



Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Gülden Gökşen^{1*}, Çağla Bakachan², H. İbrahim Ekiz²

ÖZ

Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler, güçlü antioksidan, antifungal, antimikrobiyal, antidiyabetik özellikler sergilemektedir. Bu çalışmada zeytin yaprağı fenolik bileşikleri ekstrakte edilmiş ve dış etkenlerden korunmak ve stabilitesinin sağlanmak amacıyla elektroğirme yöntemi kullanılarak kapsüle edilmiştir. Enkapsülasyon işlemi için biyobozunur bir polimer olan polivinil alkol (PVA) kullanılarak zeytin yaprağı ekstraktı içeren nanolifler üretilmiştir. Elde edilen nanoliflerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapıları incelenerek voltaj, toplayıcı plaka ile şırınga ucundaki mesafe ve akış hızının etkileri gözlemlenmiştir. Bu değerlendirmeler sonucu boncuksuz, sürekli üretimi sağlanabildiği elektroğirme proses parametreleri belirlenerek üretime başlanmıştır. Proses parametreleri ise voltaj 18.0 kV ile 19.5 kV, mesafe 10 cm ile 14 cm, akış hızı ise 0.4 ml/sa ile 0.6 ml/sa aralıklarına karar verilerek nanolif üretimi yapılmıştır. Sonuçlara göre boncuksuz, homojen dağılımlı düzgün bir nanolif yapısının eldesi için uygun proses parametreleri akış hızı 0.50 ml/sa, voltaj 18.00 kV ve mesafe 12 cm olarak tespit edilmiştir. Belirtilen koşullarda üretilen nanolifin enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi sırasıyla 78.53% ve 7.86% bulunmuştur. Zeytin yaprağı ekstaktı yüklü nanolifin antioksidan aktivitesi ise DPPH radikal inhibisyonu %87.82 olarak bulunurken toplam fenolik madde miktarı ise 5.77 µg GAE/mg nanolif bulunmuştur. Ayrıca Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analiziyle zeytin yaprağı ekstraktının PVA nanolifine kapsüle edildiği moleküler arası etkileşim ile de ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Elektroğirme yöntemi, nanolif, zeytin yaprağı, enkapsülasyon, morfolojik özellikleri

Nanoencapsulation of Olive Leaf Extract, Process Optimization and Characterization

ABSTRACT

Phenolic compounds found in olive leaves exhibit strong antioxidant, antifungal, antimicrobial and antidiabetic properties. In this study, olive leaf phenolic compounds were extracted and encapsulated via electrospinning method in order to protect it from environmental factors and to ensure its stability. For the encapsulation process, nanofibers loaded with olive leaf extract were prepared using polyvinyl alcohol (PVA), a biodegradable polymer. The morphological structures of the obtained nanofibers were examined by scanning electron microscopy (SEM) and the effects of voltage, distance between the collector plate and the syringe tip, and flow velocity were observed. As a result of these evaluations, the electrospinning process parameters that can be produced continuously without beads were determined and production process was started. The process parameters were detected to be between 17.5 kV and 19.5 kV, distance between 10 cm and 14 cm, flow rate between 0.4 ml/h and 0.6 ml/h, and nanofibers was produced. According to the results, suitable process parameters were determined as flow rate 0.50 ml/h, voltage 18.00 kV and distance 12 cm for obtaining a uniformly distributed nanofiber structure without beads. The encapsulation efficiency and loading capacity of the nanofiber produced under the specified conditions were found to be 78.53% and 7.86%, respectively. The antioxidant activity of the olive leaf extract loaded nanofiber was found to be DPPH radical scavenging activity as 87.82%, while the total phenolic content was 5.77 µg GAE/mg nanofiber. Furthermore, the intermolecular interaction of olive leaf extract was demonstrated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis, in which the olive leaf extract was encapsulated into PVA nanofiber.

Keywords: Electrospinning method, nanofiber, olive leaf, encapsulation, morphological properties

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-5432-7936, 0000-0002-2144-321X, 0000-0002-0775-9250

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 19.01.2023

Kabul Tarihi: 30.05.2023

¹ Gıda Teknolojisi Bölümü, Mersin Tarsus Organize Sanayi Bölgesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Tarsus Üniversitesi, 33100, Mersin

² Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Mersin Üniversitesi, 33343, Mersin

*E-posta: guldengoksen@tarsus.edu.tr

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Giriş

Zeytin (*Olea Europaea*) dünyanın birçok yerinde yetiştirilmesine rağmen Akdeniz bölgesinde tarımsal üretimin önemli bir kaynağıdır ve dünya üzerinde ki zeytin yetiştiriciliğinin %98'i bu bölgede yapılmaktadır (Ryan ve Robards 1998). Zeytin meyvesi, yağı ve yaprakları uzun zamandır beslenme ve tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Zeytin yaprakları ise zeytin yetiştiriciliğinin bir yan ürünüdür ve toplam zeytin ağırlığının %10'unu oluşturmaktadır. Geleneksel olarak hayvan yemi, fitoterapiler de, yüksek antioksidan içeriğiyle diyetlerde ve son zamanlarda fonksiyonel gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Cho ve ark., 2020). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda zeytin yaprağının içerdiği bileşenlerin başta oleuropein olmak üzere antioksidan, anti-mikrobiyal, antifungal, hipolipidemik özellikle hipotansif, kardiyokoruyucu, antikanser özellikler içerdiği kanıtlanmıştır (Hassen ve ark., 2015). Zeytin yaprağında bulunan ve fonksiyonel özellikler kazandıran bu bileşenler, diğer gıdalarda olduğu gibi ürünlerin işlenmesi ve ya depolanması sırasında etkinliklerini kaybedebilirler. Bu bileşenlerin biyoyararlılığından faydalanılması açısından kontrollü salınımlarının olması ve emilimlerinin artırılması için dış etkenlerden korunması gerekmektedir. Polimerik yapıda ki bir nano parçacığa biyoaktif maddeler enkapsüle edilerek bu bileşenlerin biyoyararlılığının artırılması ve korunması sağlanabilmektedir. (Wen ve ark., 2017).

