

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELMA KABUKLARINDAN ELDE EDİLEN FENOLİK BİLEŞİKLERİN
LİPOZOM İLE ENKAPSÜLASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Evren DEMİRCAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

HAZİRAN 2016

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELMA KABUKLARINDAN ELDE EDİLEN FENOLİK BİLEŞİKLERİN
LİPOZOM İLE ENKAPSÜLASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Evren DEMİRCAN
(506131534)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK

HAZİRAN 2016

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506131534 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Evren DEMİRCAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “ELMA KABUKLARINDAN ELDE EDİLEN FENOLİK BİLEŞİKLERİN LİPOZOM İLE ENKAPSÜLASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. H. Funda**
 KARBANCIOĞLU GÜLER
 İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Aslı CAN KARAÇA
 Aromsa A.Ş.

Teslim Tarihi : 2 Mayıs 2016
Savunma Tarihi : 8 Haziran 2016

Anneme ithaf ediyorum,

ÖNSÖZ

Bismillah her hayrın başıdır ilkesiyle bismillahirrahmanirrahim diyerek tezimin faydalı ve hayırlı olmasını dilerim.

Her zaman desteğini ve bilgisini benimle paylaşan değerli Nalan Demir'e, çalışmalar sırasında yardımlarını ve moral desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Kadriye Nur Kasapoğlu, Beyza Şükran Işık ve Ceren Daşkaya Dikmen'e ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm eğitimim boyunca yetişmemi sağlayan çok değerli hocalarıma ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle, her türlü desteğiyle ve yardımıyla motivasyonumu artıran ve rehberliğiyle, fikirleriyle ufkumu genişleten çok değerli ve kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Beraat Özçelik'e saygılarımla teşekkür ederim.

Haziran 2016

Evren Demircan
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Fenolik Bileşikler	4
1.2 Elmada bulunan fenolik bileşikler.....	11
1.3 Biyoyararlılık	13
1.4 Enkapsülasyon.....	15
1.4.1 Enkapsülasyon yöntemleri	17
1.4.2 Kaplama materyali olarak lipozom	21
1.4.3 İkinci katman kaplama materyali: Kitosan	22
1.4.4 Koruyucu katman kaplama materyali: Maltodekstrin.....	23
1.5 Tezin amacı	23
2. MATERYAL ve METOT	25
2.1 Materyal	25
2.2 Metotlar	25
2.2.1 Elma kabuğundan fenolik bileşen ekstraksiyonu	25
2.2.2 Lipozom hazırlama, kaplama	26
2.2.3 Kitosan hazırlama, kaplama	26
2.2.4 Maltodekstrin hazırlama, kaplama	26
2.2.5 Jel filtrasyonu ile enkapsüle edilememiş ekstraktların uzaklaştırılması	26
2.2.6 Tritonla parçalama işlemi.....	27
2.2.7 Partikül boyutu analizi ve zeta (ζ) potansiyeli ölçümü	27
2.2.8 SEM (Elektron Tarama Mikroskobu) incelemesi	27
2.2.9 Toplam fenolik miktarı tayini	28
2.2.10 Toplam flavonoid tayini.....	28
2.2.11 Antioksidan aktivite tayini	29
2.2.11.1 DPPH metodu	29
2.2.11.2 CUPRAC metodu.....	29
2.2.12 Elma kabuğu ekstraktlarının ürüne katılması.....	30
2.2.13 Ürüne katılan ekstraktların <i>in vitro</i> biyoyararlılığının incelenmesi	30
2.2.14 UFLC ile fenolik bileşen analizi	30
2.2.15 İstatistiksel analiz	31
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1 Optimizasyon Aşamasında Yapılan Ölçümler	33

3.1.1 Partikül boyutu	33
3.1.2 Zeta (ζ) potansiyeli	34
3.1.3 Toplam flavonoid miktarları	36
3.1.4 Toplam fenolik miktarları	38
3.1.5 Antioksidan aktivite analizi	39
3.1.6 Optimizasyon sonucu	41
3.2 Biyoyararlılık Sonrası Yapılan Ölçümler	42
3.2.1 Partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri	42
3.2.2 SEM görüntüleri	43
3.2.3 Toplam fenolik madde analizi	47
3.2.4 Toplam flavonoid miktarı	48
3.2.5 Antioksidan aktivite analizleri	48
3.2.6 UFLC analiz sonuçları	50
3.3 Sonuç	51
KAYNAKLAR	55
EKLER	65
ÖZGEÇMİŞ	79

KISALTMALAR

Ar-Ge	: Araştırma Geliştirme.
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu.
UFLC	: Ultra Hızlı Sıvı Kromatografisi (Ultra Fast Liquid Chromatography).
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography).
GRAS	: Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Recognized as Safe).
DPPH	: Antioksidan analiz yönteminde kullanılan kimyasal madde (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).
ABTS	: Antioksidan analiz yöntemi (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ile uygulanan yöntem).
CUPRAC	: Antioksidan analiz yöntemi (CUPric Reducing Antioxidant Capacity).
UV-Vis	: Ultraviyole-görünür alan.

SEMBOLLER

°C	: Santigrat derece.
M	: Molarite.
mM	: Milimolar.
mV	: Milivolt.
µm	: Mikrometre.
nm	: Nanometre.
µl	: Mikrolitre.
ml	: Mililitre.
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (round per minute).
dk	: Dakika.
w/v	: Ağırlık/hacim oranı (weight/volume).
v/v	: Hacim/hacim oranı (volume/volume).
kDa	: Molekül ağırlığı, kilo Dalton.
p	: İstatistik olasılık.

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1 : Gıda atıklarının sınıflandırılması ve çeşitli gıdalardan elde edilen değerli bileşenler (Galanakis, 2012).....	2
Çizelge 1.2 : Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Balasundram ve diğ., 2006).....	4
Çizelge 1.3 : Bazı gıdaların fenolik bileşikleri ve miktarları (King & Young, 1999).	7
Çizelge 1.4 : Fenolik bileşiklerin fiziksel özellikleri ve duyarlılıkları (Z. Fang & Bhandari, 2010).....	9
Çizelge 3.1 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen partikül boyutu değerleri.....	33
Çizelge 3.2 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen zeta potansiyeli değerleri.....	35
Çizelge 3.3 : Elma kabuğu enkapsülasyonu aşamalarında ölçülen toplam flavonoid miktarları.	36
Çizelge 3.4 : Elma kabuğu enkapsülasyonu aşamalarında ölçülen toplam fenolik madde miktarları.	38
Çizelge 3.5 : Elma kabuğu enkapsülasyonu aşamalarında ölçülen antioksidan aktivite.....	40
Çizelge 3.6 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen zeta potansiyeli değerleri.....	42
Çizelge 3.7 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası Folin metoduyla elde edilen toplam fenolik madde miktarları.	47
Çizelge 3.8 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası elde edilen toplam flavonoid miktarları.	48
Çizelge 3.9 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası DPPH metodu ile elde edilen antioksidan aktivite miktarları.....	49
Çizelge 3.10 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası CUPRAC metodu ile elde edilen antioksidan aktivite miktarları.....	49
Çizelge 3.11 : UFLC analiz sonuçları.	50

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Polifenollerin kimyasal yapıları (D Archivio ve diğ., 2007).....	5
Şekil 1.2 : Enkapsülasyon yöntemlerinin karakteristiklerinin temsili ilüstrasyonu (Z. Fang & Bhandari, 2010).....	18
Şekil 1.3 : Lipozomun yapısı.	21
Şekil 3.1 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen partikül boyutu değerlerinin grafiksel gösterimi.	34
Şekil 3.2 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.	35
Şekil 3.3 : Üç katmanlı (lipozom+kitosan+maltodekstrin) enkapsüle elma ekstraktlarının 4.000 (a) ve 12.000x (b) büyütülmüş SEM görüntüleri. .	44
Şekil 3.4 : Boş lipozom+kitosan+maltodekstrin kapsüllerinin 4.000 (a) ve 12.000 kat (b) büyütülmüş SEM görüntüleri.	45
Şekil 3.5 : Elma kabuğu ekstraktlarının (kapsüllenmemiş) 4.000 (a) ve 12.000 kat (b) büyütülmüş SEM görüntüleri.	46
Şekil A.1 : Toplam fenolik miktarı tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.....	66
Şekil A.2 : Toplam flavonoid miktarı tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.....	67
Şekil A.3 : DPPH antioksidan aktivite tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.....	68
Şekil A.4 : CUPRAC antioksidan aktivite tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil A.5 : Kefire katılan boş lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	70
Şekil A.6 : Kefire katılan % 0,1'lik ekstrakt içeren lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	71
Şekil A.7 : Kefire katılan elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	72
Şekil A.8 : Kefire katılan maltodekstrinle kaplı elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	73
Şekil A.9 : Boş lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	74
Şekil A.10 : Yüzde 0,1'lik ekstrakt içeren lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	75
Şekil A.11 : Elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	76
Şekil A.12 : Maltodekstrinle kaplı elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.	77

ELMA KABUKLARINDAN ELDE EDİLEN FENOLİK BİLEŞİKLERİN LİPOZOM İLE ENKAPSÜLASYONU

ÖZET

Fonksiyonel gıdalar gıdanın besin değerine ek olarak, sağlığa olumlu katkıda bulunan besinlerdir. Bu gıdaların yapısında doğal olarak bulunan, sağlığı geliştirici etkisi olan ve farmakolojik aktivite gösteren komponentler bulunmaktadır. Gıda atıkları gıda maddesindeki bu değerli maddeleri de içeren kompleks ingrediyenlerden oluşmaktadır. Bu maddeler fonksiyonel bileşikler veya biyoaktif bileşenler olarak da adlandırılmaktadır.

Günümüzde tüketici tercihleri ve yasal düzenlemeler çerçevesinde gıdalara eklenen katkı maddelerinin daha doğal ve tüketici sağlığını tehdit etmeyen hatta sağlığa olumlu katkı yapabilecek maddelerden oluşması yönünde oluşan eğilim, yapay katkı maddeleriyle aynı işlevi ve etkiyi gösteren ve gıdalarda doğal olarak bulunan bu bileşenlerin kullanımını önemli kılmıştır. Bu bileşikler gıdalarda veya ilaçlarda renklendirici, antioksidan, korucuyu madde ve katkı maddesi olarak kullanılabilmektedirler.

Fonksiyonel bileşikler daha özelde polifenoller olarak da adlandırılan fenolik bileşikler bitkilerde ve gıdalarda yoğun olarak bulunması, antioksidan, anti-enflamatuvar, antibakteriyal ve antiviral etkileri ile bir çok hastalığın önlenmesinde ve sağlığa olumlu etkileri nedeniyle insan ve hayvan diyetlerinde önemli bir yere sahiptir. Birçok klinik öncesi araştırma ve epidemiyolojik veri bitki polifenollerinin potansiyel bir kemo-preventif ve anti-kanser ajanı olarak hareket ederek bazı kanser türlerini yavaşlattığı, kardiyovasküler hastalık risklerini, nörodejeneratif hastalıkları, diyabet ve kemik erimesini azalttığını ortaya koymaktadır.

Olumlu etkilerinin ve biyolojik aktivitelerinin yanında fenolik bileşikler gıda işleme aşamalarındaki proseslere karşı stabil değillerdir. Sıcaklık, oksijen ve ışık bu bileşiklerde bozulmalara neden olmaktadır. Bununla birlikte diğer nutrasetik bileşikler gibi fenolik bileşikler de gastrointestinal bölgedeki koşullarda ortam pH'sından etkilenmekte ve enzim ve diğer nutrientlerin varlığı da bu bileşiklerin potansiyel sağlık etkilerini ve aktivitelerini engellemektedir.

Fenolik bileşiklerin çevresel etkilere karşı ve proses koşullarında, saklama ve hatta tüketim aşamalarında düşük stabiliteye sahip olmaları teknolojik zorlukları da beraberinde getirmiştir. Fonksiyonel bileşenlerin olumlu etkilerinin görülebilmesi için vücut tarafından yeterli düzeyde alınabilmesi sağlanmalıdır. Fonksiyonel bileşiklerden gerekli faydanın sağlanmasını etkileyen ve tüketim sırasında karşılaşılan sorunlardan biri de biyoyararlılık olarak tanımlanan ve alınan bileşenin vücut tarafından ne kadarının kullanılabildiğidir. Bu bileşenlerin düşük stabiliteye sahip olmaları gıda prosesleri aşamalarında ve tüketim sırasında biyoyararlılıklarını olumsuz yönde etkilemektedir. Vücut tarafından yeterli emilimin sağlanıp gerekli

organlara veya dokulara ulaşmasını sağlanması için biyokullanılabilirliğinin artırılması gereklidir.

Üretim prosesleri sırasında veya tüketim aşamalarında bu biyoaktif bileşenlerin verimli bir şekilde korumanın yöntemlerinden biri de mikro veya nano kapsülleme (enkapsülasyon) tekniklerinin kullanılmasıdır. Çeşitli enkapsülasyon yöntemleri bulunmakla birlikte hidrofobik ve hidrofilik yapısı ve uygulanabilirliği bakımından kolay olan lipozom ile enkapsülasyon tekniği dikkati çekmektedir.

Yapılan bu çalışmada hedeflenen; çok tüketilen ve çeşitli gıda proses işlemleri uygulanan elmanın atık olarak bertaraf edilen kabuklarının değerli bileşenlerini elde ederek bu bileşenlerle gıdanın fonksiyonel özelliklerini arttırmak ve bu bileşenlerin gıdalarda kullanılabilirliğini incelemek amacıyla enkapsülasyon tekniğinin etkinliğini ortaya koymaktır. Böylelikle gıda atıklarının geri kazanımı konusunda bir kapı aralamak, lipozomla enkapsülasyon yönteminin uygulanabilirliğini belirlemek ve kapsülleme yönteminin değerli fonksiyonel bileşenleri mide veya bağırsak gibi hedeflenen bölgeye kadar dış etkilere ve bozulmalardan koruyup korumadığını ve bu bölgelerde salınımını sağlayarak biyokullanılabilirliğini artırıp arttırmadığını tespit etmek hedeflenmiştir.

Bu çalışmada elma kabuklarından kimyasal yöntemlerle ekstrakte edilen fenolik bileşikler (% 0,1 – 0,5 ekstrakt içerecek şekilde) mikrofludik teknoloji kullanılarak lipozomla enkapsüle edildi. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri ölçülerek boyut analiziyle enkapsülasyon optimizasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen kapsüllenmiş fenolik bileşiklerin miktarları enkapsülasyon verimliliğini belirlemek amacıyla, kapsülleme öncesi ve kapsülleme sonrası toplam flavonoid miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik miktarı ve DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite analizleri yapılarak incelendi.

Uygun enkapsülasyon etkinliğini tespit etmek amacıyla yapılan optimizasyon sonucunda % 0,1'lik ekstrakt eklenerek hazırlanan lipozom çözeltisinde en büyük negatif zeta potansiyeliyle birlikte en büyük partikül boyutu elde edildi (-20,9 mV ve 225,4 nm). Partikül boyutunun büyük olması kaplamanın gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Bununla birlikte toplam fenolik madde miktarı (% 32,5 kapsüllenme; % 78,5 verimlilik), toplam flavonoid madde miktarı (% 35,8 kapsüllenme; % 64,4 verimlilik) ve antioksidan aktivite (% 31,1 kapsüllenme; % 92,3 verimlilik) analizlerinden elde edilen sonuçlarla en yüksek kapsülleme oranı ve en uygun enkapsülasyon verimliliği yine % 0,1'lik ekstraktlar ile hazırlanan lipozom çözeltisiyle elde edilmiştir.

En uygun kapsüllenmenin sağlandığı (% 0,1 ekstrakt içeren) oran ile enkapsülasyon işlemi yapılarak gıda ürünü içine katıldı. Gıda ürünü olarak kefir kullanıldı. Elma ekstraktları önce lipozomla kaplandı. Daha sonra pozitif yüklü kitosanla ikinci defa kaplanması sağlandı. Isısal işleme (kurutma işlemine) dayanıklılığının sağlanması için üçüncü bir katman olarak maltodekstrin ile de kaplanarak enkapsülasyon işlemi tamamlandı. Püskürtmeli kurutucuda kurutulup dayanıklılığının ve kullanılabilirliğinin artırılması sağlandı. Daha sonra lipozomla kaplamanın ekstraktların biyoyararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla mide ve bağırsak ortamının simüle edildiği in vitro sindirim yöntemi uygulandı.

Biyoyararlılık öncesi ve sonrası enkapsüle ekstrakt içeren kefir numunelerinin ve kefirsiz enkapsüle numunelerin spektrofotometrik yöntemlerle toplam flavonoid miktarı, toplam fenolik miktarı ve DPPH ve CUPRAC antioksidan aktivite analizleri

yapıldı. Ayrıca HPLC ile de kromatografik analizleri gerçekleştirilerek fenolik bileşen kompozisyonları ve toplam miktarları incelenerek karşılaştırıldı.

Biyoyararlılık öncesi kaplanmamış elma kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde analizi incelendiğinde, lipozom, kitosan ve maltodekstrinle kaplanan elma kabuğu ekstraktlarının kefir içine katıldıktan sonra fenolik madde miktarlarının 1,87 mg/g'dan 0,61 mg/g'a düştüğü, toplam flavonoid miktarının 0,30 mg/g'dan 0,30 mg/g olduğu ve değişmediği, antioksidan aktivite analizlerinde ise DPPH'te 0,55 mg/g'dan 0,06 mg/g'a düştüğü, CUPRAC analizinde 1,81 mg/g'dan 0,74 mg/g'a düştüğü ve HPLC'de yapılan analizlerde ise 147,71 mg/g'dan 61,90 mg/g'a değiştiği belirlenmiştir. Büyük oranlarda gerçekleşen azalmalara bakılarak lipozom enkapsülasyonun başarılı olduğunu ve fenolik bileşenleri etkin şekilde koruduğu söylenebilir.

Spektrofotometrik analizler ve kromatografik analiz incelendiğinde genel olarak boş lipozom ile yüzde 0,1 elma kabuğu ekstraktı içeren lipozomun sonuçlarının birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı görülmektedir ($p<0,05$). Bununla birlikte elma kabuğu ekstraktlarının verileri incelendiğinde biyoyararlılık öncesinde enkapsüle örneklerden çok daha büyük değerler olduğu ve istatistiksel olarak önemli fark olduğu ancak biyoyararlılık sonrası arada önemli fark olmadığı ($p<0,05$) ve ölçülen değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Sadece maltodekstrin ile kaplanan örneklerde de lipozomla kaplanan örneklerle benzer sonuçlara ulaşıldığı görülmüştür. Enkapsüle numuneler ile kapsüllenmemiş numune arasındaki farkın önemli olduğu, bununla birlikte biyoyararlılık sonrası ölçümlerde fark olmadığı görülmüştür ($p<0,05$).

Ağız ortamını, mide ortamını ve bağırsak ortamını laboratuvar ortamında simüle edilen ve bağırsak sonrasının analizlendiği in vitro sindirim metodu uygulandıktan sonra elde edilen sonuçların birbirlerine yakın olması lipozom ve kitosanla kaplamanın vücut tarafından emilimin gerçekleştiği bağırsak ortamında istendiği şekilde çözünerek aktif bileşenleri ortaya çıkardığının göstergesidir.

Sonuç olarak, elma kabuğundan ekstrakte edilen fenolik bileşenlerin lipozom-kitosan-maltodekstrin ile kaplanarak tüketim sırasında stabilitelerinin arttırılabileceği ve vücut tarafından biyokullanılabilirliğinin arttırılabileceği savunulabilir.

ENCAPSULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS WHICH EXTRACTED FROM APPLE PEELS

SUMMARY

Functional foods are foods which have health benefits that are in addition to those attributable to the nutritional value of the food. The term is usually applied to foods that have been modified or combined in order to enhance the health benefits but may include any food that naturally possesses components with demonstrable pharmacological activity. Food wastes contains these valuable components with complex ingredients. These valuable components usually named as functional compounds or bioactive compounds.

In recent years, consumer demands great interests and regulatory agencies' tendency of having more natural food ingredients that have positive health effect has arisen the importance of these components which have similar preservation and additive quality. The polyphenolic compounds are used in numerous sectors of the food-processing industry as natural additives like natural coloring agents, conservative agents, natural antioxidants and nutritional additives. However, it is probably in the field of human health that the economic implication of polyphenols is the most important. Actually, many plant extracts rich in phenolic molecules of interest are used as food complements or can be integrated into cosmetic or pharmaceutical formulations.

Functional compounds, specifically polyphenols named as phenolic compounds have considerable importance on human and animal diet because they associated with probable reduced risks of chronic diseases, they constitute pigments with a wide range of biological activities including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antimutagenic, chemopreventive activities and may reduce the risk of coronary heart disease through modulation of arterial protection.

Besides its benefits and biological activities, phenolics are not stable compounds. Phenolics are susceptible to degradation through factors such as the presence of light, pH (mainly pH higher than 7), temperatures higher than 60 – 80°C depending the phenolic group, the presence of sulfite, ascorbic acid, enzymes among other factors.

Low stability of phenolics during food processing, storage and even during consumption brings new technological challenges. Functional compounds should be taken at adequate dose to reveal its health benefits. One of the big challenges is bioavailability of these components. Because of some drawbacks as low extraction percentages and their relative instability which is affected by physical and chemical factors, bioavailability of these compounds should be increased to effect in the specific tissue or organ.

One possible way to effectively protect the phenolic compounds, from product processing to consumption, could be the use of micro or nano encapsulation techniques. Among different encapsulation techniques, liposom encapsulation

technique is used because of its attractive properties like being easily applicable, hydrophobic and hydrophilic properties and way to different particle sized preparation.

This study aimed to investigate encapsulation efficiency of phenolics by extracting from peel of the fruit apple which is commonly consumed and passed different processing steps, for determining how to use this extract as an ingredient to improve functional property of food. Thereby, aiming to open a door for waste recycling, to observe applicability of liposome entrapment method, whether encapsulation can protect functional compounds from degradation or other influences until gastric and intestinal environments, and if bioavailability improved by releasing of these compounds at targeted tissues.

In this study encapsulation of chemical extraction of apple peel phenolics by using liposome entrapment method by microfluidic methods was applied. Different concentrations of apple peel extracts from 0.1 to 0.5 % was prepared and encapsulation method applied to these extracts. Particle size and zeta potential values were recorded. With these values physico-chemical properties of encapsulation were defined.

Total phenolic content by Folin method, antioxidant capacity determination and total flavonoid content was measured thorough spectrophotometric analysis at different stages of encapsulation period like before encapsulation, after gel filtration process and after releasing phenolics by Triton treatment process to see the encapsulation efficiency.

During optimization that conducted to observe encapsulation efficiency, the lowest extract containing capsules (0.1 %) showed highest negative zeta potential where result is -20.9 mV and highest particle size where result is 225.4 μm . Bigger particle size than empty liposome shows that capsulation achieved.

Same extract (0.1 % extract containing capsules) showed highest capsulation rates and encapsulation efficiency where results are for total phenolic content, capsulation rate 32.5 %, encapsulation efficiency 78.5 %; for total flavonoid content capsulation rate 35.8 %, encapsulation efficiency 64.4 %; and for antioxidant activity analysis capsulation rate 31.1 %, encapsulation efficiency 92.3 %. With these results 0.1 percent preparation of apple peel extract with liposome will be more effective and used as optimized value.

After optimization with more efficient encapsulation rate (0.1 %) liposome suspensions were prepared and coated with chitosan as second protective layer. For heat stability during spray drying maltodextrin was used as third layer and encapsulation completed. Then suspension dried with spray dryer to achieve easy-to-use and get less degradable powder form.

Powdered encapsulated extract mixed with food sample to observe efficiency and recovery of encapsulation by liposome entrapment with in vitro bioavailability method in which gastric and intestinal environment simulated. A fermented milk drink (kefir) is used as food medium.

Before bioavailability and after bioavailability samples were analysed spectrophotometrically and chromatographically. Total phenolic content by Folin method, antioxidant capacity (CUPRAC and DPPH) determinations and total flavonoid content was measured thorough spectrophotometric analysis and phenolic compound composition and amount were measured by HPLC.

When non-capsulated apple peel extracts and encapsulated extracts were compared and examined, it could be seen that total phenolic compound decreased from 1.87 mg/g to 0.61 mg/g; total flavonoid content not changed (0.30), antioxidant activities in DPPH it decreased from 0.55 mg/g to 0.06 mg/g, in CUPRAC assay decreased from 1.81 mg/g to 0.74 mg/g and with HPLC analysis total phenolic compounds decreased from 147,71 mg/g to 61,90 mg/g. These big changes in amounts can be indicator of that encapsulation succeeded and capsules protected active compounds effectively.

Spectrofotometric analysis and chromatographic analysis showed that datas of liposom without extract and liposom with 0.1 % apple peel extract are nearly same and difference between means are not significantly important ($p < 0,05$). However, results of non-capsulated apple peel extract were much bigger than encapsulated samples and significantly different ($p < 0,05$) but after digestion treatment difference was not important and results were close to each for both capsulated and non-capsulated samples.

Results that gained after application of in vitro digestion method, in which mouth, gastric media and intestines were simulated, were close to each other and it can be said that encapsulation with liposom and chitosan as secondary layer and maltodextrin as third layer protected bioactive compounds and then capsules released that compounds in intestines where they would be available for body absorbtion.

As a result, with this study it can be suggested that encapsulation of apple peel extracts with liposom-chitosan-maltodextrin can improve stability of polyphenols during storage or digestion and bioavailability/bioaccessibility for body can be increased.

1. GİRİŞ

Bitkisel gıda atıkları çevre kirliliği oluşturması ve ierdiği değerli bileşenlerin kaybı aısından önemli sorunlar oluşturmaktadır. Bu sorunları azaltmak ve katma değerli rnler elde etmek amacıyla atıkların değerlendirilmesi büyük önem taşıamaktadır. Yapılan Ar-Ge araştırmaları gıdalardaki doğal bileşenlerin izolasyonu ve bunların kullanımları üzerine yoğunlaşmakta ve hatta ülke politikası olarak da yn verilmektedir. Bu bağlamda, gıdalardaki değerli bileşenlerin geri kazanımı, retimi TBTAK tarafından desteklenen ve çağırısı yapılan 1003 ve 1511 gibi öncelikli alanlar araştırma projelerinin son yıllardaki konuları arasında yer almaktadır (TBTAK, 2016).

Gıda atıkları gıda maddesindeki değerli maddeleri içeren kompleks ingrediyenlerden oluşmaktadır. Gıda endüstrisindeki çeşitli işletmelerin ürettiği atıklar genel olarak hayvansal ve bitkisel atıklar olmak üzere iki ana gruba ve yedi alt gruba ayrılmaktadır (Bkz. Çizelge 1.1). Atıklar, zirai işlemler sonucunda, gıda işleme proses yan ürünleri olarak veya tedarik zincirinin son aşamasında ortaya çıkabilmektedir. Son aşamada oluşan atıkların toplanmasının (evlerden veya evsel atıkların bulunduğu alanlardan) komplike bir toplama sistemi gerektirmesi ve bu atıklardaki bileşenlerin biyolojik stabilitelerinin patojen mikroorganizma varlığı nedeniyle daha düşük olması, zirai işlemler sırasında oluşan veya gıda işleme yan ürünlerinden oluşan atıklardaki değerli gıda bileşenleri üzerinde yoğunlaşılmasına ve çalışmaların daha konsantre ve bozulmaya daha az maruz kalmış halde bulunan bu aşamadaki atıklar üzerinde yapılmasına neden olmuştur (Galanakis, 2012). Çizelge 1.1’de çeşitli bitkisel ve hayvansal atıklardan elde edilen değerli bileşenler gösterilmektedir.

Fonksiyonel gıdalar, gıdanın besin değerine ek olarak sağlığa olumlu katkıda bulunan besinlerdir. Bu gıdaların yapısında doğal olarak bulunan, sağlığı geliştirici etkisi olan ve farmakolojik aktivite gösteren komponentler bulunmaktadır (Galland, 2013). Bu maddeler fonksiyonel bileşenler veya biyoaktif bileşenler olarak da adlandırılmaktadır.

Çizelge 1.1 : Gıda atıklarının sınıflandırılması ve çeşitli gıdalardan elde edilen değerli bileşenler (Galanakis, 2012).

