



İnce Film Hidrasyon ve Mikrofluidizasyon Yöntemleri Kullanılarak Polifenollerin Yüksek Verimle Nanokapsüllere Yüklenmesi

Mine Gültekin-Özguven^{1*}, Kadriye Nur Kasapoğlu², Ceren Güngör³, Esra Nur Ertürk⁴, Beraat Özçelik^{5,6}

^{1*} İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-2073-8075), gultekinmi@itu.edu.tr

² İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0001-6070-4948), kasapogluk@itu.edu.tr

³ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0001-9572-0666), gungorceren5@gmail.com

⁴ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0003-0558-580), erturkesraa@gmail.com

⁵ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-1810-8154), ozcelik@itu.edu.tr

⁶ BIOACTIVE Research & Innovation Food Manufac. Indust. Trade Ltd., Teknokent ARI-3, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-1810-8154), ozcelik@itu.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi 1 Haziran 2021 ve Kabul Tarihi 15 Ağustos 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.946290)

ATIF/REFERENCE: Gültekin-Özguven, M., Kasapoğlu, K. N., Güngör, C., Ertürk, E. N. & Özçelik, B. (2021). İnce Film Hidrasyon ve Mikrofluidizasyon Yöntemleri Kullanılarak Polifenollerin Yüksek Verimle Nanokapsüllere Yüklenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (25), 758-762.

Öz

Bu çalışmada, fenolikçe zengin siyah kuşburnu meyvesi ekstraktı ince film hidrasyon ve mikrofluidizasyon yöntemleri birlikte kullanılarak nano boyuttaki lipozomlara yüksek verimle yüklenmiştir. Hazırlanan nanolipozomların stabilitesinin artırılması amacıyla negatif elektrik yüklü olan nanolipozomlar elektrostatik depozisyon tekniği ile pozitif yüklü bir biyopolimer olan kitosan ile kaplanmıştır. Bunun için farklı konsantrasyonlarda (%0.1, %0.2, %0.3, %0.4 ve %0.5) çalışılarak optimum kaplama için gerekli kitosan konsantrasyonu araştırılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan nanolipozom kapsülleri ortalama partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi için toplam fenolik madde içerikleri (TPC) -Folin Ciocalteu yöntemi ve antioksidan kapasiteleri (CUPRAC ve DPPH yöntemleri) analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan %0.1 kitosan konsantrasyonu hariç (çökme gözlemlendi) diğer kitosan konsantrasyonlarında (%0.2, %0.3, %0.4 ve %0.5) kaplama başarılı olmuştur. En yüksek enkapsülasyon verimine %0.3 kitosan konsantrasyonu ile kaplanan nanolipozomlarda ulaşılmıştır. Buna göre, enkapsülasyon verimi TPC'ye göre %92, CUPRAC'a göre %87, DPPH'e göre %83 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, ince film hidrasyon ve mikrofluidizasyon yöntemlerinin birlikte kullanılmasıyla yüksek enkapsülasyon verimli nanolipozom üretiminin mümkün olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnce Film Hidrasyon, Mikrofluidizasyon, Nanolipozom, Polifenol, Enkapsülasyon Verimi

Loading Polyphenols into Nanocapsules with High Encapsulation Efficiency Using Thin Film Hydration and Microfluidization

Abstract

In this study, phenolic-rich black rosehip fruit extract was loaded into nano-sized liposomes with high efficiency by using thin-film hydration and microfluidization methods together. In order to increase the stability of the prepared nanoliposomes, negatively charged nanoliposomes were coated with chitosan, a positively charged biopolymer, by electrostatic deposition technique. For this, the chitosan concentration required for optimum coating was investigated by working at different concentrations (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% and 0.5%). For this purpose, the prepared nanoliposome capsules were characterized by mean particle size and zeta potential measurements. To determine the encapsulation efficiency, total phenolic content (TPC) by Folin Ciocalteu method and antioxidant capacity (CUPRAC and DPPH methods) analyzes were performed. Coating was successful at other chitosan concentrations (0.2%, 0.3%, 0.4% and 0.5%), except for the 0.1% chitosan concentration (aggregation was observed). The highest encapsulation efficiency was achieved in nanoliposomes coated with 0.3% chitosan concentration. Accordingly, the encapsulation efficiency was determined as 92%, 87% and 83% in terms of TPC, CUPRAC and DPPH assays, respectively. In conclusion, it has been understood that it is possible to produce nanoliposomes with high encapsulation efficiency by combining the thin film hydration and microfluidization methods together.