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğinde (100 nm'den küçük) malzemelerin, cihazların veya sistemlerin oluşturulması, kullanılması ve yönlendirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknolojinin önemli bir alanı olan nanoenkapsülasyon, biyoaktif ajanların taşıyıcı malzemeler içinde nano ölçekte bir boyutla kaplanmasını sağlayan bir süreçtir. Daha yüksek besin değeri, daha düşük dozlarda sentetik koruyucular ve daha iyi organoleptik özelliklere sahip fonksiyonel gıda üretimi için kullanılmakta ve son zamanlarda taleplerde artış görülmektedir (Goksen ve ark., 2020).

Enkapsülasyon; hassas biyoaktif maddelerin korunması, gıda katkı maddelerinin olumsuz çevre koşullarından etkilenmemesi, kötü tat ve kokuların maskelenmesi, enzim, hücre yapısı ve gıda bileşenlerinin korunmasına olanak sağlayan son günlerde popülerliği oldukça artan bir yöntemdir (Fathi ve ark., 2014). Enkapsülasyon için kaplama materyali olarak protein, nişasta ve türevleri, lipit bazlı ürünler veya bunların farklı kombinasyonlarından yararlanılmaktadır (Gökmen ve ark., 2012) Kullanılan yöntemlerden bazıları sprey kurutma, sprey soğutma ekstrüzyon kaplama, koaservasyon, akışkan yataklı kaplamadır (Ezhilarasi ve ark., 2013). Son zamanlarda nano-boyutlar da enkapsülasyon işleminde elektro-ğirme yöntemi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Elektroğirme yöntemi, mikro ve nano ölçekli polimer liflerinin üretimi için kullanılan bir yöntemdir. Uygun bir çözücüde çözünen polimer çözeltisi veya eriyik polimer damlacıkları lif oluşumu için elektrik alanı uygulanarak, topraklanmış bir toplayıcı plaka üzerinde gerçekleştirilir (Xue ve ark., 2019). Bu yöntemde etkili olan faktörler: çözelti özellikleri (polimer konsantrasyonu ve molekül ağırlığı, viskozite, elektriksel iletkenlik ve yüzey gerilimi), proses özellikleri (voltaj, toplayıcı plaka arası mesafe ve akış hızı) ve çevresel özelliklerdir (Zhang ve ark., 2020).

Bu çalışmada zeytin yaprağı özütünün elektroğirme yöntemi ile enkapsüle edilebilirliği ve proses özelliklerinde ki değişimlerin nanolif üretimi üzerinde ki etkileri incelenmiştir. Elektroğirme prosesinin optimum koşullarında zeytin yaprağı ekstraktı (ZYE) yüklü Plivinil alkol (PVA) nanolifi üretilmiştir. Elde edilen ZYE içeren PVA nanolifinin morfolojik, fonksiyonel ve moleküler karakterizasyonları belirlenmes amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Polyvinilalkol (PVA), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Folin-Ciocalteu reaktifi, etanol, gallik asit ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından satın alınmıştır.

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroeğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Zeytin Yaprağının Toplanması ve Kurutulması

Zeytin yaprakları Akdeniz bölgesinin Hatay ilinden Eylül ayında toplanmıştır. Karanlık bir ortamda oda koşullarında 8 boyunca gün kurutulmuştur.

Ekstraktların Elde Edilmesi

Kurutma işlemi tamamlanan zeytin yaprakları el değirmeni ile toz haline getirilmiştir. 25 gram zeytin yaprağı tozu, %78 etanol (h/h) ile 100 ml'ye tamamlandı. 750 rpm de 2 saat karıştırıldıktan sonra 48 saat boyunca bekletildi. Kaba filtre kağıdı kullanılarak süzme işlemi yapılarak rotary evaporatörde alkolü uçurularak zeytin yaprağı ekstraktı (ZYE) elde edildi.

Besleme Çözeltilerinin Hazırlanması

Elektroeğirme işleminde kullanılmak üzere besleme çözeltisi, 1 g PVA polimeri kullanılarak 90°C'de tamamen eriyinceye kadar 500 rpm'de karıştırıldı ve %10 (a/h) PVA çözeltisi elde edildi. Zeytin yaprağı ekstraktı içeren PVA polimer çözeltisinin hazırlanması için 10 mg ZYE tartıldı ve çözünmüş olan polimer çözeltisine ilave edildi ve bir gece boyunca homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı. Boş ve ZYE içeren PVA çözeltisi elektroeğirme işleminden besleme çözeltileri olarak kullanıldı.

Elektroeğirme İşlemi

ZYE enkapsülasyonu, elektroeğirme cihazı kullanılarak (Nanodev Scientific, Ankara, Türkiye) oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Elektroeğirme cihazı, şırınga pompası (New Era Pump Systems Inc., NE-300, Hauppauge, NY), yüksek voltajlı güç kaynağı (Spellman, CZE 1000R, High Voltage Electronics Corporation, Hauppauge, NY) ve toplama plakasından oluşmaktadır. Hazırlanan çözeltiler, bir şırınga pompasına yatay olarak yerleştirilmiş 5 ml'lik plastik şırıngalara doluyularak yapılarak üretilen nanolifler alüminyum folyo üzerinde toplandı.