Atık Türü	Atık Kaynağı	Hedef İngrediyen
Bitkisel		
(i) Tahıllar	Pirinç Kepeği	Albümin & globülin Hemiselüloz B & çözünmeyen diyet lifi
	Buğday İçi	Arabinoksilanlar
	Buğday Samanı	Hemiselüloz
	Buğday Kepeği	Glukuronoarabinoksilanlar
	Yulaf Değirmen Atığı	β -Glukan
	Malt Tozu	Glukoz, arabinoz & galaktoz
(ii) Kök & Yumrular	Patates Kabuğu	Fenoller
	Şeker Pancarı Pekmezi	Organik asitler
(iii) Yağlı Tarım Ürünleri & Baklagiller	Ayçiçeği Tohumu	Fitosteroller
	Soyafasulyesi Tohumu	Fitosteroller
	Soyafasulyesi Yağı Atığı	Fitosteroller
	Soyafasulyesi Atıksuyu	Albümin
	Zeytin Posası	Fenoller
	Zeytin Değirmen Atığı	Fenoller & Pektin
(iv) Meyve & Sebzeler	Mandalina Kabuğu	Narirutin Hesperidin
	Portakal Kabuğu	Apokarotenoid Limonen
	Limon Yan Ürünleri	Pektin
	Elma Posası	Pektin
	<u>Elma Kabuğu</u>	<u>Fenoller</u>
	Şeftali Posası	Pektin
	Kayısı Çekirdeği	Protein
	Üzüm Posası	Diyet Lifi
	Üzüm Kabuğu	Fenoller
	Muz Kabuğu	Cyanidin-3-rutinoside
	İşlenmiş Kivi	Çözünen & çözünmeyen diyet lifi
	Havuç Kabuğu	β -karoten Fenoller
	Domates Posası	Likopen
	Domates Kabuğu	Karotenoidler
	Karnabahar	Pektin

Çizelge 1.1 (devam) : Gıda atıklarının sınıflandırılması ve çeşitli gıdalardan elde edilen değerli bileşenler (Galanakis, 2012).

Hayvansal		
(v) Et Ürünleri	Tavuk Yan Ürünleri	Proteinler
	Salahane Yan Ürünleri	Proteinler
	Büyükbaş Hayvan kanı	Proteinler
	Dana Ciğeri	Protein konsantratları
	Kayun İç Organları	Protein hidrolizatları
(vi) Balık & Deniz Ürünleri	Balık Artıkları (Deri, Kafa ...)	Proteinler Lipitler
	Yengeç, Karides Kabukları	Kitosan/Kitin
	Surimi Atığı	Proteinler
		Laktoz
(vii) Süt Ürünleri	Peyniraltı Suyu	β -Laktoglobulin
		α -Laktalbumin

Koyu renkli ve altı çizili olan, bu çalışma kapsamında analizlenen gıdayı ve hedeflenen bileşeni göstermektedir.

Günümüzde tüketici tercihleri ve yasal düzenlemeler çerçevesinde gıdalara eklenen katkı maddelerinin daha doğal ve tüketici sağlığını tehdit etmeyen hatta sağlığa olumlu katkı yapabilecek maddelerden oluşması yönünde oluşan eğilim bu fonksiyonel bileşenlerin kullanımını önemli kılmıştır. Bu maddeler gıdalarda veya ilaçlarda renklendirici, antioksidan, korucuyu madde ve katkı maddesi olarak kullanılabilmektedirler (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

Fonksiyonel bileşenlerin sağlığa olumlu katkıları olduğu birçok araştırmada ortaya konmuştur. Bu etkiler arasında antioksidan (Stevenson & Hurst, 2007), anti-kanser etki (C. Zhao ve diğ., 2004), anti-allerjenik, antienflamatuvar etki (Benavente-García ve diğ., 1997) ve antimikrobiyal etki (Puupponen-Pimiä ve diğ., 2001) gösterilebilir.

Fonksiyonel bileşenlerin olumlu etkilerinin görülebilmesi için vücut tarafından yeterli düzeyde alınabilmesi sağlanmalıdır (Parr & Bolwell, 2000). Bu bileşenlerin düşük stabiliteye sahip olmaları gıda prosesleri aşamalarında ve tüketim sırasında biyoyararlılıklarını olumsuz yönde etkilemektedir. Vücut tarafından yeterli emilimin sağlanıp gerekli organlara veya dokulara ulaşmasını sağlanması için biyokullanılabilirliğinin artırılması gereklidir (McDougall ve diğ., 2005). Gıda endüstrisinde uzun yıllardan beri kullanılmakta olan enkapsülasyon tekniğiyle bu bileşenler korunarak biyoyararlılıkları artırılabilir (Heidebach ve diğ., 2012).

1.1 Fenolik Bileşikler

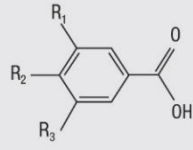
Değerli gıda bileşenlerinden olan fenolik maddeler bitkilerdeki sekonder metabolitlerdendir. Kimyasal yapıları bir veya birden fazla hidroksil içeren aromatik halkalardan oluşmaktadır. Basit fenolik molekülden kompleks polimerlere kadar değişen geniş bir aralığı kapsayan bu gruplar genellikle polifenoller olarak da anılmaktadır (Bravo, 1998). Polifenoller içerdikleri fenol halkalarına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elementlere göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır (Bkz. Çizelge 1.2 ve Şekil 1.1). Polifenollerin temel grupları flavonoidler, fenolik asitler, fenolik alkoller, stilbenler ve lignanlardır (D Archivio ve diğ., 2007).

Flavonoidler difenil propan ve iki benzen halkasının (bkz. Şekil 1.1, Ring A ve Ring B) üçlü karbon zinciriyle birleşmesinden oluşan bir yapıdadır. Üçlü karbon zinciri benzen halkalarından biriyle kapalı form piran (bkz. Şekil 1.1, Ring C) halkası oluşturur. Flavonoidler merkezi piran halkasının oksidasyon durumuna göre; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, isoflavonlar, antosiyanidinler ve flavanoller olmak üzere altı alt gruba ayrılırlar (D Archivio ve diğ., 2007).

Çizelge 1.2 : Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Balasundram ve diğ., 2006).

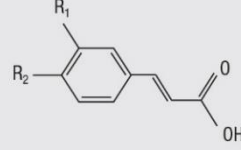
Kategori	Yapı
Basit fenolikler, benzokuinonlar	C ₆
Hidroksibenzoik asitler	C ₆ -C ₁
Asetofenonlar, fenilasetik asitler	C ₆ -C ₂
Hidroksisinamik asitler, fenilpropanoidler (kumarinler, izokumarinler)	C ₆ -C ₃
Naftokuinonlar	C ₆ -C ₄
Ksantonlar	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stilbenler, antrakuinonlar	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoidler, izoflavonoidler	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanlar, neolignanlar	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoidler	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninler	(C ₆ -C ₃) _n
Kondense tanninler (proantosiyanidinler veya flavolanlar)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Hidroksibenzoik asitler



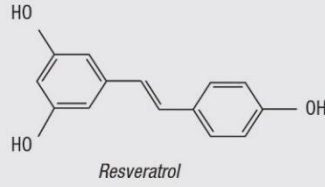
R₁=R₂=R₃=OH: Gallic acid
R₁=R₂=OH, R₃=H: Protocatechuic acid

Hidroksisinnamik asitler



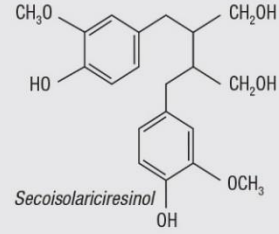
R₁=OH: Coumaric acid
R₁=R₂=OH: Caffeic acid

Stilbenler



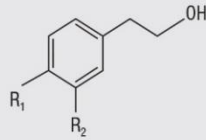
Resveratrol

Lignanlar



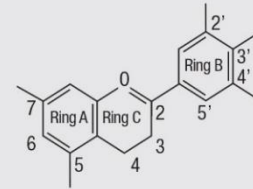
Secoisolariciresinol

Fenolikler



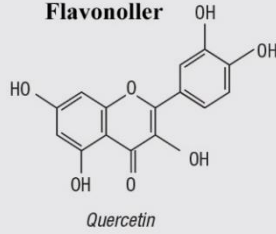
R₁=OH, R₂=H: Tyrosol
R₁=R₂=OH: Hydroxytyrosol

Flavonoidler



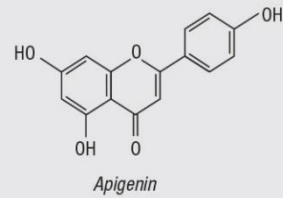
(See Figure 2)

Flavonoller



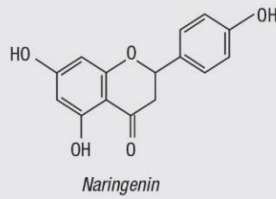
Quercetin

Flavonlar



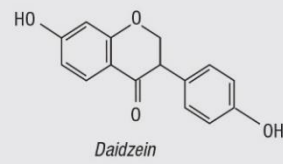
Apigenin

Flavanonlar



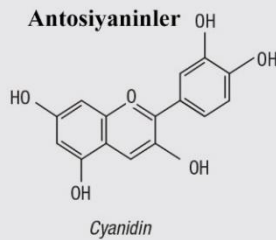
Naringenin

İzoflavonlar



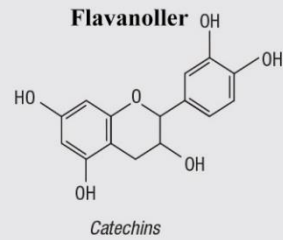
Daidzein

Antosiyaninler



Cyanidin

Flavanoller



Catechins

Şekil 1.1 : Polifenollerin kimyasal yapıları (D Archivio ve diğ., 2007).

Antosiyaninler önemli flavonoid gruplarıdır. Polar karakterli, suda çözünebilen bu gözenekli pigmentler fenil propanoid yoluyla sentezlenir. Bitkilerin hemen hemen tüm bölmelerinde (yapraklarda, köklerde, çiçeklerde ve meyvelerde) bulunmaktadır. Antosiyanidinler aromatik A halkasının oksijen içeren bir heterosiklik C halkasına ve üçüncü bir aromatik B halkasına karbon-karbon bağıyla bağlanmasıyla oluşan basit yapılı antosiyaninlerdir (Babbar ve diğ., 2015).

Birçok antosiyanidin türü bulunmasına rağmen en çok bilinen altı türü vardır. Bunlar siyanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve malvidindir. Antosiyanidinler yapılarına bir şeker grubunun bağlanmasıyla, glikozit formlarında bulunduklarında, antosiyanin olarak adlandırılırlar (Castaneda-Ovando ve diğ., 2009). Antosiyaninler moleküldeki –OH bileşenlerindeki farklılıklardan, –OH bileşenlerinin metillenme derecelerinden, aglikon molekülüne bağlanan şekerin sayısından ve bağların spesifik pozisyonlarına bağlı olarak değişik yapısal varyasyonlar gösterirler (Yousuf ve diğ., 2015).

Fenolik asitler diyet fenollerinin yaklaşık üçte birini içermektedir. Bitkilerde ester, eter veya asetal bağlarla bağlı olarak veya serbest halde bulunurlar. Aromatik halkalarındaki değişikliğe göre hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki temel gruba ayrılırlar (Babbar ve diğ., 2015).

Doğal olarak bulunan birçok fenolik bileşen diğer fenolik bileşenlere mono- ve polisakkarit ile konjüge olarak veya fonksiyonel türevleri olan ester veya metilesterleri şeklinde ortaya çıkmaktadır (Manach ve diğ., 2004).

Bu gruplardan temel diyet fenolikleri olarak taninler, flavonoidler ve fenolik asitler gösterilmektedir. Bitki fenollerinin en büyük grubu olarak bilinen flavonoidler renk pigmentleri olan antosiyaninler ve antoksantinler olarak gruplandırılmıştır. Düşük moleküllü olan bu flavonoidler genellikle şeker moleküllerine bağlı olarak bulunurlar. Antosiyaninler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve mor renk pigmentlerini oluştururken flavonoller, flavonlar, flavanoller ve izoflavonları içeren antoksantinler ise renksiz veya beyaz-sarımsı renktedirler (Balasundram ve diğ., 2006).

Bir flavonoid grubu olan flavanollerin, gıdalarda ve bitkilerde epigallo-kateşin gallat, epikateşin gallat veya kondense tanin polimerleri olarak, çayda ise gallik asitle kombine bir şekilde bulunan kateşin ve epikateşin olarak bulunduğu belirlenmiştir (Ho ve diğ., 1994). Flavonoller ise en yaygın bulunan flavonoidlerdir. Soğan, elma,

lahana gibi meyve ve sebzelerin yapısında bulunan kuersetin, mirisetin ve kampferol bu gruptaki en önemli ve en çok bulunan bileşenlerdir (Hertog ve diğ., 1993). Bazı gıdalarda bulunan flavonoid, fenolik asit ve tanin miktarları Çizelge 1.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 1.3 : Bazı gıdaların fenolik bileşikleri ve miktarları (King & Young, 1999).

Sınıflar ve alt sınıflar	Fitokimyasal	Gıda	Miktar (mg)
Flavonoidler			
Flavonoller	Kuersetin, kampferol, mirisetin	Zeytin	270–830
		Soğan	347
		Lahana	321
		Marul	308
		Kranberi	249
		Çeri domates	17–203
		Brokoli	102
		Elma	21–72
		Yeşil/Sarı Fasulye	49
		Turp	48
		Yabani marul	46
		Çay, yeşil yapraklar	30–45 g/kg KB
		Elma suyu	6–52
		Çay, siyah içecek	20
İzoflavonlar	Genistein, daidzein	Soya Fasulyesi, olgun, kuru	888–2407
		Soya Fındığı	1437–2363
		Soya unu	1036–1778
		Tofu	280–499
		Miso	256–540
		Soya Fasulyesi, olgun, taze	182–205
		Soya sütü	105–251
		Tofulu yoğurt	151

Çizelge 1.3 (devam) : Bazı gıdalardaki fenolik bileşikler ve miktarları (King & Young, 1999).

Flavonoidler			
Flavonlar	Apigenin, luteolin	Kereviz	130
		Zeytin	6–29
Flavanoller	Kateşin, epikateşin	Armut	70–420
		Çay, yeşil yapraklar	128–226 g/kg KB
		Elma	23–30
		Üzüm suyu, yeşil	110
Fenolik asitler			
Hidroksisinnamik asitler	Kafeik, ferulik, klorojenik, neoklorojenik asit	Yabanmersini	1881–2112
		Vişne, tatlı	290–1280
		Armut	44–1270
		Elma	2–258
		Portakal	21–182
		Patates, beyaz	100–190
		Greyfurt	25–60
		Vişne suyu	124
		Elma suyu	9–114
		Kahve çekirdeği	56 g/kg KB
		Hidroksibenzoik asitler	Ellajik, gallik asit
Çilek	21–89		
Üzüm suyu, siyah	79		
Tanninler			
Kondense	Kateşin, epikateşin polimerleri	Mercimek	3,8
		Börülce	141–1774
		Üzüm, siyah	43–64
		Üzüm	39–53
		Elma suyu	8–87

Miktarlar mg/kg olarak verilmiştir. KB = Kuru ağırlık. Miktarlar belirtildiği gruptaki toplam miktarı göstermektedir.

Fenolik asitler, berilerde (berries) ve kabuklu yemişlerde daha çok bulunan hidroksibenzoik asitler; bu grubun en çok bulunan bileşenleri olan ellajik ve gallik asitler ve hidroksisinnamik asitler; bu grubun en çok bulunan bileşenleri olan kafeik ve ferulik asitler olarak iki temel gruba ayrılırlar. Kafeik ve quinic asitin bileşiminden oluşan klorojenik asit meyvelerde en fazla bulunan fenolik asittir (King & Young, 1999). Taninler kondense ve hidrolize edilebilir olarak ikiye

ayrılmıştır. Meyve ve sebzelerde kondense taninler genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri olarak bulunurlar.

Fenolik bileşikler bitkilerde ve gıdalarda yoğun olarak bulunması, antioksidan, anti-enflamatuvar, antibakteriyal ve antiviral etkileri ile bir çok hastalığın önlenmesinde ve sağlığa olumlu etkileri nedeniyle insan ve hayvan diyetlerinde önemli bir yere sahiptir. Olumlu etkilerinin ve biyolojik aktivitelerinin yanında fenolik bileşikler gıda işleme aşamalarındaki proseslere karşı stabil değildirler. Sıcaklık, oksijen ve ışık bu bileşiklerde bozulmalara neden olmaktadır. Bununla birlikte diğer nutrasetik bileşikler gibi fenolik bileşikler de gastrointestinal bölgedeki koşullarda ortam pH'sından etkilenmekte ve enzim ve diğer nutrientlerin varlığı da bu bileşiklerin potansiyel sağlık etkilerini ve aktivitelerini engellemektedir (Leonard, 2000; Rodriguez-Amaya, 2016). Çizelge 1.4'te fenolik bileşiklerin fiziksel özellikleri, bozulmalarına neden olan etkiler ve bulunduğu kaynaklar belirtilmektedir.

Çizelge 1.4 : Fenolik bileşiklerin fiziksel özellikleri ve duyarlılıkları (Z. Fang & Bhandari, 2010).

Polifenol Grubu	Bileşenler	Kaynak	Özellik
Antosiyanidinler	Siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve glikozitleri.	Meyveler, çiçekler	Doğal pigmentlerdir; sıcaklığa, oksidasyona ve pH'ya karşı oldukça hassastırlar; suda çözünürler.
Kateşinler	Kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat	Çay	Oksidasyona ve ışığa karşı duyarlıdırlar; astrenjan ve tatları acıdır; suda az çözünürler.
Flavanonlar	Hesperetin, hesperidin, homoeriodictyol, naringenin, naringin	Turuncgiller	Oksidasyona, pH'ya ve ışığa karşı duyarlıdırlar; aglikonları suda çözünmez fakat glikozitleri suda çözünür.
Flavonoller	Kampferol, mirisetin, kuersetin ve glikozitleri	Meyve/Sebzeler	Oksidasyona, pH'ya ve ışığa duyarlıdırlar; aglikonları suda kısmen çözünür fakat glikozitleri suda çözünür.

Çizelge 1.4 (devam) : Fenolik bileşiklerin fiziksel özellikleri ve duyarlılıkları (Z. Fang & Bhandari, 2010).

Polifenol Grubu	Bileşenler	Kaynak	Özellik
Flavonlar	Apigenin, luteolin, tangeritin	Meyve/Sebzeler	Doğal pigmentlerdir; oksidasyona ve pH'ya karşı hassastırlar; aglikonları suda kısmen çözünür fakat glikozitleri suda çözünür.
İzoflavonlar	Daidzein, genistein, glisitein	Soya fasulyesi, yer fıstığı	Alkali pH'ya hassastırlar; astrenjan ve tatları acıdır; soya kokuludur; suda çözünür.
Hidroksibenzoik asitler	Gallik asit, <i>p</i> -hidroksibenzoik, vanillik asit	Beriler (berries), çay, buğday	Sıcaklığa, oksidasyona, pH'ya ve ışığa karşı duyarlıdırlar; suda en fazla çözünendir.
Hidroksisinamik asitler	Kafeik asit, ferulik asit, <i>p</i> -kumarik asit, sinapik asit	Meyveler, yulaf, pirinç	Oksidasyona ve pH'ya karşı duyarlıdırlar; suda en az çözünendir.
Lignanlar	Pinoresinol, podofilotoxin, steganacin.	Keten, susam, sebzeler	Diğerlerine oranla normal şartlarda daha stabildir. Uygun olmayan tatları vardır; suda çözünürler.
Tanninler (proantosiyanidinler)	Kastalin, pentagalloyl glukoz, prosiyanidinler	Çay, çikolata, beriler	Oksidasyona ve yüksek sıcaklığa karşı duyarlıdırlar; astrenjan ve tatları acıdır; suda çözünürler.

Joshi ve diğ. (2011) kurutma işlemi uygulanmış elmalardaki polifenollerin önemli ölçüde etkilendiklerini belirlemişlerdir. Sıcak hava ile kurutma uygulanan numunelerde antioksidan aktivitenin belirgin şekilde azaldığı, epikateşin, siyanidin-3-O-galaktozit, floridzin ve kuersetin glikozit kayıplarının olduğu gözlemlenmiştir (Joshi ve diğ., 2011).

Birçok klinik öncesi araştırma ve epidemiyolojik veri bitki polifenollerinin potansiyel bir kemo-preventif ve anti-kanser ajanı olarak hareket ederek bazı kanser türlerini yavaşlattığı, kardiyovasküler hastalık risklerini, nörodejeneratif hastalıkları, diyabet ve kemik erimesini azalttığını ortaya koymaktadır (Scalbert ve diğ., 2005). Bununla birlikte flavonid gruplarının, özellikle de c-glikozit yapıda olanların o-glikozit yapıdaki flavonoidlere oranla daha fazla olmak üzere, antiviral aktivite, antibakteriyal ve antifungal etkilerinin de bulunduğu belirtilmektedir (Xiao, 2015). Gıdalarda, özellikle üzümde bulunan en önemli stilbenlerden biri olan resveradrolün patojen gelişimini engelleyen doğal bir antibiyotik olduğu belirtilmektedir (Delmas ve diğ., 2006). Polifenollerle yapılan bir diğer çalışmada ise bu bileşenlerin bağırsak iltihabı hastalığına karşı antienlamatuvar etki gösterdiği ifade edilmiştir (Romier ve diğ., 2009).

Bu bileşiklerin gıdalarda doğal katkı maddesi olarak kullanılması yönünde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kammerer ve diğ. (2014) yaptığı çalışmada elmadan floridzin, pektin; üzümde antioksidan ve renk maddesi amacıyla fenolik bileşenler ve ayçiçeğinden polifenol elde etmişlerdir.

1.2 Elmada bulunan fenolik bileşikler

Elma tüm yıl boyunca marketlerde bulunması ve sağlığa olumlu etkileri bakımından en çok tüketilen gıdalardan biridir (Serra ve diğ., 2012).

Ülkemizde elma üretimi yılda 3 milyon ton civarında olmakla birlikte kişi başına yıllık tüketim 27 kg'ı bulmaktadır (TZOB, 2016). Avrupa ve A.B.D'de diyetdeki önemli flavonoid kaynağı olarak tüketilmektedir. Berilerden sonra en fazla antioksidan aktivite gösteren meyvedir. Fransa'da meyve tüketimi ve üretiminde elma ilk sırada yer almaktadır (Massias ve diğ., 2015). A.B.D'de meyvelerden alınan fenolik bileşiklerin beşte bir oranındaki miktarı elma tüketimiyle gerçekleşmektedir (Vinson ve diğ., 2001).

Elmanın yapısında 60'tan fazla fenolik bileşen bulunduğu bilinmektedir (Rupasinghe ve diğ., 2013). Bunlar dört temel gruba ayrılarak hidroksinnamik asitler (en fazla görülen klorojenik asit), dihidrokalkon türevleri (özellikle floridzin), flavan-3-ol grubundakiler (monomerler olarak kateşinler, oligomerler olarak prosiyanidinler) ve flavonoller (kuersetin ve kuersetin glikozitleri) olarak bulunurlar (Kahle ve diğ., 2005). Bunların dışında protokateşik asit, kafeik asit gibi polifenolleri de yüksek miktarlarda içermektedir. Diğer çalışmalarda da elmada kuersetin glikozit, klorojenik asit, floridzin ve epikateşin bulunduğu ortaya koyulmuştur (Schieber ve diğ., 2001).

Yapılan araştırmalarda elma kabuğunda iç kısımlara oranla iki ile altı kat (türe göre değişen oranlarda) daha fazla fitokimyasal bulunduğu ortaya konmuştur (Boyer & Liu, 2004). Volz ve McGhie (2011)'nin yaptığı çalışmada elma kabuğundaki fenoliklerin (floridzin, klorojenik asit ve kuersetin) elmanın iç kısımlarına oranla kat kat (100 ila 250 kat) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Yine benzer şekilde diğer bir çalışmada kabuğun, çekirdeğe ve elma posasına oranla daha fazla toplam polifenol, özellikle kuersetin, klorojenik asit ve floridzin, içerdiği belirlenmiştir (Massias ve diğ., 2015). Elma kabuğunda 1 mg/g civarında kuersetin bulunduğu, floridzin gibi polifenollerin kabukta ve çekirdekte bulunduğu, elma suyu gibi sıvılarda az miktarlarda bulunduğu belirlenmiştir (Scalbert & Williamson, 2000). Harnly ve diğ. (2006) yaptığı çalışmada elmada, kabuklu örneklerde daha yüksek miktarlarda olmak üzere, 5,9-9,6 mg/100g oranında kateşin ve 3,2-7,6 mg/100g oranında epikateşin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Elmada bulunan bileşenlerin kalp rahatsızlıkları, obezite, meme kanseri ve lösemi gibi hastalıkları önlemeye yardımcı olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya koyulmuştur (Massias ve diğ., 2015; O'Shea ve diğ., 2012). Denis ve diğ. (2013) yaptığı bir çalışmada elma kabuğunda bulunan polifenollerin oksidatif stres ve enflamasyon üzerine faydalı etkileri olduğunu tespit etmişlerdir. Balasuriya ve Rupasinghe (2012) elma kabuğuyla yaptıkları araştırmada, kabukta bulunan polifenollerin hipertansiyona neden olan enzimi inhibe ederek yüksek tansiyonu önlediğini ortaya koymuşlardır. S. Zhao ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada günde bir elma tüketiminin damar hastalıklarına (koroner arter hastalığı, damar tıkanıklığı) bağlı kan değerlerinde önemli ve yeterli şekilde etkide bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Gosse ve diğ. (2005) elmadaki prosiyanidinlerin kanser hücrelerine antagonistik

etkide bulunduğu ve antitümör etki gösterdiğini *in vivo* çalışmayla tespit etmişlerdir. Bir diğerk çalışmada ise elma prosiyanidinleriyle uygulanan terapide potansiyel saç-çoğaltıcı/arttırıcı etki gösterdiğı belirlenmiştir (Takahashi ve diğ., 2005). Lee ve diğ. (2014) elma polifenollerinin obstrüktif böbrek hastalığının hızının azaltılmasında alternatif işleve sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

1.3 Biyoyararlılık

Fonksiyonel bileşiklerden gerekli faydanın sağlanmasını etkileyen ve tüketim sırasında karşılaşılan sorunlardan biri de biyoyararlılık olarak tanımlanan ve alınan bileşenin vücut tarafından ne kadarının kullanılabildiğidir.

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda antosiyaninlerin emilimlerinin % 0,26-1.8 gibi düşük oranlarda olduğu belirtilmiştir (J. Fang, 2014).

Biyoyararlılık, vücuda alınan biyoaktif bileşiğın etki göstermesi beklenen alana aktif formda ulaşabildiğı düzey olarak tanımlanmaktadır. Biyoaktif bileşiklerle ilgili olarak ilaç, gıda ve beslenme alanında yapılan çalışmalar, bu bileşiklerin biyoyararlılığının birlikte alındıkları gıdanın bileşiminden ve yapısından etkilendiğini göstermektedir (McClements ve diğ., 2015). Örnek olarak domatesteki fenoliklerle yapılan bir çalışmada, domates sosuna zeytinyağı ilavesi ile domateste bulunan fenolik maddelerin çözünürlüğü ve salınımının arttığı bildirilmiştir (Martínez-Huélamo ve diğ., 2015). Çikolata ile yapılmış başka bir çalışmada ise, çikolatada bulunan flavanollerin biyoyararlılığının çikolatadaki şeker varlığı ile artmış olduğu ifade edilmiştir (Neilson ve diğ., 2009).

Biyoaktif bileşiklerin sindirim sisteminde biyoyararlılığını sınırlandıran bazı faktörler bulunmaktadır. Bu kapsamda biyoaktif bileşiğın biyoerişebilirliği, absorpsiyonu ve sindirim sistemindeki dönüşümlerden sonra biyolojik olarak aktif olduğu formu değerlendirilmelidir (McClements ve diğ., 2015).

