

**FABRİKA ATIĞI OLAN ÜZÜM POSASINDAN
RESVERATROLÜN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE LESİTİN İLE
ENKAPSÜLASYONU**

PINAR KARAGÜL

**DOKTORA TEZİ
DOĞAL, BİTKİSEL VE KOZMETİK ÜRÜNLER ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL İBRAHİM UĞRAŞ**

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FABRİKA ATIĞI OLAN ÜZÜM POSASINDAN
RESVERATROLÜN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE LESİTİN İLE
ENKAPSÜLASYONU

Pınar KARAGÜL tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Gedik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Gedik Üniversitesi

Prof. Dr. Ertuğrul KAYA

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Turgut KILIÇ

Balıkesir Üniversitesi

Doç. Dr. Sibel BAYIL OĞUZKAN

Gaziantep Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 19/06/2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

19 Haziran 2023

Pınar KARAGÜL

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ' a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Ertuğrul KAYA ve Prof. Dr. Haydar GÖKSU' ya şükranlarımı sunarım.

Yoğun çalışma döneminde gösterdiği anlayış ve destek için sevgili eşim Öğr. Gör. Dr. Bora KARAGÜL' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili Öğr. Gör. Elif Sine DÜVENCİ 'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini esirgmeden hayatımın her aşamasında yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime gönülden sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması, YÖK 100/2000 Doktora Projesi kapsamında Lisansüstü Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında BAP-2021.05.03.1243 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

19 Haziran 2023

Pınar KARAGÜL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
HARİTA LİSTESİ	xi
KISALTMALAR.....	xii
SİMGELER	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
EXTENDED ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. ÜZÜM (<i>Vitis vinifera</i>).....	6
1.2. TÜRKİYE’ DE ÜZÜMÜN YERİ	6
1.3. TÜRKİYE’DE ÜRETİLEN ÜZÜM ÇEŞİTLERİ	7
1.4. ÜZÜM ÜRETİMİ VE ATIK MİKTARLARI	9
1.5. ÜZÜM POSASI (CİBRE).....	9
1.6. ÜZÜM POSASININ İÇERİĞİ	10
1.7. ÜZÜM POSASININ ETKEN BİLEŞİKLERİ.....	11
1.7.1. Pigment Ve Tanenler	11
1.7.2. Antosiyanidinler	11
1.7.3. Vitaminler	11
1.7.4. Terpenler.....	11
1.7.5. Yağ Asitleri	12
1.7.6. Fenolik Bileşikler.....	12
1.8. STİL BENLER.....	13
1.9. RESVERATROL	14
1.10. RESVERATROLÜN KULLANIMI VE BİYİYARARLANIMI	17
1.11. RESVERATROLÜN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ	19
1.11.1. Kardiyovasküler Sisteme Etkileri.....	20
1.11.2. Antioksidan Etkileri.....	20
1.11.3. Anti trombosit Etkileri	21
1.11.4. Anjiyogenez Etkileri.....	21
1.11.5. Antikanserojen Etkileri	21
1.11.6. Anti inflamatuvar Etkileri.....	21
1.12. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA METODLARI	22
1.12.1. Ekstraksiyon Teknikleri	22
1.12.2. Kromatografik Analiz Yöntemleri	22
1.13. FLASH (FLAŞ) KROMATOĞRAFI	23
1.14. KONTROLLÜ İLAÇ SALIM SİSTEMLERİ	24
1.15. ENKAPSÜLASYON.....	25
1.15.1. Enkapsülasyon Yöntemleri	26
1.15.2. Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri	28

1.15.3. Kaplama Materyali Olarak Lipozom.....	29
1.16. <i>İN VİTRO</i> GASTROİNTESTİNAL SİSTEM.....	31
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. MATERYAL	32
2.1.1. Materyal Temini.....	32
2.1.2. Kimyasal Maddeler	32
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	32
2.2. YÖNTEM	33
2.2.1. Üzüm Posası Kurutma İşlemleri.....	33
2.2.2. Resveratrol İçeriği En Yüksek Üzüm Posasının Belirlenmesi	34
2.2.3. Ekstraksiyon Denemeleri.....	35
2.2.3.1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu.....	35
2.2.3.2. Asidik Ortam Ekstraksiyonu.....	36
2.2.3.3. Refluks Etanol Ekstraksiyonu.....	37
2.2.3.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon.....	37
2.2.3.5. Asit Hidrolizi.....	37
2.2.3.6. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon.....	37
2.2.4. Saflaştırma Denemeleri	38
2.2.4.1. Hekzan İle Ön Yıkama.....	38
2.2.4.2. Adsorban Uygulaması.....	39
2.2.4.3. Silika Gel Kolon Kromatografisi	39
2.2.4.4. Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi.....	40
2.2.4.5. Flash Kromatografi	41
2.2.5. Nihai Karar Verilen Ekstraksiyon Metodu	42
2.2.6. Nihai Karar Verilen Zenginleştirme Metodu	44
2.2.6.1. Ekstrakt İçin En İyi Mobil Fazın Belirlenmesi İçin TLC.....	44
2.2.7. Homojenizasyon	45
2.2.8. Liyofilizasyon İşlemi ile Enkapsülleme	45
2.2.8.1. Enkapsülasyon Verimliliği	46
2.2.8.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Görüntü Analizi.....	46
2.2.9. Resveratrol Yüklü Kapsüllerin <i>İN Vitro</i> Salınım Çalışmaları.....	47
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
3.1. HPLC ANALİZ METODU	49
3.1.1. HPLC Standart Kalibrasyon Grafiği.....	49
3.2. ÜZÜM POSASI KURUTMA YÖNTEMİ BELİRLEME SONUÇLARI.....	50
3.3. RESVERATROL İÇERİĞİ EN YÜKSEK ÜZÜM POSASININ BELİRLENMESİ	51
3.4. EKSTRAKSİYON DENEMELERİ HPLC SONUÇLARI	52
3.4.1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu.....	52
3.4.1.1. Çözücü Optimizasyonu.....	52
3.4.1.2. Sıcaklık Optimizasyonu.....	53
3.4.1.3. Süre Optimizasyonu	54
3.5. SAFLAŞTIRMA DENEME SONUÇLARI	57
3.5.1. Hekzan ile Ön Yıkama.....	57
3.5.2. Adsorban Uygulama	58
3.5.3. Silika Gel Kolon Kromatografisi	58
3.5.4. Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi	60
3.5.5. Flash Kromatografi Sonuçları	61
3.6. TLC UYGULAMASI.....	64
3.7. LC-MS/MS KÜTLE TAYİNİ SONUÇLARI	65
3.8. H-NMR SONUÇLARI.....	66

3.9. ENKAPSÜLASYON SONRASI KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI	67
3.9.1. Enkapsülasyon % Verimi.....	67
3.9.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları.....	68
3.10. RESVERATROL YÜKLÜ KAPSÜLLERİN <i>İN VİTRO</i> SALINIM	
ÇALIŞMALARI	69
4. SONUÇ	72
5. KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	82



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Flavonoid molekülünün genel yapısı.....	13
Şekil 1.2. Fenolik asitlerin kimyasal yapısı.	13
Şekil 1.3. <i>Trans</i> ve <i>cis</i> resveratrol dönüşümü.	14
Şekil 1.4. Bitkilerde resveratrol sentezi.	15
Şekil 1.5. En önemli birkaç stilben bileşiği.	16
Şekil 1.6. (a) Flash kromatografi genel diyagramı, (b) Flash kromatografi kartuşları. ...	24
Şekil 1.8. Taşıyıcı malzeme ile istenilen bölgeye yönelik ilaç salınımı.	25
Şekil 1.9. Enkapsülasyon yöntemlerinin karakteristiklerinin temsili illüstrasyonu.....	27
Şekil 1.10. Lipozomun yapısı.	29
Şekil 1.11. Lesitin farklı karakterde maddeleri tutma şekilleri.	30
Şekil 2.1. Öğütülmüş üzüm posası.....	34
Şekil 2.2. (a) Kalecik karası, (b) <i>Cabernet sauvignon</i> ve (c) <i>Michelle paliero</i>	34
Şekil 2.3. DeneySEL sürecin diyagramı.....	38
Şekil 2.4. (a) Birinci hekzan yıkama. (b) İkinci hekzan yıkama. (c) Üçüncü hekzan yıkama.	39
Şekil 2.5. Silika G60 kolon denemeleri.	40
Şekil 2.6. Sephadex LH-20 kolon denemeleri.	41
Şekil 2.7. <i>Trans</i> -resveratrolün nihai karar verilen ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları.....	43
Şekil 2.8. Resveratrolün kolon kromatografisi ile zenginleştirilmesi.....	45
Şekil 2.9. Enkapsülasyon aşamaları.....	46
Şekil 2.10. Laboratuvarda yapılan in-vitro salınım testleri mide ve barsak ortamı.	47
Şekil 3.1. Resveratrol standardının hplc kromatogramı.	50
Şekil 3.2. Resveratrol standarda ait a) uv spektrum taraması ve spesifik dalga boyu b) pik saflığı.	50
Şekil 3.3. Ekstraktların farklı kurutma yöntemleriyle resveratrol düzeylerinin karşılaştırılması.	51
Şekil 3.4. Farklı türdeki üzüm posalarının resveratrol düzeylerinin karşılaştırılması. ...	52
Şekil 3.5. Etanol ekstraksiyonu (siyah) ve standart hplc kromatogramı (pembe).	56
Şekil 3.6. Etanol ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.	56
Şekil 3.7. Hekzan yıkaması yapılmamış (siyah) hekzan yıkaması yapılmış deneme kromatogramı (pembe).	57
Şekil 3.8. Hekzan yıkaması yapılmış deneme ekstraksiyonun a) uv spektrumu b) pik saflığı.....	57
Şekil 3.9. Etanol ekstraksiyonu (siyah), florosil (pembe), alümina (kırmızı), bioçar (mavi) hplc kromatogramı.....	58
Şekil 3.10. 15. Elüent (mavi) ve resveratrol standardına(pembe) ait HPLC kromatogramı.	60
Şekil 3.11. 15. Elüent a) uv spektrumu b) pik saflığı.	60
Şekil 3.12. 4 numaralı elüent (mavi) ve resveratrol standardına (siyah) ait kromatogram.	61
Şekil 3.13. 4 numaralı elüente ait pik saflığı.	61
Şekil 3.14. Flash kromatografi datası.	62
Şekil 3.15. Genel tarama spektrumu.	62
Şekil 3.16. 4 numaralı fraksiyon (siyah) ve resveratrol standardına ait HPLC kromatogramı.	63

Şekil 3.17. 4 numaralı fraksiyonun a) UV spektrum b) pik saflığı.....	63
Şekil 3.18. (a) Standartlara ait TLC sonuçları ve (b) silika kolon fraksiyonları.....	64
Şekil 3.19. Resveratrol ve parçalanma ürünlerine ait moleküler iyonlar.....	65
Şekil 3.20. LC-MS/MS dataları.	66
Şekil 3.21. İzole edilen resveratrolün ¹ H-NMR kimyasal kayma (δ) değerleri (ppm). ..	67
Şekil 3.22. (a) Lesitin ve (b) Lesitin + Resveratrol 30 µm görüntüsü.....	68
Şekil 3.23. (a) Lesitin ve (b) Lesitin + Resveratrol 100 µm görüntüsü.....	69
Şekil 3.24. (a) Lesitin ve (b) Lesitin + Resveratrol 300 µm görüntüsü.....	69
Şekil 3.25. Lesitin yüklü kapsüllerin (turuncu) ve resveratrol standardının(mavi) barsak ortamındaki %salınım değerleri.....	70
Şekil 3.26. Lesitin yüklü kapsüllerin (turuncu) ve resveratrol standardının(mavi) barsak ortamındaki %salınım değerleri.....	70

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Türkiye’de yetiştirilen sofralık, şaraplık ve kurutmalık üzüm çeşitleri.....	8
Çizelge 1.2. Cibrenin karakterizasyonu.....	10
Çizelge 1.3. Yaygın olarak kullanılan kaplama materyalleri.....	29
Çizelge 1.4. Çizelge sindirim sisteminin bazı bölgeleri ve pH değerleri.	31
Çizelge 2.1. Deneyde kullanılan materyaller.....	32
Çizelge 2.2. Gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları.....	35
Çizelge 2.3. Klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları.	36
Çizelge 2.4. Flash kromatografi metot denemeleri.....	41
Çizelge 2.5. Flash kromatogtafi metot.....	42
Çizelge 2.6. En iyi çözücü sisteminin belirlenmesi için TLC' de gerçekleştirilen çözücü karıştırıcı/oran listesi.....	44
Çizelge 3.1. Hplc analiz koşulları ve uygulanan gradient yürütme metodu.	49
Çizelge 3.2. HPLC ölçüm sonuçları.	53
Çizelge 3.3. HPLC ölçüm sonuçları.	53
Çizelge 3.4. HPLC ölçüm sonuçları.	54
Çizelge 3.5. Klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmalarının sonuçları.....	55
Çizelge 3.6. Silika G-60 kolon uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı.	59
Çizelge 3.7. Sephadex LH-20 kolon uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı.	60
Çizelge 3.8. Flash kromatografi uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı.	62
Çizelge 3.9. <i>Trans</i> -resveratrol molekülüne ait pozitif ve negatif iyon değerleri.....	65

HARİTA LİSTESİ

Sayfa No

Harita 1.1.Türkiye'nin illere göre üzüm üretim miktarı.	7
--	---



KISALTMALAR

dk	Dakika
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
DMSO	Dimetilsülfoksit
ELSD	Evaporatif ışık saçılım dedektörü
FAO	Gıda tarım örgütü
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
g	Gram
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HCl	Hidroklorik asit
H-NMR	Nükleer manyetik rezonans
IEC	İyon değişim kromatografisi
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
L	Litre
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M.Ö.	Milattan önce
NaOH	Sodyum hidroksit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SFE	Süperkritik akışkan ekstraksiyonu
ppm	Milyonda bir birim
RES	Resveratrol
TLC	İnce tabaka kromatografisi
UV	Ultraviyole

SİMGELER

α	Alfa
ADI	Belirsizlik faktörü
β	Beta
>	Büyüktür
v/v	Hacimce yüzde
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
<	Küçüktür
μM	Mikrometre
mV	Milivolt
M	Molarite
Nm	Nanometre
N	Normalite
pH	Potansiyel hidrojen
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde
Yy	Yüzyıl

ÖZET

FABRİKA ATIĞI OLAN ÜZÜM POSASINDAN RESVERATROLÜN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE LESİTİN İLE ENKAPSÜLASYONU