Keywords: Thin Film Hydration, Microfluidization, Nanoliposome, Polyphenol, Encapsulation Efficiency

* Sorumlu Yazar: gultekinmi@itu.edu.tr

1. Giriş

Doğal antioksidanların gıda sistemlerinde kullanılmasına yönelik pek çok kısıtlama mevcuttur. Polifenollerin düşük çözünürlükleri ile pH, yüksek sıcaklık, oksijen, ve ışık gibi çevresel faktörlere karşı dayanımlarının zayıf olması, bu maddelerin gıda proseslerinden kaynaklanan kayıplarının fazla olmasına neden olmaktadır. Benzer şekilde, polifenollerin sindirim koşullarındaki stabiliteyi de düşüktür (Fang & Bhandari, 2010). Enkapsülasyon yöntemleri, bu bileşiklerin koruyucu küresel bir matris/ çeper içerisine yerleştirilmek suretiyle muhafaza edilerek yukarıda bahsedilen sorunların üstesinden gelmek için çok güçlü bir araçtır (Dordevic ve diğ. 2015). Oluşan kapsüller kaplanan biyoaktif bileşen ve duvar materyali arasında fiziksel bir bariyer işlevi göstererek nem, pH ve oksitlenme gibi dış zararlara karşı koruma sağlar (de Vos ve diğ., 2010).

Lipozomlar, kolesterol ve toksik olmayan doğal fosfolipidlerden oluşturulabilen küresel şekilli küçük yapay veziküllerdir. Lipozomlar, hem hidrofobik hem de hidrofilik karakterde olmaları nedeniyle pek çok bioaktif bileşen için uygun taşıyıcı sistemlerdir (Akbarzadeh ve diğ., 2013). Biyo-uyumlu ve biyo-bozunur olmaları, toksisite göstermemeleri ve kapsüllenmiş biyoaktif maddeyi kontrollü salma gibi özellikleri sayesinde son yıllarda tarım, gıda ve ilaç sanayiinde kullanım alanlarını arttırmıştır (Laye ve diğ., 2008; Gibis ve diğ., 2012). Ayrıca, doğada var olan ingrediyenlerden elde edilmesi gıdalarda kullanımında herhangi bir yasal düzenlemeye gerek bırakmamaktadır (Taylor ve diğ., 2005). Gıda uygulamalarında soya, ayçiçeği, yumurta lesitini veya birden fazla farklı fosfolipidler kullanılarak lipozomlar hazırlanabilir. Lesitinler uzun yıllardır çeşitli gıda formülasyonlarında emülgatör olarak kullanılmaktadır ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) göre Genellikle Emniyetli Kabul Edilebilen (GRAS) kategorisinde yer almaktadırlar (Kırtıl & Öztıp, 2014).

Lipozomlar kapsül içerisine aldıkları biyoaktif bileşenlerinin ortamla etkileşimini ortadan kaldırarak stabiliteyi artırıp daha uzun süre aktivitelerinin korunmasına yardımcı olmaktadır (Chun ve diğ., 2013). Ancak, lipozomların kırılabilir bir yapıya sahip olmaları nedeniyle içlerindeki enkapsüle edilmiş olan maddenin sızma olasılığı bulunmaktadır (Laye ve diğ., 2008). Diğer taraftan, lipozomlar kıvrımlı olmadıkları zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu nedenle küçük lipozomlar kıvrımlarını azaltmak için bir araya gelip birleşme eğilimindedirler. Bunun sonucunda da lipozomların partikül boyutlarının zamanla artması nedeniyle zamanla lipozomlar çökelti oluşturup dispersiyondan ayrılmaktadır. Yani lipozomlar termodinamik olarak stabil olmayan yapılardır (Gibis ve diğ., 2012). Diğer taraftan, fosfolipidlerin okside olması da lipozom stabilitesini engelleyebilmektedir. Lipozom stabilitesini artırmak için kullanılan en yaygın yöntem lipozomların kitosan, aljinat ve pektin gibi elektriksel olarak karşıt yüklü başka bir biyopolimer ile kaplanmasıdır (Chun ve diğ., 2013).