Biyoerişebilirlik, biyoaktif bileşiğın sindirim sisteminde oluşan fraksiyonu ile ilişkilidir. Tipik olarak, biyoaktif bileşik sindirim sistemindeki sıvılarda çözünebilir olmalıdır. Biyoaktif bileşiğın biyoerişebilirliği bileşiğın yapısına, içinde bulunduğu gıdanın matriksi ve sindirim sisteminde bulunan diğerk bileşenlerle etkileşimi gibi birçok faktöre bağılı olarak değişmektedir. Lipofilik yapıya sahip bir nutrasötik olan karotenoidlerle yapılan çalışmalar, bu bileşiklerin sebzenin hücre yapısında

tutulduğunu ve sindirim sisteminde tam olarak salınımının gerçekleşmediğini göstermiştir (Panozzo ve diğ., 2013). Bu tip bileşiklerin, kendilerini çevreleyen gıda matriksinden tümüyle salınımının sağlanması önemlidir. Gıda işleme yöntemlerinde (pişirme, homojenizasyon), gıdanın tüketim şeklinde (çiğneme süresinin arttırılması) veya gıdanın yapısal özelliklerinde yapılacak değişikliklerle bu salınımı sağlamak mümkün olabilir (McClements ve diğ., 2015).

Biyoaktif bileşiğin sindirim sisteminde salınımı sağlandıktan sonra biyoyararlılık gösterebilmesi için epitelyum hücreler tarafından absorbe edilmesi gerekmektedir. Son aşama olarak, biyoaktif bileşikler sindirim sisteminde kimyasal ve biyokimyasal dönüşümlere uğramaktadır. Bu dönüşümlerden sonra biyoaktif bileşiklerin, biyolojik olarak aktif olma durumlarına göre biyoyararlılıkları belirlenir (McClements ve diğ., 2015).

Polifenol biyoyararlılığı diyet ve gıda matriksiyle ilişkili çeşitli faktörlere bağlıdır. Biyoerişilebilirlik alınan doza, partikül boyuna ve ısıtmaya (bunlar gıda matriksinden ayrılmasını kolaylaştırır) bağlıdır ve matriks yapısındaki lipid, protein ve çözünmeyen karbonhidrat varlığıyla önemli şekilde etkilenmektedir. Vitamin C ve E gibi antioksidan mikrobileşenlerin polifenollerle birlikte alınması bu bileşenlerin gastrointestinal bölgedeki degradasyonunu azaltabileceği belirtilmektedir (Bohn, 2014). Zaheer ve Akhtar (2015) soyada bulunan izoflavonların biyoyararlılığının laktik asit fermentasyonundan etkilenmediğini, aglikonlarının glikozitli bileşenlerinden daha fazla ve hızlı absorblandığını, lipid varlığının biyoerişilebilirliği etkilemediğini belirtmişlerdir.

Benzer şekilde Visioli ve diğ. (2011) gıda fenoliklerinin emilimi ve biyoyararlılığını etkileyen faktörleri şu şekilde sıralamıştır;

- Polifenol-kaynaklı faktörler: kimyasal yapıları (Karakaya, 2004), gıdadaki konsantrasyonları ve alınan doz.
- Gıda-kaynaklı faktörler: gıda matriksi; örneğin gıdanın sıvı veya katı olması, hayvansal veya bitkisel kaynaklı olması, emilimi etkileyen pozitif örneğin yağ veya negatif örneğin diyet lifi etkenlerinin bulunması.
- Gıda işleme-kaynaklı faktörler: sıcaklık muamelesi, homojenizasyon, liyofilizasyon, depolama ve pişirme metodu.

- Diğer komponentler ile etkileşim: proteinlerle oluşturulan bağlar (örneğin albumin) ve benzer absorpsiyon mekanizmasına sahip diğer polifenoller ile etkileşim.
- Dış faktörler: Değişik çevrelere maruz kalma ve gıdanın bulunabilirliği.
- Faydalanıcı kaynaklı faktörler: İntestinal faktörler, örneğin enzim aktivitesi, intestinal geçiş zamanı, kolonik mikroflora; sistematik faktörler, yaş ve cinsiyet, eksiklik veya patolojik etkiler, genetik ve fizyolojik durum.

1.4 Enkapsülasyon

Fenolik bileşiklerin çevresel etkilere karşı ve proses koşullarında, saklama ve hatta tüketim aşamalarında düşük stabiliteye sahip olmaları teknolojik zorlukları da beraberinde getirmiştir. Bu bileşiklerin stabilitelerini etkileyen, ışıktan, genellikle 7’den büyük pH’lı ortamlardan, 60-80°C gibi yüksek sıcaklıklardan, oksijen varlığından, ortamdaki enzimlerden ve askorbik asit, sülfidler, kopigmentler ve metalik iyonlar gibi maddelerin varlığından korunması yönünde çalışmalar yapılmıştır (Cavalcanti ve diğ., 2011).

Bu biyoaktif bileşenlerin vücuttaki olumlu etkilerini gösterebilmesi için yeterli düzeyde alınması gerektiği ve düşük stabilitelerinin önlenmesi ve biyoyararlılığının arttırılabilmesi için çeşitli yöntemler uygulanması gerektiği belirtilmektedir (Li ve diğ., 2015).

Üretim prosesleri sırasında veya tüketim aşamalarında biyoaktif bileşenlerin verimli bir şekilde korumanın yöntemlerinden biri de mikro veya nano kapsülleme (enkapsülasyon) tekniklerinin kullanılmasıdır. Enkapsülasyon yöntemi genel olarak spesifik koşullarda aktif maddenin mikro veya nano boyutlardaki bir kaplama materyali (kapsül) ile çevrelenerek veya bir taşıyıcı materyale bağlanarak bu aktif maddenin dış etkilerden korunup istenen koşullarda veya ortamda açığa çıkarılmasına olanak sağlayan teknolojik yöntemdir. Aktif madde literatürde “coated material”, “core material”, “actives”, “fill”, “internal phase” veya “payload” şeklinde farklı şekillerde isimlendirilirken gumlar, proteinler, doğal veya modifiye polisakkaritler, lipidler veya sentetik polimerlerden oluşan kapsayıcı materyal ise “coating material”, “delivery system”, “wall material”, “capsule”, “membrane”, “carrier” veya “shell” olarak isimlendirilmektedir (Z. Fang & Bhandari, 2010).

Enkapsülasyon gıdalarda genel olarak şu amaçlarla kullanılmaktadır (Desai & Jin Park, 2005):

- Aktif maddenin reaktivitesini kapsül içinde sınırlayarak degradasyonunu azaltmak veya önlemek
- Aktif maddenin kendisinin dış ortama geçişini veya evaporasyonunu azaltmak,
- Orijinal maddenin fiziksel karakterini modifiye ederek daha kolay işlem yapılabilir hale getirmek
- Aktif maddenin belirli bir zamanda veya ortamda dış ortama geçişini sağlamak
- Aktif maddenin istenmeyen kokusunu veya tadını maskelemek
- Etkileşimde bulunabilecek karışımları birbirlerinden uzaklaştırmak.

Enkapsülasyon yöntemi seçilirken veya oluşturulurken kapsayıcı materyalin genellikle şu özellikleri dikkate alınmaktadır (McClements ve diğ., 2009):

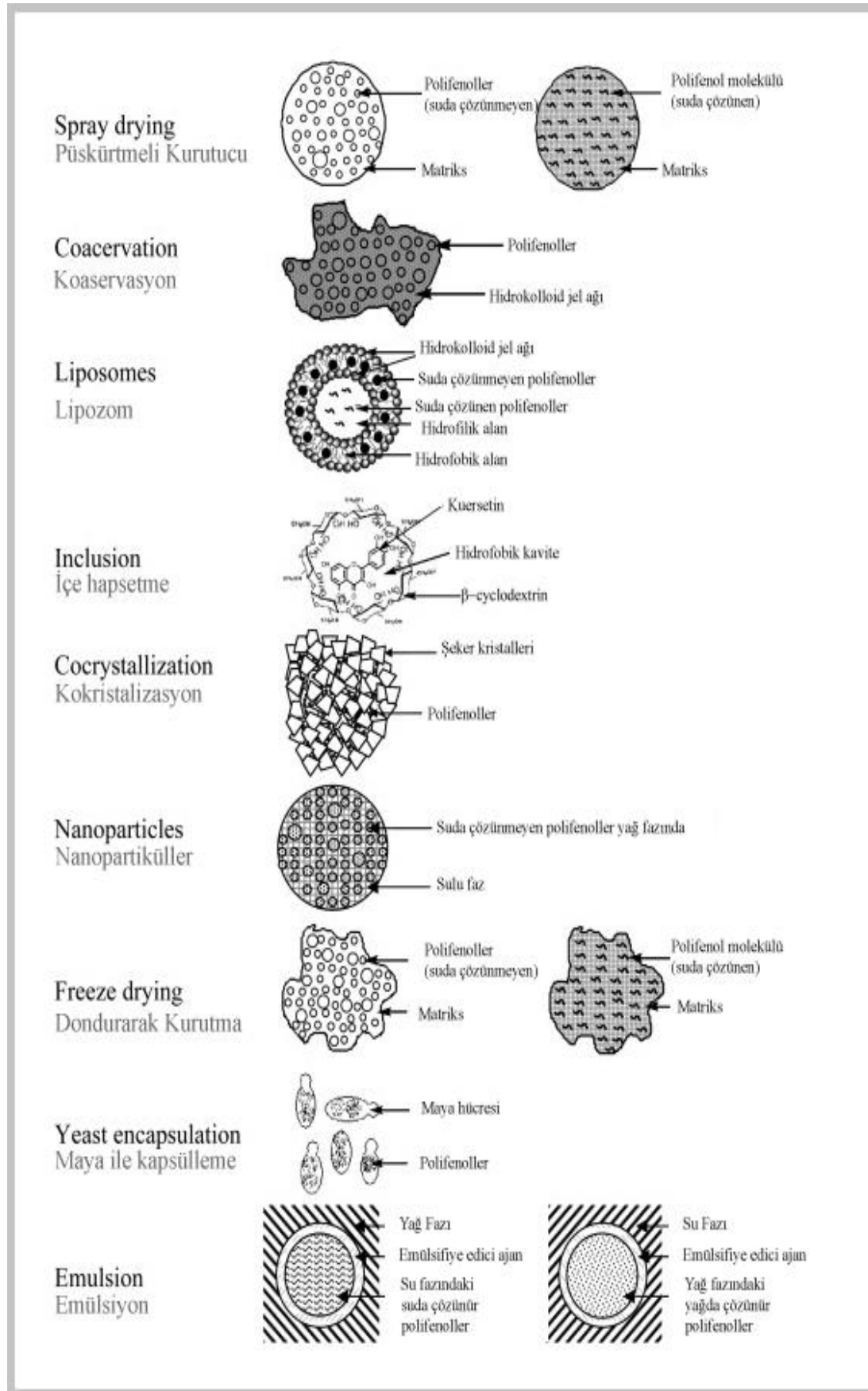
- Yükleme kapasitesi: Enkapsüle edilen materyalin, taşıyıcı madde tarafından birim kütledeki taşınabilme kapasitesi olarak tanımlanır. Taşıyıcı materyalin yüksek yükleme kapasitesine sahip olması istenir.
- Yükleme verimliliği: Taşıyıcı sistemin enkapsüle edilmiş materyali tüm işlem zamanı boyunca koruyabilme yeteneğidir. Yükleme verimliliğinin yüksek olması (%100), yani tüm depolama ve işlem sırasında materyali taşıyabilmesi istenir.
- Taşıma verimliliği: Taşıyıcı materyalin aktif maddeyi aktivite göstereceği bölüme (site of action) kadar götürebilme yeteneği olarak tanımlanır. %100 olması, yani taşıyıcı materyalin aktif maddeyi aktivite göstereceği yere kadar götürmesi istenir.
- Taşıma mekanizması: Taşıma sisteminin, fonksiyonel bileşeni aktivite göstereceği bölgeye kadar götürebilecek ve orada serbest bırakacak şekilde tasarlanmış olması istenir. Bu serbest kalma, kontrollü bir oranda veya pH, sıcaklık, enzim aktivitesi, iyonik kuvvet vb. gibi dış etkiler yardımıyla olabilmelidir.

- Kimyasal degradasyona karşı koruma: Taşıyıcı materyal aktif maddeyi, oksidasyon ve hidroliz gibi kimyasal degradasyon formlarından koruyabilecek şekilde tasarlanmalıdır. Bu kimyasal degradasyon reaksiyonları, ısı, ışık, oksijen ve özel kimyasallar gibi kontrol edilebilen dış faktörler ile oluşturulabilmelidir.
- Gıda matriksi ile uyumluluk: Taşıyıcı sistem çevresinde gıda matriksine uyum sağlamalıdır. Son üründe görünüş, tat, aroma ve stabilitede değişikliğe yol açmamalıdır, olumsuz olarak etkilememelidir.
- Gıda statüsü: Taşıyıcı sistem gıda kaynaklı maddelerden ve GRAS statüsünde, kolay işlenebilir şekilde üretilmiş olmalıdır.
- Ekonomik üretim: Taşıyıcı sistem pahalı olamayan maddelerden üretilmiş olmalıdır. Özellikle, enkapsüle edilen fonksiyonel bileşenden elde edilen kazancın (raf ömrünün uzatılması, pazarlanabilirliğin artırılması ve yeni fonksiyonel özellik eklenmesi gibi) enkapsülasyon için harcanan maliyetten daha yüksek olması istenir.
- Biyoaktivite: Taşıyıcı sistem enkapsüle komponentin biyoyararlılığını geliştirmeli veya en azından ters etki etmeyecek durumda olmalıdır.

1.4.1 Enkapsülasyon yöntemleri

Kapsülleme yöntemleri arasında; püskürtmeli kurutma (spray drying), püskürtmeli soğutma (spray cooling/chilling), ekstrüzyon (extrusion), akışkan yataklı kaplama (fluidized bed coating), koaservasyon (coacervation), lipozom ile kaplama (liposome entrapment), kapsayıcı kompleksleme (inclusion complexation), santrifüj süspansiyon ayırma (centrifugal suspension separation), dondurarak kurutma (lyophilization), kokristalizasyon ve emülsiyon oluşturma (cocrystallization and emulsion) ve süperkritik/subkritik ekstraksiyon (SFE) uygulamaları bulunmaktadır. Şekil 1.2’de enkapsülasyon yöntemlerinin karakteristiklerinin temsili görselleri görülmektedir.

Püskürtmeli kurutma yöntemi en eski ve en çok kullanılan enkapsülasyon yöntemidir. Düşük maliyetli olması, iyi verimde, yüksek kaliteli, küçük boyutlu, hızla çözünebilen ve yüksek stabilitedeki kapsül oluşturabilmesi ve sürekli üretime elverişli olması bu yöntemin avantajları arasındadır.



Şekil 1.2 : Enkapsülasyon yöntemlerinin karakteristiklerinin temsili ilüstrasyonu (Z. Fang & Bhandari, 2010).

Karbonhidratlar, süt proteinleri ve yeni tür biyopolimerler püskürtmeli kurutma ile mikroenkapsülasyon yöntemine uygun olan ve genel olarak kullanılan maddelerdir. Bu yöntemde uygun materyal seçildikten sonra suda çözündürülür, kaplanacak materyal duvar materyaline eklenerek homojenize edilir. Bu karışım püskürtmeli kurutucuda 100-160°C'lik sıcak hava ile nozzle'dan püskürtülerek evaporasyon işlemine tabi tutulur. Toz olarak gözenekli enkapsüle edilmiş partkller elde edilir (Mahdavi ve diğ., 2014).

Püskürtmeli soğutma işleminde ise aktif madde yağ matriksi içinde soğutma yardımıyla tutundurulur. Genellikle 'matriks' enkapsülasyon olarak da tanımlanır. 'Matriks' enkapsülasyon partiküllerin yağ matriksi içinde topaklanmasıyla oluşurken 'gerçek' enkapsülasyon kabuk oluşurma şeklinde oluşan kapsüllenme işlemine denir. Matriks enkapsülasyonda kapsüllerin yüzeylerinde tutunan aktif maddeler veya yağ matriksi dışında bulunan maddeler dış ortam ile direkt temas bulunması nedeniyle yüksek miktarda salınım gerçekleştirilir. Partiküller genellikle birkaç dakika içinde ortama geçiş yaparlar (Gouin, 2004).

Ekstrüzyon, matriks materyalinin ve aktif maddenin birlikte bulunduğ biyopolimer çözeltisinin bir nozzle yardımıyla jelleşme çözeltisi içine, düşük sıcaklıkta püskürtülmesi işlemiyle yapılır. Laboratuvar leğinde püskürtme işlemi şırınga ile de yapılabilir. Genel olarak kalsiyum klorit (jelleşme çözeltisi) içinde sodyum aljinat (biyopolimer çözeltisi) kullanılır (Jia ve diğ., 2016).

Akışkan yataklı kaplama işleminde yığın veya sürekli olarak toz halindeki partiküller belirli sıcaklıktaki hava ile tutularak üzerine kaplama materyali püskürtülerek enkapsülasyon işlemi gerçekleştirir. Kaplama materyali eltisi selüloz veya nişasta türevleri, proteinler ve gamlardan oluşabilmektedir (Dewettinck & Huyghebaert, 1999).

Bir diğr sık kullanılan tekniklerden biri de emülsifikasyon işlemidir. Suda çözünebilen aktif maddelere uygulanır. Su/yağ ve yağ/su emülsiyonları şeklinde iki tür emülsiyon ve birde çift emülsiyon denilen su/yağ/su emülsiyonları vardır. Yağ/su moleküllerinin lipofilik bir madde ile homojenizasyonunu takiben su/yağ emülsiyonunu oluşturacak hidrofilik maddeyle homojenizasyon sonrasında elde edilirler. Emülsifiye edici ajan olarak kullanılan surfektan konsantrasyonu ve türü emülsiyon karakteristiğini etkilemektedir (Jimnez-Colmenero, 2013). Emülsiyon

oluşturma işleminden sonra emülsiyon püskürtmeli kurutucuda veya donduruculu kurutucuda kurutulur. Kurutulmuş emülsiyonlar instant formül olarak da kullanılabilmektedir (Saravacos ve diğ., 2011).

Koaservasyon işlemi emülsiyon işleminin modifiye edilmiş halidir ve immobilizasyon olarak da tanımlanmaktadır. Biyoaktif maddeyi içeren çözelti, ters yüklü matriks molekülüyle karıştırıldığında kompleks oluşur. Kapsül büyüklüğü ve karakteristiğı pH, iyon konsantrasyonu, matriks molekülünün oranı vetürüne göre değışebilmektedir. Bu teknikte elektrostatik interaksiyonların yanında hidrofobik etkileşimlerde rol oynamaktadır (de Vos ve diğ., 2010).

Dondurarak kurutma işlemi, ısıya duyarlı materyallerin kurutulması ve mikrokenkapsülasyonu için en uygun yöntemdir. Dondurma, süblimasyon, desorpsiyon ve saklama olarak dört aşamalı bir işlemdir. Gum arabik, maltodekstrin, emülsifiye nişasta ve peyniraltı suyu proteini kaplama materyali olarak kullanılır. En önemli dezavantajları yüksek enerji ihtiyacının bulunması ve uzun süreli işlem olmasıdır. Ayrıca kaplama materyali ile aktif madde arasındaki bariyerde geniş gözenekler oluşabilmekte bu gözenekler zayıf koruma oluşmasına neden olmaktadır (Ray ve diğ., 2016).

Kapsayıcı kompleksleme işleminde genellikle siklodekstrin kullanılmaktadır. Küçük boyutlara sahip siklodekstrin suda çözündürüldükten sonra aktif madde ile belirli oranlarda karıştırılarak homojenize edilir. Püskürtmeli kurutucuda kurutularak enkapsüle edilmiş toz elde edilir (Bhandari ve diğ., 1999). Siklodekstrinin boyutlarının küçük olması yeterli kaplamanın sağlanamamasına yol açabilmektedir (Saravacos ve diğ., 2011).

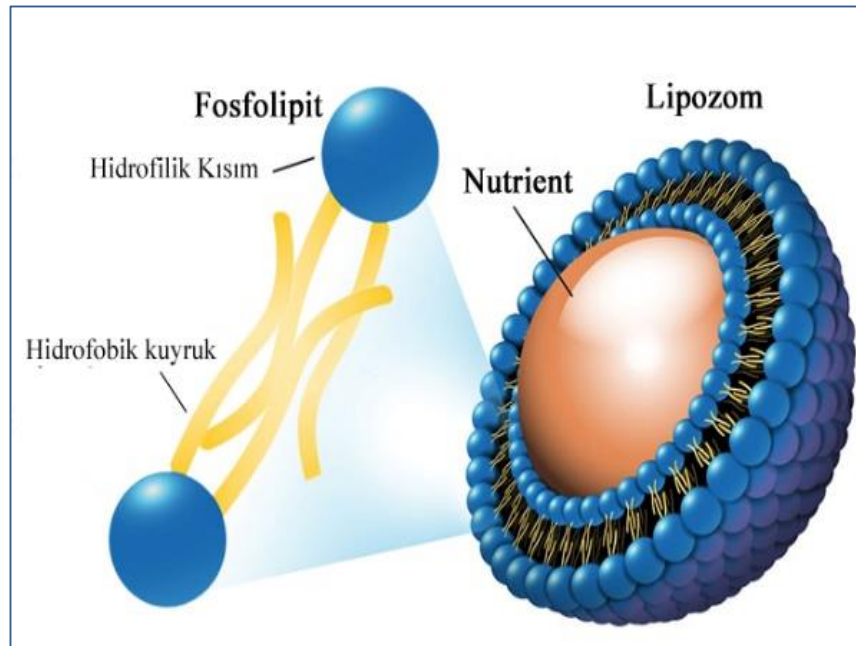
Süperkritik karbondioksit ile yapılan kapsülleme işlemi toksik madde içermemesi ve inert olması bakımından avantajlara sahiptir. Konvansiyonel yöntemlerde kolay bozunur maddelerde görülen mekanik stres ve yüksek sıcaklık etkisi gibi dezavantajlar bu yöntemde yoktur (Campardelli ve diğ., 2016). Süperkritik sıvı ile uygulanan kapsülleme yöntemleri ise kısaca şunlardır: Süperkritik çözeltinin ani genişlemesi (rapid expansion of supercritical solutions - RESS), gaz ile doygunluğa ulaşan çözeltilerdeki partiküller (particles from gas saturated solutions - PGSS), gaz anti solventi (gas anti solvent - GAS), süperkritik anti solventi (supercritical anti solvent - SAS), süperkritik akışkanla solüsyon dispersiyonu (solution enhanced

dispersion by supercritical fluids - SEDS) ve emülsiyonların süperkritik sıvı ile ekstraksiyonu (supercritical fluid extraction of emulsions - SFEE) yöntemidir (Gadkari & Balaraman, 2015). Bu yöntem (SFEE yöntemi) konvansiyonel emülsiyon tekniğinin süperkritik akışkanlar yardımıyla gerçekleştirilmesi işlemidir (Aguiar ve diğ., 2016).

1.4.2 Kaplama materyali olarak lipozom

Lipozomlar, bir veya daha fazla eş-fosfolipid katmanlar ile çevrelenmiş ve merkezi ve katmanlar arası hidrofilik bir bölmeden oluşan yapay mikroskobik vezikül (kesecik) olarak tanımlanmaktadır (Torchilin, 2005).

Kaplanacak aktif madde iç kısımdaki hidrofilik merkezde veya birden fazla fosfolipit katmanı arasında enkapsüle edilebilmektedir. Lipozomlar boyutlarına ve katmanlarına göre dört tür olarak kategorize edilmektedir. Küçük tek katmanlı kesecikler (small unilamellar vesicles - SUVs), büyük tek katmanlı kesecikler large (unilamellar vesicles - LUVs), çok katmanlı kesecikler (multilamellar vesicles - MLVs), çok veziküllü kesecikler (multivesicular vesicles - MVVs). SUV tipi lipozomların boyutları 20 ile 100 nm arasında değişmektedir. Bununla birlikte diğer tiplerin boyutları birkaç yüz nanometreden mikron boyutlarına kadar değişmektedir. Bir fosfolipit katmanının kalınlığı 4 ila 5 nm'dir (Sharma & Sharma, 1997). Lipozomun yapısı Şekil 1.3'te görülmektedir.



Şekil 1.3 : Lipozomun yapısı.

Lipozomlar biyoygunluğa sahip materyaller olmaları, suda çözünebilen aktif bileşenleri hidrofilik olan merkezinde tutundurabilmeleri, suda çözünemeyen hidrofobik bileşenleri ise membranında tutundurabilmeleri, yan etkileri olmadan çevresel etkilere dayanıklı olması, biyoaktif bileşenlerin hücre içine ve hatta hücredeki bölmelere kadar ulaştırılmasını sağlayan yegane seçenek olması ve boyutlarının çeşitli işlemlerle istenen hale getirilebilmeleri gibi kabul görülen biyolojik aktivitelere sahiptirler (Torchilin, 2005).

pH hassasiyeti olan; asitle tetiklenen lipozomlar (pHSL), sıcaklık hassasiyeti olan; ısıyla tetiklenen (TL), ekojenik; ultrases ile tetiklenen lipozomlar (EL), manyetik lipozomlar (ML) ve ışığa duyarlı lipozomlar olmak üzere hedef dokuda/bölgede aktif maddenin salınımını gerçekleştirme yöntemine göre çeşitli türleri üretilebilmektedir (Eloy ve diğ., 2014).

1.4.3 İkinci katman kaplama materyali: Kitosan

Kitosan gıda statüsünde taşıyıcı materyal olarak kullanılabilen katyonik özelliklere sahip bir polisakkarittir (McClements, 2015). Selülozdan sonra doğada ikinci en fazla bulunan ve biyosferdeki rejenerasyonu yıllık yüz tonu aşan doğal polimer olan *kitinin* enzimatik veya kimyasal olarak kısmi deasetilasyonu ile elde edilir. Kitin polimerlerinin ana kaynağı kabuklu deniz canlılarının kabukları, böceklerdeki kütiküller ve mantarların hücre duvarlarıdır (Hernández-Téllez ve diğ., 2016).

Kitosan, $(C_6H_{11}O_4N)_n$ kimyasal formülüne sahip lineer bir polimerdir. Moleküller arası dengelenmiş üç boyutlu alfa heliks konfigürasyonuna sahiptir. Zincir uzunluğuna bağlı olarak kitosan 50-200 kDa arasında değişik moleküler ağırlıklara ve % 40-98 arasında deasetilasyon derecelerine sahip olabilmektedir (Gallo ve diğ., 2016).

Kitin/kitosan tabanlı maddeler, diğer sentetik materyallerden yüksek azot içeriği (sentetik eşdeğerleri selüloza oranla), biyoygunlukları, biyokullanılabilirlikleri, düşük toksisiteleri, adsorplama kapasiteleri ve doğal antibakteriyal aktiviteleri bakımından ticari olarak tercih edilmektedir (Yi ve diğ., 2012).

N-Karboksimetil kitosan, hidrofobik kitosan, metoksifenil fonksiyonuna sahip kitosan, tirozin glukon, aşırı katyonik kitosan, poliüretan-tip kitosan ve hidroksialkil kitosanlar olmak üzere kullanım amacına göre birçok modifiye edilmiş türleri bulunmaktadır (Kumar ve diğ., 2004).

1.4.4 Koruyucu katman kaplama materyali: Maltodekstrin

Maltodekstrinler ve modifiye nişastalar enkapsülasyon materyali olarak geniş bir alanda kullanılmakta olan polisakkaritlerdir. Enkapsüle edilen materyale iyi bir oksidatif stabilite sağlarlar ancak düşük emülsifikasyon kapasitesi ve emülsiyon stabilitesi gösterirler. Bu polimerlerin dektroz ekivalent değerleri arttıkça uçucu aroma bileşenlerini tutabilme kapasiteleri de artar. Maltodekstrinler maliyet-fayda bakımından tercih edilmektedir. (Chranioti & Tzia, 2013).

1.5 Tezin amacı

Bu çalışmada elma kabuklarından kimyasal yöntemlerle ekstrakte edilen fenolik bileşikler mikrofludik teknoloji kullanılarak lipozomla enkapsüle edildi. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri ölçülerek boyut analiziyle enkapsülasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği belirlendi.

