’ya düşmüştür. Gibis ve diğ. (2012) ise yaptıkları çalışmada %0.1’lik üzüm çekirdeği ekstraktı için enkapsülasyon verimini %83.5 olarak bildirmişlerdir. Sonuçların diğer araştırmacıların rapor etiketleriyle uyumu olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 2. Lipozomlardaki Fenoliklerin Yeri, İçeriği ve Enkapsülasyon Verimi

Lipozomal Örnekler	Lipozomun Yüzeyindeki Fenolik Miktarı (mg/L)	Lipozomun İçindeki Fenolik Miktarı (mg/L)	Enkapsülasyon Verimi (%)
<i>Fındık iç zar ekstraktlı örnekler</i>			
Ekstraktlı (%0.1) birincil lipozom	400	55	79 <sup>a</sup>
Ekstraktlı (%0.2) birincil lipozom	402	78	60 <sup>b</sup>
Ekstraktlı (%0.3) birincil lipozom	503	79	46 <sup>c</sup>
<i>Antepfıstığı iç zar ekstraktlı örnekler</i>			
Ekstraktlı (%0.1) birincil lipozom	300	70	88 <sup>a</sup>
Ekstraktlı (%0.2) birincil lipozom	450	100	71 <sup>b</sup>
Ekstraktlı (%0.3) birincil lipozom	650	105	60 <sup>c</sup>

\*Her iki fındık içzar ekstraktı ve Antep fıstığı içzar ekstraktı içeren birincil lipozomlar ayrı ayrı istatistik analizlerine tabi tutulmuştur. Her kolondaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir.

## 4. Sonuç

Ülkemiz önemli bir fındık ve Antepfıstığı üreticisi ve ihracatçısıdır. Kültürümüzde önemli bir yer tutan bu kuruyemişlerin iç zarlarının iyi birer fenolik kaynağı olduğu ve ekstraktlarının yeni katma değerli ürünler geliştirilmesi için değerlendirilmesi gerektiğini önermekteyiz. Diğer taraftan, lipozomlar fenolik bileşikler için uygun doğal, toksik olmayan, çevreyle dost fosfolipid yapısındaki taşıma sistemleridir ve fenolik bileşiklerce zengin ekstraktlar için umut verici sonuçlar vermektedir. Enkapsülasyon verimi oldukça yüksektir. Ancak kırılabilir yapıları nedeniyle elektriksel olarak zıt yüklü en az bir biyopolimerle kaplanması uygundur. Bu çalışmada kitosanla kaplama çalışması başarılı sonuç vermiştir. Bu sıvı sistemlerin gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde kullanımı için öncelikle çeşitli yöntemler kullanarak toz haline getirilmesi, böylece kullanım alanlarının çeşitlendirilmesi, stabiliteilerinin artırılması ve raf ömrünün uzatılması çalışmalarının yoğunlaştırılması gerekmektedir.

## Kaynakça

Alasalvar, C., Karamać, M., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2006). Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut green leafy cover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4826-4832. Doi: 10.1021/jf0601259

- Akgün, D., Gültekin-Özgüven, M., Yüceetepe, A., Altın, G., Gibis, M., Weiss, J., & Özçelik, B. (2020). Stirred-type yoghurt incorporated with sour cherry extract in chitosan-coated liposomes. *Food Hydrocolloids*, 101, 105532. Doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105532
- Altın, G., Gültekin-Özgüven, M., & Ozcelik, B. (2018a). Chitosan coated liposome dispersions loaded with cacao hull waste extract: Effect of spray drying on physico-chemical stability and in vitro bioaccessibility. *Journal of Food Engineering*, 223, 91-98. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.12.005
- Altın, G., Gültekin-Özgüven, M., & Ozcelik, B. (2018b). Liposomal dispersion and powder systems for delivery of cocoa hull waste phenolics via Ayran (drinking yoghurt): Comparative studies on in-vitro bioaccessibility and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids*, 81, 364-370. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.02.051
- Contini, M., Baccelloni, S., Frangipane, M. T., Merendino, N., & Massantini, R. (2012). Increasing espresso coffee brew antioxidant capacity using phenolic extract recovered from hazelnut skin waste. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 137-146. Doi: 10.1016/j.jff.2011.09.005
- Gibis, M., Vogt, E., & Weiss, J. (2012). Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food & function*, 3(3), 246-254. DOI: 10.1039/c1fo10181a
- 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. Doi:10.3390/pharmaceutics5030421
- Gibis, M., Zeeb, B., & Weiss, J. (2014). Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38, 28-39. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.11.014
- Gültekin-Özgüven, M., Karadağ, A., Duman, Ş., Özkal, B., & Özçelik, B. (2016). Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessibility studies. *Food chemistry*, 201, 205-212. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.091
- Monagas, M., Garrido, I., Lebrón-Aguilar, R., Gómez-Cordovés, M. C., Rybarczyk, A., Amarowicz, R., & Bartolomé, B. (2009). Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut, and almond skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10590-10599. Doi: 10.1021/jf901391a
- Santos, D. T., Albarelli, J. Q., Beppu, M. M., & Meireles, M. A. A. (2013). Stabilization of anthocyanin extract from jaboticaba skins by encapsulation using supercritical CO<sub>2</sub> as solvent. *Food Research International*, 50(2), 617-624. Doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.019
- Seeram, N. P., Zhang, Y., Bowerma, S., & Heber, D. 2008. Phytochemicals and health aspects of pistachio (*Pistacia vera* L.). İçinde: *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. Eds C. Alasalvar, & F. Shahidi, CRC Press, pp. 295-304.
- Şahin, S., Kılıç, Ö., Şengül, S., Perçin, S. (2019). Farklı İllerden Temin Edilen Fındık Zarının Bileşimi ve Antioksidan Etkinliğinin Araştırılması. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(1), 27-35.
- Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C., & Saija, A. (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, 92(9), 1115-1122. Doi: 10.1016/j.biochi.2010.03.027
- Yağcı, S., Altan, A., Göğüş, F., & Maskan, M. (2006). Gıda atıklarının alternatif kullanım alanları. *Türkiye*, 9, 24-26.
- Ziraat Mühendisleri Odası (2018). Fındık Raporu (08.08.2018). Alınmıştır: [http://zmo.org.tr/genel/bizden\\_detay.php?kod=30070&tipi=38&sube=0](http://zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=30070&tipi=38&sube=0).