Deney Tasarımı

Yapılan ön denemeler sonucunda zeytin yaprağı ekstraktı ve PVA içeren besleme çözeltisi %10'luk konsantrasyonda sabit tutulmuştur.

Elde edilecek nanoliflerin çapı, boncuksuz ve homojen yapıda olması uygulanacak voltaj, şırınga ucu ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe, hazırlanan çözeltinin akış hızı gibi parametrelerdeki değişikliklere göre belirlenmektedir. Optimum deney parametrelerinin seçiminde, tarama elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri alınan nanoliflerin morfolojik özelliklerinden yararlanılmıştır. Üretimin sürekli olduğu ve şırınga ucunda damlacık gözlenmediği en düşük ve en yüksek aralıklar tespit edilmiştir. Deney tasarımı Çizelge 1' de verilmiştir.

Çizelge 1. Deney tasarımı

	Akış hızı (ml/sa)	Uzaklık (cm)	Voltaj (kV)
1	0.40	12.00	19.50
2	0.40	10.00	18.00
3	0.50	12.00	18.00
4	0.50	12.00	18.75
5	0.40	10.00	18.75
6	0.50	14.00	18.00
7	0.60	14.00	18.00
8	0.60	12.00	19.50
9	0.50	14.00	19.50
10	0.60	12.00	18.00
11	0.50	12.00	18.75
12	0.50	12.00	18.75
13	0.50	12.00	18.75
14	0.50	12.00	19.50
15	0.50	10.00	19.50
16	0.40	14.00	18.75
17	0.60	10.00	18.75
18	0.40	12.00	18.00

Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Elektroeğirme yöntemiyle elde edilen nanoliflerin morfolojisi, 5 kV hızlanma voltajında ve 50.000 × büyütmede bir tarama elektron mikroskobu (SEM) (Supra 55, Carl Zeiss, Almanya) kullanılarak karakterize edildi. Numuneler 2 nm platin ile püskürtülerek kaplanmıştır. Ortalama lif çapını belirlemek için, her numune için rastgele seçilen 100 lif ImageJ yazılımı (Image J, NIH, Maryland, ABD) kullanılarak analiz edildi.

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Antioksidan Aktivite ve Toplam Fenolik Madde Tayini

Zeytin yaprağı özü yüklü nanolif ve yüksüz nanolif örnekleri, 0.1 g tartıldı ve 10 mL distile su içine atıldı ve manyetik karıştırıcıda 750 rpm de nanolif çözülünceye kadar karıştırıldı. Bu örnekler antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde tayininde kullanıldı. Nanolif örneğinin antioksidan aktivite tayini, güçlü bir radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)'ı indirgeme yeteneğine göre belirlenmiş ve Aytac & Uyar (2016) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Analiz sonuçlarının 517 nm' de absorbans değerleri spektrofotometrede (Cary60 UV\VIS, Agilent Technologies, Malaysia) okunmuştur. DPPH yöntemi ile % İnhibisyon değeri (ID) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% ID = \frac{(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek})}{Abs_{kontrol}} \times 100$$

Abs_{kontrol}=Kontrolün absorbans değeri, Abs_{örnek}=Örneğin absorbans değeri olarak verilmiştir.

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak, Gallik Asit Eşdeğeri (µg GAE/mg nanolif) olarak belirlenmiştir ve örneklerin absorbans değerleri 760 nm'de ölçülmüştür (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2017). Gallik asit standart eğrisi çizildi ve hesaplamada bu eğriden elde edilen denklem kullanıldı.

Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesi

Zeytin yaprağı ekstraktının enkapsülasyon verimliliği (EV) ve yükleme kapasitesi (YK) (Göksen et al. 2020) yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlendi. ZYE@PVAn alüminyum folyodan soyuldu ve %70'lik etanol çözeltisinde atıldı ve oda sıcaklığında karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Daha sonra elde edilen süpernatantlar seyreltildi ve enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi toplam fenolik madde tayini kullanılarak aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

$$\% EV = \frac{(ZYE'nün nanolif içindeki gerçek miktarı)}{ZYE'nün nanolif içindeki teorik miktarı} \times 100$$

$$\% YK = \frac{(ZYE'nün nanolif içindeki gerçek miktarı)}{\text{nanolif miktarı}} \times 100$$

Bulgular ve Tartışma

Elektroğirme yöntemi kullanılarak elde edilen nanoliflerin morfolojik özellikleri zeytin yaprağı özütünün enkapsülasyonu, kontrollü salınımı ve dış etkenlerden korunması açısından önemlidir. Enkapsüle edilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla akademik çalışmalar incelenerek ön denemeler yapılmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan morfolojik incelemelerde, zeytin yaprağı özütünden elde nanoliflerin düzgün ve boncuksuz yapı oluşturabildiği görülmüştür. Elde edilen nanoliflerin çapları 115 ile 215 nm arasında değişmektedir. Proses parametrelerinde ki değişim lif çapına etkisi Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Deney tasarımı ve çap değişiminde ki sonuçlar