Elde edilen kapsüllenmiş fenolik bileşiklerin miktarları enkapsülasyon verimliliğini belirlemek amacıyla, kapsülleme öncesi ve kapsülleme sonrası toplam flavonoid, Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik miktarı ve DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite analizleri yapılarak incelendi.

En uygun kapsüllenmenin sağlandığı oran ile enkapsülasyon işlemi yapılarak gıda ürünü içine katıldı. Gıda ürünü olarak kefir kullanıldı. Elma ekstraktları önce lipozomla kaplandı. Daha sonra pozitif yüklü kitosanla ikinci defa kaplanması sağlandı. Isısal işleme (kurutma işlemine) dayanıklılığının sağlanması için üçüncü bir katman olarak maltodekstrin ile de kaplanarak enkapsülasyon işlemi tamamlandı. Püskürtmeli kurutucuda kurutulup dayanıklılığının ve kullanılabilirliğinin artırılması sağlandı.

Daha sonra lipozomla kaplamanın ekstratların biyoyararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla mide ve bağırsak ortamının simüle edildiği *in vitro* sindirim yöntemi uygulandı.

Biyoyararlılık öncesi ve sonrası enkapsüle ekstrakt içeren kefir numunelerinin ve kefirsiz enkapsüle numunelerin spektrofotometrik yöntemlerle toplam flavonoid miktarı, toplam fenolik miktarı ve DPPH ve CUPRAC antioksidan aktivite analizleri yapıldı. Ayrıca HPLC ile de kromatografik analizleri gerçekleştirilerek fenolik bileşen kompozisyonları ve toplam miktarları incelenerek karşılaştırıldı.

Yapılan bu çalışmada hedeflenen; çok tüketilen ve çeşitli gıda proses işlemleri uygulanan elmanın atık olarak bertaraf edilen kabuklarının değerli bileşenlerini elde ederek bu bileşenlerle gıdanın fonksiyonel özelliklerini arttırmak ve bu bileşenlerin gıdalarda kullanılabilirliğini incelemek amacıyla enkapsülasyon tekniğinin etkinliğini ortaya koymaktır. Böylelikle gıda atıklarının geri kazanımı konusunda bir kapı aralamak, lipozomla enkapsülasyon yönteminin uygulanabilirliğini belirlemek ve kapsülleme yönteminin değerli fonksiyonel bileşenleri mide veya bağırsak gibi hedeflenen bölgeye kadar dış etkilere ve bozulmalardan koruyup korumadığını ve bu bölgelerde salınımını sağlayarak biyokullanılabilirliğini artırıp arttırmadığını tespit etmek hedeflenmiştir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

Deneyler sırasında kullanılan kırmızı elma numuneleri İstanbul'daki yerel pazarlardan temin edilmiştir. Numuneler akan su altında yıkandıktan sonra kabukları soyulmuş ve alınan kabuklar ekstraksiyon aşamasına kadar -18°C'de saklanmıştır.

Kimyasallar ve diğer materyaller

Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır. Kitosan, Primex (Siglufjörður, İzlanda) firmasından, lesitin (Soyafasulyesi fosfolipitleri, %97-Ultralec P) Rotel Türkiye'den, maltodekstrin Tunçkaya Kimyevi Maddeler firmasından, Sephadex G50, GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, İsveç) firmasından temin edilmiştir. Folin Ciocalteu fenol kimyasalı, Merck KGaA (Darmstadt, Almanya), Triton X100, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Almanya) firmasından ve sodyum asetat trihidrat, asetik asit, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, potasyum klorür kimyasalları, gallik asit ve kateşin standartları Sigma–Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

2.2 Metotlar

2.2.1 Elma kabuğundan fenolik bileşen ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemi Grigorias ve diğ. (2013) yaptığı yöntemde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elma kabukları soyulduktan sonra donduruculu kurutucuda (Alpha 1-2, Christ) 16 saat bekletilerek nemi uzaklaştırıldı. Daha sonra laboratuvar tipi öğütücüde (IKA-T10) öğütülerek toz haline getirildi. 20 ml etanol (teknik saflıkta) 1 gr toz numune ile vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoda 20 dakika çözünmesi sağlandı. Ortam sıcaklığından etkilenmemesi için ultrasonik banyo içine buz eklendi. 5000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek süpernatant ayrıldı (Sigma 2-16P Santrifüj, Almanya). Bu işlem aynı ekstrakt üzerine 2 defa daha 10 ml etanol ile gerçekleştirilerek toplamda 1 gr numune 40 ml etanol ile çözüldürüldü. Etanol, rotary evaporatörde (Büchi R20, İsviçre)

uzaklaştırılarak kalan kısım donduruculu kurutucuda kurutulup deneyler yapılana kadar -18°C’de saklandı.

2.2.2 Lipozom hazırlama, kaplama

Lipozomlar Gültekin-Özgüven ve diğ. (2016) yaptığı çalışmadaki yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. % 2 (w/v)’lik lesitin tozu, 0,1 M pH 3,5’lik asetat tampon çözeltisiyle oda sıcaklığında bir gece manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı (IKA, Almanya). Optimizasyon öncesi elma kabuğu ekstraktı % 0,05-1 (w/v) olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda; optimizasyon sonrası tespit edilen oranda (% 0,1) lesitinde çözündürüldü. Boş lipozom içeren ve elma kabuğu ekstraktı içeren karışımlar homejenizatör ile (Ultraturrax DI-25 Yellowline, IKA) ile 10 dakika boyunca üçüncü seviyede (yaklaşık 9500 rpm) karıştırıldıktan sonra mikrofludayzırdan (Microfluidizer Processor M-110L, Microfluidics, Newton, ABD) 25 bin psi basınçta beş defa geçirilerek homojenize edilerek lipozom süspansiyonları elde edildi. Homejenizasyon hücresi işlem süresince aşırı ısınmayı engellemek için buz eklenerek soğutuldu.

2.2.3 Kitosan hazırlama, kaplama

Negatif yüklü lipozomlar daha sonra pozitif yüklü olan kitosan ile kaplandı. Toz kitosan % 0,8 (w/v)’lik olacak şekilde asetat tamponunda çözündürülerek kitosan çözeltisi hazırlandı. Kitosan çözeltisi 1/1 (v/v) olacak şekilde lipozom süspansiyonlarına katılarak 1 gece manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırıldı.

2.2.4 Maltodekstrin hazırlama, kaplama

% 20’lik maltodekstrin çözeltisi saf suyla hazırlandı. Kitosan-lipozom kaplı ekstrakt içeren çözeltiye 1/1 (w/w) olacak şekilde eklenerek bir saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Elde edilen çözelti püskürtmeli kurutucuda kurutularak toz haline getirildi (Büchi, B290 Spray Dryer, İsviçre). Toz numuneler deneylerde ve üründe kullanılmak üzere nem almayacak şekilde desikatörde ve 4°C’de saklandı.

2.2.5 Jel filtrasyonu ile enkapsüle edilememiş ekstraktların uzaklaştırılması

Sephadex jel filtrasyon yöntemi kullanılarak bağlanmayan kitosanlar ve enkapsüle olmamış ekstraktlar ve lipozomlar uzaklaştırıldı. Gibis ve diğ. (2012) uyguladıkları

yöntem küçük değişikliklerle kullanılarak Sephadex G50 % 5'lik suda hazırlanarak 6 ml'lik şırıngalara 3 ml'lik katman oluşturacak şekilde koyuldu. 1,5 ml asetat tampon eklenerek santrifüj edildi. Daha sonra enkapsülasyon işlemleri uygulanan ekstrakt çözeltisinden 1,5 ml eklenerek falkon tüpü içinde santrifüj edildi. Kaplanmamış lipozom ve kitasanların uzaklaştırıldığı eluent deneylerde kullanılmak üzere toplandı.

2.2.6 Tritonla parçalama işlemi

Jel filtrasyonu işleminden sonra elde edilen çözeltideki enkapsüle edilmiş fenolik bileşenlerin açığa çıkarılması ve analizlenmesi için Tritonla muamele işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sadece optimizasyon öncesi yapılan işlemlerde gerçekleştirildi.

Triton x100 kullanılarak % 0,15 (w/v)'lik çözeltisi suyla hazırlandı. 1:3 oranında enkapsüle çözeltiyle karıştırıldı. 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant alınarak analizler gerçekleştirildi.

2.2.7 Partikül boyutu analizi ve zeta (ζ) potansiyeli ölçümü

Kaplanmış ve kaplanmamış lipozomların partikül boyutu dağılımı statik "light scattering" cihazıyla (Mastersizer 2000, Malvern Instruments) ölçüldü. Zeta potansiyeli ölçümü liposomal dispersiyonun partikül konsantrasyonu olan yaklaşık % 0,005 oranında asetat tamponuyla seyreltildikten sonra Zetasizer ile gerçekleştirildi (Zetasizer 2000, Malvern Instruments).

Lipozomlar ölçümler yapılmadan hemen önce yeni olarak hazırlandı ve ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı. Ölçümler hem optimizasyon öncesi hem de optimizasyondan sonraki aşamada gerçekleştirildi.

2.2.8 SEM (Elektron Tarama Mikroskobu) incelemesi

Püskürtmeli kurutucuda kurutulmuş lipozom kaplı ve lipozomsuz elma kabuğu ekstraktı numuneleri yapışkan kaplı alüminyum çubuk üzerine tutturuldu. Hava akımı geçirilerek fazlalık tozlar uzaklaştırıldı.

Çubuklar, Lecia vakum kaplama ünitesinde 40mA'da 100 s boyunca 3 defa ince altın tabaka ile, 50 mm mesafeden argon gazı altında kaplandı (Quorum SC7620 Sputter Coater). Daha sonra Quanta FEG 250 SEM cihazında 5 kV artan voltajlı yüksek vakumda incelendi. Görüntüler 4.000× ve 12.000× yakınlaştırma ile alındı.

2.2.9 Toplam fenolik miktarı tayini

Toplam fenolik miktarı tayini Folin–Ciocalteu yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. (Singh ve diğ., 2002). Ölçümler optimizasyon öncesinde; farklı konsantrasyonlardaki lipozomlar jel filtrasyonundan geçirilerek ve Triton kullanılarak kapsüller parçalanıp içindeki bileşenlerin açığa çıkarılmasından sonra ve optimizasyon sonrasında; biyoyararlılık uygulanan enkapsüle edilmemiş ekstraktlarda, enkapsüle ekstraktların katıldığı gıda ürünü ve biyoyararlılık uygulanmayan enkapsüle edilmemiş ekstraktlarda ve enkapsüle ekstraktların katıldığı gıda ürünü yapıldı.

1:10 oranında seyreltilmiş 200 µl örnek çözeltisi ve 1,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (10 kat seyreltilmiş olarak) karıştırıldı. %7,5 (w/v)'lik sodyum karbonat çözeltisinden 1,2 ml eklendikten sonra tüpler vortekste karıştırıldı ve 25°C'de karanlık ortamda 90 dakika bekletildikten sonra UV-Vis spektrofotometrede 765 nm'de absorbans ölçüldü. Toplam fenol içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri olarak verildi. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı. Kalibrasyon grafiği Şekil A.1'de belirtilmiştir.

2.2.10 Toplam flavonoid tayini

Toplam flavonoid tayini Valcarcel ve diğ. (2015) uyguladığı yöntem kullanılarak Synergy HT (Biotek Inc.) spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Kalibrasyon standardı olarak kateşin kullanıldı. Ölçümler optimizasyon öncesinde; farklı konsantrasyonlardaki lipozomlar jel filtrasyonundan geçirilerek ve Triton kullanılarak kapsüller parçalanıp içindeki bileşenlerin açığa çıkarılmasından sonra ve optimizasyon sonrasında; biyoyararlılık uygulanan enkapsüle edilmemiş ekstraktlarda, enkapsüle ekstraktların katıldığı gıda ürünü ve biyoyararlılık uygulanmayan enkapsüle edilmemiş ekstraktlarda ve enkapsüle ekstraktların katıldığı gıda ürünü yapıldı.

Uygun oranlarda seyreltilmiş 0,25 ml örnek çözeltisi ve 1,25 ml saf su karıştırıldı. Sırasıyla 75 µl % 5'lik NaNO₂, 6 dakika sonra 150 µl % 10'luk AlCl₃.6H₂O ve 5 dakika sonra 0,5 ml 1 M NaOH ilave edildi. En son saf su ilave edilerek 2,5 ml'ye tamamlandı. 10 saniye vorteksten sonra spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbans okundu. Toplam flavonoid içeriği kateşin kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kateşin eşdeğeri olarak verildi. Deneyler üç tekrarlı olarak

gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı. Kalibrasyon grafiği Şekil A.2’de belirtilmiştir.

2.2.11 Antioksidan aktivite tayini

Antioksidan aktivite analizleri DPPH ve CUPRAC yöntemleri ile ve standart olarak Trolox kullanılarak gerçekleştirildi (Goupy ve diğ., 1999).

Ölçümler yine aynı şekilde optimizasyon öncesinde; farklı konsantrasyonlardaki lipozomlar jel filtrasyonundan geçirilerek ve Triton kullanılarak kapsüller parçalanıp içindeki bileşenlerin açığa çıkarılmasından sonra ve optimizasyon sonrasında; biyoyararlılık uygulanan enkapsüle edilmemiş ekstraktlarda, enkapsüle ekstraktların katıldığı gıda ürünü ve biyoyararlılık uygulanmayan enkapsüle edilmemiş ekstraktlarda ve enkapsüle ekstraktların katıldığı gıda ürünü yapıldı. Sonuçlar, Trolox eşdeğeri (TE) cinsinden ifade edildi. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı. Kalibrasyon grafikleri DPPH için Şekil A.3’te, CUPRAC için Şekil A.4’te belirtilmiştir.

2.2.11.1 DPPH metodu

Örneklerin antioksidan aktivitesi, hidrojen bağlama kabiliyeti DPPH metoduyla (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikalini yakalama) ölçüldü.

Uygun oranda seyreltilmiş örneklerden 100 µl alındı ve üzerine 2 ml 0,1 mM DPPH metanol solüsyonu ilave edildikten sonra vortekste karıştırılıp oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika bekletildi. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 517 nm’de ölçüldü.

2.2.11.2 CUPRAC metodu

CUPRAC metodu kullanılarak (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) antioksidanların bakır iyonunu azaltma kabiliyeti ölçülerek örneklerin toplam antioksidan aktivitesi belirlendi.

Bu yönteme göre uygun oranlarda seyreltilmiş örnekten 100 µl alınarak 1 ml 10^{-2} mM Bakır (II) klorit çözeltisi, 1 ml $7,5 \times 10^{-3}$ Neocuproine çözeltisi, 1 ml 1 M amonyum asetat (pH 7) tampon çözeltisi, 1 ml saf su ile karıştırıldı ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 450 nm’de ölçüldü.

2.2.12 Elma kabuğu ekstraktlarının ürüne katılması

En fazla verimin alındığı kaplama yüzdesiyle (%0,1'lik) elma ekstraktları önce lipozomla daha sonra kitosanla ve en son olarak maltodekstrinle kaplanarak enkapsüle edildi. Püskürtmeli kurutucuda kurutularak toz forma getirildi. Yerel marketlerden satın alınan kefir numunesi içine katılarak üründeki fenolik bileşen stabilitesi incelendi.

2.2.13 Ürüne katılan ekstraktların *in vitro* biyoyararlılığının incelenmesi

Enkapsüle edilen elma kabuğu ekstraktlarını içeren kefir numunesinin *in vitro* sindirim/biyoyararlılık analizi gerçekleştirildi. Örneklerin biyoyararlılıklarının belirlenmesi amacıyla Tan ve diğ. (2014)'nin *in vitro* sindirim sistemi yöntemi kullanıldı.

Hazırlanan örneklerden 1,5 ml alınarak 13,5 ml ağız sıvısı (140 mM NaCl, 5 mM KCl) eklenerek ağız sindirimi için 10 dakika çalkamalı su banyosunda muamele edildi. Mide sindirimi için, 4,5 ml mide sıvısı (1 M HCl'de 3,2 g/l pepsin) ilave edildi ve 1 M NaOH ile pH 2.0'ye ayarlandı. 37°C'de 1 saat inkübasyon sonunda yine 1 M NaOH kullanılarak numunelerin pH'ı 7,5 olarak ayarlandıktan sonra bağırsak sıvısı (4,76 mg/ml pankreatin ve 5,16 mg/ml safra tuzu, pH 7,5) eklendi. 2 saatlik bağırsak sindirimi boyunca yağ sindiriminden açığa çıkan serbest yağ asitlerini nötralize etmek için belirli aralıklarda 1 M NaOH ilave edilerek pH (7,5) ayarlaması yapıldı ve eklenen hacim kaydedildi. Bağırsak sindirimi sonunda örnekler ependorf tüplerinde 4°C'de 18000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek (Hettich Zentrifugen Universal 32R) analizleri gerçekleştirilmek üzere -20°C'de saklandı.

Ayrılan örneklerle daha sonra toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan aktivite analizleri uygulanarak biyoyararlılık değerleri hesaplandı.

2.2.14 UFLC ile fenolik bileşen analizi

Biyoyararlılık örnekleri sıvı kromatografisi analizinden önce katı-fazlı ekstraksiyon (SPE) ile saflaştırıldı.

Öncelikle, 500 mg/4 ml C18 SPE kartuşları (Sep-Pak) 6 ml formik asit/metanol (1:100, v/v) ve sonrasında 4 ml formik asit/saf su (1:100, v/v) ile yıkandı. 1,5 ml örnek 30 µl formik asitle 16000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatantları 5 ml formik asit/saf su (1:100, v/v) ile yıkanmış kartuşlardan geçirildi. Biyoyararlılık

örnekler en son formik asit/metanol (1:100, v/v) ile ayrıştırılarak elde edildi. Diğer örnekler ise metanol ile 1:1 oranında çözülerek cihaza verildi.

Tüm örnekler 0,45 µm'lik membran filtrelerinden geçirilip sıvı kromatografisi analizi için viallere konularak Shimadzu 20A series ultra fast liquid chromatograph (UFLC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) sistemi ile analizlendi. Gradyen mobil faz kısmında A çözgeni olarak 7,5 mM formik asit ve mobil faz B çözgeninde ise asetonitril kullanıldı. Akış hızı ise 0,5 ml/dak olarak uygulandı. 20 dakikalık programda gradyen olarak uygulanan çözgen sistemi şu şekilde uygulandı: 0–1 dak: % 5 B; 1-2 dak: % 10 B; 2-5 dak: % 50 B; 5-10 dak: % 50 B; 10-15 dak: % 95 B; 15-19 dak: % 95 B; 19–20 dak: % 5 B.

Fenolikler asitleri belirlemek amacıyla standart olarak klorojenik asit, kafeik asit, 4-(p)-hidroksibenzoik asit, trans-sinamik asit, p-kumarik asit, elajik asit, prokateşuik asit, ferulik asit, sinapik asit, şirincik asit, rutin, kuersetin ve gallik asit kullanıldı.

2.2.15 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Minitab 17.3.1 (Minitab Inc., A.B.D) istatistik programıyla, üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneylerin sonuçları kullanılarak tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) yapıldı. Tüm örneklerin ortalamaları arasındaki ve örneklerin de kendi içinde, sadece kefire katılarak oluşturulan gruplamaların ortalamaları arasındaki farklılıklar Tukey testiyle % 95'lik güven aralığında incelendi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Optimizasyon Aşamasında Yapılan Ölçümler

3.1.1 Partikül boyutu

Boş lipozom ve % 0,1 - 0,5 elma kabuğu ekstraktı içeren numunelerin partikül boyutu ölçümleri ve bu ölçümlerdeki standart sapmalar Çizelge 3.1’de ve Şekil 3.1’de belirtilmiştir. Ölçümler nanometre boyutunda yapılmıştır.

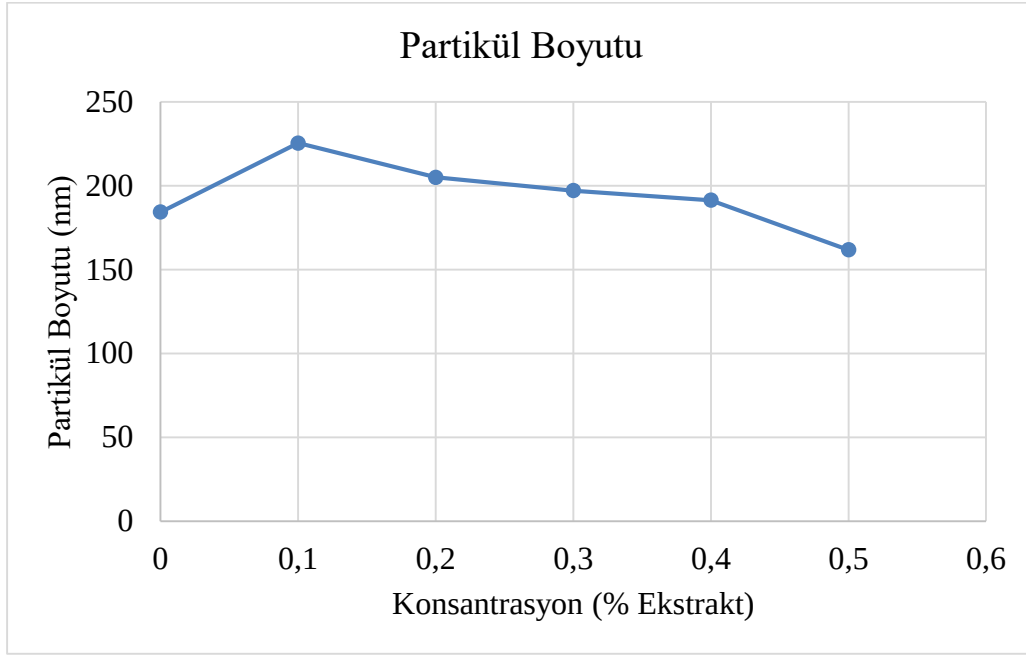
Partikül boyutu lipozom karakteristiği hakkında parenteral kontrol için kritik öneme sahip olması bakımından en önemli bilgiyi veren fiziksel özelliktir. Ayrıca lipozom üretim aşamasındaki dalgalanmaları ve yığın kalitesi hakkında bilgi verir (Pattni ve diğ., 2015).

Çizelge 3.1 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen partikül boyutu değerleri.

Ekstrakt miktarı	Partikül Boyutu (nm)	Std Sapma
0	184,3	15,6
0,1	225,4	9,6
0,2	205,0	5,5
0,3	197,1	8,7
0,4	191,3	2,4
0,5	161,8	1,4

Boş lipozomun ölçümlenen partikül boyutu (184,3 nm) incelendiğinde Pattni ve diğ. (2015) yaptığı sınıflandırmaya göre 100 nm’den büyük olan LUV (large unilamellar vesicles – büyük tek katmanlık kesecikler) grubuna girdiği görülmektedir. Elde edilen değer Gibis, Thellmann, ve diğ. (2014) ve Gibis ve diğ. (2012) sadece lipozomla yaptıkları kaplamadaki değerlerden (sırasıyla, 34 nm ve <40 nm) oldukça büyük olmakla birlikte Gültekin-Özgüven ve diğ. (2016) tespit ettiği (150 nm) ve

Santo ve diğ. (2014) elde ettiği (128 nm - 290 nm) ve Tsai ve Rizvi (2016)'nin ölçümlediği (20-150 nm) değerlere yakın görünmektedir.



Şekil 3.1 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen partikül boyutu değerlerinin grafiksel gösterimi.

Ekstrakt içeren lipozomlarda ise % 0,1 – 0,2 – 0,3 ve 0,4'lük hazırlanan ekstraktların boş lipozomdan daha büyük olduğu görölmektedir. Gültekin-Özgüven ve diğ. (2016), Gibis, Thellmann, ve diğ. (2014) ve Gibis ve diğ. (2012) de tespit ettiği gibi enkapsülasyonu tamamlayan lipozomlar daha büyük boyutlarda olmaktadır (sırasıyla, 200 nm, 102 nm, <100 nm). Bu durum lipozomun fenolik maddeyi enkapsüle ettiği anlamına gelmektedir. % 0,5'lik hazırlanan ekstraktın ise lipozom boyutundan küçük olduğu bunun da yeterli enkapsülasyon yapılmadığı anlamına geldiği söylenebilir.

3.1.2 Zeta (ζ) potansiyeli

Boş lipozom ve % 0,1 – 0,5 elma kabuğu ekstraktı içeren numunelerin zeta potansiyeli ölçümleri ve bu ölçümlerdeki standart sapmalar Çizelge 3.2'de ve Şekil 3.2'de belirtilmiştir.

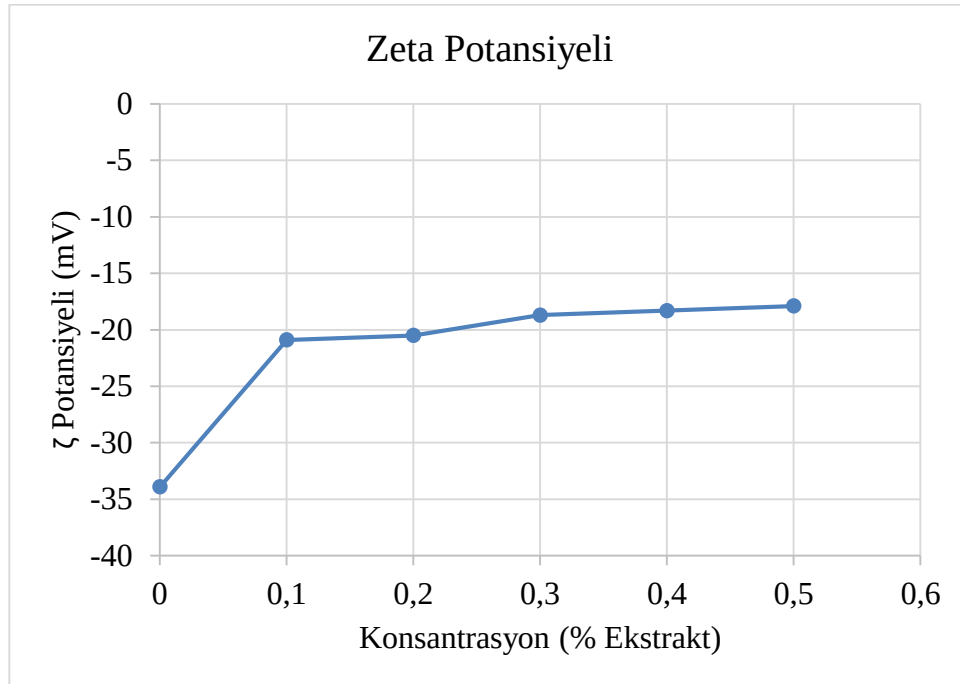
Zeta potansiyeli kolloidal stabiliteyi tahmin etmek için ölçümlenir ve partiküller arası interaksiyonların incelenmesini sağlar. Partikül süspansiyonlarında topaklanmayı tahmin etmek için kullanışlıdır ve partiküllerin elektriksel itme güçlerinin bir ölçüsüdür (Babaei, 2010).

Çizelge 3.2 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen zeta potansiyeli değerleri.

Ekstrakt miktarı	Zeta Potansiyeli (mV)	Std Sapma
0	-33,9	2,8
0,1	-20,9	0,9
0,2	-20,5	2,1
0,3	-18,7	2,4
0,4	-18,3	1,9
0,5	-17,9	1,8

Boş lipozomun zeta potansiyeli lipozoma özgü negatif yüklü ve Gibis ve diğ. (2012)'nin ölçümlendiği (-21,8 | -57,7 mV) ve Gültekin-Özgüven ve diğ. (2016)'nin tespit ettiği (-27,6 | -36,0 mV) değerler ile uygunluk göstermektedir. Benzer şekilde ekstraktların da negatif yüklere sahip olmasına bakılarak lipozom tarafından enkapsüle edildikleri söylenebilir. Yüksek değerli zeta potansiyeli değeri, partiküller arası daha büyük itme kuvveti olduğunun ve bu durumun da kümelenmeyi önlediğini ve daha stabil süspansiyon elde edildiğinin göstergesidir (Pattni ve diğ., 2015).