Etanol enjeksiyon, ince film hidrasyonu, ters faz evaporasyonu gibi konvansiyonel yöntemlerle yüksek enkapsülasyon verimli lipozomlar elde edilebilmektedir. Lipozomların üretiminde en eski ve yaygın kullanılan yöntem Bangham metodu olarak da bilinen ince film hidrasyonu olup, temelde fosfolipidlerin organik çözücüde çözülerek, sonrasında çözücü ayrıştırılıp kalan ince film tabakasının hidratlanmak suretiyle kendiliğinden lipozom veziküllerinin oluşturulmasına dayanır (Esposito ve diğ., 2021; Trucillo ve diğ., 2020).

Elde edilen konvansiyonel lipozomların boyutunu küçültmek için sonikasyon, mikrofluidizasyon, yüksek basınçlı

ekstrüzyon gibi tekniklerden yararlanmak mümkündür. Aslında lipozomlar ve nanolipozomlar fiziksel ve termodinamik olarak benzer olsa da nanolipozomların konvansiyonel lipozomlara göre daha küçük boyutta olmaları ve daha yüksek yüzey/hacim oranı nanolipozomların biyoyararlılığını arttırmaktadır. Mikrofluidizasyon tekniği, lipozomların boyutlarını istenen şekilde küçültmesinin yanı sıra toksik solventler kullanmadan büyük ölçekli lipozom üretimine uygundur (Zou ve diğ., 2014). Burada vurgulanan noktalardan yola çıkarak bu çalışmanın amacı siyah kuşburnu meyvesinden elde edilen polifenollerce zengin etanol ekstraktının ince film hidrasyon yöntemini takiben mikrofluidizasyon tekniği kullanılarak hazırlanan nanolipozomlara yüksek enkapsülasyon verimini hedefleyerek enkapsüle edilmesi ve bu nanolipozomların kitosanla kaplanarak stabilitesinin artırılmasıdır. Bu amaçla, elde edilen nanolipozom kapsülleri ortalama partikül boyutu ve zeta potansiyeli analizleri yapılarak karakterize edilip optimum enkapsülasyon koşulları tespit edilmiştir. Enkapsülasyon verimini hesaplamak için ise toplam fenolik madde içeriği (Folin-Ciocalteu yöntemi) ve antioksidan kapasite (CUPRAC ve DPPH yöntemleri) analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO) satın alınmıştır. Siyah kuşburnu meyvesi ise Bayburt yöresinden temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.1.1. Polifenol Ekstraktının Hazırlanması

Sıvı azot kullanılarak dondurulan siyah kuşburnu meyveleri elektrikli öğütücü kullanılarak toz haline getirildikten sonra etanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Bunun için, 1 g öğütülmüş meyvenin üzerine 10 mL etanol eklenerek ultrasonikatörle 2 dakika süreyle muamele edilmiştir. Daha sonra, karışım 7168 g'de 5°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek etanol fazı katı kısımdan ayrılmıştır. İşlem üç defa tekrarlanmış olup elde edilen etanol fazları birleştirilmiştir. Son olarak, etanol 40°C'de vakum altında döner buharlaştırıcı (Büchi) yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

2.1.2. Polifenol Ekstraktının İnce Film Hidrasyon Yöntemi ve Mikrofluidizasyon Kullanılarak Nanolipozomal Enkapsülasyonu

Lipozomlar ince film hidrasyonu yöntemine göre Yang ve diğ. (2011) tarafından tarif edildiği gibi hazırlanmıştır. Buna göre, 0.1g ekstrakt, 800 mg fosfolipit ve 200 mg kolesterol tartılıp üzerine 10 ml kloroform eklenip iyice karıştırıldıktan sonra kloroform kısmı 50°C'de döner buharlaştırıcıda uçurulmuştur. Oluşan ince filmin üstüne 400 mg Tween 80 ve 50 ml fosfat tampon çözeltisi (pH 4.0) eklenmiştir.