	Akış hızı (ml/sa)	Uzaklık (cm)	Voltaj (kV)	Çap (nm)
1	0.40	12.00	19.50	215.60
2	0.40	10.00	18.00	113.97
3	0.50	12.00	18.00	202.67
4	0.50	12.00	18.75	135.47
5	0.40	10.00	18.75	182.33
6	0.50	14.00	18.00	180.07
7	0.60	14.00	18.00	207.63
8	0.60	12.00	19.50	203.12
9	0.50	14.00	19.50	126.92
10	0.60	12.00	18.00	146.02
11	0.50	12.00	18.75	104.03
12	0.50	12.00	18.75	108.09
13	0.50	12.00	18.75	114.09
14	0.50	12.00	19.50	123.86
15	0.50	10.00	19.50	137.03
16	0.40	14.00	18.75	120.17
17	0.60	10.00	18.75	133.89
18	0.40	12.00	18.00	115.97

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

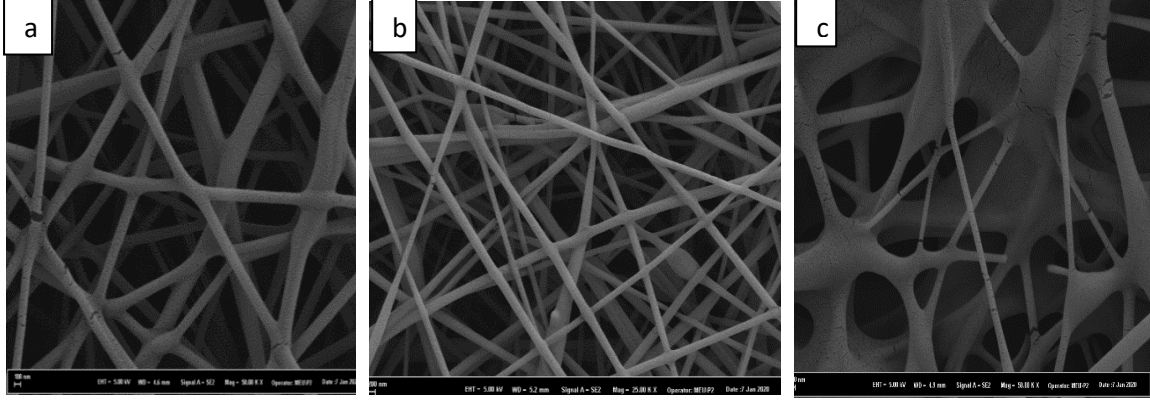
Akış Hızının Etkisi

Akış hızının artmasıyla birlikte şırınga iğnesinde ki damlanın kütlesi artacaktır bu durum iğne ucundan toplayıcı plakaya giden çözücünün tamamının buharlaşarak uçmasına engel olmaktadır. Bu nedenle akış oranı artırıldığında lif çapı artmakta ve boncuklu bir yapı oluşmaktadır. Toplayıcı plaka üzerinde biriken lifin yapısı, devam etmekte olan elektrik alan etkisi ve tam kurumamış olması nedeniyle lifin yassı benzeri bir görünüm olmasını sağlar (Sill and von Recum 2008).

Akış hızının düşük olması ise uygulanacak elektriksel alan ile toplayıcı plakaya çekilen polimer çözeltisini etkiler ve Taylor konisinin kesintisiz bir şekilde olmasına engel olur.

Farklı akış hızlarında sabit voltaj (18 kV) ve uzaklıkta (12 cm) zeytin yaprağı ekstraktından elde edilen nanoliflerin SEM görüntüleri şekil 1 de verilmiştir.

Akış hızı 0,4 ml/sa uygulanan nanolifin ortalama lif çapı 113.97 nm olarak bulunmuş ve



Şekil 1. Zeytin yaprağı ekstraktı yüklü nanoliflerin 18 kV voltaj ve 12 cm mesafede farklı akış hızlarında ki a) 0.40 ml/sa, b)0.50 ml/sa, c)0.60 ml/sa SEM görüntüleri

Toplayıcı plaka ile şırınga ucu arasındaki mesafedeki değişimlerin elektroğirme yöntemiyle elde edilen nanoliflerin morfolojik yapısı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 10, 12 ve 14 cm mesafeler de üretim yapılmıştır. Üretilen nanoliflerin SEM görüntüleri Şekil 2’ de verilmiştir. Mesafenin 10 cm olduğunda nanoliflerin çapı 202.67 nm olarak bulunmuş ve homojen bir dağılım gözlemlenmiştir (Şekil 2.

boncuklu yapı gözlenmemiştir (Şekil 1.a). Akış hızı 0.5 ml/sa çıkarıldığında ise ortalama lif çapı 202.67 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 1.b). Akış hızı 0.6 ml/sa olduğunda ise lifin yapısında bozulmalar ve yassılaşıma gözlenmiştir.

Toplayıcı Plaka ile Şırınga Ucu Arasındaki Mesafe

Elektroğirme işlemine etki eden faktörlerden bir diğeri de toplayıcı plaka ile şırınga ucu arasındaki mesafedir. Mesafe, çözeltinin jet oluşturacak şekilde ayarlanmalı ve çözücünün buharlaştırılarak uzaklaşması sağlamalıdır. Mesafenin kısa oluşu buharlaşma süresinin kısalttığı için toplayıcı plakada Taylor Konisindeki kararsızlığa neden olup ıslak ve boncuklu yapıda lifler oluşur. Buna bağlı olarak da lifler silindirik yapısını kaybeder yassı ve şerit şekline sahip olurlar. (Bhardwaj and Kundu 2010). Mesafenin uzun olması durumunda ise buharlaşma süresinin uzayacağından daha kuru ve küçük çaplarda lif oluşumunu gerçekleştirmektedir.