Zeta potansiyel ölçümleri arasında büyük farklar olmamakla birlikte en yüksek negatif değere % 0,1'lik ekstrakt ile hazırlanan enkapsülasyonda ulaşılmıştır. En büyük partikül boyutlarına da yine bu çözeltideki ölçümlerde ulaşılmıştır.



Şekil 3.2 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.

Elde edilen sonuçlarla; % 0,1'lik ekstrakt kullanılarak hazırlanacak lipozom süspansiyonunun diğerlerine oranla daha stabil olacağı ve enkapsülasyon veriminin de daha yüksek olabileceği belirtilebilir.

3.1.3 Toplam flavonoid miktarları

Enkapsülasyon verimliliğini ölçmek amacıyla yapılan toplam flavonoid miktarı analizinde ilk aşama olarak elma kabuğu ekstraktları lipozomla kaplandıktan sonra herhangi bir işlem uygulanmadan deneyler yapıldı (Lipozom). Daha sonra bu lipozom süspansiyonu Sephadex jel filtrasyonundan geçirilerek enkapsüle edilemeyen ekstraktların uzaklaştırılması sağlandı ve sadece enkapsüle ve kapsül yüzeyine yapışan ekstraktların bulunduğu bu süspansiyona tekrar analiz yapıldı (Sephadex). Sadece enkapsüle edilen lipozomların ve kapsül yüzeyine yapışan ekstraktların bulunduğu süspansiyon Triton'la muamele edilip lipozom kapsüllerinin parçalanması sağlanarak içindeki ekstraktların açığa çıkması sağlandı ve toplam flavonoid miktarı tekrar ölçüldü (Triton). Toplam flavonoid analizi sonuçları Çizelge 3.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.3 : Elma kabuğu enkapsülasyonu aşamalarında ölçülen toplam flavonoid miktarları.

Ekstrakt Miktarı (%)	Lipozom	Sephadex	Triton	Kapsüllenme Oranı	Bağlanma Oranı
0,1	0,146	0,100	0,170	% 32,5	% 78,5
0,2	0,184	0,153	0,196	% 19,1	% 86,4
0,3	0,194	0,131	0,173	% 17,8	% 73,4
0,4	0,205	0,159	0,200	% 16,6	% 81,5
0,5	0,268	0,173	0,212	% 12,5	% 69,1

Lipozom : lipozomla karıştırıldıktan sonraki (yüzeyde tutunan ve dış ortamda bulunan ekstraktlar), *Sephadex* : jel filtrasyonundan geçirildikten sonraki (sadece yüzeyde tutunan ekstraktlar), *Triton* : Triton'la parçalama işleminden sonraki (kapsül içinde ve yüzeyde bulunan ekstraktlar) ölçümleri; *Bağlanma Oranı* : Triton/Toplam ve *Kapsüllenme Oranı* : Tritondan Sephadex değerinin çıkarılıp toplam değere bölünmesiyle elde edilen değeri belirtmektedir. Sonuçlar mg kateşin / g kuru örnek olarak belirtilmiştir.

Lipozom aşamasında, yüzeyde tutunan ve kapsüllenemeyen (dış ortamda bulunan) ekstraktların flavonoid miktarları ölçülmüş oldu. Sephadex aşamasında, sadece yüzeye tutunan ekstraktların miktarları ve Triton aşamasında ise yüzeye tutunanlar ve kapsüllenen ekstraktların flavonoid miktarları ölçülmüş oldu. Toplam flavonoid miktarı kapsüllenen miktar, yüzeye tutunan miktar ve kapsüllenemeyen miktarların toplamıdır.

Kapsüllenme oranı, elma kabuğu ekstraktlarındaki flavonoidlerin lipozom tarafından ne kadarının kapsüle edildiğini göstermektedir (3.1).

$$KO = \frac{Triton-Sephadex}{Toplam} = \frac{Triton-Sephadex}{Lipozom+Triton-Sephadex} \quad (3.1)$$

Hesaplama; Triton aşamasında elde edilen (parçalanmış kapsüllerden ve yüzeydeki tutunan ekstraktları içeren değerden) Sephadex aşamasında elde edilen (lipozom veziküllerinin yüzeyine yapışan) flavonoid miktarlarının çıkarılıp toplam ekstrakt değerine (ilk baştaki lipozom süspansiyonunda ölçülen miktara Triton aşamasındaki miktarın eklenip Sephadex aşamasındaki miktarın çıkarılmasıyla elde edilen miktara) bölünmesiyle yapıldı.

Bağlanma oranı (enkapsülasyon verimi), elma kabuğu ekstraktlarındaki flavonoidlerin lipozom tarafından ne kadarının kapsüle edildiğini ve yüzeyinde tutundurduğunu göstermektedir (3.2).

$$BO = \frac{Triton}{Toplam} = \frac{Triton}{Lipozom+Triton-Sephadex} \quad (3.2)$$

Hesaplama; Triton aşamasında elde edilen (parçalanmış kapsüllerden ve yüzeydeki tutunan ekstraktları içeren değer) miktarın toplam ekstrakt değerine (ilk baştaki lipozom süspansiyonunda ölçülen miktara Triton aşamasındaki miktarın eklenip Sephadex aşamasındaki miktarın çıkarılmasıyla elde edilen miktara) bölünmesiyle yapıldı.

Bağlanma oranlarının (enkapsülasyon verimi) % 69 - % 86,4 aralığında olduğu görülmektedir. Bu değerler Istenič ve diğ. (2016) (–)-epigallokateşin galat ile yaptıkları çalışmadaki değerden (% 97) ve Isailović ve diğ. (2013)’nin resveradrol kaplama ile elde ettikleri değerden (% 97,4) daha düşüktür. Bununla birlikte bu değerler Gibis, Zeeb, ve diğ. (2014)’nin amberçiçeği (hibiscus) ile yaptıkları çalışmadaki enkapsülasyon verimliliği değerleriyle (% 63 – 72) uyumludur.

Ekstrakt miktarı arttıkça kapsüllenme oranının azaldığı görülmekle birlikte ölçümlerde en iyi kapsüllenme oranı % 0,1'lik hazırlanan ekstraktan elde edildi.

3.1.4 Toplam fenolik miktarları

Elma kabuğu ekstraktlarının lipozomla karıştırıldıktan sonraki kapsüllenemeyen ve vezikül yüzeyine yapışan tüm fenolik bileşikler, Sephadex jel filtrasyonundan geçirildikten sonra sadece lipozom vezikülü yüzeyine yapışan fenolik bileşikler ve Triton'la parçalama işleminden sonraki kapsüllenen ve yüzeye yapışan fenolik bileşen miktarları ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 3.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4 : Elma kabuğu enkapsülasyonu aşamalarında ölçülen toplam fenolik madde miktarları.

Ekstrakt Miktarı (%)	Lipozom	Sephadex	Triton	Kapsüllenme Oranı	Bağlanma Oranı
0,1	0,041	0,018	0,041	35,8%	64,4%
0,2	0,080	0,028	0,029	1,3%	35,0%
0,3	0,128	0,047	0,054	5,2%	39,8%
0,4	0,173	0,053	0,059	3,5%	33,0%
0,5	0,203	0,082	0,088	2,6%	42,2%

Lipozom : lipozomla karıştırıldıktan sonraki (yüzeyde tutunan ve dış ortamda bulunan ekstraktlar), *Sephadex* : jel filtrasyonundan geçirildikten sonraki (sadece yüzeyde tutunan ekstraktlar), *Triton* : Triton'la parçalama işleminden sonraki (kapsül içinde ve yüzeyde bulunan ekstraktlar) ölçümleri; *Bağlanma Oranı* : Triton/Toplam ve *Kapsüllenme Oranı* : Tritondan Sephadex değerinin çıkarılıp toplam değere bölünmesiyle elde edilen değeri belirtmektedir. Sonuçlar mg gallik asit /g kuru örnek olarak belirtilmiştir.

Analiz aşamaları flavonoid deneylerindeki aşamalarla aynı şekilde uygulanmıştır. Enkapsülasyon verimliliğini ölçmek amacıyla ilk aşama olarak elma kabuğu

ekstraktları lipozomla kaplandıktan sonra herhangi bir işlem uygulanmadan deneyler yapıldı (Lipozom). Daha sonra bu lipozom süspansiyonu Sephadex jel filtrasyonundan geçirilerek enkapsüle edilemeyen ekstraktların uzaklaştırılması sağlandı ve sadece enkapsüle ve kapsül yüzeyine yapışan ekstraktların bulunduğu bu süspansiyona tekrar analiz yapıldı (Sephadex). Sadece enkapsüle edilen lipozomların ve kapsül yüzeyine yapışan ekstraktların bulunduğu süspansiyon Triton'la muamele edilip lipozom kapsüllerinin parçalanması sağlanarak içindeki ekstraktların açığa çıkması sağlandı ve toplam fenolik miktarı tekrar ölçüldü (Triton).

Kapsülleme oranı denklem 3.1'deki hesaplamayla, elma kabuğu ekstraktlarındaki fenolik bileşenlerin lipozom tarafından ne kadarının kapsüle edildiğini göstermektedir.

Bağlanma oranı, enkapsülasyon verimi de, denklem 3.2'deki hesaplamayla elma kabuğu ekstraktlarındaki fenolik bileşenlerin lipozom tarafından ne kadarının kapsüle edildiğini ve yüzeyinde tutundurduğunu göstermektedir.

Fenolik bileşen analizinde enkapsülasyon verimliliği % 33 – 64,4 aralığında gerçekleşmiştir. Ekstrakt miktarına göre değişkenlik gösterdiği görülmekle birlikte ölçümlerde en iyi kapsülleme oranı yine % 0,1'lik hazırlanan ekstraktlardan elde edilmiştir. Bu ekstrakt oranında en yüksek verimliliğe de ulaşılmıştır. Bu değer (% 64,4) Gültekin-Özgüven ve diğ. (2016)'nin dut ekstraktında ölçümlendiği değerler aralığına girmektedir (% 51 – % 84,7). Ancak üzüm çekirdeğiyle yapılan bir çalışmadaki değerden (% 88,2) çok daha düşüktür (Gibis ve diğ., 2016).

Enkapsülasyon verimliliklerindeki farklar uygulanan kapsülleme metodlarının farklılığından (sonikasyon uygulanması, prolipozom uygulaması ve mikrofluidizer basınç değerlerinin farklı olması vs. gibi), partiküllerin kümelenmesinden veya zeta potansiyellerinin ortama göre (pH'ya göre veya iyon varlığında) farklı olmasından veya analizleme yöntemlerinin farklılığından (spektrofotometrik ve kromatografik) kaynaklanıyor olabilir.

3.1.5 Antioksidan aktivite analizi

DPPH yöntemiyle elma kabuğu ekstraktlarının lipozomla karıştırıldıktan sonraki kapsüllemeyen ve vezikül yüzeyine yapışan fonksiyonel bileşenlerin, Sephadex jel filtrasyonundan geçirildikten sonra sadece lipozom vezikülü yüzeyine yapışan fonksiyonel bileşenlerin ve Triton'la parçalama işleminden sonraki kapsüllenen ve

yüzeye yapışan fonksiyonel bileşenlerin antioksidan aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 3.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5 : Elma kabuğu enkapsülasyonu aşamalarında ölçülen antioksidan aktivite.

Ekstrakt Miktarı (%)	Lipozom	Sephadex	Triton	Kapsüllenme Oranı	Bağlanma Oranı
0,1	0,098	0,087	0,131	31,1%	92,3%
0,2	0,148	0,101	0,122	12,4%	71,9%
0,3	0,186	0,233	0,252	9,5%	123,1%
0,4	0,140	0,186	0,192	3,8%	131,6%
0,5	0,501	0,208	0,225	3,3%	43,5%

Lipozom : lipozomla karıştırıldıktan sonraki (yüzeyde tutunan ve dış ortamda bulunan ekstraktlar), *Sephadex* : jel filtrasyonundan geçirildikten sonraki (sadece yüzeyde tutunan ekstraktlar), *Triton* : Triton'la parçalama işleminden sonraki (kapsül içinde ve yüzeyde bulunan ekstraktlar) ölçümleri; *Bağlanma Oranı* : Triton/Toplam ve *Kapsüllenme Oranı* : Tritondan Sephadex değerinin çıkarılıp toplam değere bölünmesiyle elde edilen değeri belirtmektedir. Sonuçlar mg TROLOX/g kuru örnek olarak belirtilmiştir.

Analiz aşamaları fenolik bileşen deneylerindeki aşamalarla aynı şekilde uygulanmıştır. Enkapsülasyon verimliliğini ölçmek amacıyla ilk aşama olarak elma kabuğu ekstraktları lipozomla kaplandıktan sonra herhangi bir işlem uygulanmadan deneyler yapıldı (Lipozom). Daha sonra bu lipozom süspansiyonu Sephadex jel filtrasyonundan geçirilerek enkapsüle edilemeyen ekstraktların uzaklaştırılması sağlandı ve sadece enkapsüle ve kapsül yüzeyine yapışan ekstraktların bulunduğu bu süspansiyona tekrar analiz yapıldı (Sephadex). Sadece enkapsüle edilen lipozomların ve kapsül yüzeyine yapışan ekstraktların bulunduğu süspansiyon Triton'la muamele edilip lipozom kapsüllerinin parçalanması sağlanarak içteki ekstraktların açığa çıkması sağlandı ve toplam antioksidan aktivite tekrar ölçüldü (Triton).

Kapsüllenme oranı denklem 3.1'deki hesaplamayla, elma kabuğu ekstraktlarındaki antioksidan bileşenlerin lipozom tarafından ne kadarının kapsüle edildiğini göstermektedir.

Enkapsülasyon verimi ise yine denklem 3.2'deki hesaplamayla elma kabuğu ekstraktlarındaki antioksidan maddelerin lipozom tarafından ne kadarının kapsüle edildiğini ve yüzeyinde tutundurduğunu göstermektedir.

Elma ekstraktlarındaki antioksidan aktivite gösteren bileşenlerin enkapsülasyon verimlilikleri % 43,5 ile % 131,6 aralığında değişmekle birlikte en uygun kapsüllenme oranı diğer analizlerde de olduğu gibi % 0,1'lik ekstrakt eklenerek hazırlanan süspansiyonda görülmektedir. Bu ekstrakt oranında antioksidan aktivite ölçümleriyle elde edilen enkapsülasyon verimliliği ise % 92,3 olarak elde edilmiştir. Bu değer (% 92,3) Isailović ve diğ. (2013)'nin sonikasyon uygulanmamış ve lipozomla kaplı resveradrolün ABTS yöntemiyle elde ettikleri antioksidan aktivite ölçüm değeriyle (% 90,4) uyumludur. Bununla birlikte Rashidinejad ve diğ. (2014)'nin kateşin ve türevlerini farklı konsantrasyonlarda lipozomla enkapsüle ettikleri çalışmanın verimlilik sonuçlarından (% 53 - 75) daha yüksektir.

Farklılık antioksidan ölçüm metotları arasındaki değişikliklerden ve lipozom dispersiyonlarının farklı zeta potansiyeli özelliklerinden ve ortamın pH ve iyonik yük yoğunluğunun farklılığından kaynaklanmış olabilir.

3.1.6 Optimizasyon sonucu

Zeta potansiyel ölçümünün negatif oluşu polar bir molekül olan fosfatidilkolinden oluşan lipozomun tipik özelliği olan ve su ile interaksiyonu sonucu oluşan negatif yüklerin sonucudur ve lipozom dispersiyonlarının stabilitelerinin korunmasına yardımcı olmaktadır (Toniazzo ve diğ., 2014). % 0,1'lik lipozom çözeltisinde en büyük negatif zeta potansiyeliyle birlikte en büyük partikül boyutu elde edilmiştir. Partikül boyutunun büyük olması kaplamanın gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Bununla birlikte toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivite analizlerinden elde edilen sonuçlarla en yüksek kapsülleme oranı yine %0,1'lik ekstraktlar ile hazırlanan lipozom çözeltisiyle elde edilmiştir.

Optimizasyon sonucunda elde edilen % 0,1'lik oranla elma kabuğu ekstraktlarından elde edilen enkapsüle lipozom dispersiyonu, kitosan ve maltodekstrin ile kaplandıktan sonra püskürtmeli kurutucuda kurutularak daha uzun ömürlü ve kolay

kullanılabilir hale getirildi ve gıda ürünü içine (kefire) katılarak biyoyararlılık çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2 Biyoyararlılık Sonrası Yapılan Ölçümler

Lipozomun elma kabuğu ekstraktlarındaki etkinliğini inceleyebilmek için içinde ekstrakt bulunmayan boş lipozom, % 0,1'lik elma kabuğu ekstraktı içeren lipozom-kitosan-maltodekstrin kaplı örnek, lipozomsuz (kaplanmamış) elma kabuğu ekstraktı ve maltodekstrinin etkisini inceleyebilmek için sadece maltodekstrinle kaplanmış elma kabuğu ekstraktı numuneleri örnek olarak kullanıldı.

Kefir içine eklenen enkapsüle ekstraktların ilk eklendiği gün (0. Gün) ve sonraki gün (1. Gün) HPLC ve spektrofotometrik analizleri gerçekleştirildi.

Kefir içindeki etkinliği inceleyebilmek adına kefir kullanılmadan sadece asetat tamponunda çözülerek elde edilen çözeltilerde de aynı analizler gerçekleştirildi.

3.2.1 Partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri

Boş lipozomun ve % 0,1 örnek içeren lipozomun kitosanla ve maltodekstrinle kaplandıktan sonra elde edilen zeta potansiyeli ve partikül boyutu ölçümleri ve bu ölçümlerdeki standart sapmalar Çizelge 3.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.6 : Elma kabuğu ekstraktı enkapsülasyonu sonrası ölçülen zeta potansiyeli değerleri.

	Zeta Potansiyeli	Partikül Boyutu
Boş Kitosan	7,85±0,21	354,90±30,28
% 0,1 Kitosan	13,60±0,31	626,00±40,45
Boş Maltodekstrin	14,90±0,14	368,10±7,94
% 0,1 Maltodekstrin	27,30±0,85	691,20±2,69

Boş Kitosan : Ekstrakt içermeyen lipozom ve kitosan kaplı örneği, *% 0,1 Kitosan :* İçinde % 0,1 oranında ekstrakt içeren lipozom ve ikinci katman olarak kitosan kaplı örneği, *Boş Maltodekstrin :* Ekstrakt içermeyen lipozom, kitosan ve maltodekstrin kaplı örneği, *% 0,1 Maltodekstrin:* İçinde % 0,1 oranında ekstrakt içeren lipozom ve ikinci katman olarak kitosan ve üçüncü katman olarak Maltodekstrin kaplı örneği göstermektedir.

Kitosan ile ikinci katman enkapsülasyon yapıldıktan sonra zeta potansiyel değerlerin kitosana özgü (içerdiği amino gruplarından ve yüksek konsantrasyondan dolayı) pozitif değerlere dönüştüğü görülmektedir (Harris ve diğ., 2011). Ekstrakt içeren (% 0,1 ekstrakt içeren kitosan kaplı) örneğin zeta potansiyelinin, boş (ekstrakt içermeyen) kitosan kaplı örnekten büyük olması stabilitesinin daha büyük olduğunun göstergesidir denilebilir.

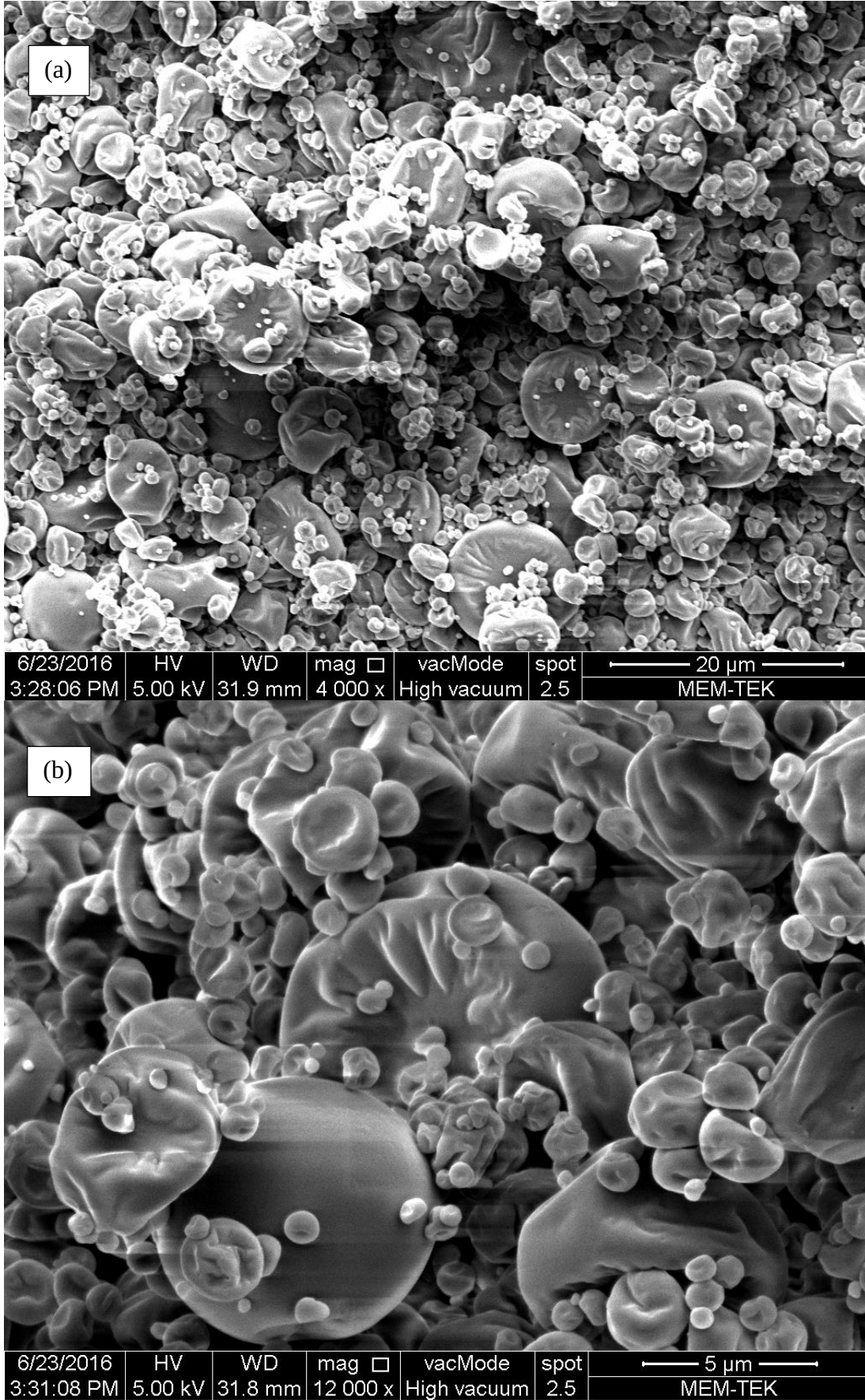
Boş kitosanın partikül boyutu (354 nm) Gibis ve diğ. (2016) elde ettiği boyutlardan (66,7 nm) çok daha büyük görünmektedir ve bu çalışmada ve yaptığımız çalışmada ekstrakt eklendikten sonra partikül boyutu yaklaşık olarak iki katına çıkmaktadır (sırasıyla 160,3 nm ve 626 nm). Boyut artışı ekstraktların kapsül içine hapsedilebildiğinin göstergesidir. Ogawa ve diğ. (2003) mısır yağını lipozom ve kitosanla kapladıkları çalışmada 760 nm boyutlarında kapsül boyutu elde etmişlerdir. Bu değer bu çalışmada elde ettiğimiz değerlere uygunluk göstermektedir. Ayrıca optimizasyon aşamasında birincil katman lipozomla ölçtüğümüz partikül boyutunun (225 nm) daha yaklaşık iki-üç katı olması (626 nm) da ekstraktlarımızı enkapsüle edebildiğimiz göstergesi sayılabilir.

Benzer şekilde üçüncü katman maltodekstrin ile kaplama partikül boyunu ve zeta potansiyeli değerini arttırmıştır. Zeta potansiyelindeki artış maltodekstrinin kitosana oranla daha itici güçlere sahip olduğunun, kitosanın yapısal özelliği olan yapışkanlığını (McClements, 2015) azalttığının ve enkapsülasyon stabilitesini arttırdığının göstergesi sayılabilir.

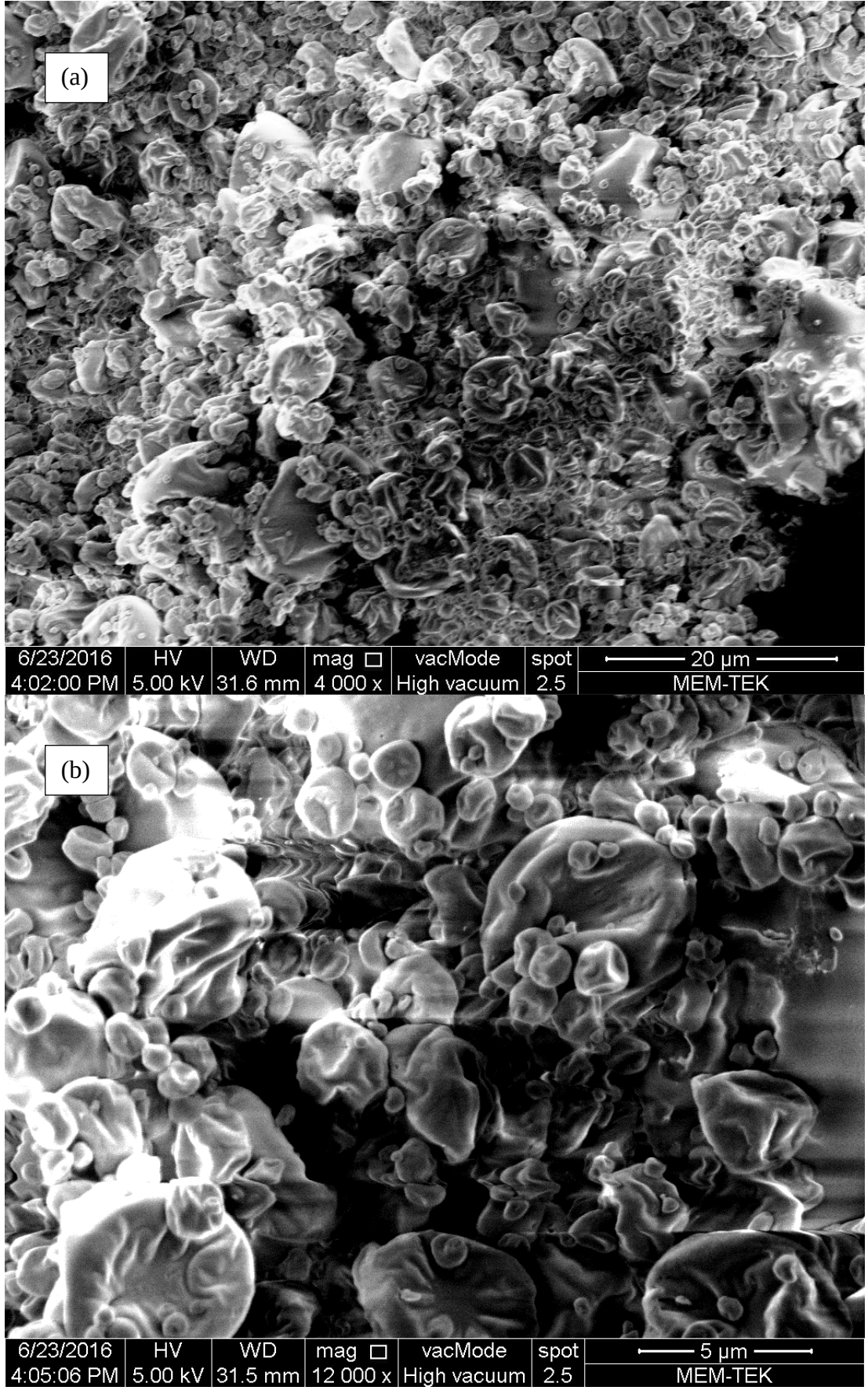
3.2.2 SEM görüntüleri

Yüzde 0,1'lik elma kabuğu ekstraktı içeren lipozom-kitosan-maltodekstrin kaplı ve lipozomsuz (kaplanmamış) elma kabuğu ekstraktı ve ekstrakt içermeyen boş lipozoma ait 4.000 ve 12.000 kat büyütülmüş elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te verilmiştir.