PINAR KARAGÜL

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Haziran 2023, 81 sayfa

Son yıllarda beslenme bilincinin artmasıyla özellikle pandeminin de getirmiş olduğu etkiyle birlikte insanların doğal ürünlere eğilimi de artmıştır. Günümüze baktığımızda insanlar gıdaları sadece açlığı giderici olarak değil aynı zamanda sağlık üzerine olan etkilerinden faydalanmak amaçlı da kullanma ihtiyacı duymuşlardır. Artan bu ihtiyaçla birçok sektör sentetik gıda takviyeleri yerine doğal ve bitkisel ürünlerden elde edilen sağlıklı destekleyici ürünler üzerine çalışmalarını başlatmışlardır. Bu yaklaşım, tüketicilerin sağlıklı bir yaşam tarzı sürdürmelerine ve beslenme ihtiyaçlarını karşılamalarına yardımcı olmayı hedeflemektedir. Tez konusu kapsamında şarap ve meyve suyu fabrikalarının endüstriyel atığı olarak hayvan yemine gönderilen üzüm posasının en önemli bileşiklerinden olan resveratrol etken maddesinin eldesi ve saflaştırılması için metot geliştirilmiştir. Bu kapsamda üzüm posasından belirlenen ekstraksiyon metodu ve saflaştırma basamaklarından sonra kolon kromatografisi ile zenginleştirme yapılarak fraksiyonların toplanması sağlanmıştır. Etken madde miktarı en az yirmi kat deriştirilerek lesitin yardımıyla enkapsülasyonu yapılmıştır. Aktif bileşenlerin enkapsülasyonu, elde edilen ürünün stabilizasyonunun sağlanması için önemli bir yöntemdir. Aynı zamanda çözünürlüğü düşük olan moleküllerin biyoyararlanımı arttırmak amacıyla yapılmaktadır. Resveratrol, biyoyararlanımı düşük ve stabilitesi zor bir etken bileşiktir. Kapsülleme işlemi sonrası *in vitro* gastrointestinal salınım testleri yapılmıştır. Kontrollü salınımlarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle belirlenmesi, salınım davranışının açıklanması amaçlanmıştır. Elde edilen *trans*-resveratrol yapı tayini için LC-MS-MS, HPLC ve H-NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. *In vitro* salınım testleri sonucunda lesitin ile kapsüllemenin resveratrolün biyoyararlanımını arttırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Ekstraksiyon, Flash kromatografi, Lesitin, Resveratrol, Üzüm posası.

ABSTRACT

ENRICHMENT OF RESVERATROL FROM FACTORY WASTE GRAPE PUSS AND ENCAPSULATION WITH LECITHIN

Pınar KARAGÜL

Düzce University

Graduate Education Institute, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim UGRAS

June 2023, 81 pages

In recent years, with the increase in nutritional awareness, especially with the effect of the pandemic, people's tendency towards natural products has also increased. When we look at today, people have felt the need to use food not only to satisfy hunger but also to benefit from its effects on health. With this increasing need, many sectors have started to work on health-supporting products derived from natural and herbal products instead of synthetic food supplements. This approach aims to help consumers maintain a healthy lifestyle and meet their nutritional needs. Within the scope of this thesis, a method was developed for the extraction and purification of the active ingredient resveratrol, which is one of the most important compounds of grape pomace sent to animal feed as industrial waste of wine and fruit juice factories. In this context, after the extraction method and purification steps determined from grape pomace, enrichment was performed by column chromatography and fractions were collected. The amount of active substance was concentrated at least twenty times and encapsulated with the help of lecithin. Encapsulation of active ingredients is an important method to ensure the stabilization of the product obtained. It is also done to increase the bioavailability of molecules with low solubility. Resveratrol is an active compound with low bioavailability and difficult stability. In vitro gastrointestinal release tests were performed after encapsulation. It was aimed to determine the controlled release by high performance liquid chromatography (HPLC) method and to explain the release behavior. LC-MS-MS, HPLC and H-NMR analyses were performed for the structure determination of the obtained trans-resveratrol. As a result of in vitro release tests, it was determined that encapsulation with lecithin increased the bioavailability of resveratrol.

Keywords: Extraction, Flash chromatography, Lecithin, Resveratrol, Grape pomace.

EXTENDED ABSTRACT

ENRICHMENT OF RESVERATROL FROM FACTORY WASTE GRAPE RUSS AND ENCAPSULATION WITH LECITHIN

Pınar KARAGÜL

Düzce University

Graduate Education Institute, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil Ibrahim UGRAS

June 2023, 81 pages

1. INTRODUCTION

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene; RES) is a prominent antioxidant found in grapes and their skins. It has been hypothesized that RES contributes to the French paradox, which refers to the lower incidence of coronary heart disease despite a diet high in saturated fats. Resveratrol belongs to the most significant class of phytochemicals found in plants. It has been scientifically proven to possess antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, vasodilatory, anti-diabetic, anti-aging, and general antimicrobial properties. RES has low solubility in water but exhibits high membrane permeability. Previous studies have reported a solubility of approximately 0.03 mg/mL for RES. However, in vivo pharmacokinetic studies have shown that the oral bioavailability (BA) of RES is nearly negligible. This contradicts the physiological significance of the higher concentrations commonly used in in vitro studies. Recent evidence suggests that encapsulating RES in various delivery systems, such as Ca-alginate submicron particles, oil-in-water emulsions, and double emulsions, can enhance its absorption and stability. Moreover, numerous nanoformulations and delivery systems have been developed to improve the oral BA of RES. While RES is well-absorbed when consumed orally by humans, its bioavailability is relatively low due to rapid metabolism and elimination. This thesis aims to evaluate the utilization of waste products from wine and fruit juice factories, which are sent to animal feed, to obtain resveratrol additives with high added value for domestic and international markets. The concentration of the active ingredient will be increased to reduce the amount of by-products resulting from herbal extracts. The interest and consumption of plant extract-supported food supplements among the public will ensure a safer and more effective extract mixture based on the available literature. To achieve this, classical solvent extraction techniques such as Soxhlet extraction, solid-liquid phase extraction, liquid-liquid phase extraction, as well as innovative methods like

microwave and ultrasonic-assisted extraction will be separately employed for grape seeds and skins. Multiple parameters including temperature, time, and solid-liquid ratio will be varied in these trials. Comparative analysis of the results will help determine the optimal extraction conditions and the most suitable solvents. The successfully extracted resveratrol compound will be formulated using appropriate nanoparticles, and its effects and bioavailability will be evaluated through cell culture experiments and animal studies. This study aims to investigate the effects of bioenhancers on the oral bioavailability of resveratrol, a natural and beneficial phytosterol. Unique auxiliary substances such as nanoparticles, plants containing effective compounds, and ascorbic acid, which have not been explored before, will be employed for bioavailability studies.

2. MATERIAL AND METHODS

In today's nutrition-conscious society, consumers view food not only as a means to satisfy hunger but also as a source of health support. In light of this, the food industry is focusing on developing new products that promote health rather than relying on synthetic food additives that may have negative health implications. In the scope of this thesis, we aim to extract resveratrol, a beneficial compound, from grape pomace, which is currently discarded as industrial waste by wine and fruit juice factories. The objective is to concentrate the amount of this active ingredient at least 20 times and utilize lecithin for encapsulation. One of the primary motivations behind encapsulating active ingredients is to ensure stability throughout the production process and in the final product. In the case of our active ingredient, resveratrol, encapsulation is specifically employed to enhance its bioavailability. Thus, during the initial reporting period, various studies were conducted to investigate the encapsulation techniques for resveratrol, with a focus on improving both its stability and bioavailability.

- Literature review:

Among the grape varieties cultivated in our country for viticulture, Öküzgözü, Kalecik Karası, and Horoz Karası varieties stand out for their exceptional qualities in wine production. Several factors contribute to the quality of wine, including the chemical composition, variety, vintage, harvest conditions, growing region, and geographical characteristics associated with the grapes. Grape pomace, an agricultural by-product, remains underutilized in our country. Grape pomace consists of grape skins, pulp, and stems obtained after the crushing and pressing of grapes, either with or without the grape

seeds, during wine production. Approximately 3% of the grapes cultivated in our country are used for winemaking. Considering that 15-25% of the processed wine grapes consist of pomace, the quantity of grape pomace should not be underestimated. Resveratrol, a phenolic compound known for its high potency, is abundantly present in grape pomace. Various studies support the bioactivity of phenolic compounds, especially those with a flavonoid structure. The concentration of resveratrol in grape pomace is reported to be around 0.5%, which is relatively low. Our primary goal is to reduce the 0.5% resveratrol content to desired levels by concentrating it at least 20 times, thereby achieving standardization. Subsequently, we will employ encapsulation techniques using lecithin for the standardized concentrated extract. The use of lecithin is particularly noteworthy due to its structural similarity to cell membranes. This unique characteristic enables certain bioactive agents to efficiently distribute and release within the cells of the body, as evidenced by intracellular studies. Additionally, lecithin allows nanoparticles to enter intercellular spaces through blood *transport*, further enhancing the encapsulation process.

- Material Supply;

In the thesis, grape pomace, which is our experimental material, was obtained by contacting wine factories and fruit juice factories. Through the factory, waste products have been collected since September. It was collected by paying attention to the harvest time of the grape plant. Afterwards, it performs the cleaning, drying and grinding processes required for extraction and makes it ready for extraction processes.

- Cleaning operations;
 - Removal of other impurities
 - Removal of rotten leaves
 - Dust removal with water

Transactions have been made.

- Drying Operations;

During the drying process, the drying process is carried out by paying attention to the properties of the desired active substance in the grape pulp. It is aimed to obtain the active substance in the highest efficiency.

- Grinding Operations;

During the grinding process, separate grinding processes were carried out for our grape pomace material, which we will dry and use in 4 different ways. Grinding process A portable mechanical shredder with 110 W stainless steel grinding blade was used.

- Extraction Operations;

In order to obtain the optimum extract, extraction processes were performed with different methods and solvents at laboratory scale and the results were compared. In this context, the following methods have been tried.

a. Traditional Methods

- Soxlet extraction
- Classic solvent extraction

b. Innovative Methods

- Microwave Assisted Extraction
- Extraction by Ultrasonication
- Concentration Studies;

The following studies were carried out to remove unwanted by-products from the primary extracts obtained and to increase the concentration of target active substances.

- Chromatographic Concentration;

The determination and concentration of the target active substance amounts in the secondary extracts obtained were carried out. HPLC (high performance liquid chromatography) methods were used in active ingredient determination studies. A new method has been developed by using the literature as HPLC method. HPLC analyzes gave us information about the nature of our active ingredient families and other structures.

- Flash chromatography studies

Within the scope of the studies, the fractions using silica column and hexane/ethylacetate method were collected and analyzed in HPLC.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

In this study, grape pulp was obtained from three different regions. First of all, the material with the highest amount of active substance from these grape pomaces was determined and Cabernet species obtained from Kırklareli region was found. Afterwards,

the optimum drying method, extraction method and purification methods were determined. As a drying method, it was found that the resveratrol content of the materials dried outside at room conditions was higher. Ethanol was determined as the extraction solvent and it was determined that the optimum conditions were the extraction environment at 30°C for 24 hours.

After determining the optimum extraction conditions, solvent extraction, acid hydrolysis, liquid extraction, reflux extraction and ultrasonic bath extraction were tried and the highest yield was obtained in solvent extraction. After the extraction method was determined, purification steps were tried. In the purification processes, pre-washing with apolar solvent, adsorbent application and column experiments were carried out. It was seen that hexane washing was necessary and it was determined that the adsorbents were effective in retaining the impurities, but retained some resveratrol, and the adsorbent application was abandoned. In the column trials, silica and sephadex columns were tested separately, and the desired purity was achieved in both. However, silica column was chosen in terms of cost. Afterwards, the encapsulation processes of the resveratrol-containing product obtained by enrichment by flash chromatography were carried out. The lyophilization method was used as a method in encapsulation processes. In vitro release tests of the lyophilized encapsulated product were carried out and their % release was examined. Release tests were performed in the stomach and intestinal environment, and it was found that the release of encapsulated resveratrol molecules in the intestinal environment was higher than in the stomach environment. Structure determination analyzes were performed by LC-MS-MS, HPLC, and H-NMR.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

This research represents an important step in the evaluation and waste management of grape pomace, an industrial byproduct that is often underutilized and contains various beneficial compounds, including resveratrol, known for its potential health benefits. The study focuses on the isolation and enrichment of resveratrol from grape pomace under optimized extraction conditions, followed by its encapsulation using lecithin. Structural analysis of the obtained capsules was performed using SEM (Scanning Electron Microscopy). Subsequently, release tests in simulated gastric and intestinal environments were conducted to investigate their bioavailability.