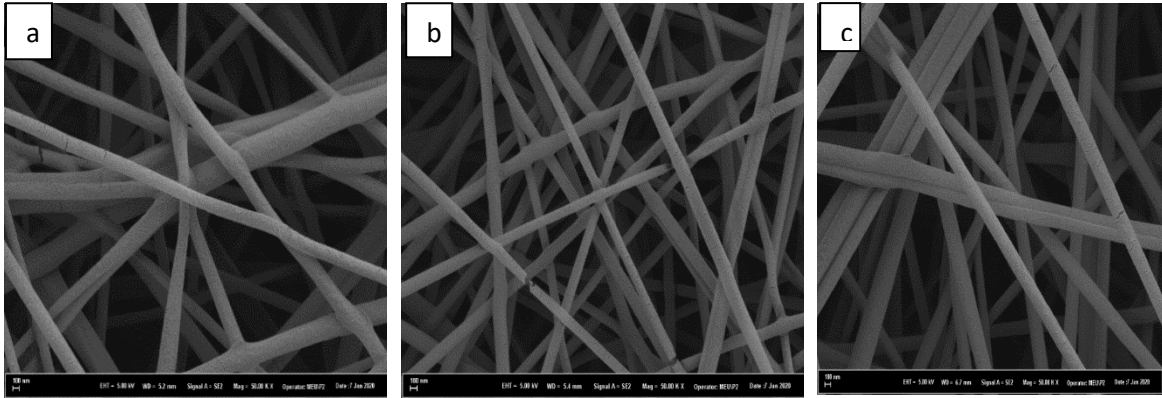
a). Mesafe 12 cm’e çıkarıldığında ise buharlaşma süresinde ki artışın etkisiyle lif çapında azalma olmuş ve ortalama lif çapı 135.47 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 2. b). Mesafenin 14 cm olması lif çapında azalmaya neden olmuş ama homojenik bir yapı gözlemlenmemiştir (Şekil 2.c).

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Voltaj

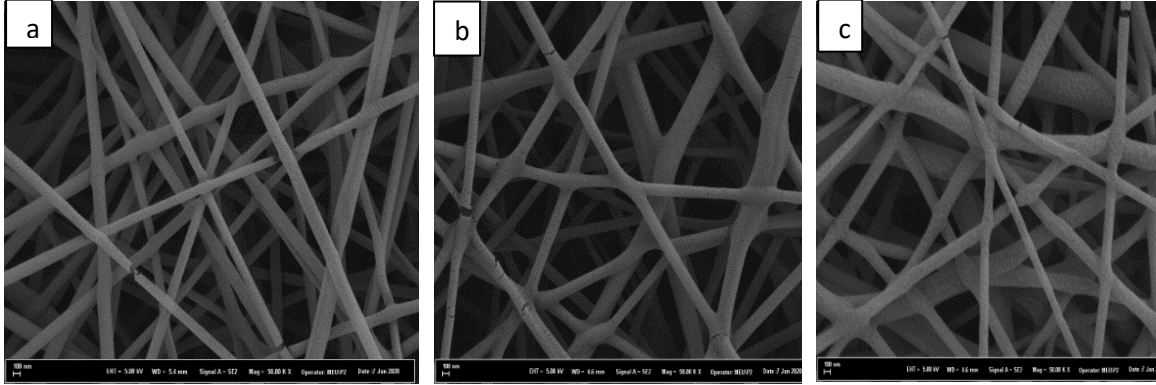
Elektroğirme prosesinde uygulanacak homojen yapıda bir lif oluşumu için en önemli parametrelerden biridir. Belirli bir voltaj değerine kadar lif oluşumu gözlenmemektedir. 18 kV'dan sonra lif oluşumu gözlenmeye başlamıştır. Bu nedenle uygulanacak voltaj aralığı 18 kV ile 19.50 kV aralığında seçilmiştir. Uygulanan voltaj değerine bağlı olarak lif çapında değişiklik görülmektedir. Düşük voltaj değerinde ortalama lif çapı azalırken, voltaj değeri artırıldığında ise homojen yapıda bozulma ve boncuk oluşumu görülmektedir. Zeinali ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hünnap extract yüklü PVA nanolifleri üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Nanoliflerin SEM görüntüleri doğrusal bir morfolojiye ve boncuksuz bir yapıya sahip bununla birlikte, PVA nanolif içine kapsüllemiş hünnap özü şerit ve düz olarak görüntülenmiştir (Zeinali ve ark, 2021).

Kim ve ark., 2016 yılında yaptıkları çalışmada Çin ardıcı ekstraktı yüklü PVA nanolifleri üretmişlerdir. Proses parametreleri olarak voltaj, şırınga ucunda toplayıcı plaka arasındaki mesafe ve akış hızı sırasıyla 10 kV, 15 cm ve 2 ml/sa idi. Ekstrakt yüklü PVA nanoliflerin çapları, eklenen ekstrakt konsantrasyonuna göre 311 ve 368 nm arasında değişiklik göstermektedir. Nanolif çaplarının homojen ve boncuksuz yapısı SEM görüntüleri değerlendirilerek ortaya konmuştur. Estevez-Areco ve ark. (2020) biberiye ekstraktı yüklü PVA nanoliflerini 2.2 ml/sa akış hızında, 20 cm mesafede ve 30 kV voltaj kullanarak üretmişlerdir. Biberiye ekstraktı yüklü PVA nanoliflerinin ortalama çapını 180 nm olarak hesaplamışlardır. Elde edilen nanoliflerin morfolojisinin boncuksuz, tek düze ve homojen olduğunu belirtmişlerdir. Kullanılan polimerin ve ekstrakt konsantrasyonları, polimerin özellikleri, kullanılan cihaz ve çevresel koşullar proses parametrelerini etkilediği yapılan çalışmalar ile de ortaya konmuştur.