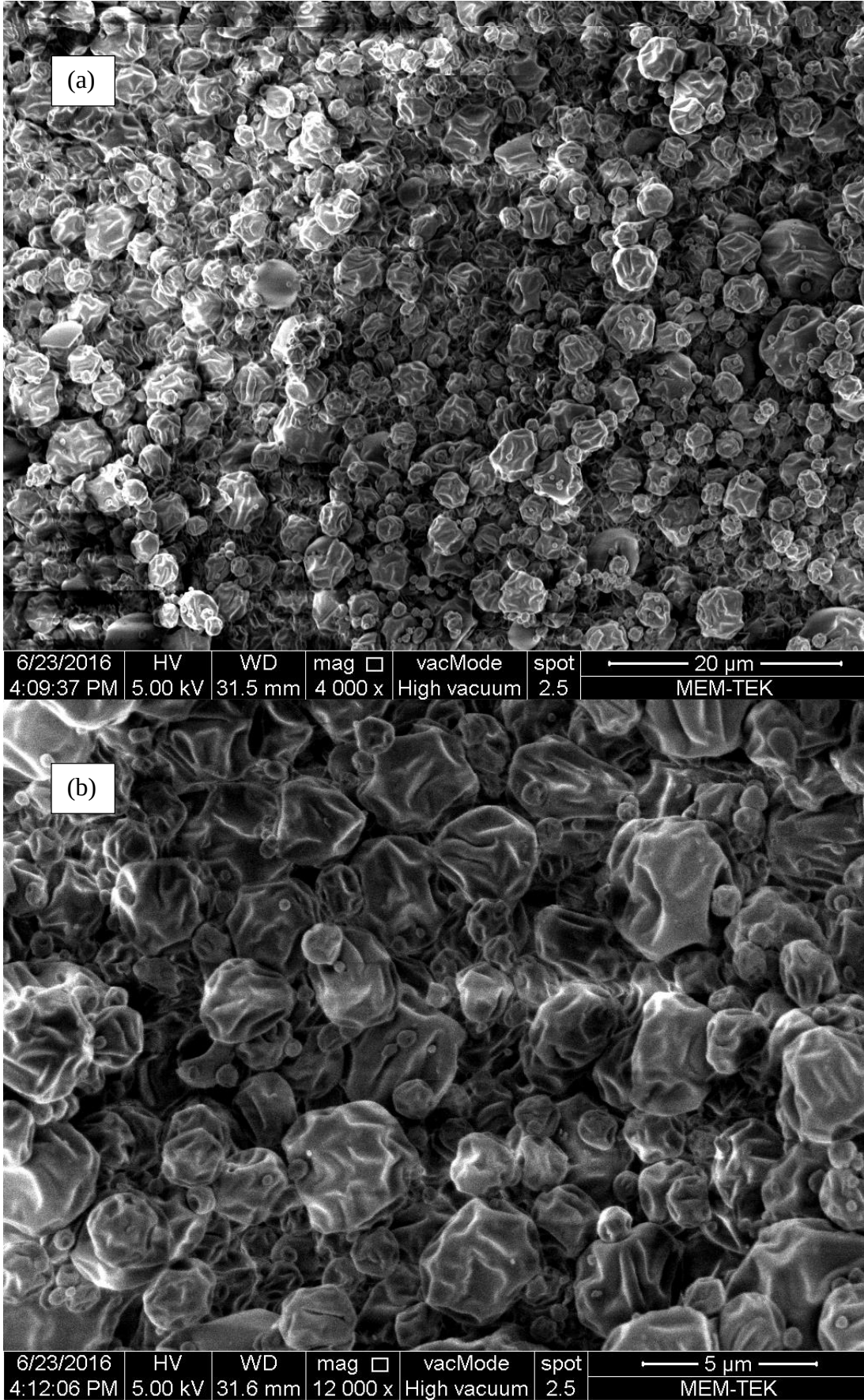
Elektron mikroskobu görüntülerinde partiküllerin çeşitli boylara sahip olduğu görülmektedir. Şekil 3.3'te lipozom, kitosan ve maltodekstrin kaplı % 0,1 ekstrakt içeren numunenin partikül boyutları incelendiğinde, entsrümental cihazda yapılan ölçümdeki boyutlardan (691 nm) hem aynı boyutlarda hem daha küçük hem de çok daha büyük boyutlu (5.000 – 20.000 nm) yuvarlak ve büzüşük şekilli partiküller bulunduğu görülmektedir.



Şekil 3.3 : Üç katmanlı (lipozom+kitosan+maltodekstrin) enkapsüle elma ekstraktlarının 4.000 (a) ve 12.000x (b) büyütülmüş SEM görüntüleri.



Şekil 3.4 : Boş lipozom+kitosan+maltodekstrin kapsüllerinin 4.000 (a) ve 12.000 kat (b) büyütülmüş SEM görüntüleri.



Şekil 3.5 : Elma kabuğu ekstraktlarının (kapsüllenmemiş) 4.000 (a) ve 12.000 kat (b) büyütülmüş SEM görüntüleri.

Şekillere bakılarak kapsüllenmiş ekstraktların (aynı boyutlardakilerin), kapsüllenmemiş veya topaklanmış lipozomların (çok daha büyük boyutlardakilerin) birarada olduğu söylenebilir. Şekillerin hemen hemen yuvarlak olması mikrofluidik etkiyle ve püskürtmeli kurutucunun nozzle etkisiyle açıklanabilir. Benzer görüntüler boş kitosan içeren numunede ve sadece elma ekstraktı içeren numunede de görülmektedir.

3.2.3 Toplam fenolik madde analizi

Kefirli ve kefirsiz örneklerde sıfırıncı gün ve birinci gün Folin metoduyla uygulanan toplam fenolik madde analizi sonuçları Çizelge 3.7’de gösterilmiştir. Sonuçlar biyoyararlılık öncesi ve biyoyararlılık sonrası olarak iki aşamada verilmiştir.

Çizelge 3.7 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası Folin metoduyla elde edilen toplam fenolik madde miktarları.

	Toplam Fenolik Madde	Biyoyararlılık			
		0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün
Kefirli	Boş Lipozom Kefirde	0,64 ^c	0,60 ^c	23,65 ^b	19,95 ^b
	%0.1 Lipozom Kefirde	0,55 ^b	0,61 ^b	19,65 ^{bcd}	18,48 ^b
	Elma Ekstraktı Kefirde	1,05 ^b	1,87 ^b	20,96 ^b	17,26 ^b
	Maltodekstrin Kaplı Elma Kefirde	0,53 ^b	0,64 ^b	14,98 ^{bcd}	18,04 ^b
Kefirsiz	Boş Lipozom	0,24 ^d	0,24 ^d	7,00 ^{cd}	2,83 ^c
	%0.1 Lipozom	0,25 ^d	0,25 ^d	5,03 ^d	2,82 ^c
	Elma Ekstraktı	21,82 ^a	21,82 ^a	21,82 ^{bcd}	169,05 ^a
	Maltodekstrin Kaplı Elma	0,12 ^d	0,12 ^d	44,23 ^a	2,71 ^c

Boş Lipozom: İçinde ekstrakt içermeyen lipozomu; %0,1 Lipozom: İçinde % 0,1 oranında elma kabuğu ekstraktı içeren lipozomu; Elma Ekstraktı: Kaplama materyali olmayan elma kabuğu ekstraktını; Maltodekstrin Kaplı Elma: Elma ekstraktlarının sadece maltodekstrinle kaplanmış halindeki; Biyoyararlılık: Biyoyararlılık sonrası yapılan ölçümleri belirtmektedir. Sonuçlar mg gallik asit/g kuru örnek olarak belirtilmiştir. Her kolonda üst indis olarak ifade edilen harflerdeki değişiklikler ortalamalardaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$). Sayıların yanında bulunan değişik harfler ise satırlar arasındaki farkların önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

3.2.4 Toplam flavonoid miktarı

Kefirli ve kefirsiz örneklerde sıfırıncı gün ve birinci gün uygulanan toplam flavonoid madde analizi sonuçları Çizelge 3.8’de gösterilmiştir. Sonuçlar biyoyararlılık öncesi ve biyoyararlılık sonrası olarak iki aşamada verilmiştir.

Çizelge 3.8 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası elde edilen toplam flavonoid miktarları.

Toplam Flavonoid Miktarı			Biyoyararlılık		
	0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün	
Kefirli	Boş Lipozom Kefirde	0,38 ^{cd} _b	0,28 ^c _b	9,24 ^c _a	8,42 ^b _a
	%0.1 Lipozom Kefirde	0,35 ^{de} _c	0,30 ^c _c	6,07 ^{cd} _b	8,10 ^b _a
	Elma Ekstraktı Kefirde	0,29 ^e _c	0,30 ^c _c	19,14 ^b _a	8,22 ^b _b
	Maltodekstrin Kaplı Elma Kefirde	0,34 ^{de} _b	0,27 ^c _b	6,06 ^{cd} _a	6,88 ^{bc} _a
Kefirsiz	Boş Lipozom	0,57 ^b	0,57 ^b	1,78 ^d	3,24 ^{cd}
	%0.1 Lipozom	0,48 ^{bc}	0,48 ^b	1,02 ^d	4,57 ^{bcd}
	Elma Ekstraktı	128,06 ^a	128,06 ^a	109,85 ^a	98,18 ^a
	Maltodekstrin Kaplı Elma	0,05 ^f	0,05 ^d	0,86 ^d	1,28 ^d

Boş Lipozom: İçinde ekstrakt içermeyen lipozomu; %0,1 Lipozom: İçinde % 0,1 oranında elma kabuğu ekstraktı içeren lipozomu; Elma Ekstraktı: Kaplama materyali olmayan elma kabuğu ekstraktını; Maltodekstrin Kaplı Elma: Elma ekstraktlarının sadece maltodekstrinle kaplanmış halindeki; Biyoyararlılık: Biyoyararlılık sonrası yapılan ölçümleri belirtmektedir. Sonuçlar mg kateşin/g kuru örnek olarak belirtilmiştir. Her kolonda üst indis olarak ifade edilen harflerdeki değişiklikler ortalamalardaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$). Sayıların yanında bulunan değişik harfler ise satırlar arasındaki farkların önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

3.2.5 Antioksidan aktivite analizleri

Kefirli ve kefirsiz örneklerde sıfırıncı gün ve birinci gün uygulanan antioksidan aktivite analizi sonuçları DPPH için Çizelge 3.9’da ve CUPRAC için Çizelge 3.10’da gösterilmiştir. Sonuçlar biyoyararlılık öncesi ve biyoyararlılık sonrası olarak iki aşamada verilmiştir.

Çizelge 3.9 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası DPPH metodu ile elde edilen antioksidan aktivite miktarları.

DPPH Metodu Antioksidan Aktivite		Biyoyararlılık	
		0. Gün	1. Gün
Kefirli	Boş Lipozom Kefirde	0,12 ^d c	0,01 ^d d
	%0,1 Lipozom Kefirde	0,10 ^d b	0,06 ^d b
	Elma Ekstraktı Kefirde	0,28 ^{cd} b	0,55 ^c ab
	Maltodekstrin Kaplı Elma Kefirde	0,02 ^d c	0,11 ^d c
Kefirsiz	Boş Lipozom	0,57 ^{bc}	0,57 ^c
	%0,1 Lipozom	0,97 ^b	0,97 ^b
	Elma Ekstraktı	270,16 ^a	270,16 ^a
	Maltodekstrin Kaplı Elma	0,20 ^{cd}	0,20 ^d

Boş Lipozom: İçinde ekstrakt içermeyen lipozomu; %0,1 Lipozom: İçinde % 0,1 oranında elma kabuğu ekstraktı içeren lipozomu; Elma Ekstraktı: Kaplama materyali olmayan elma kabuğu ekstraktını; Maltodekstrin Kaplı Elma: Elma ekstraktlarının sadece maltodekstrinle kaplanmış halindeki ölçümleri belirtmektedir. Sonuçlar mg Trolox/g kuru örnek olarak belirtilmiştir. Her kolonda üst indis olarak ifade edilen harflerdeki değişiklikler ortalamalardaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$). Sayıların yanında bulunan değişik harfler ise satırlar arasındaki farkların önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

Çizelge 3.10 : Biyoyararlılık öncesi ve sonrası CUPRAC metodu ile elde edilen antioksidan aktivite miktarları.

CUPRAC Metodu Antioksidan Aktivite		Biyoyararlılık	
		0. Gün	1. Gün
Kefirli	Boş Lipozom Kefirde	0,75 ^e c	0,63 ^e c
	%0,1 Lipozom Kefirde	0,66 ^e c	0,74 ^e c
	Elma Ekstraktı Kefirde	1,32 ^d b	1,81 ^d b
	Maltodekstrin Kaplı Elma Kefirde	0,57 ^e b	0,67 ^e b
Kefirsiz	Boş Lipozom	5,29 ^c	5,29 ^c
	%0,1 Lipozom	6,02 ^b	6,02 ^b
	Elma Ekstraktı	747,91 ^a	747,91 ^a
	Maltodekstrin Kaplı Elma	0,45 ^e	0,45 ^e

Boş Lipozom: İçinde ekstrakt içermeyen lipozomu; %0,1 Lipozom: İçinde % 0,1 oranında elma kabuğu ekstraktı içeren lipozomu; Elma Ekstraktı: Kaplama materyali olmayan elma kabuğu ekstraktını; Maltodekstrin Kaplı Elma: Elma ekstraktlarının sadece maltodekstrinle kaplanmış halindeki ölçümleri belirtmektedir. Sonuçlar mg Trolox/g kuru örnek olarak belirtilmiştir. Her kolonda üst indis olarak ifade edilen harflerdeki değişiklikler ortalamalardaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$). Sayıların yanında bulunan değişik harfler ise satırlar arasındaki farkların önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

3.2.6 UFLC analiz sonuçları

Kefir içine katılarak analizlenen elma ekstraktı numuellerinin (kefirli) ve kefire katılmadan asetat tamponunda çözündürülerek kullanılan (kefirsiz) örneklerde sıfırıncı gün ve birinci gün uygulanan UFLC sıvı kromatografisi analiz sonuçları Çizelge 3.11’de gösterilmiştir. Sonuçlar biyoyararlılık öncesi ve biyoyararlılık sonrası olarak iki aşamada verilmiştir.

Çizelge 3.11 : UFLC analiz sonuçları.

UFLC Sonuçları		Biyoyararlılık			
		0. Gün	1. Gün	0. Gün	1. Gün
Kefirli	Boş Lipozom Kefirde	100,77 ^{ca}	39,19 ^{da}	662,43 ^{aa}	502,58 ^{ab}
	% 0,1 Lipozom Kefirde	71,45 ^{cb}	61,90 ^{db}	532,46 ^{aa}	586,15 ^{aa}
	Elma Ekstraktı Kefirde	160,76 ^{bcb}	147,71 ^{db}	545,43 ^{aa}	592,24 ^{aa}
	Maltodekstrin Kaplı Elma Kefirde	66,93 ^{cb}	65,59 ^{db}	540,92 ^{aa}	691,81 ^{aa}
Kefirsiz	Boş Lipozom	524,01 ^{ab}	524,01 ^c	537,87 ^a	393,28 ^{ab}
	%0.1 Lipozom	936,00 ^a	936,00 ^a	608,37 ^a	575,68 ^{ab}
	Elma Ekstraktı	685,74 ^a	685,74 ^b	136,35 ^b	151,10 ^b
	Maltodekstrin Kaplı Elma	63,13 ^c	63,13 ^d	603,75 ^a	466,44 ^{ab}

Boş Lipozom: İçinde ekstrakt içermeyen lipozomu; %0,1 Lipozom: İçinde % 0,1 oranında elma kabuğu ekstraktı içeren lipozomu; Elma Ekstraktı: Kaplama materyali olmayan elma kabuğu ekstraktını; Maltodekstrin Kaplı Elma: Elma ekstraktlarının sadece maltodekstrinle kaplanmış halindeki; Biyoyararlılık: Biyoyararlılık sonrası yapılan ölçümleri belirtmektedir. Sonuçlar mg/g kuru örnek olarak belirtilmiştir. Her kolonda üst indis olarak ifade edilen harflerdeki değişiklikler ortalamalardaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$). Sayıların yanında bulunan değişik harfler ise satırlar arasındaki farkların önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

Elde edilen HPLC kromatogramları eklerde Şekil A.5 (boş lipozom kefirde), Şekil A.6 (% 0,1 lipozom kefirde), Şekil A.7 (elma ekstraktı kefirde), Şekil A.8 (maltodekstrin kaplı elma kefirde), Şekil A.9 (Boş lipozom asetat tamponunda), Şekil A.10 (% 0,1 lipozom asetat tamponunda), Şekil A.11 (elma ekstraktı asetat tamponunda) ve Şekil A.12’de (maltodekstrin kaplı elma asetat tamponunda) gösterilmiştir.

3.3 Sonuç

Biyoyararlılık öncesi kaplanmamış elma kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde analizi incelendiğinde, lipozom, kitosan ve maltodekstrinle kaplanan elma kabuğu ekstraktlarının kefir içine katıldıktan sonra fenolik madde miktarlarının 1,87 mg/g'dan 0,61 mg/g'a düştüğü, toplam flavonoid miktarının 0,30 mg/g'dan 0,30 mg/g olduğu ve değişmediği, antioksidan aktivite analizlerinde ise DPPH'te 0,55 mg/g'dan 0,06 mg/g'a düştüğü, CUPRAC analizinde 1,81 mg/g'dan 0,74 mg/g'a düştüğü ve HPLC'de yapılan analizlerde ise 147,71 mg/g'dan 61,90 mg/g'a değiştiği belirlenmiştir. Büyük oranlarda gerçekleşen azalmalara bakılarak lipozom enkapsülasyonun başarılı olduğunu ve fenolik bileşenleri etkin şekilde koruduğu söylenebilir.

Toplam fenolik madde analizi incelendiğinde ilk gün (sıfırıncı gün) ve birinci gün yapılan analizlerde kefirsiz örnekler ile kefirli örnekler arasında önemli farklar olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Kefirsiz ve kefirli örneklerde; kaplı olan örnekler arasında fark olmadığı fakat kaplanmamış elma kabuğu ekstraktı ile aralarındaki farkın önemli olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Bu durumda, kaplama materyallerinin (lipozom+kitosan+maltodekstrin ve sadece maltodekstrin) hem kefirli hem de kefirsiz örneklerde ekstraktları koruyabildiği söylenebilir. Biyoyararlılık örnekleri incelendiğinde ise kefirli örneklerde her iki günde de enkapsüle ve kaplı olmayan örnekler arasında önemli farklar olmadığı ($p<0,05$) ve bu sonucun kaplama materyallerinin sindirim ortamında yapılarının bozularak içlerindeki aktif maddeleri ortama çıkardığı ve normal sindirimin gerçekleştiği anlamına geldiği söylenebilir.

Toplam flavonoid miktarı analizi incelendiğinde benzer şekilde sıfırıncı gün ve birinci gün yapılan analizlerde kefirsiz örnekler ile kefirli örnekler arasında önemli farklar olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Ancak enkapsüle örnekler ile kaplanmamış örnekler arasında fark olmadığı görülmektedir ($p<0,05$). Bu durumun enkapsülasyon etkinliğinin yeterli olmadığı anlamına geldiği söylenebilir. Biyoyararlılık örnekleri incelendiğinde ise kefirli örneklerde sıfırıncı günde yapılan analizlerde kaplanmamış elma kabuğu ekstraktı ile enkapsüle örnekler arasındaki farkın önemli olduğu görülmekte ancak birinci günde yapılan analizlerde arada önemli fark olmadığı görülmektedir ($p<0,05$). Bu sonuca bakılarak bir gün bekletildikten sonra *in vitro* sindirim işlemi uygulanan örneklerde kapsüllerin sindirim ortamında bozularak

tuttukları aktif maddeleri ortama saldığı söylenebilir. Kefirsiz örneklerde de benzer şekilde kapsüllenmiş ve kapsüllenmemiş örnekler arasında fark olduğu görölmektedir ($p<0,05$).

Antioksidan aktivite analizleri incelendiğinde ise kefirli örnekler ile kefirsiz örnekler arasında diğer analizlerdeki gibi kesin fark olmadığı hem biyoyararlılık öncesinde hem de biyoyararlılık sonrasında görölmektedir ($p<0,05$). Ancak herbir örneğin biyoyararlılık öncesi ve sonrası karşılaştırılması sonucunda elma kabuğu ekstraktının DPPH analizinde biyoyararlılık sonrası önemli fark oluşmadığı fakat CUPRAC analizi incelendiğinde aradaki farkın önemli olduğu görölmektedir ($p<0,05$). Lipozom kaplı örneklerde ise kefirli numunelerdeki biyoyararlılık öncesi ve sonrasında önemli farklar oluştuğu görölmektedir ($p<0,05$).

Kromatografik analizde ise kefirli ve kefirsiz örnekler arasındaki farkların önemli olduğu bununla birlikte aradaki farkın enkapsüle ve kapsüllenmemiş örnekler arasında olduğu görölmektedir ($p<0,05$). Biyoyararlılık örneklerinde ise elma kabuğu ekstraktı ile enkapsüle örnekler arasındaki farkın önemli olduğu fakat enkapsüle örnekler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görölmektedir ($p<0,05$). Kefirli örnekler arasındaki farkın spektrofotometrik analizlerdeki gibi önemli olmadığı görölmektedir ($p<0,05$).

Kromatografik analiz sonucunda kefir içine katılan elma kabuğu ekstraktında en fazladan en aza doğru kuersetin, şirincik asit, sinapik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, gallik asit, epikateşin, t-sinamik asit, klorojenik asit, kateşin ve 4-hidroksibenzoik asit tespit edilmiştir (şekil A.7). Elde edilen sonuç elmada beklendiği gibi kuersetinin en fazla olduğunu göstermektedir (Schieber ve diğer., 2001). Biyoyararlılık sonrası benzer bileşikler görölmekle birlikte elde edilme miktarları ve çokluk sıralamasının farklı olduğu tespit edilmiştir. Aradaki farklılığın nedeni ortam pH'sının bileşenler üzerindeki farklı etkilerinden, bu bileşenlerin okside olmaları, degradasyona uğramaları, glikozit bağlarının kopmamasından veya metillenme sonrası absorplanmasından kaynaklanıyor olabilir (Karakaya, 2004).

Spektrofotometrik analizler ve kromatografik analiz incelendiğinde genel olarak boş lipozom ile yüzde 0,1 elma kabuğu ekstraktı içeren lipozomun sonuçlarının birbirine yakın olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı görölmektedir ($p<0,05$). Bununla birlikte elma kabuğu ekstraktlarının verileri incelendiğinde

biyoyararlılık öncesinde enkapsüle örneklerden çok daha büyük değerler olduğu ve istatistiksel olarak önemli fark olduğu ancak biyoyararlılık sonrası arada önemli fark olmadığı ($p<0,05$) ve ölçülen değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Sadece maltodekstrin ile kaplanan örneklerde de lipozomla kaplanan örneklerle benzer sonuçlara ulaşıldığı görülmüştür. Enkapsüle numuneler ile kapsüllenmemiş numune arasındaki farkın önemli olduğu, bununla birlikte biyoyararlılık sonrası ölçümlerde fark olmadığı görülmüştür ($p<0,05$).

Ağız ortamını, mide ortamını ve bağırsak ortamını laboratuvar ortamında simüle edilen ve bağırsak sonrasının analizlendiği *in vitro* sindirim metodu uygulandıktan sonra elde edilen sonuçların birbirlerine yakın olması lipozom ve kitosanla kaplamanın vücut tarafından emilimin gerçekleştiği bağırsak ortamında istendiği şekilde çözünerek aktif bileşenleri ortaya çıkardığının göstergesidir.

Yukarıdaki veriler ışığında, elma kabuğundan ekstrakte edilen fenolik bileşenlerin lipozom-kitosan-maltodekstrin ile kaplanarak tüketim sırasında stabilitelerinin arttırılabileceği ve vücut tarafından biyokullanılabilirliğinin arttırılabileceği savunulabilir.

KAYNAKLAR

- Aguiar, A. C. d., Silva, L. P. S., Rezende, C. A. d., Barbero, G. F., & Martínez, J.** (2016). Encapsulation of pepper oleoresin by supercritical fluid extraction of emulsions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 112, 37-43. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.009
- Babaei, M. J.** (2010). Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. 7. doi:http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59701
- Babbar, N., Oberoi, H. S., & Sandhu, S. K.** (2015). Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 319-337. doi:10.1080/10408398.2011.653734
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- Balasuriya, N., & Rupasinghe, H. P. V.** (2012). Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chemistry*, 135(4), 2320-2325. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.023
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A.** (1997). Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4505-4515. doi:10.1021/jf970373s
- Bhandari, B. R., D'Arc, B. R., & Padukka, I.** (1999). Encapsulation of Lemon Oil by Paste Method Using β -Cyclodextrin: Encapsulation Efficiency and Profile of Oil Volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5194-5197. doi:10.1021/jf9902503
- Bohn, T.** (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429-452. doi:10.1111/nure.12114
- Boyer, J., & Liu, R. H.** (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1), 1-15. doi:10.1186/1475-2891-3-5
- Bravo, L.** (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333. doi:10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x
- Campardelli, R., Espirito Santo, I., Albuquerque, E. C., de Melo, S. V., Della Porta, G., & Reverchon, E.** (2016). Efficient encapsulation of proteins in submicro liposomes using a supercritical fluid assisted continuous process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 163-169. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.007

- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. D., Paez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A., & Galan-Vidal, C. A.** (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A.** (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, 44(2), 499-509. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007
- Chranioti, C., & Tzia, C.** (2013). Binary Mixtures of Modified Starch, Maltodextrin and Chitosan as Efficient Encapsulating Agents of Fennel Oleoresin. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3238-3246. doi:10.1007/s11947-012-0966-7
- D Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R.** (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.
- 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008
- Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B., & Latruffe, N.** (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, 7(4), 423-442. doi:10.2174/138945006776359331
- Denis, M. C., Furtos, A., Dudonné, S., Montoudis, A., Garofalo, C., Desjardins, Y., . . . Levy, E.** (2013). Apple Peel Polyphenols and Their Beneficial Actions on Oxidative Stress and Inflammation. *PLoS ONE*, 8(1), e53725. doi:10.1371/journal.pone.0053725
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H.** (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. doi:10.1081/DRT-200063478
- Dewettinck, K., & Huyghebaert, A.** (1999). Fluidized bed coating in food technology. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 163-168. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00041-2
- Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M.** (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345-363. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029
- Fang, J.** (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Reviews*, 46(4), 508-520. doi:10.3109/03602532.2014.978080
- Fang, Z., & Bhandari, B.** (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003

- Gadkari, P. V., & Balaraman, M.** (2015). Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 93, 122-138. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.004
- Galanakis, C. M.** (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003
- Galland, L.** (2013). Functional Foods: Health Effects and Clinical Applications A2 - Caballero, Benjamin *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)* (pp. 366-371). Waltham: Academic Press.
- Gallo, M., Naviglio, D., Armone Caruso, A., & Ferrara, L.** (2016). 13 - Applications of chitosan as a functional food A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai *Novel Approaches of Nanotechnology in Food* (pp. 425-464): Academic Press.
- Gibis, M., Ruedt, C., & Weiss, J.** (2016). In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.010
- Gibis, M., Thellmann, K., Thongkaew, C., & Weiss, J.** (2014). Interaction of polyphenols and multilayered liposomal-encapsulated grape seed extract with native and heat-treated proteins. *Food Hydrocolloids*, 41, 119-131. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.024
- 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., Zeeb, B., & Weiss, J.** (2014). Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38, 28-39.
- Gosse, F., Guyot, S., Roussi, S., Lobstein, A., Fischer, B., Seiler, N., & Raul, F.** (2005). Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26(7), 1291-1295. doi:10.1093/carcin/bgi074
- Gouin, S.** (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., & Amiot, M. J.** (1999). Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1625-1634. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1625::AID-JSFA411>3.0.CO;2-8
- Grigoras, C. G., Destandau, E., Fougère, L., & Elfakir, C.** (2013). Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 49, 794-804. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.026

- 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 bioaccessability studies. *Food Chemistry*, 201, 205-212. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.091
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S.** (2006). Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966-9977. doi:10.1021/jf061478a
- Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengibar, M., & Heras, A.** (2011). Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 803-806. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.003
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U.** (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), 291-311. doi:10.1080/10408398.2010.499801
- Hernández-Téllez, C. N., Plascencia-Jatomea, M., & Cortez-Rocha, M. O.** (2016). Chapter 12 - Chitosan-Based Bionanocomposites: Development and Perspectives in Food and Agricultural Applications A2 - Bautista-Baños, Silvia. In G. Romanazzi & A. Jiménez-Aparicio (Eds.), *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* (pp. 315-338). San Diego: Academic Press.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., & Kromhout, D.** (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20(1), 21-29. doi:10.1080/01635589309514267
- Ho, C.-T., Ferraro, T., Chen, Q., Rosen, R. T., & Huang, M.-T.** (1994). Phytochemicals in Teas and Rosemary and Their Cancer-Preventive Properties *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II* (Vol. 547, pp. 2-19): American Chemical Society.
- Isailović, B. D., Kostić, I. T., Zvonar, A., Đorđević, V. B., Gašperlin, M., Nedović, V. A., & Bugarski, B. M.** (2013). Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 181-189.
- Istenič, K., Cerc Korošec, R., & Poklar Ulrih, N.** (2016). Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi:10.1002/jsfa.7691
- Jia, Z., Dumont, M.-J., & Orsat, V.** (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15, 87-104. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007
- Jiménez-Colmenero, F.** (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52(1), 64-74. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.040

- Joshi, A. P. K., Rupasinghe, H. P. V., & Khanizadeh, S.** (2011). IMPACT OF DRYING PROCESSES ON BIOACTIVE PHENOLICS, VITAMIN C AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF RED-FLESHED APPLE SLICES. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(4), 453-457. doi:10.1111/j.1745-4549.2010.00487.x
- Kahle, K., Kraus, M., & Richling, E.** (2005). Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(8), 797-806. doi:10.1002/mnfr.200500064
- Kammerer, D. R., Kammerer, J., Valet, R., & Carle, R.** (2014). Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Research International*, 65, Part A, 2-12. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.012
- Karakaya, S.** (2004). Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453-464. doi:10.1080/10408690490886683
- King, A. M. Y., & Young, G.** (1999). Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213-218. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00051-6
- Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J.** (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, 104(12), 6017-6084. doi:10.1021/cr030441b
- Lee, W.-C., Jao, H.-Y., Hsu, J.-D., Lee, Y.-R., Wu, M.-J., Kao, Y.-L., & Lee, H.-J.** (2014). Apple polyphenols reduce inflammation response of the kidneys in unilateral ureteral obstruction rats. *Journal of Functional Foods*, 11, 1-11. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.010
- Leonard, N. B.** (2000). Stability Testing of Nutraceuticals and Functional Foods *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*: CRC Press.
- Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., & Chen, F.** (2015). Health Benefits of Anthocyanins and Molecular Mechanisms: Update from Recent Decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00. doi:10.1080/10408398.2015.1030064
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E.** (2014). Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*, 32(5), 509-518. doi:10.1080/07373937.2013.839562
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Martínez-Huélamo, M., Tulipani, S., Estruch, R., Escribano, E., Illán, M., Corella, D., & Lamuela-Raventós, R. M.** (2015). The tomato sauce making process affects the bioaccessibility and bioavailability of tomato phenolics: A pharmacokinetic study. *Food Chemistry*, 173, 864-872.