Ultrasonikatör yardımıyla homojenize edildikten sonra oluşan dispersiyon mikrofluidizerden (Microfluidizer Processor M-110L, Microfluidics, Newton, ABD) 25,000 psi basınçta 5 defa geçirilerek polifenol ekstraktı içeren nanolipozomlar elde edilmiştir. Ayrıca, kontrol olarak ekstrakt içermeyen boş nanolipozomlar da benzer şekilde üretilmiştir.

2.1.3. Nanokapsüllerin Kitosanla Kaplanması

Elde edilen boş ve ekstrakt içeren nanolipozomlar negatif yüklü oldukları için pozitif yüklü kitosan polimeri ile tabaka-tabaka yöntemine göre Özgüven ve diğ. (2020)'nin tarif ettiği şekilde kaplanmıştır. Bunun için kitosan farklı konsantrasyonlarda (%0.2, %0.4, %0.6, %0.8 ve %1.0 w/v) hazırlandıktan sonra üretilen nanolipozom dispersiyonları ile

karıştırıldıktan sonra bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

2.1.4. Nanokapsüllerin Karakterizasyonu

Elde edilen nanokapsüllerin karakterizasyonu için zeta potansiyeli ve ortalama partikül boyutu (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) ölçülmüştür.

2.1.5. Enkapsülasyon Verimi

Nanolipozomlara tutuklanan ekstraktın enkapsülasyon verimini hesaplamak için Gültekin-Özgülven ve diğ. (2016)'nın tarif ettiği şekilde jel filtrasyon yöntemi kullanılmıştır. Sephadex G50'nin fosfat tamponda oluşturduğu jelden geçirilen ekstrakt içeren nanolipozomlardan enkapsüle olmayan ekstrakt ve bunların kitosan kaplı hallerinden bağlanmamış kitosan kısımları jelde tutularak uzaklaştırılır. Daha sonra, jelden geçen nanolipozomlar ise %0.15'lik Triton X-100 çözeltisi kullanılarak parçalanır. Yapılan işlemin prensibi, lipozomu parçalayarak, lipozomların yüzeyindeki ve içindeki fenolik bileşiklerin açığa çıkarılması ilkesine dayanmaktadır.

2.1.6. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır (Gültekin-Özgülven ve diğ., 2016). Seyreltilmiş ekstrakt içeren nanolipozom örneklerinden 200'er µl alınarak üzerine 1.5 ml 1:10 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Daha sonra bu karışıma 1.2 ml %7.5'lük sodyum karbonat eklenerek karıştırılmış ve 45 dakika karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Oluşan renk spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda okunmuştur. Boş lipozom örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden mg GAE/100 ml ekstrakt olarak hesaplanmıştır.

2.1.7. Toplam Antioksidan Kapasite

Toplam antioksidan kapasite CUPRAC ve DPPH yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

2.1.7.1. CUPRAC Yöntemi

Apak ve diğ. (2004)'nin yöntemine göre ekstrakt içeren nanolipozom örneklerinden 100'er µl alınarak üzerine 1 ml Bakır (II) klorit, 1 ml Neocuproine ve 1 ml sodyum asetat çözeltileri ve 1 ml saf su ile karıştırılıp 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Oluşan renk 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur. Boş lipozom örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Trolox eşdeğeri (TE) cinsinden mg TE/100g ml ekstrakt olarak hesaplanmıştır.

2.1.7.2 DPPH Yöntemi

Ekstrakt içeren nanolipozom örneklerinden 100'er µl alınıp üzerine 2 ml DPPH içeren metanol çözeltisi eklenerek vortekslle karıştırılması sağlanmıştır. 30 dakika karanlık bir ortamda bekletildikten sonra sonucu oluşan renk spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda okutulmuştur (Altın ve diğ., 2018). Boş lipozom örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Trolox eşdeğeri (TE) cinsinden mg TE/100 ml ekstrakt olarak hesaplanmıştır.

2.1.8. 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. Nanokapsüllerin Karakterizasyonu

Tablo 1'de görüldüğü gibi nanolipozomların karakterizasyonu için ortalama partikül boyutu ve elektriksel yükü belirten zeta potansiyeli ölçümlerinden yararlanılmıştır.