Şekil 2. Zeytin yaprağı ekstraktı yüklü nanoliflerin 18 kV voltaj ve 0.5 ml/sa akış hızında farklı uzaklıklarda ki a)10 cm, b)12 cm, c)14 cm SEM görüntüleri

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroçirime Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu



Şekil 3. Zeytin yaprağı ekstrektü yüklü nanoliflerin 0.5 ml/sa akış hızı ve 12 cm mesafede farklı voltaj değerlerinde ki a)18 kV, b)18.75 kV, c)19.5 kV SEM görüntüleri

Antioksidan Aktivite, Toplam Fenolik Madde Tayini, Enkapsülasyon Verimliliği, Yükleme Kapasitesi

PVAn ve ZYE@PVAn nanoliflerinin inhibisyon değeri, toplam fenolik madde miktarı, enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi Çizelge 3'te verilmiştir. PVAn ve ZYE@PVAn nanolifinin inhibisyon değerleri ve toplam fenolik madde miktarları incelendiğinde, ZYE'nin nanolif ile kapsüle edildiği yapılan çalışmada ortaya konmuştur. PVAn nanolifin antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 2.65% ve 0.74 µg GAE/mg nanolif tespit edilmişken, ZYE@PVAn nanolifin ise 87.82% ve 5.77 µg GAE/mg nanolif olarak bulunmuştur. Doğan ve arkadaşlarının, 2016 yılında koaksiyel elektroçirime yöntemiyle kabuk/çekirdek morfolojisine sahip ve zeytin yaprağı ekstrektü (OLE) yüklü ipek fibroin (SF)/hyaluronik asit (HA) nanolifleri üretmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan OLE'nin toplam fenolik madde miktarı 14.04 mg GAE/g OLE bulunurken OLE

yüklü nanoliflerin toplam fenol içeriklerini ise 0.10-0.13 mg GAE/g nanolif olarak belirlenmiştir. OLE'nin toplam antioksidan kapasitesi 11.62 ± 1.22 mM Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) /g OLE olarak tespit edilmiştir. ZYE yüklü nanoliflerin antioksidan kapasiteleri 2.74 ve 2.15 mM TEAC/g nanolif olarak bulunmuştur.

Antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarında ortaya çıkan farklılıklar, bitkinin yetiştiği bölge farklılıklarına, bitkinin genetiğine, toprağın mineral kompozisyonuna, iklim ve çevresel şartlara, ekstraksiyon işlemine ve koşullarına bağlı olmaktadır (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2017; Zargoosh ve ark., 2019; Rashidi ve ark., 2021).

ZYE@PVAn'nın kapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi sırasıyla %78.53 ve %7.86 olarak hesaplanmıştır. Hünnap extract yüklü PVA nanolifinin kapsülasyon verimi ise 88.34% olarak belirlenmiştir (Zeinali ve ark., 2021).

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroçirime Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

Çizelge 3. Boş PVA nanoliflerinin ve ZYE yüklü PVA nanoliflerinin inhibisyon değeri, toplam fenolik madde miktarı, kapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi

	İnhibisyon değeri (%)	Toplam fenolik madde ($\mu\text{g GAE}/\text{mg nanolif}$)	Enkapsülasyon verimliliği (%)	Yükleme kapasitesi (%)
PVAn	2.65±0.21 ^a	0.74±0.21 ^a	-	-
ZYE@PVAn	87.82±1.87 ^b	5.77±1.70 ^b	78.53±0.69	7.86±0.07

Ortalama±;standart sapma. Aynı sütundaki farklı küçük harfle belirtilen değerlerin istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olduğunu belirtmektedir ($p<0.05$).

FTIR

ZYE, PVAn ve ZYE@PVAn nanoliflerin kimyasal karakterizasyonu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) cihazı belirlenmektedir. Zeytin yaprağı ekstraktı ve enkapsülasyonda kullanılan kabuk materyali arasındaki olası etkileşimleri ortaya koymak ve ayrıca bağ yapısında oluşan değişikliklerin belirlenebilmesi sağlamak amacıyla FTIR tercih edilmiştir. ZYE, PVA nanolifin ve ZYE yüklü PVA nanolifinin kimyasal yapıları birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu sayede ZYE'nin nanolif ile kapsülasyonu da ortaya konmuştur.