- Massias, A., Boisard, S., Baccaunaud, M., Leal Calderon, F., & Subra-Paternault, P.** (2015). Recovery of phenolics from apple peels using CO₂ + ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 172-182. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.007
- McClements, D. J.** (2015). Emulsion-Based Delivery Systems *Food Emulsions* (pp. 577-622): CRC Press.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J.** (2009). Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 577-606. doi:10.1080/10408390902841529
- McClements, D. J., Zou, L., Zhang, R., Salvia-Trujillo, L., Kumosani, T., & Xiao, H.** (2015). Enhancing Nutraceutical Performance Using Excipient Foods: Designing Food Structures and Compositions to Increase Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 824-847.
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D.** (2005). Assessing Potential Bioavailability of Raspberry Anthocyanins Using an in Vitro Digestion System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896-5904. doi:10.1021/jf050131p
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F.** (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793.
- Neilson, A. P., George, J. C., Janle, E. M., Mattes, R. D., Rudolph, R., Matusheski, N. V., & Ferruzzi, M. G.** (2009). Influence of chocolate matrix composition on cocoa flavan-3-ol bioaccessibility in vitro and bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9418-9426.
- O'Shea, N., Arendt, E. K., & Gallagher, E.** (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 1-10. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.002
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J.** (2003). Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by Lecithin–Chitosan Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2806-2812. doi:10.1021/jf020590f
- Panozzo, A., Lemmens, L., Van Loey, A., Manzocco, L., Nicoli, M. C., & Hendrickx, M.** (2013). Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by high pressure homogenisation: a case study on differently coloured tomatoes. *Food Chemistry*, 141(4), 4094-4100.
- Parr, A. J., & Bolwell, G. P.** (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 985-1012. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7

- Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P.** (2015). New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*, 115(19), 10938-10966. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00046
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M.** (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494-507. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x
- 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.115
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R.** (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76-83. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009
- Rodriguez-Amaya, D. B.** (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004
- Romier, B., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., & During, A.** (2009). Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutrition Reviews*, 67(7), 363-378. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00210.x
- Rupasinghe, H., Thilakarathna, S., & Nair, S.** (2013). Polyphenols of Apples and their potential health benefits (pp. 333-368): Nova Science Publishers Inc.: New York, NY, USA.
- Santo, I. E., Campardelli, R., Albuquerque, E. C., de Melo, S. V., Della Porta, G., & Reverchon, E.** (2014). Liposomes preparation using a supercritical fluid assisted continuous process. *Chemical Engineering Journal*, 249, 153-159. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.099
- Saravacos, G., Taoukis, P., Krokida, M., Karathanos, V., Lazarides, H., Stoforos, N., . . . Bugarski, B.** (2011). 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11)An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L.** (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306. doi:10.1080/1040869059096
- Scalbert, A., & Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 130(8S Suppl), 2073s-2085s.
- Schieber, A., Keller, P., & Carle, R.** (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910(2), 265-273. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01217-6

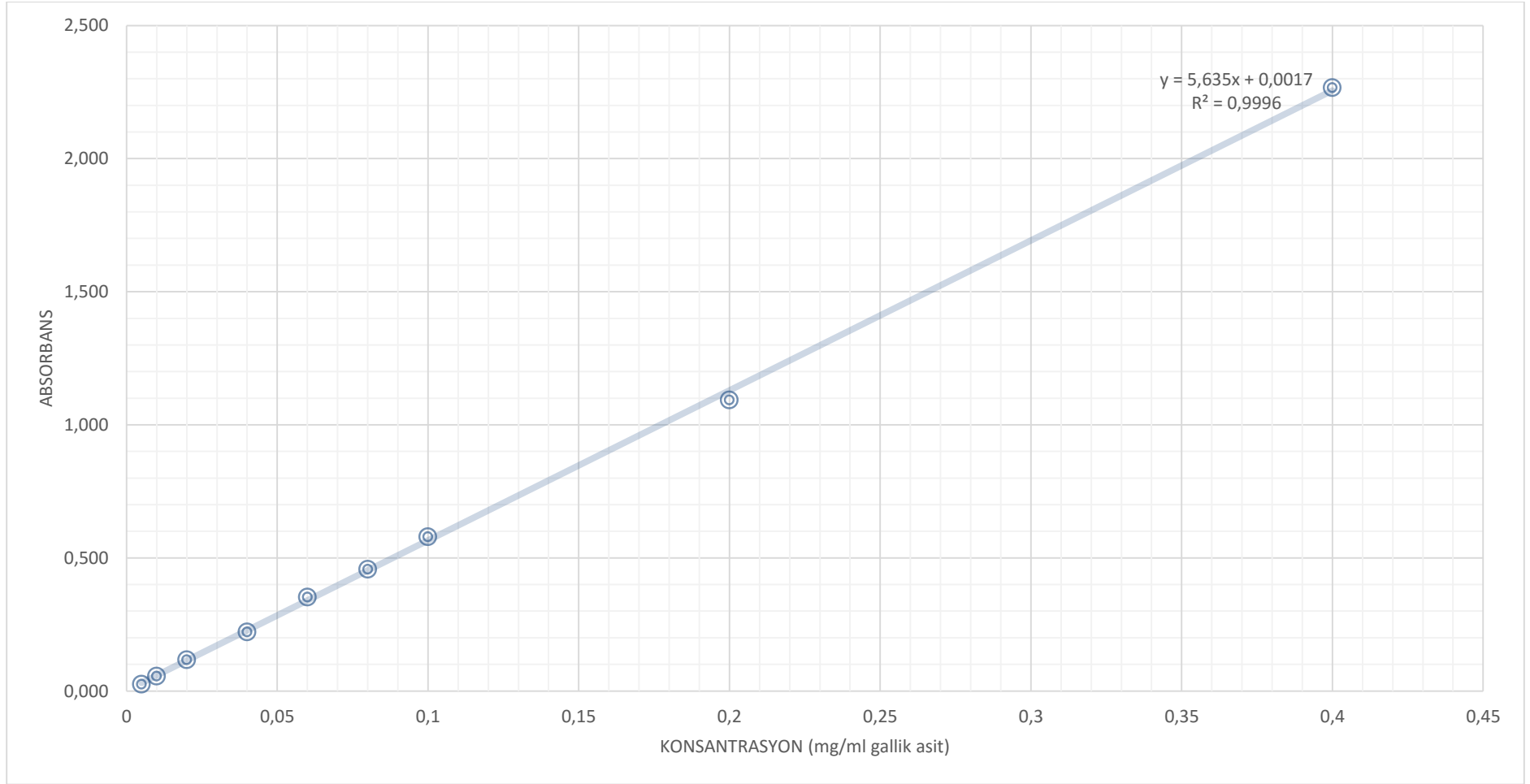
- Serra, A. T., Rocha, J., Sepodes, B., Matias, A. A., Feliciano, R. P., de Carvalho, A., . . . Figueira, M. E.** (2012). Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties – Correlation of response with composition. *Food Chemistry*, 135(4), 2378-2386. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.067
- Sharma, A., & Sharma, U. S.** (1997). Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154(2), 123-140. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K.** (2002). Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81-86. doi:10.1021/jf010865b
- Stevenson, D. E., & Hurst, R. D.** (2007). Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900-2916. doi:10.1007/s00018-007-7237-1
- Takahashi, T., Kamimura, A., Kagoura, M., Toyoda, M., & Morohashi, M.** (2005). Investigation of the topical application of procyanidin oligomers from apples to identify their potential use as a hair-growing agent. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 4(4), 245-249. doi:10.1111/j.1473-2165.2005.00199.x
- Tan, C., Xue, J., Abbas, S., Feng, B., Zhang, X., & Xia, S.** (2014). Liposome as a Delivery System for Carotenoids: Comparative Antioxidant Activity of Carotenoids As Measured by Ferric Reducing Antioxidant Power, DPPH Assay and Lipid Peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6726-6735. doi:10.1021/jf405622f
- Toniazzo, T., Berbel, I. F., Cho, S., Fávoro-Trindade, C. S., Moraes, I. C., & Pinho, S. C.** (2014). β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1265-1273.
- Torchilin, V. P.** (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 145-160. doi:10.1038/nrd1632
- Tsai, W.-C., & Rizvi, S. S. H.** (2016). Liposomal microencapsulation using the conventional methods and novel supercritical fluid processes. *Trends in Food Science & Technology*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.012
- TÜBİTAK.** (2016). TÜBİTAK - ARDEB Kimyasal Maddeler Çağrı Programı. Erişim Mayıs 1 2016, <http://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/1003-kmy-kmym-2016-1donem.pdf>
- TZOB.** (2016). Elmada talep sorununu ihracat çözer.... *Türkiye Ziraat Odaları Birliği Portal*. Erişim 12 Haziran 2016, <http://www.tzob.org.tr/Basin-Odası/Haberler/ArtMID/470/ArticleID/1744/Elmada-talep-sorununu-ihracat-231246zer...>

- Valcarcel, J., Reilly, K., Gaffney, M., & O'Brien, N. M.** (2015). Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavonoid Content in Sixty Varieties of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Grown in Ireland. *Potato Research*, 58(3), 221-244. doi:10.1007/s11540-015-9299-z
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P.** (2001). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5315-5321. doi:10.1021/jf0009293
- Visioli, F., Lastra, C. A. D. L., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Cassano, A., . . . Edeas, M.** (2011). Polyphenols and Human Health: A Prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 524-546. doi:10.1080/10408391003698677
- Volz, R. K., & McGhie, T. K.** (2011). Genetic Variability in Apple Fruit Polyphenol Composition in *Malus × domestica* and *Malus sieversii* Germplasm Grown in New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11509-11521. doi:10.1021/jf202680h
- Xiao, J.** (2015). Phytochemicals in Food and Nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00. doi:10.1080/10408398.2015.1111074
- Yi, L., Yu, B., & Huwei, L.** (2012). Analytical Methodologies of Chitosan in Functional Foods *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods* (pp. 513-544): CRC Press.
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P.** (2015). Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00. doi:10.1080/10408398.2013.805316
- Zaheer, K., & Akhtar, M. H.** (2015). An Updated Review of Dietary Isoflavones: Nutrition, Processing, Bioavailability and Impacts on Human Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00. doi:10.1080/10408398.2014.989958
- Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A.** (2004). Effects of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic Colonic Cell Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6122-6128. doi:10.1021/jf049517a
- Zhao, S., Bomser, J., Joseph, E. L., & DiSilvestro, R. A.** (2013). Intakes of apples or apple polyphenols decrease plasma values for oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I complex. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 493-497. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.010

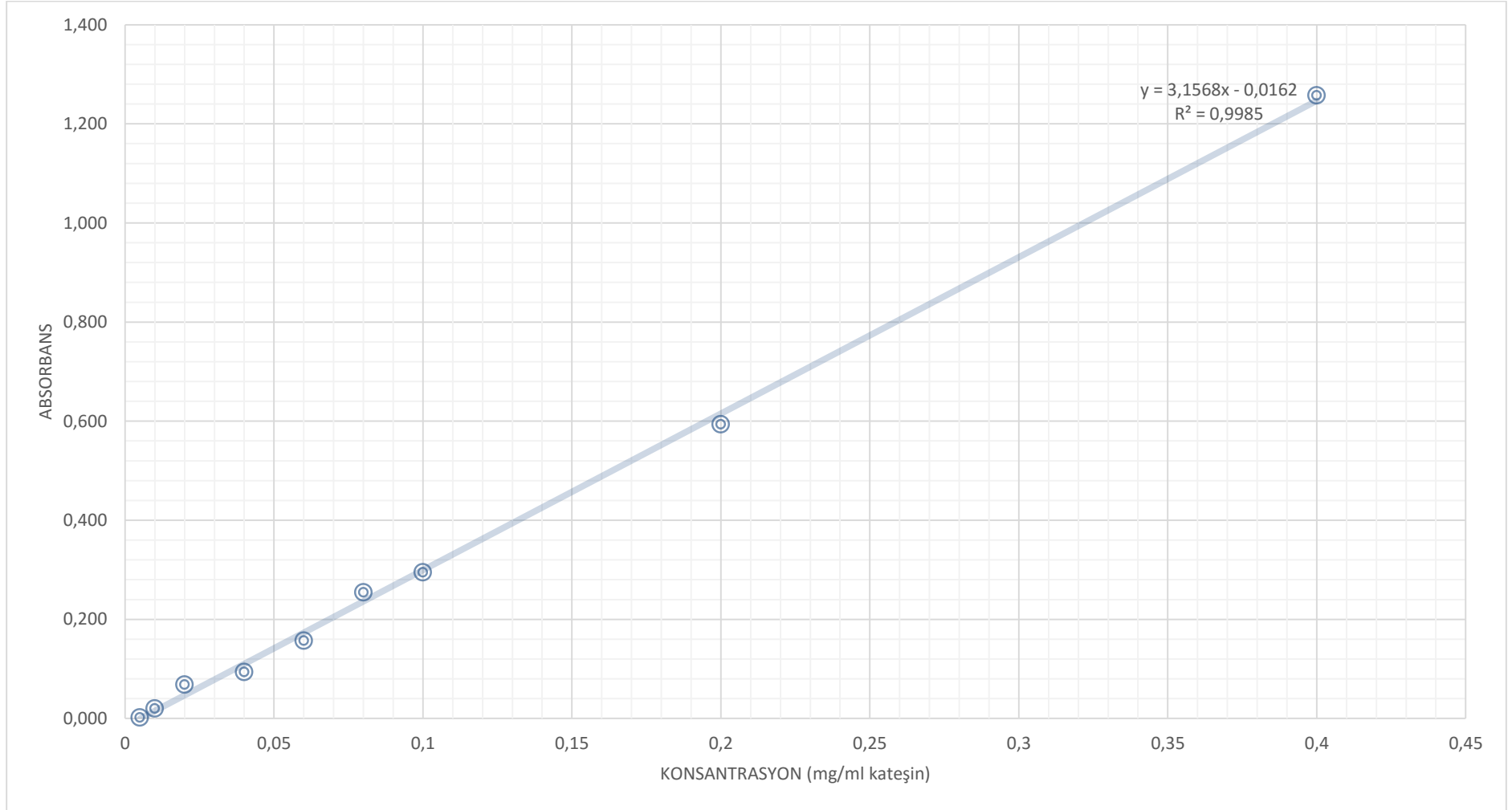
EKLER

EK A: Kalibrasyon grafikleri ve HPLC kromatogramları.

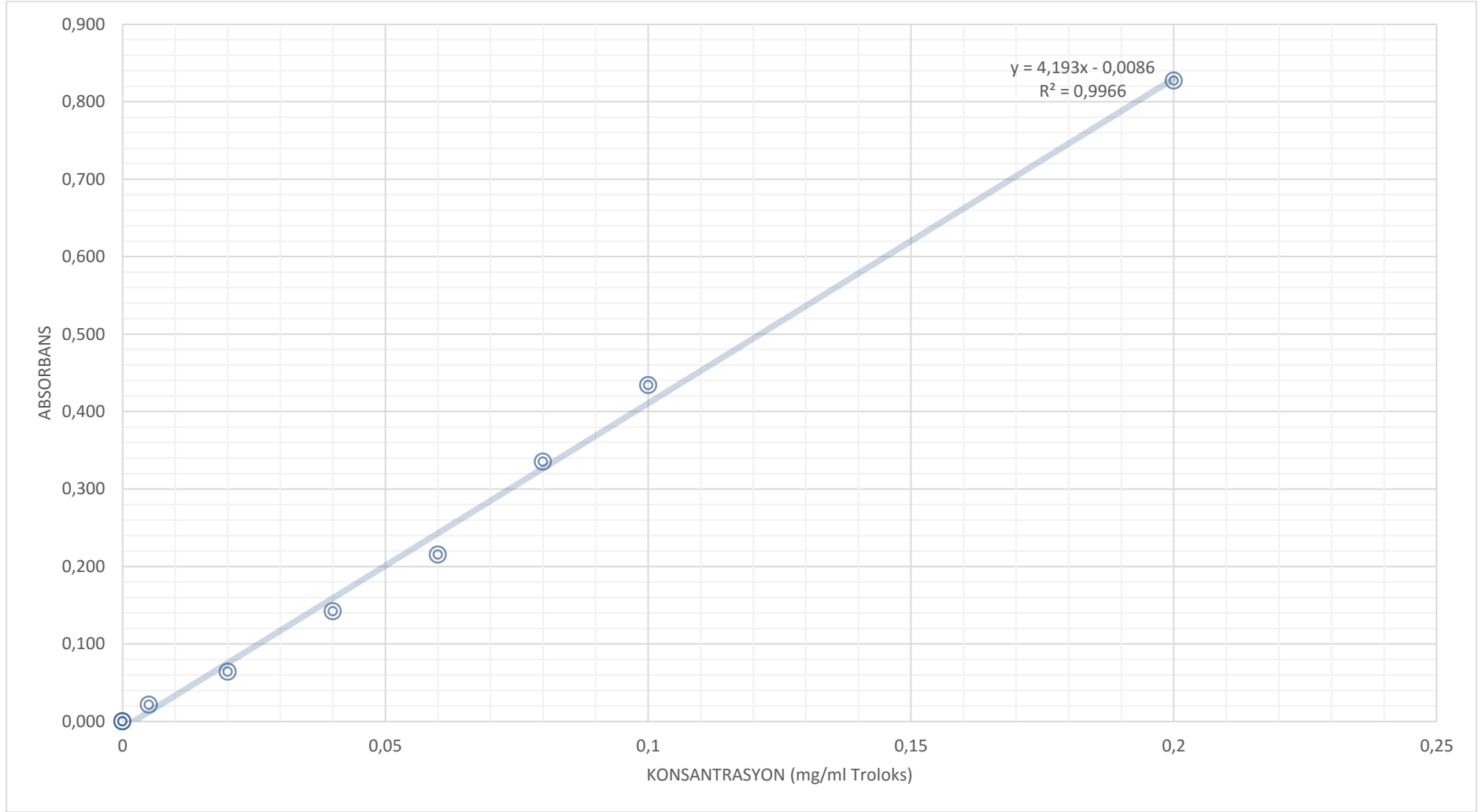
EK A



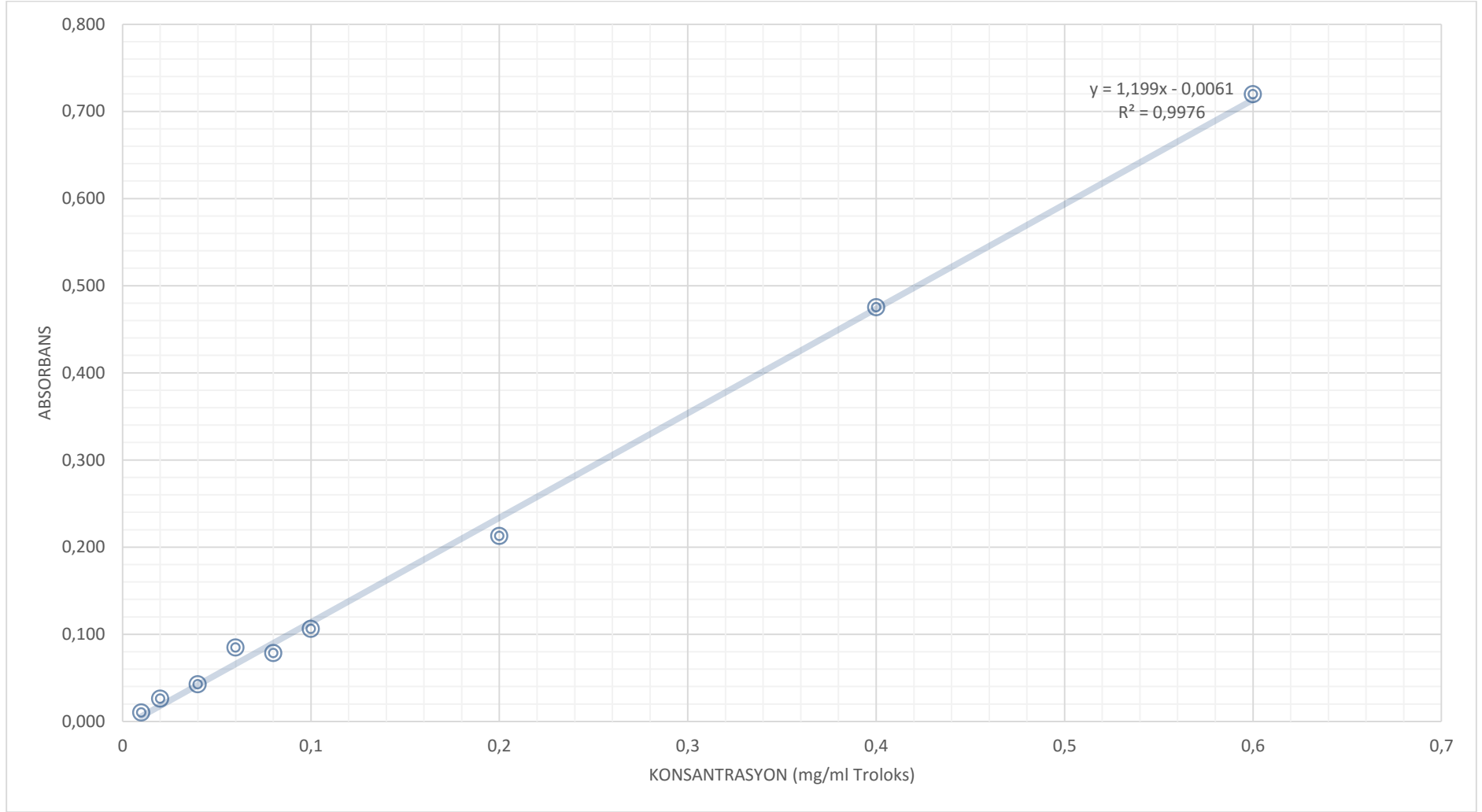
Şekil A.1 : Toplam fenolik miktarı tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.



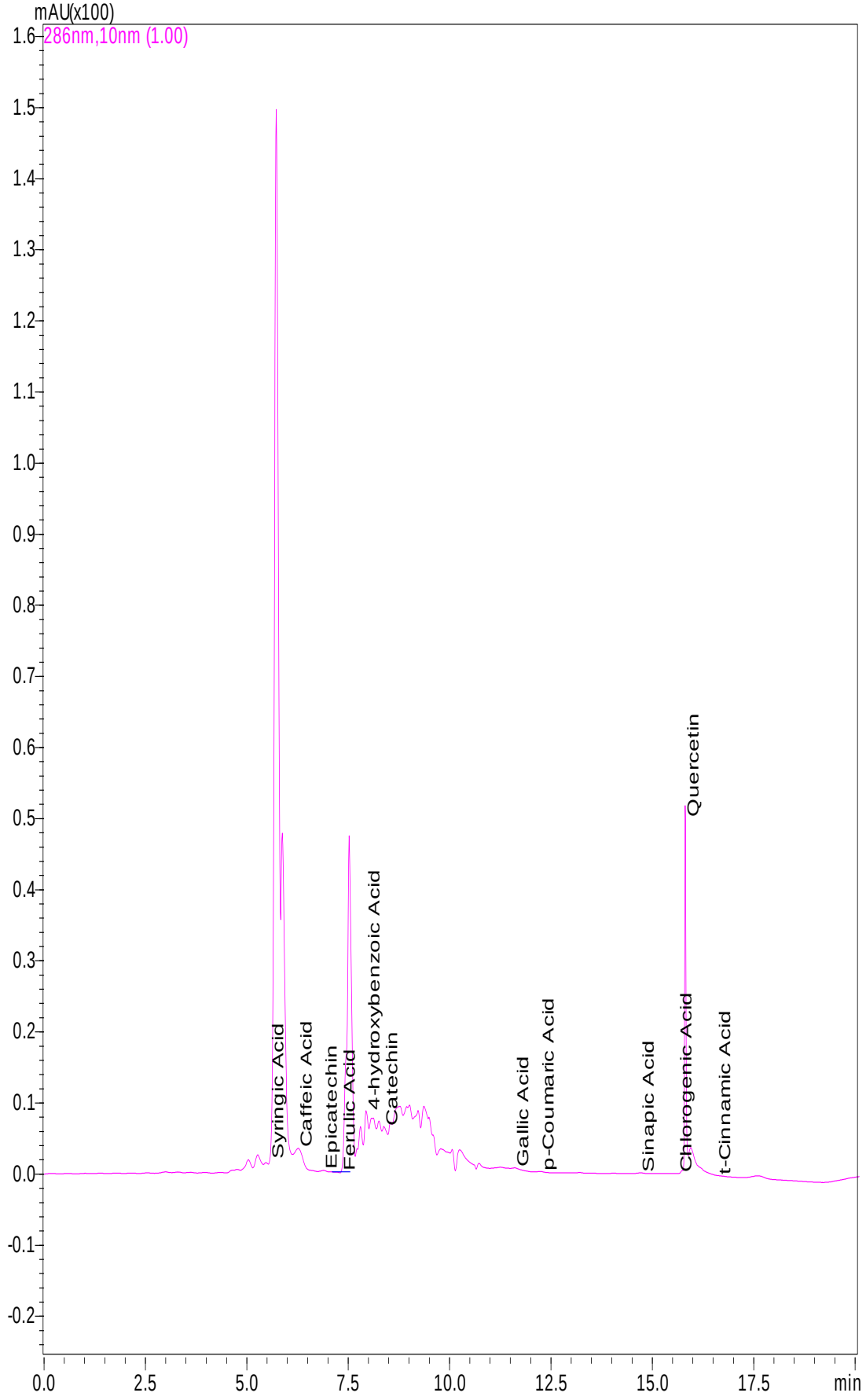
Şekil A.2 : Toplam flavonoid miktarı tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.