1. GİRİŞ

Dünyada nüfusun hızla artmasıyla ve sanayileşmenin etkisiyle gerek çevre kirlenmesi gerekse dünya hammadde kaynaklarının sınırlı olması sebebiyle, fabrika atıklarının çeşitli şekillerde değerlendirilmeleri bir zorunluluk haline gelmiştir. Fabrika atıkları, endüstriyel süreçlerin bir yan ürünüdür ve üretim faaliyetlerinden kaynaklanan kimyasal, fiziksel ve biyolojik maddeler içerir. Fabrika gıda atıkları hem çevre kirliliği oluşturması hem de içermiş oldukları değerli bileşenlerin kaybının yaşanması açısından önemli sorunlar oluşturabilmektedir. Bu sorunların ortadan kaldırılması ve bu değerli bileşenlerin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu önemli konu son yıllarda TÜBİTAK tarafından desteklenen ve çağrısı yapılan 1003 ve 1511 gibi öncelikli alanlar araştırma projeleri arasında yer almaktadır. Ülkemizde yeterince değerlendirilemeyen tarımsal sanayi atıklarının en önemlilerinden birisi de üzüm posasıdır[1]. Üzüm posası, şarap ve meyve suyu fabrikalarının yan ürünü olup, şarap ve meyve suyu yapılırken üzümün preslenmesi sonucunda oluşan kabuk ve çekirdekten oluşmaktadır. Üzüm posası başka amaçla kullanılmayıp çevreye gelişigüzel atıldığı için çürüyerek çevre kirliliğine neden olmaktadır. Çevresel kirliliğin giderek artması ile birlikte son yıllarda bu kirliliğin önlenmesi ve atıkların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, bitkisel üretim sonucu ortaya çıkan hasat atıkları ve tarımsal ürün kaynaklı fabrikasyon atıklarının çeşitli yöntemlerle tekrar kullanılabilir hale getirilmesi giderek artmaktadır. Tarımsal sanayi ürünü olup değerlendirilen ürünlerden birisi de üzümdür. Üzüm, sarımsı yeşil renkli veya mor siyah renkli yemişleri ile bilinen bir çalı veya asma türlerinden oluşan bir cinstir. Taksonomik olarak Vitaceae familyasına aittir. Vitis cinsinde sınıflandırılır. Farklı birçok türü mevcuttur. Üzüm (*Vitis vinifera* L.), dünya genelinde popüler bir meyve olan ve yüksek besin içeriği ile ön plana çıkan bir türdür. Yaklaşık olarak 7 milyon hektarlık bir alanda yetiştirilen üzüm, dünya genelinde en yaygın yetiştirilen meyvelerden biridir ve ülkemizde de yaygın bir şekilde tüketilir. İçerdiği su, şeker, lif, vitaminler ve mineraller ile besleyici bir profil sunar. Üzümler ayrıca antioksidanlar açısından da zengin bir kaynak olarak bilinirler. Dünya geneline bakıldığında üzüm üretiminin yaklaşık %71'i şarap, %27'si sofralık ve %2'si kurutulmuş meyve olarak kullanılmaktadır. Bir kısmı ise "ilave şeker içermeyen ve "%100 doğal" üzüm suyu üretimine gitmektedir[2]. Üzümün

15,000'nin üzerinde çeşidinin olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayı diğer meyvelerle kıyaslandığında oldukça fazladır. Sadece anavatanı olarak bilinen Anadolu'da üzüm çeşitlerinin sayısı 1,200'den fazladır. Üzümün yapılan en önemli endüstriyel ürünlerden biri şaraptır[3]. Dünya genelinde üretilen üzümler tüketim amaçlarına göre sofralık ve şaraplık olarak ikiye ayrılmaktadır. Dünyada üretilen üzümün yaklaşık %80'i şarap yapımında kullanılmaktadır. Geri kalan %20'lik kısım ise sofralık olarak kullanılmaktadır. Çoğunluğu aynı türe ait olsa da sofralık ve şaraplık üzümler önemli farklılıklar gösterir. Şaraplık üzümler daha küçük, çekirdekli ve kalın kabukludur. Sofralık üzüm çeşitleri ise, ince kabuklu, çekirdeksiz ve nispeten büyük olabilirler[4]. Ülkemizdeki üzüm yetiştiriciliğine baktığımızda uygun ekolojik yapısı sebebiyle bağcılık alanında dünyanın en önemli ülkelerindendir. Ülkemizde yaş üzüm üretimi her yıl ortalama 4 milyon ton civarındadır. Üretilen üzümlerin yaklaşık %3'ü şaraplık olarak değerlendirilmektedir. Türkiye'de birçok farklı bölgede şaraplık üzüm yetiştirilmektedir. En bilinen şaraplık üzümlerden bazıları şunlardır: Öküzgözü, özellikle Elâzığ, Diyarbakır, Şanlıurfa ve Gaziantep gibi Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetiştirilir. Boğaz kere: Türkiye'nin en eski şaraplık üzümlerinden biridir ve özellikle Diyarbakır ve Elâzığ'da yetiştirilir. Kalecik Karası: Bu üzüm Türkiye'nin başkenti Ankara yakınlarındaki Kalecik ilçesinde yetiştirilir. Hafif ve meyvemsi bir şarap yapmak için kullanılır. Narince: Türkiye'nin kuzeydoğusunda, Tokat ve Erzincan bölgelerinde yetiştirilen Narince üzümü, aromatik bir beyaz şarap yapmak için kullanılır. Şirince Emir: Bu üzüm, Türkiye'nin batısındaki İzmir yakınlarındaki Şirince köyünde yetiştirilir. Şarapları genellikle meyvemsi ve yumuşak bir tada sahiptir. *Cabernet sauvignon*, Fransa'nın Bordeaux bölgesinde ortaya çıkmıştır ve dünya genelinde en çok üretilen şarap üzüm çeşitlerinden biridir. Şarköy, Bozcaada ve Gelibolu gibi yerlerde *cabernet sauvignon* üzümlerinin yetiştiriciliği ve şarap üretimi oldukça yaygındır. Shiraz üzüm çeşidi, büyük, kalın kabuklu ve siyah mor renkte üzümlerden oluşur. Shiraz üzüm çeşidi, Türkiye'de de yetiştirilmektedir. Özellikle Ege ve Akdeniz bölgesindeki bazı şarap üreticileri, Shiraz üzümlerini kullanarak kaliteli şaraplar üretmektedirler. Bu sadece birkaç örnek olup Türkiye'de birçok farklı şaraplık üzüm türü yetiştirilmektedir[5]. Üzümün şaraplık olarak işlenmesi sonucunda elde edilen üzüm posasının önemli bir miktar (yaklaşık %15-25 oranında) olduğu düşünüldüğünde, üzüm posası üretimi önemsenmesi gereken bir boyuta sahiptir. İşlenmiş üzüm posası, genellikle kabukların %50'si, çekirdeklerin %25'i ve üzüm saplarının %25'i şeklinde bileşenlere sahiptir. Bu bağlamda atıkların geri dönüştürülmesi veya yeniden kullanılması, sürdürülebilirlik

açısından ve ekonomik getirisi olması açısından önemlidir[1]. Atığa gönderilen üzüm posası polifenolce zengin olup çok kıymetli bileşikler içermektedir. Bu fenolik bileşiklerin insan sağlığına faydaları yapılan birçok çalışma ile ispatlanmıştır[6]. Son yıllarda özellikle pandeminin etkisiyle doğal ürünlerden elde edilen fenolik bileşiklere olan ilgi artmıştır. Üzüm, dünya genelinde en büyük meyve üretimlerinden birini gerçekleştirmektedir ve kırmızı üzüm posası, sağlık açısından önemli biyolojik etkilere sahip olan fenolik bileşikler içermektedir. Bu nedenle, üzüm posası ve içerdiği fenolik bileşikler, büyük bir ilgiyle incelenmektedir. Fenolik bileşikler, antioksidan özellikleri nedeniyle insan sağlığı üzerinde çeşitli potansiyel faydaları olan bir grup bileşiktir. Antioksidanlar, vücuttaki serbest radikalleri nötralize ederek hücre hasarını azaltmaya yardımcı olabilirler. Bazı fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, kalp hastalığı, kanser, diyabet ve diğer kronik hastalıkların riskini azaltmaya yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan birçok çalışmada fenolik bileşiklerin birçok hastalık için tedavi edici özellikleri bulunmuş olup mevcut kimyasal ilaçların göstermiş olduğu yan etkilerden daha az yan etkilerinin bulunması sebebiyle dikkat çekmektedirler. Hali hazırda birçok gıda ve ilaç firmasının fenolik bileşikler kullanmaya yöneldiği görülmektedir. Bitkiler âleminin en geniş ailesi olan fenolik bileşikler içeriğinde birçok faydalı bileşik barındırmaktadır. Bu önemli bileşiklerden birisi de *trans*-resveratrol'dür. Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene) molekülü, stilben adı verilen bir tür fenolik bileşiktir ve $C_{14}H_{12}O_3$ kimyasal formülüne sahiptir. Resveratrol, birçok bitkide doğal olarak bulunan bir bileşiktir ve kırmızı üzümlerde yoğun olarak bulunur. Özellikle üzümün kabuğunda oldukça fazla bulunan tamamen savunma amaçlı sentezlenen bir sekonder metabolittir. Polifenol yapısında olup bitkinin ihtiyacı olduğu anda sentezlenerek bitkiyi fungal enfeksiyonlara karşı korumaktadır. Molekül, iki fenil halkası arasında dört karbon-carbon çift bağı ($C=C$) içeren bir stilben çekirdeğine sahiptir. Stilben çekirdeğinin her iki yanında da hidroksil ($-OH$) grupları bulunur. Stilben bileşiği olan resveratrolün sağlık açısından faydaları yapılan çok sayıda çalışma ile ispatlanmıştır. Resveratrol, ilk olarak 1940'larda Japon bitki bilimcisi Michio Takaoka tarafından "*Polygonum cuspidatum*" bitkisinde keşfedilmiştir. Daha sonra, resveratrolün antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri ile ilgili araştırmalar yapılmıştır[7]. 1976 yılında İngiltere'deki Shell Araştırma Laboratuvarları'nda Dr. James E. Langcake ve Dr. Ronald W. Pryce tarafından üzüm asmasından izole edildiği bilinmektedir. Langcake ve Pryce, *trans*-resveratrolün üzüm asmasının odunsu kısmında bulunan temel madde olduğunu ve yapraklardaki fitoaleksin olarak tanımlandığını keşfetmişlerdir. Ancak, üzüm tanesindeki

miktarının oldukça az olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu keşif, sonrasında resveratrolün antioksidan özellikleri ve sağlık yararları üzerine yapılan araştırmaların temelini oluşturmuştur[8]. Resveratrolün insan sağlığı üzerindeki potansiyel faydaları, 1992 yılında Fransız bilim adamları tarafından yayınlanan bir çalışmada keşfedilmiştir. Bu çalışma, resveratrolün kırmızı şarapta bulunduğunu ve kalp hastalığına karşı koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermiştir[9]. Soleas ve diğer araştırmacılar (1997), *trans*-resveratrolün LDL (kötü kolesterol) oksidasyonunu önlediğini ve dolayısıyla ateroskleroz riskini azalttığını gösteren önemli bir araştırma yapmışlardır. Ayrıca, *trans*-resveratrolün kan basıncını düşürdüğü ve kan pıhtılaşmasını engellediği de diğer çalışmalarda ortaya konulmuştur. Bu nedenle, *trans*-resveratrolün sağlıklı bir kalp ve damar sistemi için önemli bir bileşik olduğu düşünülmektedir[10]. Özellikle son birkaç yılda yapılan çalışmalar, resveratrolün kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlattığını ve hatta öldürdüğünü göstermiştir. Resveratrol ayrıca, tümör oluşumuna neden olabilecek hücre içi moleküller üzerindeki serbest radikallerin bağlanmasını önleyerek kanser oluşumunu engellemeye yardımcı olabilir. Bazı araştırmalar, resveratrolün özellikle prostat, meme ve kolon kanseri gibi bazı kanser türlerinin önlenmesinde etkili olabileceğini öne sürmektedir. Antioksidan özelliğe sahip bir polifenol olan resveratrol, ilaç ve tıp alanında yapılan araştırmalarda etki alanı oldukça geniş olan etkin bir bileşiktir. Resveratrolün sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin fark edilmesi, bu maddeyi içeren bitkisel özütlerin ve takviye edici gıdaların üretimini artırmıştır. Özellikle üzüm ve şarap gibi besinlerin içinde bulunan doğal kaynaklardan resveratrol alımı, tüketicilerin ilgisini çekmektedir. Ancak resveratrolün kararsız, okside olabilir, ısı ve ışığa duyarlı bir molekül olması tüketimi noktasında bazı sınırlandırmalar getirmektedir. Bu sebeple resveratrolün yapısının bozulmasını önleyecek, onu koruyacak mekanizmalar geliştirilmiştir[11]. Resveratrol molekülü aynı zamanda biyoyararlanımı oldukça düşük olan bir bileşiktir. Yapılan birçok çalışmada, oral yoldan alınan resveratrolün sindirim sistemi tarafından yeterince emilmediği ve karaciğer tarafından çok hızlı metabolize edildiğini ortaya koymaktadır. Önceki çalışmalarda, resveratrolün farmakokinetik parametreleri incelenmiş ve saf madde olarak (*trans*-resveratrol) tek başına kullanıldığında düşük biyoyararlanım değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen C_{max}, t_{max} ve AUC değerleri, resveratrolün düşük oranda emildiğini ve vücut tarafından etkili bir şekilde kullanılmadığını göstermektedir. [12]. Bu sebeple sağlık üzerinde bu kadar faydalı etkisi olan resveratrolün biyoyararlanımının artırılması noktasına odaklanılmıştır. Fakat bu konuda çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Biyoyararlanımı ile ilgili yapılan birkaç

çalışmaya bakacak olursak, Wall ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, insanlarda oral resveratrolün emilimi ve biyoyararlanımı incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları, oral resveratrolün emilim oranının %75 olmasına rağmen, %1'den düşük bir biyoyararlanım oranına sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, resveratrolün daha yüksek dozlarının gerektiğini ve belirli bir etkiyi elde etmek için alternatif uygulama yöntemlerinin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir[13]. Vitali'ne ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 25 sağlıklı gönüllü insanda kırmızı şarap tüketiminden sonra elde edilen *trans*-resveratrol biyoyararlanımı üç farklı deneyle incelenmişlerdir. Çalışmanın sonuçları, kırmızı şarap yoluyla alınan *trans*-resveratrolün emiliminde düşük bir verimlilik olduğunu göstermiştir. Kırmızı şarap tüketiminden 30 dakika sonra alınan serum örneklerinde, serbest *trans*-resveratrolün izole miktarlarda ölçüldüğü gözlemlenmiştir. Ancak daha uzun sürelerden sonra alınan örneklerde, resveratrolün metabolitlerinden olan glukuronidlerin baskın olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, resveratrolün vücutta hızla metabolize olduğunu ve başlıca metabolitlerinin glukuronid formunda bulunduğunu göstermektedir[14]. Sağlık üzerine bu kadar olumlu etkisi olduğu bilinen resveratrolün diyetle alınan az dozlardaki biyoyararlanımı[15], biyoyararlanımına şarap veya üzüm suyu içindeki diğer bileşiklerin etkisi, doza bağlı olarak etkinin değişimi[16], biyoyararlanım artırıcı etkisi olduğu bilinen bazı bitkilerle [17], resveratrolün çözünürlüğünü artırıcı maddeler ile [18], biyoyararlanımının nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında, ülkemizde atığa gönderilen üzüm posalarının değerlendirilmesi amacıyla, polifenolik ve biyoyararlanımı düşük bir bileşik olan resveratrolün fabrika atığı olan üzüm posasından ekstraksiyonu, saflaştırılması, kromatografi kullanılarak konsantrasyonunun değiştirilmesi, lesitin ile enkapsülasyonu ve salım çalışmaları yapılmıştır. Saflaştırılmış ve değiştirilmiş resveratrolün enkapsüle edilmesi bileşiğin suda çözünürlüğünün düşük olması, ısı ve ışıktan etkilenecek kimyasal stabilitesinin bozulması, biyoyararlanımının düşük olması gibi zayıf yönlerinin geliştirilmesi amacıyla uygulanmıştır. Kapsülleme materyali olarak lesitin, toksik olmaması, biyoyararlanımlı olması gibi yönleri sebebiyle tercih edilmiştir. Aynı anda su ve yağ fazına sahip olmalarının vermiş olduğu etkiyle hem suda hem de yağda çözünür özellik gösteren lesitin suda çözünürlüğü düşük olan resveratrolün biyolojik yararlılığının ve dayanıklılığının artırılması amaçlanarak kullanılmıştır. HPLC, LC-MS/MS, H-NMR ile yapı aydınlatmaları, SEM, FTIR, DSC yöntemleri ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