Nano boyutuna küçültülen boş lipozomlar elektriksel olarak negatif (-10.9) yüklüdür. Polifenol ekstraktı yüklenen nanolipozomların zeta potansiyelinin polifenol ekstraktının da negatif elektrik yüklü olmasından dolayı arttığı (-14.7) görülmektedir. Diğer taraftan, boş nanolipozomların partikül boyutunun da 85.6 nm'den içine ekstrakt yüklendiğinde 93.9 nm'ye büyüdüğü belirlenmiştir.

Elektrostatik etkileşimler sayesinde nanolipozomlar kitosan polimeriyle kaplanmıştır. Bu nedenle, kitosanla kaplanan ekstrakt içeren ve içermeyen nanolipozomların zeta potansiyelinin negatiften pozitifte geçmesi beklenmektedir. Nitekim boş nanolipozom için -10.90 ve ekstrakt içeren nanolipozom için -14.70 mV olan zeta potansiyeli kitosanla kaplanmasının sonucunda sırasıyla en fazla 18.93 (%0.4 konsantrasyonda) ve 15.76 (%0.5 konsantrasyonda) mV'a kadar değişmiştir. Bulgular literatürle (Akgün ve diğ., 2020; Gibis ve diğ., 2012) uyumludur. Ayrıca, nanolipozomların kitosanla kaplanmasının sonucunda partikül boyutunda da artış olmuştur. Boş nanolipozomların partikül boyutu 85.6 nm'den en fazla 171.2 nm'ye kadar artmıştır. Benzer şekilde, ekstrakt içeren nanolipozomlar da 93.9 nm'den en fazla 161.3 nm'ye kadar artış göstermiştir. Buradan yola çıkarak, %0.2'lik kitosan çözeltisi ile kaplanan ekstrakt içeren ve içermeyen nanolipozomlar hariç diğer tüm kitosan konsantrasyonlarında (%0.2, %0.6, %0.8 ve %1.0) kitosanla kaplanmanın başarılı olduğu anlaşılmıştır. Söz konusu konsantrasyonlar kullanılarak sırasıyla %0.1, %0.3, %0.4 ve %0.5 konsantrasyonlarında kitosanla kaplanmış nanolipozom kapsülleri elde edilmiş olur. %0.1 konsantrasyonda kitosanla kaplama denemesinde çökme gözlenmiştir. % 0.2'den düşük kitosan konsantrasyonunun çökelti oluşumuna neden olduğu, lipozomların kaplanmasında uygun olmadığı başka çalışmalarda da bildirilmiştir (Li ve diğ., 2015). Elde edilen kitosanla kaplanmış ekstrakt içeren ve içermeyen nanolipozomlardan yüksek zeta potansiyeline sahip ve düşük partikül boyutunda olanların en yüksek stabiliteye sahip olduğu söylenebilmektedir.

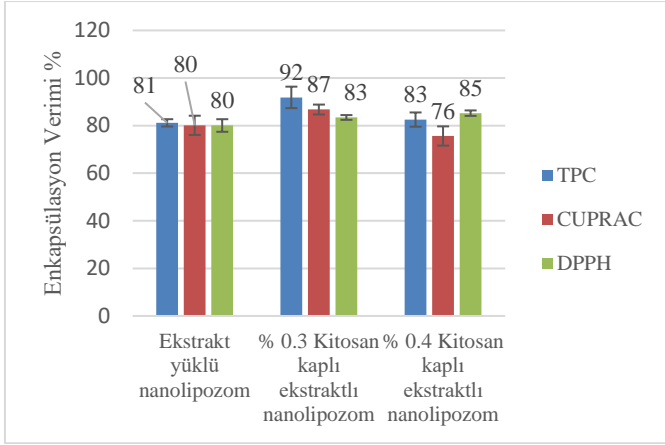
3.2. Enkapsülasyon Verimi

Enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında toplam fenolik madde ile toplam antioksidan kapasite (CUPRAC ve DPPH) analizleri kullanılmıştır. Şekil 1'de verildiği gibi ekstrakt içeren nanolipozomların enkapsülasyon verimi TPC, CUPRAC ve DPPH sonuçlarına göre sırasıyla %81, %80 ve %80 olarak bulunmuştur. Bu enkapsülasyon verimi oldukça yüksektir ve literatür bilgileriyle de uyumaktadır (Akgün ve diğ., 2020; Gibis ve diğ., 2012; Gültekin-Özgülven ve diğ., 2016).