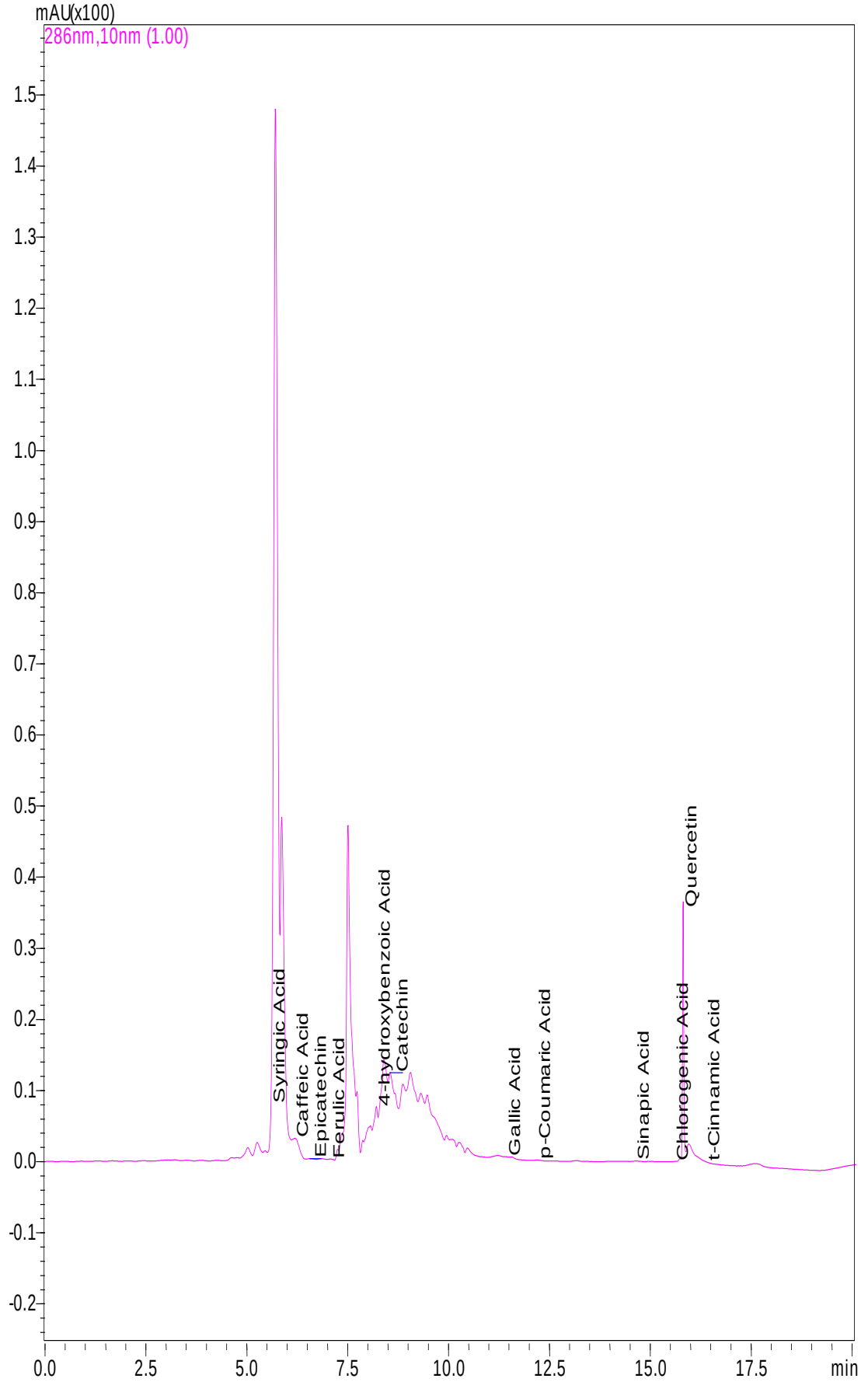
Şekil A.3 : DPPH antioksidan aktivite tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.



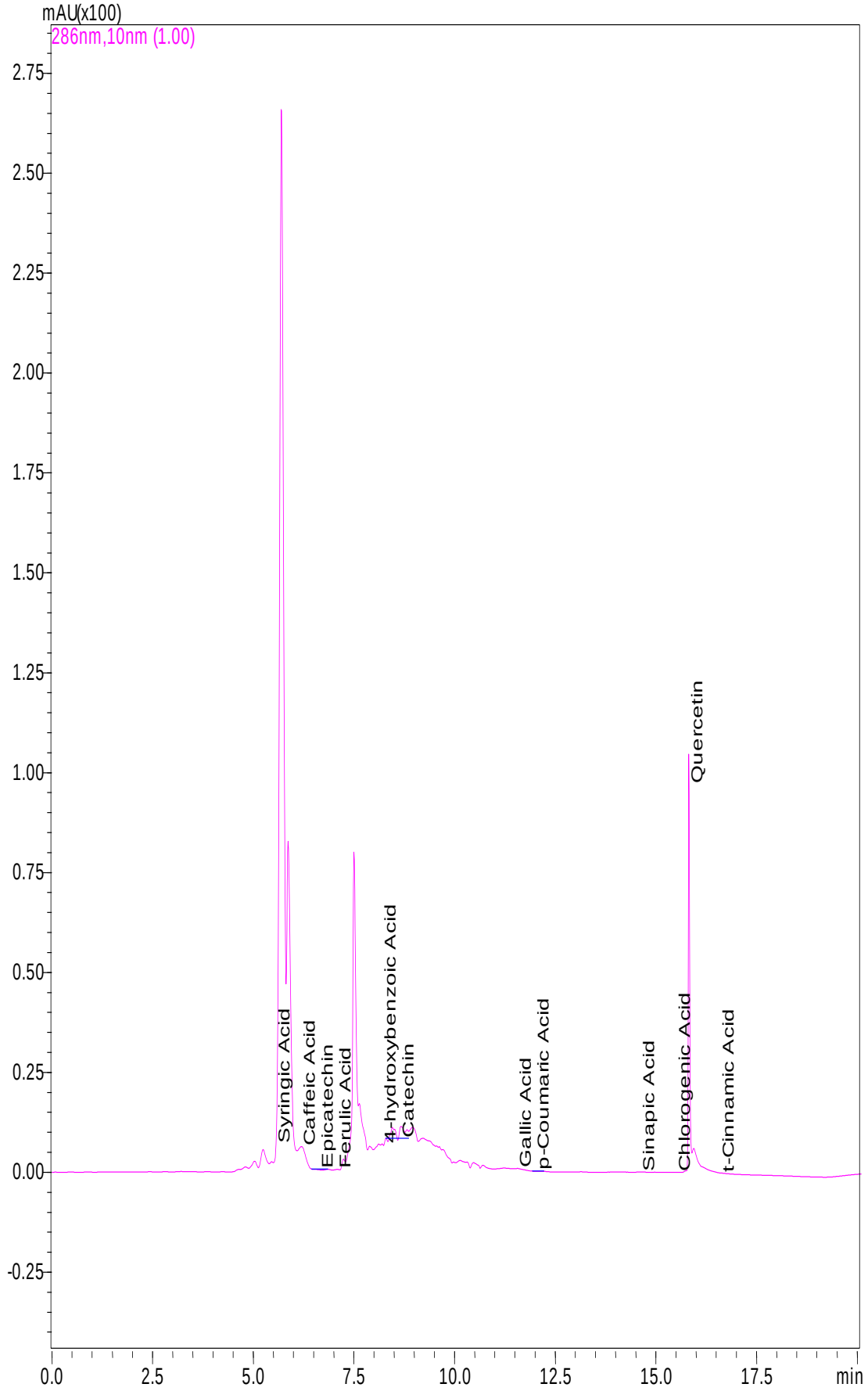
Şekil A.4 : CUPRAC antioksidan aktivite tayininde elde edilen ve hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği.



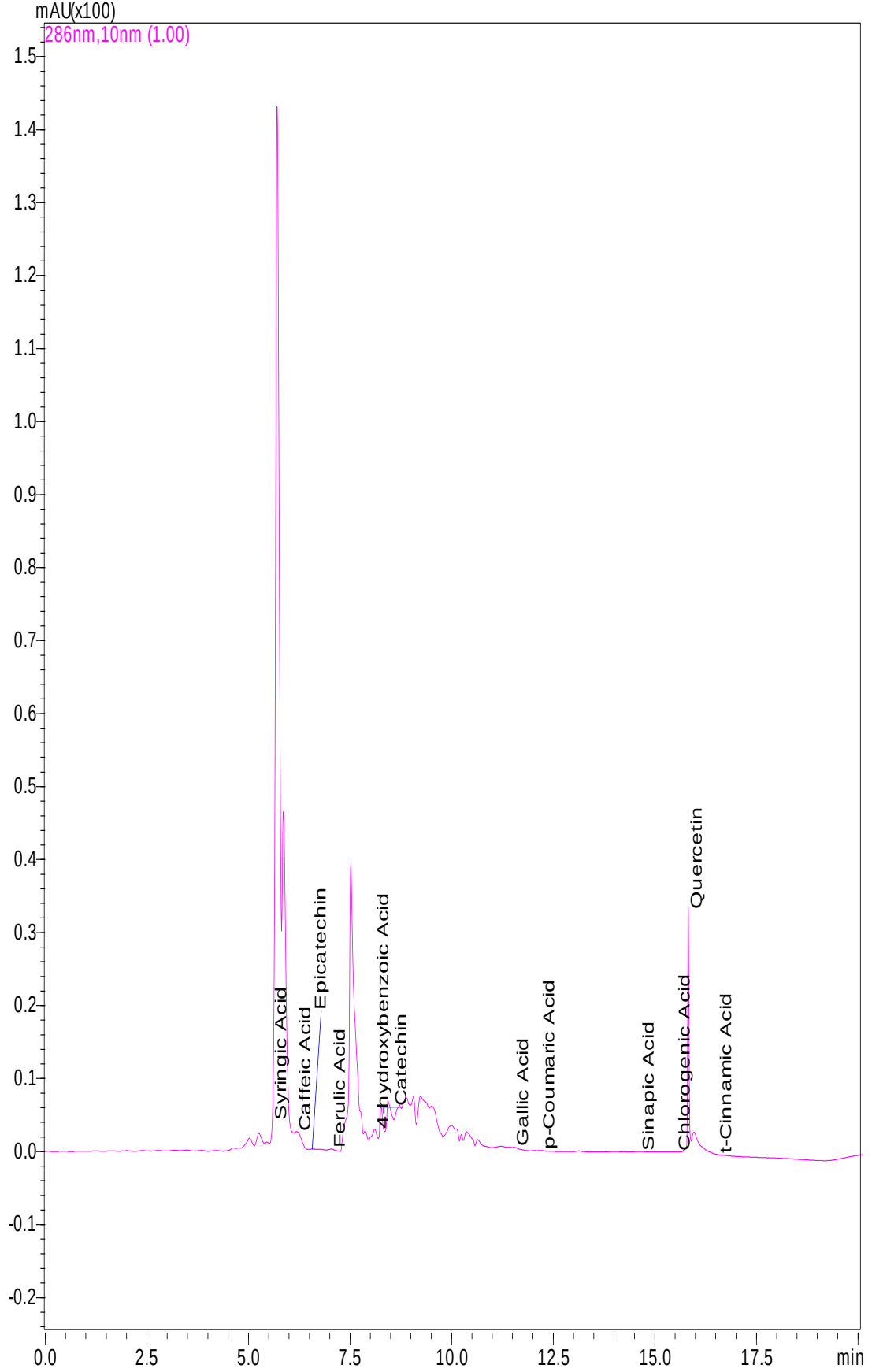
Şekil A.5 : Kefire katılan boş lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.



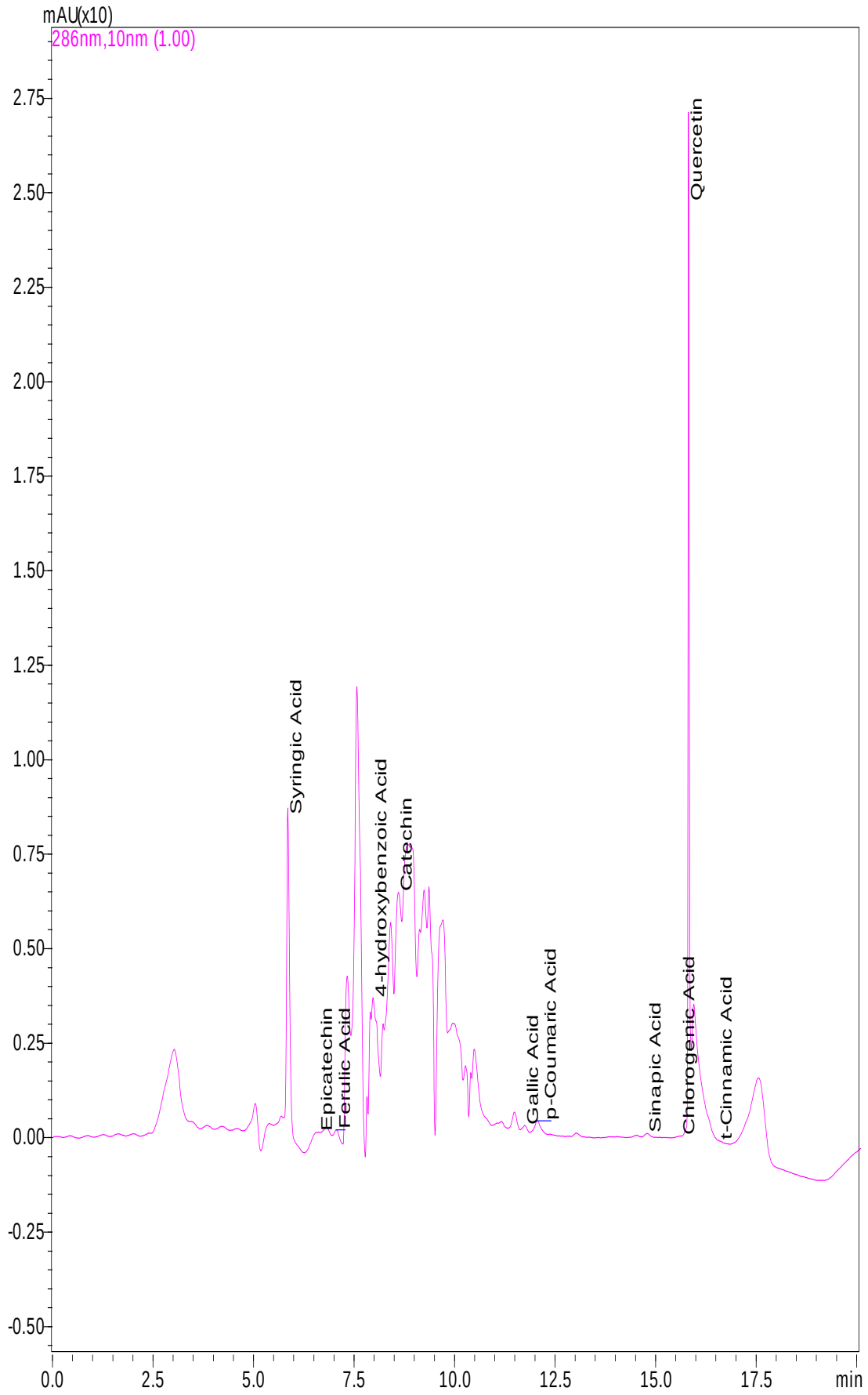
Şekil A.6 : Kefire katılan % 0,1'lik ekstrakt içeren lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.



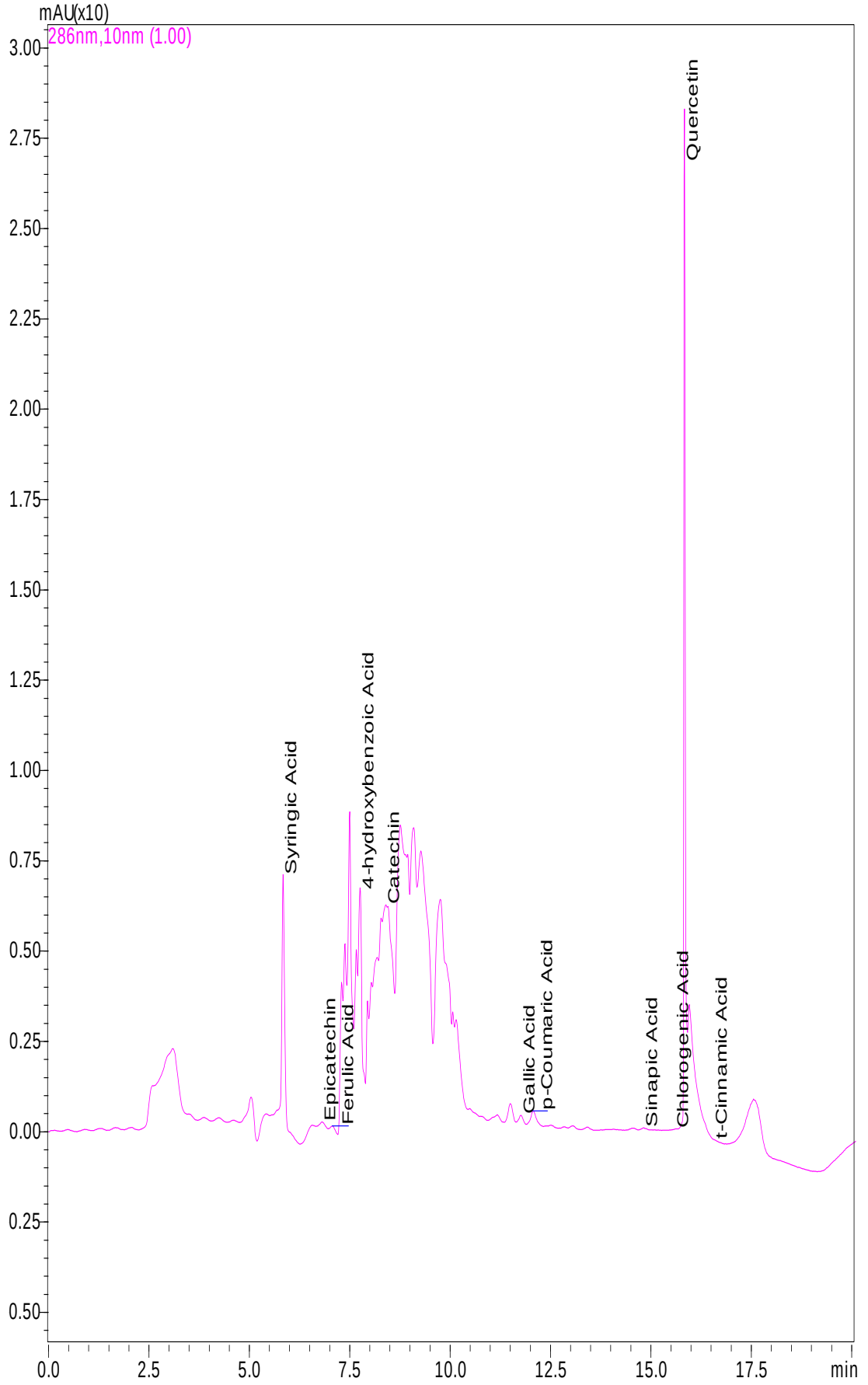
Şekil A.7 : Kefire katılan elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.



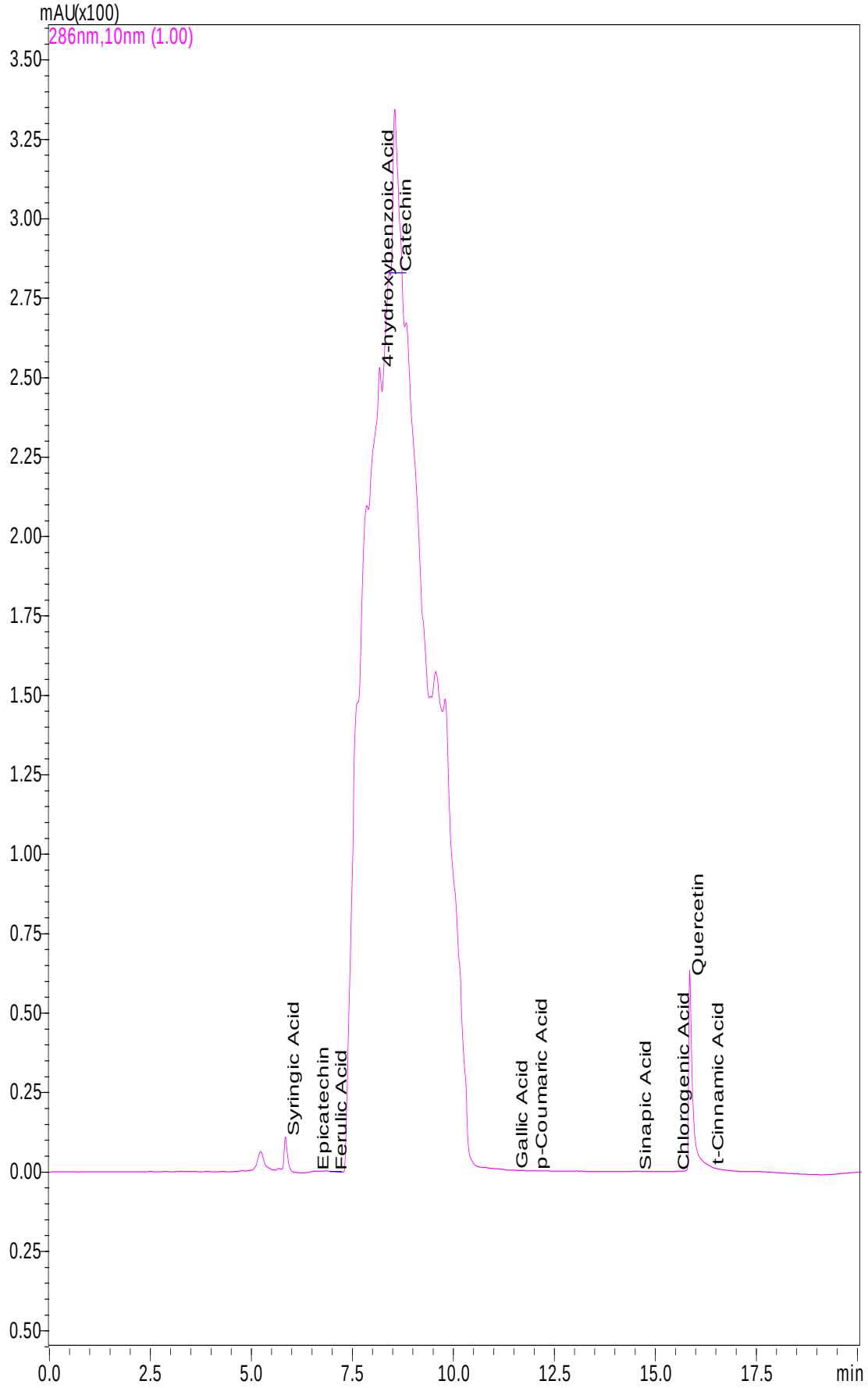
Şekil A.8 : Kefire katılan maltodekstrinle kaplı elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.



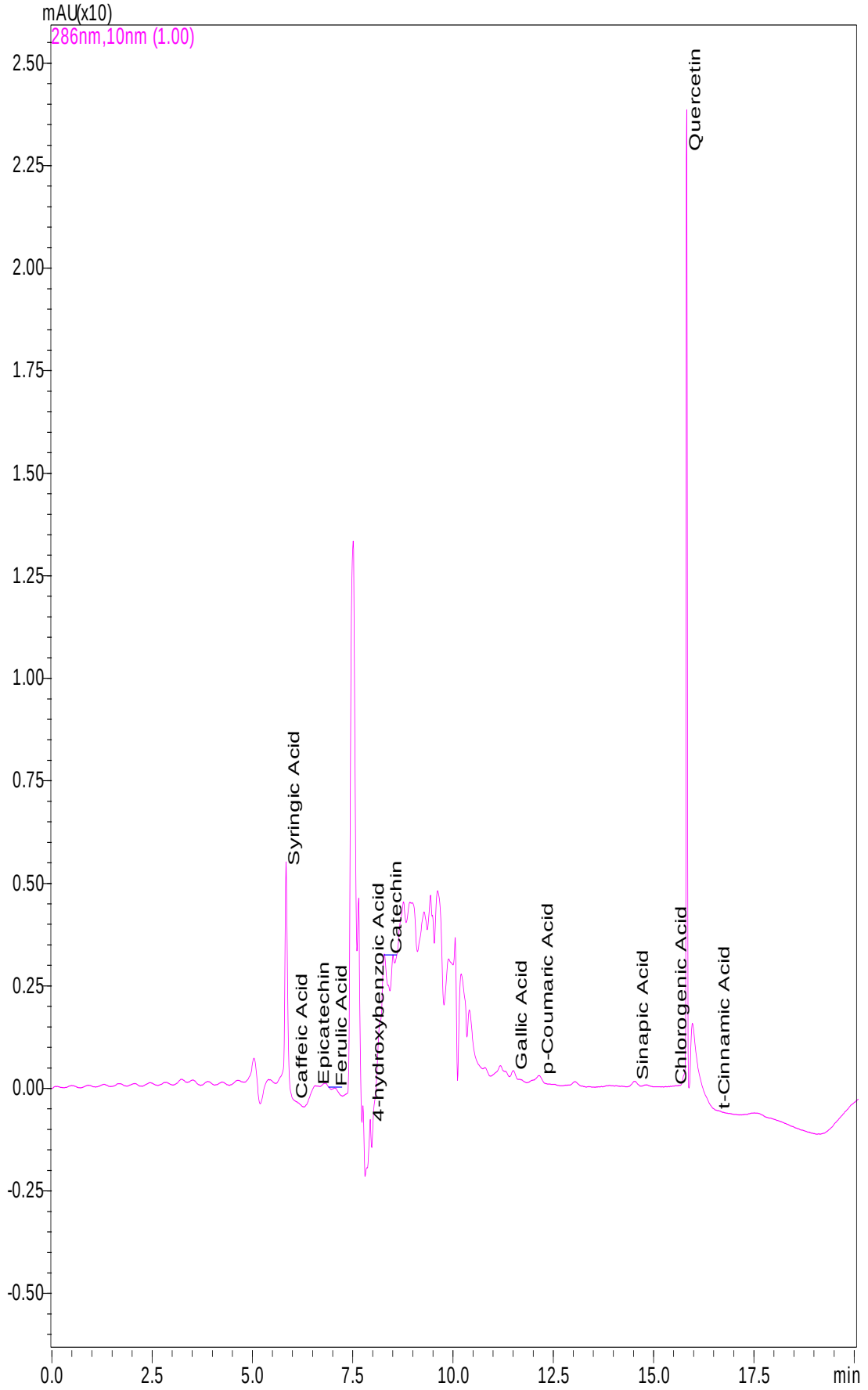
Şekil A.9 : Boş lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.



Şekil A.10 : Yüzde 0,1'lik ekstrakt içeren lipozom süspansiyonunun birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.



Şekil A.11 : Elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.



Şekil A.12 : Maltodekstrinle kaplı elma ekstraktının birinci gün analizinden elde edilen HPLC kromatogramı.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Evren Demircan
Doğum Tarihi ve Yeri : 01/09/1982, Diyarbakır
E-posta : evrendemircan@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2006, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2006-2013 yılları arasında yemek sektöründe girişimcilik yaparak çalıştı.
- 2013 yılından beri İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde mühendis olarak çalışmaktadır.