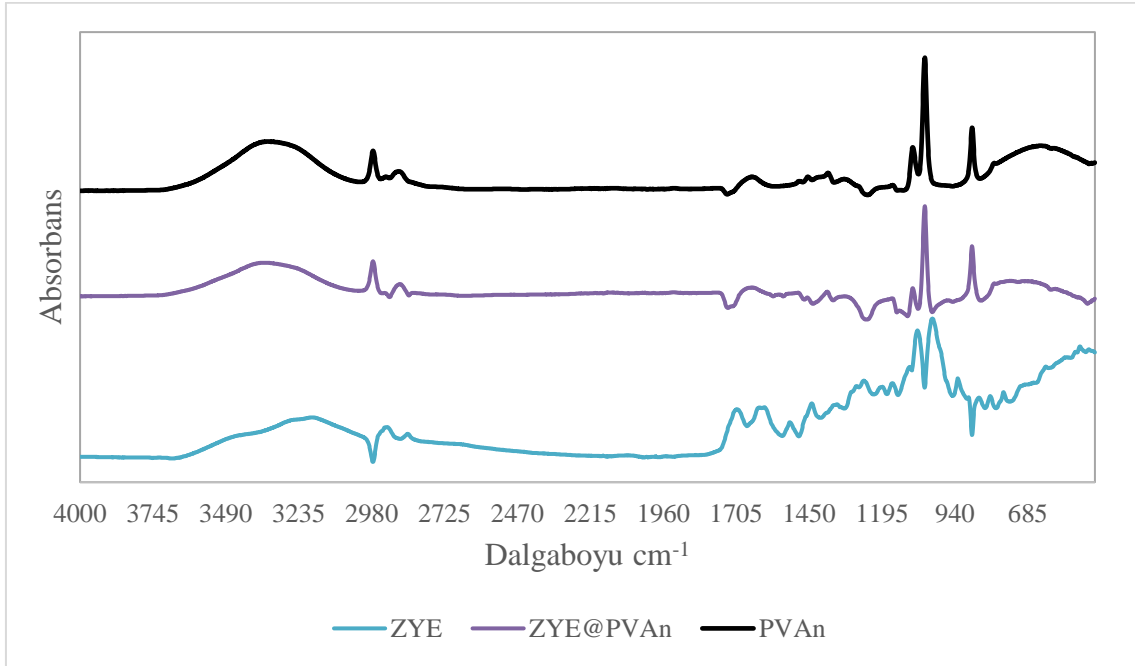
ZYE, 3189, 2973, 2895, 2848, 1733, 1599, 1506, 1443, 1335, 1221, 1115, 1004, 926, 879, 816 ve 767 cm^{-1} dalga boylarında önemli spektrumlar tespit edilmiştir. Fonksiyonel gruplarında bulunan bu spektrumlar C = C, N – H, O – H, C = O ve C-H' i ifade etmektedir (Kesente ve ark., 2017).

ZYE@PVAn nanolifinde ise belirlenen önemli spektrumlar ise 3335, 2973, 2870, 1596, 1445, 1330, 1150, 1083, 1047, 878 ve 649 cm^{-1} 'dir. ZYE yüklü PVA nanolifinde 3350-3200 cm^{-1} dalga boyu arasında belirlenen geniş pik hidroksil gruplarıyla ilişkilendirilebilir. 3335 cm^{-1} dalga boyunda oluşan keskin güçlü bant O-H bandı olarak tanımlanmaktadır. 1380-1200 cm^{-1} aralığında ki pikler O-H ve C-H gruplarının titreşimleri ve 850-600 cm^{-1} aralığında ki pikler ise OH ve CH gruplarının düzlem dışı titreşimleriyle ilişkilendirilmektedir (Kumeta ve ark., 2003; Khanna ve ark., 2005). Fenolik halkalardaki metilen grupları (C-H) veya N-H bükülmesi 2870 cm^{-1} dalga boyunda tespit

edilirken, 1700-1600 cm^{-1} civarındaki tepe noktası oleuropein, rutin ve karbonil gruplarının ise C = O bağlarının esnemesi ile belirlenmiştir. Aromatik halkalarda C bükülmesi 1330-1445 cm^{-1} aralığındaki dalgaboyunda pikler ile tespit edilmiştir. 650-880 cm^{-1} civarında ki pikler ise C – C, C – O'nun iskelet titreşimi ve ayrıca fenolik bileşiklerde bulunan C-H gruplarıyla ilişkilendirilmiştir. Belirlenen sonuçlar yapılan çalışmada tespit edilen pikler ile benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (Agatonovic-Kustrin ve ark., 2021). He ve ark. (2019), nar kabuğu ekstraktı (NKE) ve sodyum dehidroasetat (SD) içeren aktif bir polivinil alkol (PVA) kompozit film, elektroçirime yöntemi kullanılarak hazırladı. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi yardımıyla NKE, SD ve PVA arasındaki etkileşimin karmaşık olduğunu gösterdi. Hem KKD hem de SD içeren tüm PVA nanoliflerinin, 3100–3500 cm^{-1} aralığında hidroksil titreşim tepe noktalarında bir "kayma" gerçekleştiği belirtildi. Artan KKD içeriğiyle birlikte de bu kayma gözlemlendi. KKD ve PVA arasındaki hidrojen bağlarının oluşumu ile atfedilmiştir. Bu nedenle FTIR sonuçları, KKD'nin dahil edilmesinin nanolif matların matrisindeki moleküller arası etkileşimin değiştirdiğini ve daha kompakt bir nanolif yapısına yol açtığını göstermiştir.

ZYE, PVAn ve ZYE@PVAn spektrumlarında elde edilen piklerdeki farklılık, moleküler arası etkileşimini ve yeni bağların oluştuğunun göstergesi olarak ifade edilebilir.

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu



Şekil 4. ZYE, PVAn ve ZYE@PVAn FTIR spektrumları

Sonuç

Tarımsal atık olan zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktın kapsülasyonu yapıldığında gıda endüstrisinde verimli bir şekilde kullanılabilir ve ayrıca kozmetik ve ilaç üretiminde kullanılan sentetik antioksidanların yerini alabilir. Doğal antioksidanlara yönelik artan talep, bu alandaki araştırmaların önemini güçlendirmektedir ve bu çalışmanın sonuçları elektroğirme teknolojisinin, fenolik bileşiklerce zengin ekstraktların kapsülasyonunda etkili ve yeni bir yöntem olduğunu göstermektedir. ZYE@PVAn nanoliflerinin boncuksuz, homojen dağılımlı düzgün bir nanolif yapısının eldesi için optimum elektroğirme proses değerleri akış hızı 0.50 ml/saat, voltaj 18.75 kV ve uzaklık 12 cm olarak tespit edilmiştir. ZYE@PVAn'nın enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi sırasıyla %78.53 ve %7.86 olarak bulunmuştur. FTIR alınan spektrumlar incelendiğinde ZYE'nin PVA nanoliflerine yüklendiği moleküler etkileşim ile de kanıtlanmıştır. Elde edilen nanokapsüllemiş zeytin yaprağı ekstraktının gıda aktif paketleme ve diğer gıda uygulamalarda kullanılabilirliği ortaya konmaktadır.