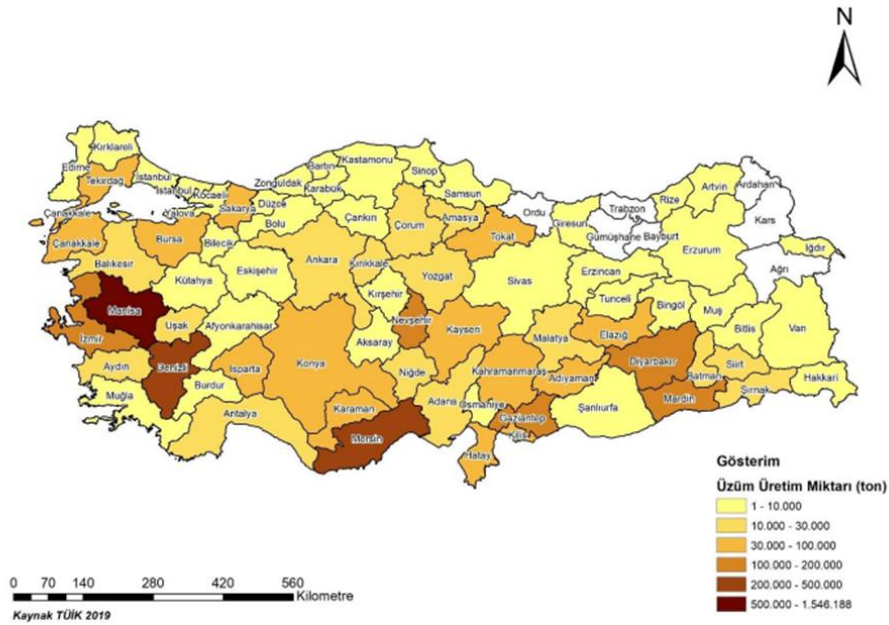
1.1. ÜZÜM (*Vitis vinifera*)

Türkiye, bağcılık için uygun bir iklim kuşağına sahip olup, kültür asması (*Vitis vinifera* L.) yetiştiriciliğine M.Ö. 6 000-5 000 yıllarında başlamıştır. Dünya genelinde 14 000'den fazla üzüm çeşidi ve tipi bulunmaktadır ve önemli bir bölümü Anadolu'da yer almaktadır[19]. Üzüm, dünya genelinde farklı çeşitleri olan değerli bir meyvedir. *Vitis vinifera* adlı asma türünün meyvesi olan üzüm, tatlı, sulu, ekşi veya sert olabilir. Üzüm meyvesi, küçük, yuvarlak veya oval şekilli ve kabuk rengi, türüne göre yeşil, siyah, mor, kırmızı veya sarı tonlarında olabilir. Üzüm, Kapalı Tohumlular (Angiosperms) sınıfında yer alan bir bitki türüdür ve taneleri kabuk, meyve eti ve çekirdekten oluşur. Üzüm, içerdiği fenolik bileşiklerle ön plana çıkmaktadır[20]. Fenolik bileşikler bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunurlar ve insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptirler. Bu bileşikler benzen halkaları içeren organik maddelerdir ve bitkilerde ikincil metabolit olarak bulunurlar[21]. Üzüm ve ürünlerindeki fenolik bileşiklerin bileşimleri, çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir. Fenolik bileşikler bitkilerde ikincil metabolit olarak bulunur ve olgunlaşma dönemine, çeşit ve iklim koşullarına bağlı olarak değişebilir. Ayrıca, kültürel işlemlere, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerine de bağlı olarak üzüm ve şarapta bulunan polifenolik bileşiklerin içeriği önemli ölçüde değişebilir[22]. Son yıllarda, çevresel kirliliği önlemek ve atıkları değerlendirmek amacıyla bitkisel üretimden kaynaklanan hasat artıkları ve tarımsal ürünlerin fabrika atıkları farklı alanlarda yeniden kullanılabilir hale getirilme eğilimi göstermektedir. Bu süreç, tarımsal endüstrideki birçok atığın geri kazanılmasını hedeflemektedir. Bu kapsamda, üzüm gibi tarımsal ürünler de değerlendirilen tarımsal endüstri ürünleri arasında yer almaktadır.

1.2. TÜRKİYE' DE ÜZÜMÜN YERİ

Türkiye bağcılık için çok uygun bir iklim kuşağına sahiptir ve uzun yıllardır bağcılık kültürüne sahiptir. Türkiye'nin birçok bölgesinde üzüm yetiştiriciliği yapılmaktadır ve ülkede yetiştirilen üzüm çeşitleri oldukça çeşitlidir. Türkiye'nin üzüm gen kaynağı oldukça zengindir ve pek çok farklı asma türü ve çeşidi mevcuttur. Ayrıca, Türkiye'deki üzüm yetiştiricileri genellikle farklı asma türleri ve çeşitlerini melezlenerek yeni ve daha dayanıklı üzüm çeşitleri elde etmek için çalışmaktadırlar. Bu nedenle, Türkiye'de bağcılık sektörü oldukça gelişmiştir ve ülkede yetiştirilen üzümler yüksek kalitede ve lezzetlidir. Türkiye'nin üzüm bağları hem yerli hem de yabancı turistler için önemli bir turistik cazibe

merkezi haline gelmiştir[23]. Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2021 verilerine göre, dünya genelinde toplam üzüm üretimi 77,9 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Çin, İtalya, İspanya, Türkiye ve ABD, en fazla üzüm üreten ülkeler arasında ilk beş sırayı almaktadır. Türkiye ise 5,5 milyon ton üretimle dördüncü sırayı işgal etmektedir. Türkiye'de, üzüm üretimi en yoğun olarak Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde gerçekleştirilmektedir. FAO verilerine göre, Türkiye'nin dünya üzüm üretimindeki payı %7,1'dir. Türkiye'nin yaş üzüm üretimi ise her yıl değişkenlik göstermektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2020 yılı verilerine göre, bu yılda toplam üzüm üretimi 4,9 milyon ton olarak kaydedilmiştir. Harita 1.1'de Türkiye'nin illere göre üzüm üretim miktarı verilmiştir.



Harita 1.1. Türkiye'nin illere göre üzüm üretim miktarı.

1.3. TÜRKİYE'DE ÜRETİLEN ÜZÜM ÇEŞİTLERİ

Türkiye'de üzüm çeşitliliği oldukça fazladır ve hemen hemen her bölgede sofralık ve şaraplık üzüm yetiştirilmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2021 yılı verilerine göre, ülkemizde üretilen üzümlerin yaklaşık %35,4'ü sofralık, %41,7'si kurutmalık, %5,5'i şaraplık, %8,8'i ise şıralık üzüm olarak kullanılmaktadır. Bu şıralık üzümler, pekmez, köfte, sucuk, reçel gibi ürünlerin imalatında değerlendirilmektedir[24]. Üzüm ihracatı, Türkiye'nin önemli ihraç ürünlerinden biridir ve çekirdeksiz kuru üzüm ve sofralık üzüm, şarap ile üzüm suyu ihracat gelirinin toplamının %8,3-9'unu oluşturmaktadır [25]. Çizelge 1.1'de Türkiye'de yetiştirilen sofralık, şaraplık ve kurutmalık üzüm çeşitleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Türkiye’de yetiştirilen sofralık, şaraplık ve kurutmalık üzüm çeşitleri.

Coğrafi Bölgeler	Yetiştirilen Üzüm Çeşitleri		
	Sofralık	Şaraplık ve Şırahık	Kurutmalık
Marmara Bölgesi	Çavuş, Hafızali, Müşküle, Razaki, Hamburg Misketi, Alphonse Lavelle, Muscat Rein des Vignes, Cardinal, Beyazı	Clairette, Pinot Chordonnay, Riesling, Beylerce, Semillon, Pinot noir, Papaz Karası, Adakarası, Kuntra (Karasakız), Gamay, Shiraz, Cabernet Sauvignon	Razaki
Ege Bölgesi	Razaki, Kozak Beyazı, Sultani ve Yuvarlak Çekirdeksiz, Alphonse Lavellée, Hamburg Misketi, Kozak Siyahı, Pembe Gemre, Cardinal,	Semillon, Cabernet	Sultani Çekirdeksiz, Yuvarlak Çekirdeksiz, Erikara, Razaki, Aşıkara.
İç Anadolu Bölgesi	Besni (Bamba), Razaki, Çavuş (Nevşehir), Büzgülü (Karagevrek), Gül Üzümlü, Hamburg Misketi, Etalia, Hafızali, Alphonse Lavallée	Sungurlu, Narince, Emir, Hasandede, Kalecik Karası, Papaz Karası	Muscat rein des Vignes
Akdeniz bölgesi	Alphonse Laval, Perlette, Cardinal, Perle de Csaba, Muscat rein des Vignes, Razaki, Işıklı,	Dökülgen, Kabarcık, Rumi, Azezi, Üvezi, Tosbağa Kabarcığı, Serpene, Kıran, Horozkarası	Dimrit, Hevenk, Kuş Yüreği, Miski, Fırt, Dımışkı
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	Dımışkı, Ağbesni (Besni), Muhammediye, Tahannebi, Hönüsü, Horozkarası (Kilis karası)	Dökülgen, Öküzgözü, Boğazkere, Horozkarası	Besni (Bamba), Dımışkı
Doğu Anadolu Bölgesi	Kara erik, Tahannebi, Besni, Şilfoni, Muhammediye	Narince, Öküzgözü, Boğazkere	
Karadeniz Bölgesi	Hafızali, Çavuş, Hamburg Misketi	Narince, Öküzgözü, Boğazkere	Razaki, Balbal, Kepenek

Şarap endüstrisi atık ürünü olan üzüm posası, genellikle özel yetiştirilmiş besin değeri yüksek üzümlerin kullanılması sebebiyle içermiş oldukları fitokimyasallar bakımında oldukça zengindir. Fitokimyasallar sağlık için son derece önemli bileşikler olup bu

bakımdan üzüm posası da ekonomik potansiyele sahiptir. Fabrikalarda işlenen üzümünden %20-30 oranında posa elde edildiği bilinmektedir. Bu değer küçümsenmeyecek boyuttur.

Üzüm işlendikten sonra arta kalan posanın bileşimi, üzümün çeşidine, hasat ve işleme yöntemlerine bağlı olarak değişebilir. Ancak genellikle posanın yaklaşık %50'si kabuk, %25'i çekirdek ve %25'i üzüm sapından oluşmaktadır. Üzüm işleme sonrasında ortaya çıkan posa birikerek atık haline gelmekte ve çevre kirliliği oluşturmaktadır. Bu atıkların doğru şekilde değerlendirilmediği durumlarda önemli bir ekolojik sorun ve çevre kirliliğine neden olabilmektedir.

1.4. ÜZÜM ÜRETİMİ VE ATIK MİKTARLARI

Üzüm, her yıl küresel olarak üretilen 60 milyon tondan fazla üretim ile dünyadaki ana genişletilmiş tarımsal ekonomik faaliyetlerden biridir. Dünya da 2014 yılından bu yana üzüm üretimi toplam 210 milyon tonu geçmiştir. Üretilen üzümlerin yaklaşık %15'i (31,5 milyon ton) şarapçılık endüstrisinde kullanılmış olup yaklaşık %30'u (9,45 milyon ton) atık olarak ortaya çıkmaktadır.[26]. Türkiye'de yıllık üzüm üretiminin 3.65 milyon ton olduğu ve bunun yaklaşık 425 000 tonunun şaraplık üzüm olduğu ve şarap endüstrisinin yılda 106 000 ton üzüm posası ürettiği bilinmektedir. Bu üzüm posalarının çevre üzerindeki olumsuz etkilerini minimize etmek için çeşitli uygulamalar yapılmaktadır.

1.5. ÜZÜM POSASI (CİBRE)

Üzüm posası kabuk, çekirdek ve saplardan oluşur. Üzümün içerisindeki cibre oranının, cinsine ve işleme şekline göre %15-25 arasında değiştiği ve bu cibrenin yaklaşık %50'sinin kabuk, %25'inin çekirdek ve %25'lik bir kısmının ise salkım iskeletinden oluştuğu belirtilmektedir. Bütün üzümlerin preslenmesiyle şıra, şarap ve meyve suyu gibi ürünlerin üretimi sırasında ortaya çıkan fabrika atığıdır. Bu atık ürün bertaraf sorunuyla karşı karşıyadır. Şu anda dünyada yılda 9 milyon ton bu organik kalıntı üretiliyor[26]. Atık bir ürün olan posa fabrikalar için bertaraf sorunu oluşturabilmektedir[27]. Bu sebeple alternatif alanlarda kullanımları araştırılmaktadır. Özellikle üzüm posasının içermiş olduğu önemli biyoaktif bileşenler sebebiyle çok fazla ilgi görmüştür. Üzüm posasının genel bileşimi ile ilgili olarak, üzüm çeşidine ve olgunlaşma durumuna bağlı olarak nem yüzdesi %50 ile %72 lignin içeriği ise %16,8 ila %24,2 ve %4'ten daha düşük

bir protein içeriğine sahiptir. Üzüm posası genellikle yüksek miktarlarda antosiyaninler, kateşinler, flavanol glikozitler, fenolik asitler ve alkoller tipinde fenoller ve ana bileşenler olarak stilbenlerden oluşur. Fenolik bileşiklerin kompozisyonunu belirlemek amacıyla üzüm posası ile birçok çalışmalar yapılmıştır. Üzüm cibresi ile ilgili yapılan bir araştırma, marc üzüm posasının cinsine göre 0,27 ile 9,66 mg/L arasında miktarlarda gallik asit, furfural, kateşin, vanilik asit, epikateşin polifenollerinin bulunduğunu belirtmişlerdir. [28]. Üzüm posası, çeşitli uygulamalarla yeniden değerlendirilebilen bir atık üründür. Toprak düzenleyici veya gübre yapımında kullanılabileceği gibi, hayvan yemi olarak da kullanılabilir. Ayrıca, yenilenebilir enerji kaynağına dönüştürülebilir. Üzüm posasının son ürünleri, sağlığı teşvik eden bileşiklerin potansiyel bir kaynağı olarak hizmet eder ve diyet takviyelerinde kullanılır. Üzüm posasından sitrik asit üretimi, gıda renklendiricileri ve lakkaz üretimi gibi farklı yöntemlerle yararlanmak mümkündür[29],[27].