Polifenollerin lipozomlara tutuklanmalarında kullanılan lipozom hazırlama yöntemine göre farklı enkapsülasyon verimleri elde edilmektedir. Trucillo ve diğ. (2018) zeytin fenoliklerinin enkapsülasyonunda süperkritik destekli prostenen yararlanarak en fazla %58 enkapsülasyon verimine ulaşırken Paini ve diğ. (2015) sonikasyon işlemi sayesinde apigenini %98 verimle enkapsüle edebilmiştir ve sonikasyon uygulamasının enkapsülasyon verimini artırdığını rapor etmiştir.

%0.3 kitosanla kaplama yapıldıktan sonra nanolipozomların enkapsülasyon verimi TPC'ye göre %92, CUPRAC'a göre %87, DPPH'e göre %83 olarak belirlenmiştir. Bunu TPC'ye göre %83, CUPRAC'a göre %76, DPPH'e göre %85 enkapsülasyon verimi ile %0.4'lük kitosan kaplı ekstrakt içeren nanolipozomların takip etmektedir. Görüldüğü gibi ince film hidrasyon yöntemini takiben mikrofluizasyon tekniği kullanılarak hazırlanan nanolipozom kapsüllerin enkapsülasyon verimi oldukça yüksektir. İnce film hidrasyon yöntemi ile sonikasyon tekniğinin kullanılarak kitosan kaplı kuersetin

nanolipozomlarının enkapsülasyon verimi % 71.14 olarak rapor edilmiştir (Hao ve diğ., 2017).



Şekil 1. Ekstrakt Yüklü Nanolipozom, %0.3 Kitosan Kaplı Ekstraktlı Nanolipozom ve %0.4 Kitosan Kaplı Ekstraktlı Nanolipozomun % Enkapsülasyon Verimleri.

Diğer taraftan, enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında yararlanılan spektrofotometrik yöntemlerden ziyade HPLC gibi daha hassas sonuç veren cihazlar kullanılarak daha gerçekçi olarak hesaplanması da mümkün olacaktır (Paini ve diğ., 2015).

İstatistiksel olarak %0.3 ve %0.4 kitosan konsantrasyonu ile nanolipozomların kaplanmasında partikül boyutu ve zeta potansiyeli açısından fark görülmediğinden ($p>0.05$) enkapsülasyon verimi daha yüksek olduğu için %0.3'lük kitosan konsantrasyonu ile kaplanan nanolipozomların seçilmesinin daha uygun olduğu düşünülmektedir.

4. Sonuç

İnce film hidrasyon yöntemini izleyen mikroflüizidasyon sonucu elde edilen ve kitosanla kaplamanın (%0.2, %0.3, %0.4,

%0.5) başarılı olduğu ekstrakt içeren nanolipozomların enkapsülasyon verimleri dikkate alındığında %0.3'lük kitosan çözeltisi ile kaplanan nanolipozomların toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite (CUPRAC ve DPPH) açısından değerlendirildiğinde en yüksek enkapsülasyon verimine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, %0.3'lük kitosan konsantrasyonu kullanılarak kaplanan nanolipozomların partikül boyutu ve zeta potansiyeli açısından daha stabil oldukları anlaşılmıştır. Sonuç olarak ince film hidrasyon ve mikroflüizidasyon yöntemlerinin birlikte kullanılarak yüksek enkapsülasyon verimine sahip nanolipozom elde edilebileceği, elde edilen nanolipozomların kaplanmasında kullanılan kitosan polimeri ile geniş bir konsantrasyon aralığında (%0.2-0.5) kaplama yapmanın mümkün olabileceği anlaşılmıştır. Diğer taraftan, ince film hidrasyon yönteminde etanol gibi çözümlerden yararlanıldığı için bu yöntemin hidrofobiklerin yanı sıra hidrofobik ve lipofilik karakterdeki fenolik bileşiklerin enkapsülasyonunda da kullanılması söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle, ince film hidrasyon yöntemi ve mikroflüizidasyon tekniğinin birlikte kullanılarak özellikle suda çözünürlüğü az olan hidrofobik veya lipofilik karakterdeki fenolik bileşiklerde denenmesi, elde edilen nanokapsüllerin özellikle biyoyararlılık ve stabilite üzerine çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Böylece suda çözünürlüğü az olan ancak yüksek antioksidan kapasitesi olan fenolikleri içeren kapsüllerin ilerde gıda, besin takviyesi, kozmetik ve ilaçta kullanımının ilk çalışmaları gerçekleştirilmiş olacaktır.