Teşekkür

Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 2021-1-TP2-4350 no'lu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A. G. ve Maggi, F. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 107(February), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.063>
- Aytac, Z. ve Uyar, T. (2016). Antioxidant activity and photostability of α -tocopherol/ β -cyclodextrin inclusion complex encapsulated electrospun polycaprolactone nanofibers. *European Polymer Journal*, 79, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.04.029>
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.A., Casabianca, H., El

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroğirme Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

- Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R. ve Elaissari, A., (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Estevez-Areco, S., Guz, L., Candal, R. ve Goyanes, S. (2020). Active bilayer films based on cassava starch incorporating ZnO nanorods and PVA electrospun mats containing rosemary extract. *Food hydrocolloids*, 108, 106054. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106054>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 28(3), 325-347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>
- Cho, W. Y., Kim, D. H., Lee, H. J., Yeon, S. J. ve Lee, C. H. (2020). Evaluation of effect of extraction solvent on selected properties of olive leaf extract. *Journal of Food Quality*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3013649>
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N. ve Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628-647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Fathi, M., Martín, Á. ve McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 39(1), 18-39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R. ve Sarıçoban, C. (2012). Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1), 36-50.
- Göksen, G., Fabra, M. J., Ekiz, H. I. ve López-Rubio, A. (2020). Phytochemical-loaded electrospun nanofibers as novel active edible films: Characterization and antibacterial efficiency in cheese slices. *Food Control*, 112, 107133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107133>
- Xue, J., Wu, T., Dai, Y. ve Xia, Y. (2019). Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical reviews*, 119(8), 5298-5415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>
- Hassen, I., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. *Journal of Functional Foods*, 18, 926-940. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.001>
- Ryan, D. ve Robards, K. (1998). Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123(5), 31R-44R. <https://doi.org/10.1039/a708920a>
- Sill, T. J. ve Von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>
- Zhang, C., Li, Y., Wang, P. ve Zhang, H. (2020). Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 479-502. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12536>
- Wen, P., Zong, M. H., Linhardt, R. J., Feng, K. ve Wu, H. (2017). Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 70, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.009>
- Soleimanifar, M., Jafari, S. M. ve Assadpour, E. (2020). Encapsulation of olive leaf phenolics within electrospayed whey protein nanoparticles; production and characterization. *Food Hydrocolloids*, 101, 105572.

Zeytin Yaprağı Ekstraktının Nanoenkapsülasyonu, Elektroçirime Proses Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

- <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105572>
- Kumeta, K., Nagashima, I., Matsui, S., & Mizoguchi, K. (2003). Crosslinking reaction of poly (vinyl alcohol) with poly (acrylic acid)(PAA) by heat treatment: effect of neutralization of PAA. *Journal of applied polymer science*, 90(9), 2420-2427. <https://doi.org/10.1002/app.12910>
- Khanna, P. K., Singh, N., Charan, S., Subbarao, V. V. V. S., Gokhale, R., & Mulik, U. P. (2005). Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. *Materials chemistry and physics*, 93(1), 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.02.029>
- Agatonovic-Kustrin, S., Gegechkori, V., Petrovich, D. S., Ilinichna, K. T. ve Morton, D. W. (2021). HPTLC and FTIR Fingerprinting of Olive Leaves Extracts and ATR-FTIR Characterisation of Major Flavonoids and Polyphenolics. *Molecules*, 26(22), 6892. <https://doi.org/10.3390/molecules26226892>
- Kesente, M., Kavetsou, E., Roussaki, M., Bliidi, S., Loupassaki, S., Chanioti, S., Siamandoura, P., Stamatogianni, C., Philippou, E., Papaspyrides, C. ve Vouyiouka, S. (2017). Encapsulation of olive leaves extracts in biodegradable PLA nanoparticles for use in cosmetic formulation. *Bioengineering*, 4(3), 75. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030075>
- Kim, J. H., Lee, H., Jatoi, A. W., Im, S. S., Lee, J. S., ve Kim, I. S. (2016). Juniperus chinensis extracts loaded PVA nanofiber: Enhanced antibacterial activity. *Materials Letters*, 181, 367-370. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.05.164>
- Tavassoli-Kafrani, E., Goli, S. A. H. ve Fathi, M. (2017). Fabrication and characterization of electrospun gelatin nanofibers crosslinked with oxidized phenolic compounds. *International journal of biological macromolecules*, 103, 1062-1068. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.152>
- Rashidi, M., Mansour, S. S., Mostashari, P., Ramezani, S., Mohammadi, M. ve Ghorbani, M. (2021). Electrospun nanofiber based on Ethyl cellulose/Soy protein isolated integrated with bitter orange peel extract for antimicrobial and antioxidant active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 1313-1323. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.182>
- Zargoosh, Z., Ghavam, M., Bacchetta, G., & Tavili, A. (2019). Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Scientific Reports*, 9(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52605>