1.6. ÜZÜM POSASININ İÇERİĞİ

Üzüm posası, şarap yapımı sırasında yan ürün olarak ortaya çıkan şarap işleme endüstrisinde önemli bir atık ürünüdür. Üzüm posası, üzümün kabukları, tohumları, sapları ve diğer kalıntılardan oluşur. İçeriği, şarap yapımındaki işlemlerin türüne ve üzümün çeşidine bağlı olarak değişebilir[30]. Üzüm posasının karakterizasyonu, onun içeriğinin ayrıntılı olarak analiz edilmesini ve değerlendirilmesini içerir. Çizelge 1.2’de Cibrenin karakterizasyonu yapılmıştır.

Çizelge 1.2. Cibrenin karakterizasyonu.

Özellikler (Kütlece)	Yaş Üzüm Cibresi	Kurutulmuş Üzüm Cibresi
Kuru Madde	>30,0	>85,0
Ham Selüloz	<15,0	<40,0
Ham Kül	<2,0	<7,0
HCL’de çözünmeyen kül	<0,5	<1,0
Yabancı madde	<0,5	<1,0
Aflatoksin µg/kg	<20	<20

Üzüm posası, polifenolik bileşikler, organik asitler, lif, protein, karbonhidratlar ve mineraller gibi çeşitli besin maddeleri açısından zengin bir kaynaktır. Bu bileşenlerin

çoğu antioksidan özelliklere sahiptir ve insan sağığı için oldukça faydalıdır. Şarap, şıra veya meyve suları yapımında üzümün suyu kullanılıp faydalı bileşiklerce zengin kısmı olan posanın atılması önemli bir fenolik bileşik kaynağının çöpe gitmesi demektir. Üzüm posası, özellikle kabuk ve çekirdek bölümlerinde çeşitli önemli fitokimyasal bileşikler içermektedir. Bu bileşikler arasında fenolik bileşikler, organik asitler, vitaminler, mineraller, enzimler, monosakkaritler ve türevleri, azotlu bileşikler, terpenik bileşikler ve lipidler bulunur. Ayrıca etanol, tartratlar, malatlar, sitrik asit, üzüm çekirdeğı yağı, hidrokolloidler ve diyet lifi gibi değerli bileşenler de içermektedir. Fenolik bileşikler ise en önemli bileşenler arasında yer alır ve daha ayrıntılı olarak incelenecektir[31].

1.7. ÜZÜM POSASININ ETKEN BİLEŞİKLERİ

1.7.1. Pigment Ve Tanenler

Üzüm posasının başlıca fenolik bileşenleridir. Bu bileşikler üzüm kabuğunda hücrelerde bulunur ve şarap rengi ve tadının belirlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Ham meyve yeşil renkli iken, olgunlaşma sürecinde klorofil kaybolur ve kırmızı veya siyah renkli antosiyanidin bileşikleri (delfinidin, petunidin, malvidin, siyanidin ve peonidin gibi) ortaya çıkar. Bu bileşikler, üzümün kabuğunda ve bazı durumlarda çekirdeklerinde de bulunabilirler ve şarabın renginin tonunu ve şiddetini belirleyebilirler[32].

1.7.2. Antosiyanidinler

Antosiyanidinler rengi kırmızı veya mavi olan pigmentlerdir ve üzüm çeşitlerinin yaprakları, bu pigmentlere bağılı olarak renklidir. Delfinidin, antosiyanidinler arasında mor renkli bir bileşiktir. Ayrıca, üzüm meyve kabuğı ve çekirdeğinde prosiyanidinler de bulunur ve ayrıca önemli miktarda resveratrol içerirler. Tanenler açısından da zengindirler[32].

1.7.3. Vitaminler

Üzüm posasında B grubu vitaminleri bulunur ve bunların bileşiklerinin miktarı, bitkinin gelişim evrelerine ve yetiştirildiğı bölgedeki çevresel faktörlere bağılı olarak değışebilir. Taze posada C vitamini düşük miktarda bulunur[32].

1.7.4. Terpenler

Monoterpenik bileşikler, çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunan ve tat ve koku veren

uçucu yağlar olarak bilinirler. Üzüm kabuğunda da bu bileşikler mevcuttur ve meyvenin tat ve kokusunu belirlerler. Farklı varyetelerde ve büyüme koşullarında, monoterpenik bileşiklerin miktarı ve bileşimi değişebilir[32].

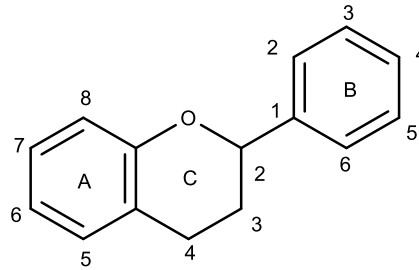
1.7.5. Yağ Asitleri

Üzümün çekirdeğindeki sabit yağın yanı sıra, meyve kabuğundaki mum tabakasındaki oleanolik asit de önemli bir bileşendir. Oleanolik asit, anti-inflamatuar, anti-kanser ve antioksidan özelliklere sahip bir triterpenoiddir. Ayrıca, kabukta mumsu bir tabaka bulunmaktadır. Bu mum tabakasının içeriğine bakıldığında %50–70 oranında oleanolik asit olduğu ve meyvenin dış etkilere karşı korunmasına yardımcı olduğu bilinmektedir[20].

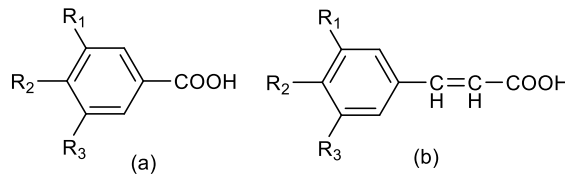
1.7.6. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkiler âlemindeki en geniş aile grubunu oluştururlar. Şimdiye kadar 8 000'den fazla bileşiğin izole edilip tanımlandığı bilinmektedir. Fenolik bileşikler, aromatik halkaya bağlanmış bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren fitokimyasallardır. Fenolik veya polifenol, kısaca hidroksil grubu taşıyan bileşikler olarak tanımlanabilir. Fenolik bileşikler bitkiler âleminin en yaygın sekonder metabolitleridirler. Sekonder metabolitler, savunma (otçullara, mikroplara, virüslere veya rakip bitkilere karşı), sinyal (tozlaşan veya tohum dağıtan hayvanları çekmek için) ayrıca bitkiyi ultraviyole radyasyon ve oksidanlardan koruyan bileşiklerdir[33]. Fenolikler esas olarak meyvelerde, baklagillerde, sebzelerde, çayda, şarapta, kahvede bulunur ve bitki besinlerinin organoleptik özelliklerinden sorumludur. Benzer şekilde, fenolik bileşikler tükürük glikoproteini ile etkileşimleri nedeniyle meyvelerin acılığında sorumludur. Fenolikler ayrıca birçok meyve ve sebzenin rengini belirleyen bileşiklerdir. Fenoliklerin, farklı şarap markalarının tat ve rengindeki farklılıklara sebep olduğu bilinmektedir[34]. Fenolik bileşikler bitkilerde fenilpropanoid metabolizması olarak bilinen bir süreçte üretilir. Bu süreç, Şikimat adlı bileşikten fenilalanin sentezlenmesiyle başlar. Fenilalanin, ardından tirozin ve diğer fenolik bileşiklerin biyosentezinde kullanılan *trans*-sinamik asit gibi diğer ara maddelere dönüştürülür. Flavonoidler gibi polifenolik bileşikler, fenilpropanoid metabolizmasının yan dallarından birinde sentezlenir ve genellikle bitkilerin yaprakları, meyveleri, kabukları, çiçekleri ve tohumlarında bulunurlar. Polifenollerin farklı yapısı, aromatik halkaların farklı yapısal düzenlemelerine, OH gruplarının sayısına ve organik asitlerle karbonhidratların yapmış olduğu bağlara bağlıdır[35]. Literatürü incelediğimizde

fenolik bileşiklerin sınıflandırılması ile ilgili farklı veriler mevcuttur. Bunlardan birkaçı şu şekildedir. Harborne (1989) “Bitki fenolikleri” adlı kitabında fenolik bileşikler karbon halkalarına göre 16 temel sınıfa ayırmıştır. Bu sınıflar fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetik asitler, hidroksisinnamik asitler, fenilpropanlar, kumarin ve izokumarinler, kromonlar, naftokinonlar, ksantonlar, stilbenler , antrokinonlar, flavonoidler , lignan ve neolignanlar ve ligninler şeklindedir[36]. Downey vd. e göre ise fenolik bileşikler 7 gruba ayrılmaktadır. Bunlar, fenolik asitler, flavan-3-oller, flavonoller, flavononlar, proantosiyanidinler, antosiyaninler ve stilbenlerdir[37]. Bir diğer sınıflandırma ise, fenolik bileşiklerin nonflavonoidler ve flavonoidler olmak üzere 2 gruba ayrıldığını belirtmiştir[38]. Genel olarak fenolik asitleri iki ana gruba ayırabiliriz. Bunlar, fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturur. Bu gruba bakıldığında flavonoller, flavanoller, antosiyaninler, kumarinler, tanninler, izoflavonoidler, flavonlar, flavononlar ve lignin gibi önemli maddeler yer aldığı görülür. Fenolik asitler, bitkiler âlemindeki en basit fenolik bileşiklerdir. Hidroksibenzoik asit, hidroksisinnamik asit ve stilbenlerden oluşurlar. Stilbenlerin ana temsilcisi resveratroidir. Şekil 1.1 ve Şekil 1.2’de Flavonoid ve Fenolik asit moleküllerinin genel yapısı verilmiştir.



Şekil 1.1. Flavonoid molekülünün genel yapısı.



Şekil 1.2. Fenolik asitlerin kimyasal yapısı.

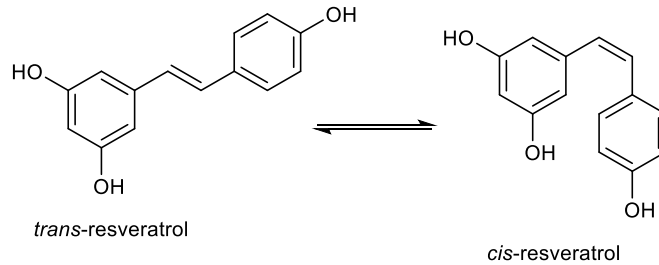
1.8. STİLBENLER

Stilbenler asmanın meyveleri, yaprakları, dalları ve kökleri gibi farklı organlarında bulunabilen fenolik maddelerdir[39]. Stilbenler, patojen saldırısına yanıt olarak bitki

tarafından sentezlendikleri için antifungal bileşikler olarak işlev görürler. Ultraviyole ışınları ve ağır metaller gibi diğer abiyotik uyarıcılar stilben üretimini tetikleyebilir. Üzüm ve şarapta birçok stilbenik bileşik tespit edilmiştir (resveratrol, piceid, viniferinler, astringin, vb.)[40]. Stilbenler C₆-C₂-C₆ yapısında bileşiklerdir. Yapısal olarak aromatik halkalara bağlı hidroksiller taşıyan 1,2-difeniletilen iskeletinin varlığı ile karakterizedir. En bilinen stilben bileşiği polifenolik fitoaleksin olan Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben)'dür. Resveratrol *trans*-(E) ve *cis*-(Z) olmak üzere iki geometrik izomer olarak bulunur.

1.9. RESVERATROL

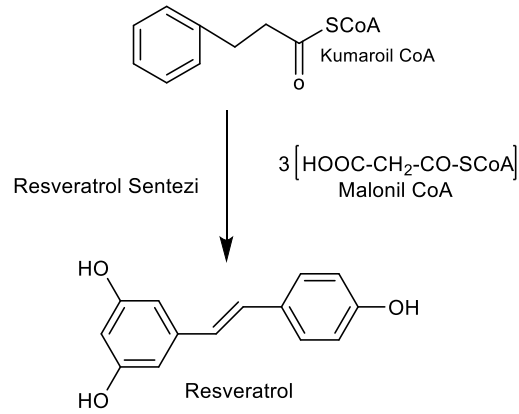
Resveratrol (*trans*-resveratrol; *trans*-3,5,4'-trihidroksi-stilben) C₁₄H₁₂O₃ kimyasal formülüne sahiptir. Resveratrol bileşiğinin yapısında iki fenil halkası, bir çift bağ ve hidroksil (-OH) grupları yer alır. Resveratrol, keto ve enol iki tautomere sahip bir bileşiktir. Doğada bu *trans* ve *cis* formları ile bulunmasına rağmen bitki materyallerinde genellikle *trans*- izomer bulunur. Suda çözünürlüğü düşük olan resveratrol etanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözünen bir moleküldür[41]. *Trans*- resveratrol *cis* resveratrole göre daha fazla biyoaktif özellik göstermektedir. *Cis* resveratrol üzüm kabuğu veya diğer bileşenlerde tespit edilememiş olup *trans* resveratrolün izomerizasyonu sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. *Trans* resveratrol UV ışınlarına duyarlı bir molekül olup maruziyeti sonucunda *cis*-izomere dönüşümü gerçekleşebilir. Işık, ısı ve oksijenin *trans*-resveratrolün degradasyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Isı, ışık, oksijen gibi etkenler bileşiğin saflığını değiştirebilmektedir[42]. Şekil 1.3'de *trans* ve *cis*-resveratrol dönüşümü verilmiştir.



Şekil 1.3. *Trans* ve *cis* resveratrol dönüşümü.