5. Teşekkür

Yazarlar İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Yüksek Gıda Mühendisi Evren Demircan'a desteklerinden dolayı teşekkür eder.

Tablo 1. Nanokapsüllerin Karakterizasyonu.

Nanokapsüller	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
Boş nanolipozom	85.6±1.33 ^f	-10.90±1.27 ^a
% 0.1 Kitosan kaplı boş nanolipozom	Çöktü	-
% 0.2 Kitosan kaplı boş nanolipozom	180.9 ± 7.53 ^a	13.96 ± 1.11 ^d
% 0.3 Kitosan kaplı boş nanolipozom	157.4 ± 1.38 ^b	17.03 ± 2.77 ^e
% 0.4 Kitosan kaplı boş nanolipozom	171.2 ± 2.62 ^a	18.93 ± 0.80 ^e
% 0.5 Kitosan kaplı boş nanolipozom	156.2 ± 4.83 ^c	17.56 ± 2.00 ^e
Ekstraktlı nanolipozom	93.9±2.76 ^e	-14.70±0.58 ^b
% 0.1 Kitosan kaplı ekstraktlı nanolipozom	Çöktü	-
% 0.2 Kitosan kaplı ekstraktlı nanolipozom	139.4 ± 1.13 ^d	7.29 ± 0.36 ^c
% 0.3 Kitosan kaplı ekstraktlı nanolipozom	153.5 ± 2.28 ^c	11.44 ± 3.32 ^d
% 0.4 Kitosan kaplı ekstraktlı nanolipozom	150.7 ± 1.47 ^c	13.96 ± 1.72 ^d
% 0.5 Kitosan kaplı ekstraktlı nanolipozom	161.3 ± 2.17 ^b	15.76 ± 1.26 ^d

Her kolondaki harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları $p<0.05$ düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Kaynakça

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ... & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1-9.

Akgün, D., Gültekin-Özgülven, M., Yüce-tepe, 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.

- Altin, G., Gültekin-Özgülven, M., & Ozcelik, B. (2018). 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.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- 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.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20(4), 292-302.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., ... & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.
- Esposito, B. S., Jauregi, P., Tapia-Blácido, D. R., & Martelli-Tosi, M. (2020). Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 40-48.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Gibis, M., Vogt, E., & Weiss, J. (2012). Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food Funct.*, 3(3), 246-254.
- Gültekin-Özgülven, 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.
- Hao, J., Guo, B., Yu, S., Zhang, W., Zhang, D., Wang, J., & Wang, Y. (2017). Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 37-44.
- Kırtıl, E., & Öztıp, M. H. (2014). Enkapsülasyon maddesi olarak lipozom ve gıdalarda kullanımı: Yapısı, karakterizasyonu, üretimi ve stabilitesi. *Akademik Gıda*, 12(4), 41-57.
- 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-N15.
- Li, Z., Paulson, A. T., & Gill, T. A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, 19, 733-743.
- 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.
- Paini, M., Daly, S. R., Aliakbarian, B., Fathi, A., Tehrani, E. A., Perego, P., ... & Valtchev, P. (2015). An efficient liposome based method for antioxidants encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 1067-1072.
- 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.
- Trucillo, P., Campardelli, R., Aliakbarian, B., Perego, P., & Reverchon, E. (2018). Supercritical assisted process for the encapsulation of olive pomace extract into liposomes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 135, 152-159.
- Trucillo, P., Campardelli, R., & Reverchon, E. (2020). Liposomes: From bangham to supercritical fluids. *Processes*, 8(9), 1022.
- Yang, J., Ni, B., Liu, J., Zhu, L., & Zhou, W. (2011). Application of liposome-encapsulated hydroxycamptothecin in the prevention of epidural scar formation in New Zealand white rabbits. *The Spine Journal*, 11(3), 218-223.
- Zou, L. Q., Liu, W., Liu, W. L., Liang, R. H., Li, T., Liu, C. M., ... & Liu, Z. (2014). Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 934-941.