Resveratrol başta üzüm, yer fıstığı, dut, yaban mersini kızılçık olmak üzere 72 bitki türünde tespit edilmiştir. Resveratrol bitkilerin savunma sistemlerinin başrol

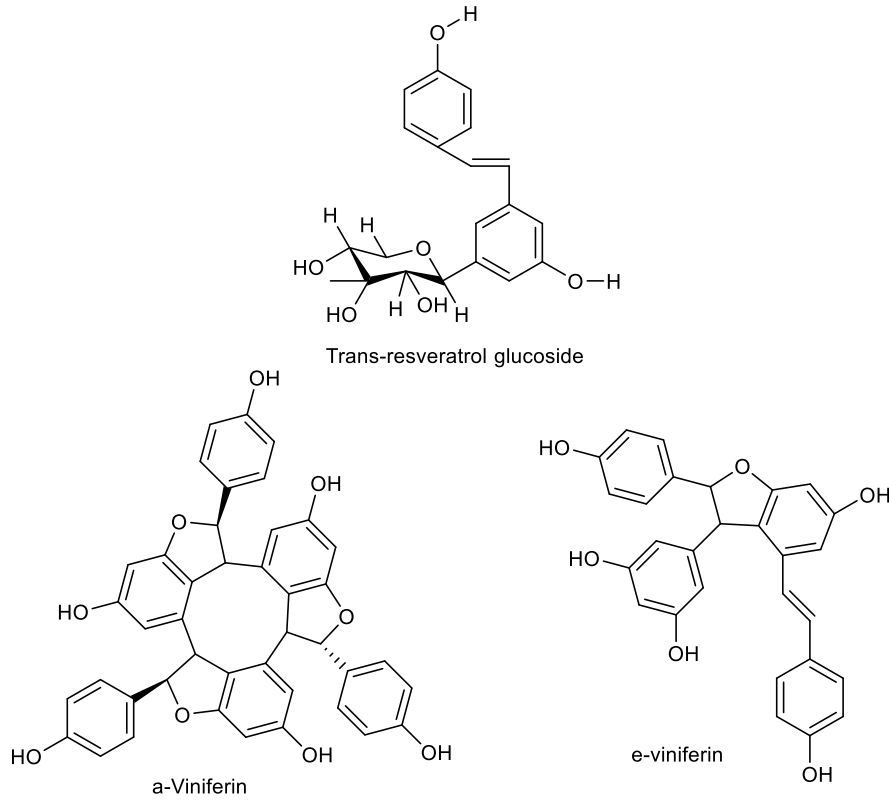
oyuncusudur. Özellikle üzümde en fazla bulunduğu görülmüş ve kırmızı üzüm çeşitlerinde beyaz üzüm çeşidine göre daha fazla olduğu da ayrıca keşfedilmiştir. Üzüm ve diğer asma türlerinde en yüksek miktarda sentezlenen stilben bileşiğidir. Resveratrol sentezi, bitkilerin savunma mekanizmalarından biridir ve dışarıdan gelen stres faktörlerine karşı aktive olur. Bu stres faktörleri arasında yaralanma, UV maruziyeti ve fungus enfeksiyonları sayılabilir. Stilben sentaz enzimi yardımıyla üretilmektedir. Bitkilerin savunma mekanizmalarının tehdit altında olduğunu düşündüğü durumlarda ortaya çıkan p-coumaroyl- CoA ve malonyl-CoA tarafından sentezlenmektedirler. Şekil 1.4’de Bitkilerde resveratrol sentezinin nasıl gerçekleştiği verilmiştir.



Şekil 1.4. Bitkilerde resveratrol sentezi.

Savunma mekanizmasının aktivasyona geçmesiyle resveratrol düzeyinde artış başlamaktadır. Bazı kaynaklarda resveratrol düzeyinin stres faktörü oluşumundan yaklaşık 24 saat sonra maksimum seviyelere ulaştığı ve daha sonra stilben oksidazın aktivasyonu sonucunda 42-72 saat sonra düşmeye başladığı belirtilmiştir[43]. Bu süreç, bitkinin stres faktörüne verdiği tepkiye ve stilben sentaz enziminin aktivitesine bağlı olarak değişebilir. Üzümde resveratrol sentezinin en fazla gerçekleştiği yer kabuğu sonrasında da çekirdeğidir. Üzümün meyve etinde ise çok düşük miktarlarda bulunmuştur. Resveratrol sentezlenen ikincil en önemli bileşik olmakla birlikte onun dışında birçok stilben bileşiği de bulunmaktadır. Bu bileşikler arasında en önemli arasında *trans*- ve *cis*-piceid (resveratrol glikoziti), ϵ -viniferin (*trans*-resveratrol dimeri), pterostilben (*trans*-3,5-dimetoksi-4'-tetrahidroksi-stilben), piceatannol (*trans*-3,3',4,5'-tetrahidroksi-stilben) ve pallidol (*trans*-resveratrol dimeri) sayılabilir. Bu stilben bileşikleri de resveratrol gibi antioksidan özelliklere sahip olabilir ve sağlık yararları sağlayabilirler. Ancak, her bileşiğin kendine özgü özellikleri ve etkileri olması sebebiyle ayrı ayrı araştırılmaları gerekmektedir. Şekil 1.5’de en önemli birkaç stilben bileşiği

verilmiştir.



Şekil 1.5. En önemli birkaç stilben bileşiği.

Resveratrol ilk olarak 1940'larda *Veratrum grandiflorum* bitkisinde keşfedilmiştir[44]. Ancak, *Veratrum grandiflorum* bitkisi, resveratrolün en yaygın kaynakları olan üzüm ve diğer gıdalar gibi tüketim için uygun değildir. Daha sonra resveratrol, Japon madımağı (*Polygonum cuspidatum*) köklerinde bulunmuş ve geleneksel Çin ve Japon tıbbında kullanılmaktadır[45]. Resveratrolün kimyasal yapısı 1963 yılında belirlenmiştir. Ancak, farmakolojik ve tıbbi potansiyeli ancak 1990'ların sonlarında keşfedilmiş ve araştırmalara başlanmıştır. Günümüzde, resveratrolün antioksidan, anti-inflamatuar, antikanserojen ve metabolik hastalıklar gibi çeşitli sağlık sorunları üzerindeki etkileri üzerine birçok araştırma yapılmaktadır ve resveratrol bazlı ilaçlar üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Son on yıldır yapılan çalışmalarda resveratrolün varlığının ve miktarının tespiti için HPLC ve GC gibi yöntemler kullanılmıştır.

1.10. RESVERATROLÜN KULLANIMI VE BİYOYARARLANIMI

Bazı fonksiyonel bileşiklerin tüketiminden beklenen faydaların elde edilmesi, bileşiğin vücut tarafından ne kadar kullanılabilirdiği, yani biyoyararlılığı ile ilgilidir. Biyoyararlılık, tüketilen bileşiğin sindirim, absorpsiyon, metabolizma ve eliminasyon gibi süreçlerle nasıl etkileşime girdiğini ve sonuçta ne kadarının aktif bileşen olarak vücutta bulunabildiğini ifade eder. Tüketilen bileşiğin biyoyararlılığı, onun sağlık yararları açısından önemli bir faktördür. Ancak, birçok fonksiyonel bileşik, tüketim sırasında biyoyararlılığını etkileyen çeşitli sorunlarla karşılaşabilir. Bu sorunlar arasında, sindirim sistemi enzimlerinin aktivitesi, bileşiğin kararlılığı, yüksek pH değerleri, sindirim sistemi geçiş hızı, etkileşimler ve daha birçok faktör yer almaktadır. Dolayısıyla, fonksiyonel bileşiklerin biyoyararlılığı, tüketicilerin alınan bileşiğin faydalarını elde etme olasılıklarını arttırmak için dikkate alınması gereken önemli bir faktördür. Biyoyararlılık, vücutta etki göstermesi amaçlanan biyoaktif bileşiğin aktif formda ulaşabildiği düzeydir. Yapılan çalışmalar, ilaç, gıda ve beslenme alanındaki biyoaktif bileşiklerin biyoyararlılığının alınan gıdanın bileşiminden ve yapısından etkilendiğini göstermektedir. Örneğin, bir domates çalışmasında, domates sosuna zeytinyağı eklenmesinin fenolik bileşiklerin çözünürlüğü ve salınımını artırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, bir çikolata çalışmasında, çikolatadaki şeker varlığının flavanol biyoyararlılığını artırdığı belirtilmiştir[46]. Geçmişten günümüze sağlık üzerindeki etkileri bilinen resveratrolün bilim insanları tarafından potansiyel etkileri ilk kez 1992 yılında araştırılmaya başlanmıştır. Fransız paradoksu olarak bilinen, Fransızların genellikle yüksek miktarda doymuş yağlı yiyecekler tüketmelerine rağmen, kalp hastalığına yakalanmalarının diğer ülkelere göre daha düşük olmasını kırmızı şarap tüketimi sebebiyle olabileceği ortaya atılmış ve kırmızı şaraptaki resveratrol (RES) varlığı ilk kez tanımlanmıştır. Bu paradoks, 1980'lerin başında Fransız epidemiyolog Serge Renaud tarafından ortaya atılmış ve tartışılmıştır. Resveratrol, sindirim sistemi tarafından yeterince emilemeyen ve hızla metabolize olan bir bileşiktir. Bu nedenle, terapötik etkileri göstermek için yüksek dozlar gerekebilir. Yüksek dozlar alındığında, resveratrol vücutta hızla metabolize edilir ve aktif bileşenleri hızla kanda dolaşmaya başlar. Resveratrol, karaciğerde bir dizi enzimatik reaksiyonla metabolize edilir ve solunum, idrar yolu veya dışkı yoluyla vücuttan atılır. Resveratrolün biyoyararlanımı düşük olduğundan, bazı araştırmacılar daha etkili bir biyoyararlanım için yeni formülasyonlar geliştirmektedirler[47]. *Trans*-resveratrol insanlarda oral yoldan alındığında iyi emilir,

ancak hızlı metabolizması ve eliminasyonu nedeniyle biyoyararlanımı göreceli olarak düşüktür. Bu, *trans*-resveratrolün vücutta kısa süreli kalmasına ve aktif bileşenlerinin düşük konsantrasyonlarda kalmasına neden olur[48]. Sağlıklı erkek ve kadınlara 25 mg dozda oral *trans*-resveratrol verildiğinde, plazmada saptanan *trans*-resveratrol miktarı çok düşüktür. Bunun nedeni, *trans*-resveratrolün vücutta hızla metabolize olması ve metabolitlerinin oluşmasıdır. Bu metabolitler, aktif bileşenlerinin konsantrasyonunu artırır ve plazma konsantrasyonları 30-60 dakika sonra 2 µM/L civarında olabilir. Bu nedenle, *trans*-resveratrolün biyoyararlanımını artırmak için yeni formülasyonlar geliştirilmelidir. Ayrıca, *trans*-resveratrolün birçok farklı metaboliti olduğundan, bu metabolitlerin biyolojik etkilerinin de dikkate alınması gerekmektedir. Üzüm suyu gibi bazı gıdalarda bulunan *trans*-resveratrolün biyoyararlanımı, özellikle piceid gibi RES glukozitlerinin varlığı durumunda, düşük olabilir. Bu nedenle, gıdaların içerdikleri RES formunu ve miktarını dikkate alarak, RES'in biyoyararlanımını tahmin etmek zordur. Ayrıca, hücre kültürü çalışmalarında kullanılan RES konsantrasyonları, insanlarda alındığında ulaşılan doruk konsantrasyonlarından 10-100 kat daha yüksek olabilir. Bu nedenle, RES'in hücre kültürlerindeki etkileri, insanlarda alındığında gözlenen etkilerle aynı olmayabilir. İnsanlarda yapılan çalışmalar, RES'in metabolitlerinin etkisi altında kalan diğer dokuların olduğunu göstermektedir. Ancak, RES metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri hakkında çok az bilgi vardır ve bazı dokuların RES metabolitlerini tekrar RES'e dönüştürüp dönüştürmediği bilinmemektedir. Bu nedenlerle, RES'in insanlar üzerindeki etkilerini anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca, RES'in farklı formülasyonlarının ve dozajlarının etkilerini değerlendirmek de önemlidir.

RES'in genel olarak güvenli olduğuna ve kabul edilebilir günlük alımının belirlenebileceğine dair bulgular vardır. Yapılan hayvan ve insan çalışmaları, kısa süreli (28 günlük) ve uzun süreli (bir yıl) toksisite çalışmaları ve üreme ve gelişimsel toksisite çalışmaları, RES'in genellikle toksik olmadığını ve düşük doz seviyelerinde bile güvenli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar yüksek doz seviyelerinde, özellikle 1000 mg/kg/gün 'den daha yüksek doz seviyelerinde toksisite belirtileri göstermemiştir.

Bir belirsizlik faktörü kullanılarak insanlar için RES ADI (Resveratrol için kabul edilebilir günlük alım dozu) belirlenebilir. Bu belirsizlik faktörü, insanlarda güvenlik bilgisinin eksikliğini gidermek için kullanılan bir faktördür. Bu faktör, insanlarda kullanılan dozların hayvanlarda görülen toksisite seviyelerinden daha düşük olması

nedeniyle genellikle 100'e eşittir. Bu faktör, insanlarda RES'in güvenliği hakkında daha fazla bilgi edinilene kadar kullanılır[49]. Smoliga ve Blanchard, RES'in insanlarda düşük biyoyararlanımına sahip olması nedeniyle etkinliğini arttırmak için neler yapılması gerektiği konusunda bir derleme yazmışlardır. RES'in yaşlanma sürecini yavaşlatarak ve kronik hastalıkları önleyerek sağlıklı yaşam süresini artıracak önde gelen bir madde olduğunu belirtmişlerdir. Ancak, insanlarda RES'in zayıf biyoyararlanımı, temel bilimsel bulguların klinik faydaya dönüştürülmesi konusunda ciddi bir endişe kaynağıdır. Bazı olumlu sonuçlar elde edildiği halde, insan klinik çalışmalarından elde edilen sonuçların birçoğunun, kullanılan dozaj protokollerine bağlı olarak çelişkili olduğu bildirilmiştir.

Farklı yöntemler, RES'in biyoyararlanımını artırmak için geliştirilmiştir. Bu çözümler arasında gıdaların öğütülerek toz haline getirilmesi, ek fitokimyasalların ilave edilmesi, kontrollü salım sistemleri ve nanoteknolojik formülasyonlar yer almaktadır. Laboratuvar çalışmaları, bu yaklaşımların RES'in biyoyararlanımını ve klinik faydasını artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, insanlarda RES'in biyoyararlanımı hakkında sınırlı veri bulunmaktadır. Bu nedenle, insanlarda RES'in biyoyararlanımını optimize etmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Wenzel ve Somoza tarafından yapılan bir derlemede *trans*-RES'in metabolizması ve biyoyararlanımı incelenmiştir. RES'in bitkilerde çoğu stilben antifungal fitoaleksinin gibi davrandığı, genellikle enfeksiyon veya yaralanmaya yanıt olarak sentezlendiği ve üzüm, şarap, yer fıstığı ve yer fıstığı ürünleri gibi besin kaynaklarının önemli bir bileşeni olduğu belirtilmiştir. Antioksidan, anti-inflamatuar, östrojenik, antikanser ve kemopreventif etkileri RES'in başlıca biyolojik etkileri olarak özetlenmiştir. Bu derlemede, emilim, metabolizma ve biyoyararlanımı çeşitli *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* modeller kullanılarak ele alınmıştır. Sonuçlar, RES'in yaklaşık %75'inin emilim ve metabolizma sonrasında dışkı ve idrar yoluyla atıldığını göstermiştir. Oral biyoyararlanımın, hızlı ve kapsamlı metabolizma nedeniyle neredeyse sıfır olduğu rapor edilmiştir. RES'in konjugatlarının biyolojik aktivitesinin gelecekteki araştırmalarda dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır[48].

1.11. RESVERATROLÜN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ

Bugüne kadar, resveratrolün birçok biyolojik dokuda etkileri araştırılmıştır. Resveratrolün antioksidan, anti trombosit, kalp koruyucu, damar gevşetici, antikanserojen ve anti inflammatuar etkileri kanıtlanmıştır. Ancak, etki mekanizmaları tam olarak

aydınlatılamamıştır.

1.11.1. Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Resveratrol'ün kardiyovasküler sisteme olan etkileri ve etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, damarların kasılma ve gevşeme yanıtları üzerinde endotel hücrelerinin rolü ve endotelden salınan nitrik oksidin etkileri ortaya konulmuştur. Resveratrol ile yapılan ilk çalışmalar üzüm kabuğu ekstraktlarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, üzüm kabuğundan elde edilen ekstraktın, sağlıklı sıçan aort halkalarında oluşturulan kasılma yanıtlarında anlamlı bir gevşeme etkisi oluşturduğunu ancak endotel çıkarılan halkalarda etkisi olmadığını göstermiştir[50]. Üzüm kabuğunun, kasılmaları etkileyerek gevşetici etki gösterdiği ve nitrik oksit ve GMP yolu üzerinden GMP artışına neden olduğu belirtilmiştir. Bu etkilerin sadece aortta değil, karaciğer, akciğer, böbrek, adrenal bezler, timüs, iskelet kası ve trake gibi diğer organlarda da gözlemlendiği ifade edilmiştir. Sıçan aortasında yapılan benzer bir çalışma da, resveratrolün nitrik oksit aracılı ve aracılı olmayan mekanizmalarla etkili olduğunu göstermektedir[51]. Resveratrolün damar genişletici etkileri üzerine yapılan bir araştırmada, dişi farelerin uterus arteri ve mezenterik arterleri kullanılmıştır. Bu çalışmada, resveratrolün etkisinin östrojen siklusu, nitrik oksit ve prostanoidlerle ilişkisi araştırılmıştır. Resveratrol, düşük konsantrasyonlarda nitrik oksit mekanizmasıyla etkileşime girebilirken, yüksek konsantrasyonlarda bu mekanizmayı etkilememiştir. Bu durum, resveratrolün hem nitrik oksit mekanizmasıyla hem de farklı yollarla damar genişletici etkiler sağlayabileceğini göstermektedir. Resveratrolün progesteron ve östrojen plazma düzeyleriyle ilişkisi ise belirlenememiştir. Ayrıca, obez ve normal kilolu fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, resveratrolün kasılmaları %95 oranında azalttığı gösterilmiştir[52].

1.11.2. Antioksidan Etkileri

Resveratrol, antioksidan özellikleriyle özellikle peroksi radikal süpürücü etkisiyle kalp koruyucu etkilere sahip olabileceği öne sürülmüştür. Dokularda lipid peroksidasyonu arttığında, istemi ve reperfüzyon hasarı ortaya çıkar ve buna bağlı olarak peroksi radikaller oluşmaktadır. Bir çalışmada, sıçan kalbinde oluşan istemi-reperfüzyon hasarında, resveratrolün malondialdehit düzeyini azalttığı gösterilmiştir. Bu etkisi, peroksi radikal süpürücü etkisi yüksek bir madde olan "trolox"dan daha fazla olmuştur. Ayrıca, demir ve bakır iyonlarından kaynaklanan malondialdehit düzeyini de azalttığı görülmüştür[53].

1.11.3. Anti trombosit Etkileri

Ateroskleroz ve kanserde, trombositlerde çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bu durumda trombosit aktivasyonu ve pıhtılaşma durumu artar. Resveratrol, trombositlerde ADP'nin rol oynadığı artışları engellemektedir. Trombositler alfa granüllerinde çeşitli pıhtılaşma faktörlerini taşırlar ve lipid peroksidasyonu trombositlerin uyarılmasına ve pıhtılaşma faktörlerinin salınmasına neden olur. Resveratrol, düşük konsantrasyonlarda protein salınımını inhibe ederken yüksek konsantrasyonlarda aktive olarak antagonist bir etki gösterir. Bir tavşan çalışmasında, yüksek kolesterol ve ADP'nin uyarılmasıyla oluşan trombosit salınımını resveratrolün engellediği görülmüştür[54].

1.11.4. Anjiyogenez Etkileri

Yeni kapiller damar oluşumu, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik süreçlerde gözlemlenmektedir. Ancak, kontrolsüz anjiyogenez birçok patolojik durumda ortaya çıkarak ve diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik enflamasyon, tümör büyümesi ve metastazdan sorumlu tutulmaktadır. Resveratrol, hidrojen peroksit gibi radikallerin inhibisyonu yoluyla büyüme faktörlerinin artışını destekler ve kapiller damar oluşumunu hızlandırarak yara iyileşmesine olumlu etki sağlamaktadır[55].

1.11.5. Antikanserojen Etkileri

Elde edilen veriler, resveratrolün birçok dokuda ribo nükleotid redüktaz enzim aktivitesini inhibe ederek antikanserojen etki gösterdiğini göstermektedir. Ayrıca, prostat kanseri ile ilgili kanser genlerini inhibe ederek androjenleri yeniden düzenlediği için prostat kanserinin önlenmesi ve tedavisine yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Hepatit hücrelerinde yapılan araştırmalar, resveratrolün sitokrom P450 aktivasyonunu önemli ölçüde azaltarak, aromatik hidrokarbonların kanserojen aktivitesini önleyebildiğini ve meme kanserini engellediğini göstermiştir[56].

1.11.6. Anti inflamatuvar Etkileri

İnflamasyon durumlarında, nitrik oksit salınımının arttığı bilinmektedir. Ancak, nitrik oksit fazlasının peroksi nitritlere dönüşerek hücrelerde toksik etki oluşturduğu da bilinmektedir. Anti trombosit, nitrik oksit sentazını inhibe ederek inflamasyon oluşumunu engeller. Aterosklerozun erken dönemlerinde nitrik oksit seviyesi artarken, ilerleyen dönemlerde T lenfositleri ve makrofajlardan nitrik oksit salınımının arttığı görülür. Etanolle birlikte verilen resveratrol, bu artışı önleyerek inflamasyona engel olmuştur[57].

1.12. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA METODLARI

1.12.1. Ekstraksiyon Teknikleri

Bitki örneğinden istenilen bileşiğin izolasyonu genellikle seçici ekstraksiyon yöntemleriyle gerçekleştirilir. Bu yöntemle, farklı çözücülerin kullanımı, artan polarite ve ardı ardına yapılan ekstraksiyon işlemleriyle bitkiden istenilen bileşiğin ayrılması sağlanmaktadır. Bu işlemde, öncelikle petrol eteri veya hekzan gibi lipofilik karakterde çözücü kullanılarak lipofilik bileşiklerin ayrılması sağlanmaktadır. Daha sonra artan polaritelerde çözücülerle ardışık olarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilir. Bu sayede bitki örneğinden istenilen bileşiğin seçici olarak izole edilmesi sağlanmaktadır.

Diğer bir yöntemde ise, bitki örneği öncelikle apolar bir çözücü ile işlem görerek lipofilik bileşiklerden arındırılır. Daha sonra düşük molekül ağırlıklı alkol veya sulu çözeltileriyle birkaç kez ekstrakte edilir. Elde edilen ekstraktların saflaştırılması ve bileşiklerin ayrılması için preparatif kağıt, TLC, kolon kromatografisi ve HPLC gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemde de amaç, bitki örneğinden istenilen bileşikleri seçici olarak izole etmektir.

1.12.2. Kromatografik Analiz Yöntemleri

Kromatografik analiz yöntemleri, bileşiklerin karışımlarından ayrılmasını, izole edilmesini veya tayin edilmesini sağlayan önemli bir tekniktir. Bu yöntemlerin temel prensibi, bileşiklerin bir hareketli faz (mobil faz) içinde birbirinden farklı hareketliliklere sahip olmasına dayanmaktadır. Kromatografik analiz yöntemleri, ayırma yapmak istenilen bileşiklerin fiziksel veya kimyasal özelliklerine göre seçilmektedir. Bazı kromatografik yöntemler, iyonik özellikler, polarite veya hidrofobiklik gibi kimyasal özellikleri kullanarak ayırma yaparken, diğerleri molekül ağırlığına, boyuta veya çözünürlüğe dayalıdır.

En yaygın olarak kullanılan kromatografik analiz yöntemleri:

Gaz Kromatografisi (GC): Gaz fazında yapılan bir kromatografi türüdür. Analitlerin uçuculuğuna bağlı olarak kullanılır.

Sıvı Kromatografisi (LC): Sıvı fazında yapılan bir kromatografi türüdür. Analitlerin çözünürlüklerine ve polaritelerine bağlı olarak kullanılır.

İyon Değişim Kromatografisi (IEC): Yüklü iyonları ayırmak için kullanılan bir

kromatografi türüdür. Özellikle biyokimyasal ve farmasötik uygulamalarda sıkça kullanılır.

Kağıt Kromatografisi: Analitlerin kağıt üzerinde hareketlerine bağlı olarak ayırmak için kullanılan basit bir kromatografi türüdür.

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC): Analitleri ince bir tabaka üzerinde hareketlerine bağlı olarak ayırmak için kullanılan bir kromatografi türüdür.

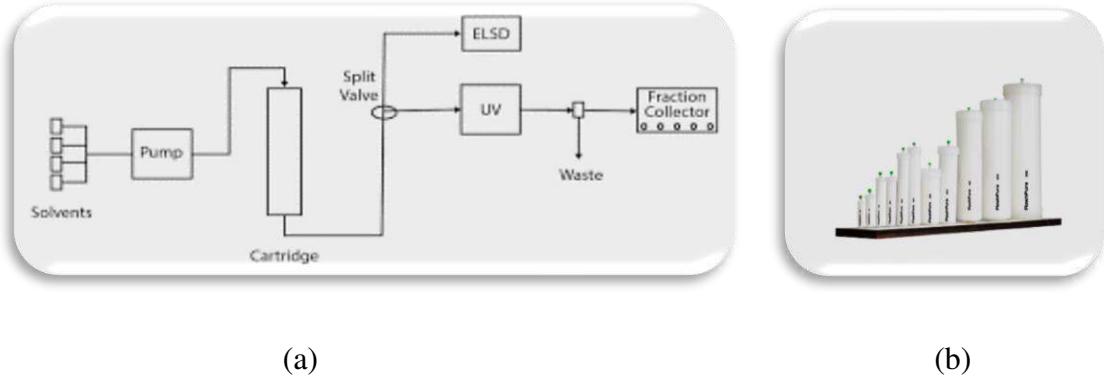
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC): Analitleri yüksek basınçlı sıvı fazında ayırmak için kullanılan bir kromatografi türüdür. HPLC, birçok farklı uygulama alanında kullanılmaktadır.

Kolon kromatografisi: Bir karışım içindeki bileşenleri ayırtmak için kullanılan bir kromatografik analiz yöntemidir. Bu yöntemde, hareketli faz olarak bilinen bir çözücü, bir kolon içinden geçirilirken sabit faz olarak bilinen bir dolgu malzemesi üzerindeki bileşenler ayrıştırılır. Kolon kromatografisinde, kolon içindeki dolgu malzemesi seçilen bileşenleri ayırmak için önemlidir. Genellikle silika jel, alümina, sephadex veya polimerik malzemeler kullanılır.

1.13. FLASH (FLAŞ) KROMATOĞRAFI

Bu tez çalışması kapsamında kullanılmış olan flash kromatografisi yöntemi son yıllarda popüleritesi giderek artan hızlı ve verimli bir ayırma yöntemi olarak kimya, biyokimya ve ilaç geliştirme alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Flash kromatografisi hızlı ve verimli bir kromatografi yöntemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem, yüksek saflıkta bileşiklerin büyük miktarlarda hazırlanmasına olanak tanımaktadır. Flash kromatografisinde, bir kolon içine yerleştirilen ve sıvı fazı içeren bir malzeme yatağı kullanır. Örnek, yatağın üstüne uygulanır ve sıvı fazın hareketiyle yataktan aşağı doğru akar. Farklı bileşenler, yatağın içinde farklı hızlarda hareket ederler ve böylece bileşikler ayrılırlar. Bu yöntem, daha yavaş kromatografi yöntemlerine göre daha hızlıdır ve büyük ölçekli ayrımlar için uygundur. Ayrıca, kolon boyutu ve yatağın malzemesi gibi parametrelerin kontrol edilmesi, verimliliği artırabilir ve saflığı artırabilir. Flash kromatografisi, organik sentezde kullanılan bileşiklerin saflaştırılması, bitki özütleri veya doğal ürünler gibi kompleks karışımlardan bileşiklerin ayrılması için de kullanılabilir. Flash kromatografisi, yüksek verimlilik, kolay uygulanabilirlik ve hızlı işlem süresi gibi avantajları nedeniyle, kromatografi alanında yaygınlığı giderek artan bir yöntemdir.

Adsorbent malzemenin seçimi, flash kromatografisinde ayrılacak bileşenlerin özelliklerine bağlıdır. Silika jel, en yaygın olarak kullanılan adsorbenttir. Ayrıca, alumina ve polistiren reçineler de kullanılabilir. Adsorbent malzemenin seçimi, ayrılacak bileşenlerin polaritesi, boyutu, yüklülüğü ve diğer özelliklerine göre belirlenir. Flash kromatografisinin bir diğer önemli bileşeni, kolon boyutudur. Kolon boyutu, ayrılacak bileşenlerin sayısı, çözücü akış hızı ve verim gibi faktörlere bağlı olarak seçilir. Genellikle, 4-20 cm aralığında değişen çapta kolonlar kullanılmaktadır. Şekil 1.6'da gösterildiği üzere flash kromatografi sistemlerinde farklı ebatlarda paketlenmiş silika-jel veya ters faz içerikli kartuşlar kullanılabilir. Flash kromatografisi sistemlerine baktığımızda kartuş, pompa ünitesi, eluent toplamak için fraksiyon ünitesi, enjeksiyon sistemi, dedektörler (UV,ELSD) gibi kısımlardan oluştuğu görülmektedir. Şekil 1.6'da flash kromatografi genel diyagramı ve kullanılan kartuşlar verilmiştir.

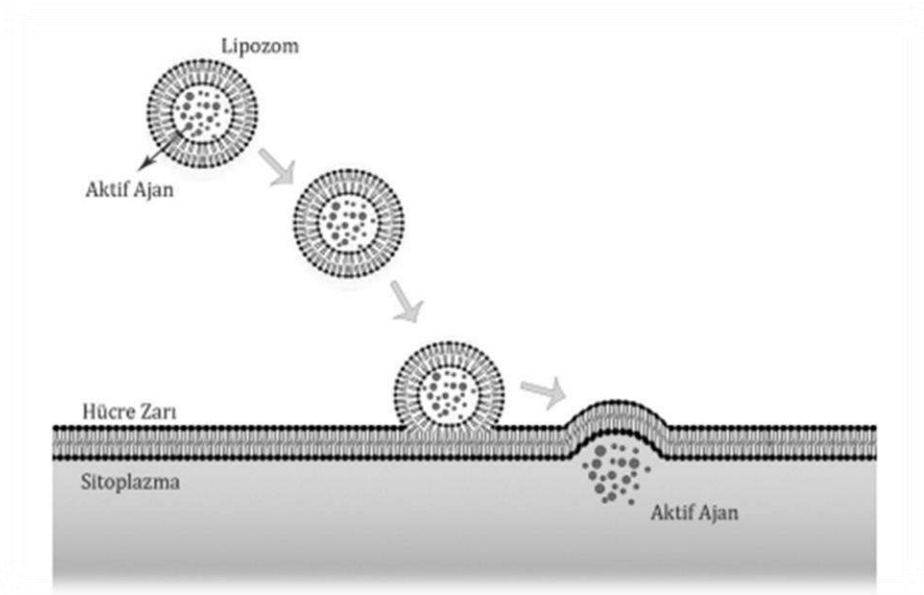


Şekil 1.6. (a) Flash kromatografi genel diyagramı, (b) Flash kromatografi kartuşları.

1.14. KONTROLLÜ İLAÇ SALIM SİSTEMLERİ

Son yıllarda biyoteknoloji, genomik ve kimya alanındaki gelişmelerle birlikte, çok çeşitli, daha güçlü ve spesifik terapötikler ortaya çıkmıştır. Ancak, düşük çözünürlük ve ilaçların birçoğunun çok yüksek ve/veya zayıf stabilitesi gibi sebepler nedeniyle, ilaçların etkinliği ve potansiyeli üzerinde bazı sorunlar gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle, ilaç salım sistemleri, daha güvenli ve etkili yöntemlerin ve cihazların kullanılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Kontrollü ilaç salım sistemleri, ilacı polimer bazlı diskler, çubuklar, topaklar, beadler, mikrokapsüller, mikroküreler, liposferler, mikro parçacıklar ve nanopartiküller gibi taşıyıcı sistemler aracılığıyla kontrollü bir şekilde salınmasını sağlar. Bu sistemler, ilacın biyofarmasötik, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini optimize etmek amacıyla en uygun rotanın belirlenmesiyle tasarlanmıştır. Ayrıca, ilacın kanda sabit bir

dozaj seviyesinde kalmasını sağlayarak dozaj sıklığı ve yan etkilerin azaltılması ve böylece hasta uyumunun artırılması hedeflenir. Kontrollü salım sistemleri, ilacın uygulama yolu ve mekanizmasına bağlı olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde zayıf çözünürlüğe sahip, stabilitesi ve biyoyararlanımı düşük olan moleküller için genellikle başvuru yöntem oral uygulamalardır. Bu yöntemde, ilaç salımının asidik mide ortamı gibi engelleri aşması istenmektedir. Bu amaçla, ilaçları bozulmaya karşı koruyabilen ve bunları gastrointestinal kanal içinde istenilen bölgeye ulaştıran ilaç taşıyıcı malzemeler kullanılmaktadır. Şekil 1.7’de taşıyıcı malzeme ile istenilen bölgeye yönelik ilaç salınımı verilmiştir.



Şekil 1.7. Taşıyıcı malzeme ile istenilen bölgeye yönelik ilaç salınımı.

1.15. ENKAPSÜLASYON

Bazı biyoaktif bileşikler, çevresel etkilere karşı ve proses koşullarında, saklama ve hatta tüketim aşamalarında düşük stabiliteye sahip olmaları nedeniyle teknolojik zorluklarla karşı karşıya kalmaktadır. Bu bileşiklerin stabilitesini etkileyen faktörler arasında, ışık, genellikle pH değeri 7'den büyük ortamlar, yüksek sıcaklıklar (60-80°C), oksijen varlığı, ortamdaki enzimler ve askorbik asit, sülfidler, kopigmentler ve metal iyonlar gibi maddelerin varlığı yer almaktadır. Bu nedenle, bu bileşiklerin stabilitesinin artırılması için çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalar, bileşikleri yukarıdaki faktörlerden korumak için çeşitli yöntemler içermektedir. Öte yandan stabilitelerinin korunmasının yanında bazı biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımının çok düşük olması da

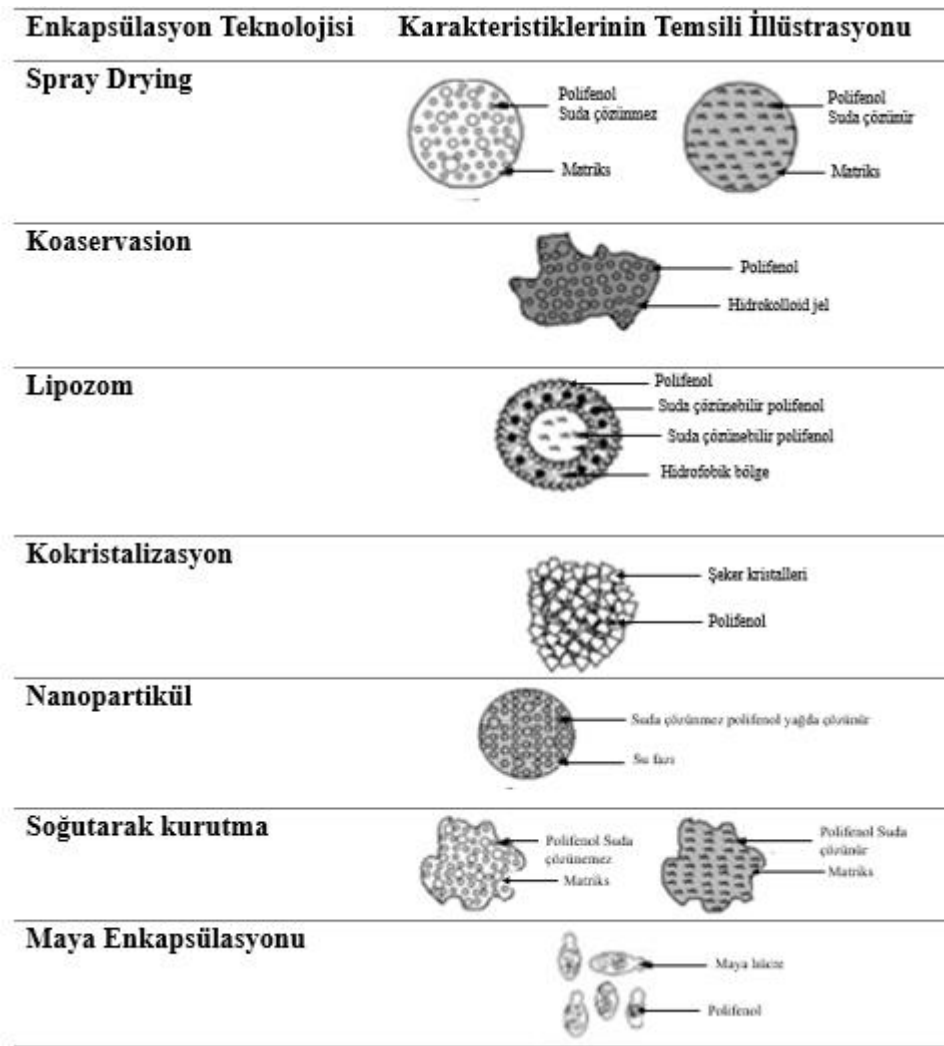
enkapsülasyonu için yeterli bir sebeptir. Bileşiklerin vücutta istenilen etkiyi gösterebilmeleri için yeterli düzeyde alınmaları ve etkili olmaları gerekmektedir. Düşük stabilitelerinin önlenmesi ve biyoyararlılığının arttırılabilmesi için çeşitli kapsülleme teknikleri geliştirilmiştir. Mikrokapsülleme, belirli şartlar altında, katı, sıvı veya gaz halindeki malzemelerin, içeriklerini kontrollü bir şekilde salabilen minyatür ve sızdırmaz kapsüller halinde paketlenmesi işlemidir[58]. Bu küçük paketler olan mikrokapsüller, boyutları mikron altından birkaç milimetre kadar değişebilen ve kullanılan malzemelere ve yöntemlere bağlı olarak farklı şekillere sahip olabilen yapılar olarak tanımlanabilir. Enkapsülasyon, gıda endüstrisi tarafından 75 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Son yıllarda fonksiyonel gıdaların önem kazanmasıyla birlikte, mikroenkapsülasyon işlemi gıda sektörü için daha da önemli hale gelmiştir. Genel olarak, gıda işleme kaplama teknolojisi, kuru üzüm, fındık, şekerleme gibi tüm bileşenlerin yanı sıra asitlik düzenleyicileri, kabartıcıları, yapay tatlandırıcıları, mineralleri, vitaminleri, antioksidanları, temel yağları, aromaları ve biyoaktifleri gibi çok küçük gıda bileşenlerinin kaplanması için makro kaplama (tüm bileşenler için) ve mikro kapsülleme (küçük parçacıklar için) tekniklerini içerir. Enkapsülasyon teknolojisi, bugün farmakoloji, kimya, kozmetik, gıda ve boya gibi çeşitli sektörlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır[59]. Geleneksel olarak, aroma maddeleri, vitaminler ve mineraller gibi etken içerikler, gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, daha yeni olan içerikler arasında probiyotik mikroorganizmalar ve biyoaktif bileşikler de yer almaktadır. Parçacık kaplama teknolojisi ise gıda endüstrisi tarafından potansiyel olarak kullanılabilir bir yöntem olarak görülmektedir ve çeşitli uygulama alanları keşfedilmektedir. Bununla birlikte, eczacılık ve tıp alanlarıyla kıyaslandığında, etken içeriklerin mikrokapsülasyonu henüz gıda endüstrisinde daha az yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomedikal alanda ise, ilaçların kontrollü salınımı sağlamak için matrislerin geliştirilmesi aktif bir araştırma alanıdır. Eczacılık ve tıp alanlarında elde edilen bu kapsamlı bilgiler, yeni fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi amacıyla da kullanılabilir[60].

1.15.1. Enkapsülasyon Yöntemleri

Enkapsülasyon yöntemleri arasında birçok farklı seçenek mevcuttur ve hangi yöntemin tercih edileceği, hedeflenen bileşiklerin özelliklerine, uygulama alanına ve amaçlanan kullanım şekline bağlı olarak değişebilir. Püskürtmeli kurutma, püskürtmeli soğutma ve akışkan yataklı kaplama yöntemleri, sıvı veya eriyik haldeki bileşenlerin kuru toz formuna dönüştürülmesinde sıklıkla kullanılırken, ekstrüzyon yöntemi ise hamur

halindeki bileşenlerin şekil verilerek kapsülleştirilmesinde etkilidir. Kokristalizasyon ve koaservasyon yöntemleri, tercih edilen bileşikler arasında çözünürlük farkı olanlarda uygulanabilirken, emülsiyon oluşturma yöntemi yağ içeren bileşiklerin kapsülleştirilmesinde sıkça tercih edilir. SFE yöntemi ise sıvı haldeki bileşenlerin düşük sıcaklık ve basınç altında gaz haline dönüştürülerek kapsüllemesine olanak tanır.

Bu tez çalışması kapsamında, çözücümüzün alkol içerikli olması sebebiyle liyofilizasyon yöntemi kullanılmış olup iyi verimde, yüksek kaliteli, küçük boyutlu, topaklanmayan, hızla çözünebilir ve yüksek stabilitedeki kapsüller elde edilmiştir. Şekil 1.8’da enkapsülasyon yöntemlerinin karakteristiklerinin temsili illüstrasyonu verilmiştir.



Şekil 1.8. Enkapsülasyon yöntemlerinin karakteristiklerinin temsili illüstrasyonu.

Dondurarak kurutma işlemi, materyalin dondurulmasını, ardından vakum altında su buharlaştırılarak materyalin kurutulmasını içerir. Bu yöntem, ısıya duyarlı bileşenlerin ve mikroorganizmaların korunması için idealdir, çünkü düşük sıcaklıklarda işlem

yapıldığından, sıcaklık nedeniyle bileşenlerin zarar görmesi engellenir. Bu yöntem ayrıca, kapsüllenen bileşenlerin uzun süreli depolanması için de uygun olan düşük nem içeriği sağlar. Ancak, yüksek enerji ihtiyacı ve uzun işlem süresi, bu yöntemin dezavantajları arasındadır. Elde edilen biyoaktif bileşiklerin stabilizasyonunda ve saklanmasıyla sıklıkla kullanılan bir yöntem olan liyofilizasyon, suyun katıdan gaz haline geçtiği bir kurutma işlemidir. Özellikle proteinler, enzimler, aşılarda, hormonlar, antikorlar gibi ısıya ve nem değişimine duyarlı biyolojik materyallerin saklanması ve işlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Liyofilizasyon işlemi, öncelikle ürünün dondurulmasıyla başlar. Daha sonra düşük basınç altında, özel bir buharlaştırma cihazı kullanılarak su buzdan gaz haline geçirilir ve üründen uzaklaştırılır. Bu şekilde ürünün yapısı bozulmadan su alınmış olur. Liyofilizasyon işleminin avantajları arasında, ürünlerin özgün yapısının korunması, uzun raf ömrü, taşıma ve depolama kolaylığı, hafiflik ve çevre dostu olması yer almaktadır. Liyofilizasyonun uygulama alanları oldukça geniştir. Bunlar arasında gıda endüstrisi, ilaç endüstrisi, biyoteknoloji, tıp ve veterinerlik yer almaktadır. Özellikle ilaç endüstrisinde, aşılarda ve diğer biyolojik ürünlerin stabilizasyonu ve saklanması için sıkça kullanılmaktadır.

1.15.2. Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri

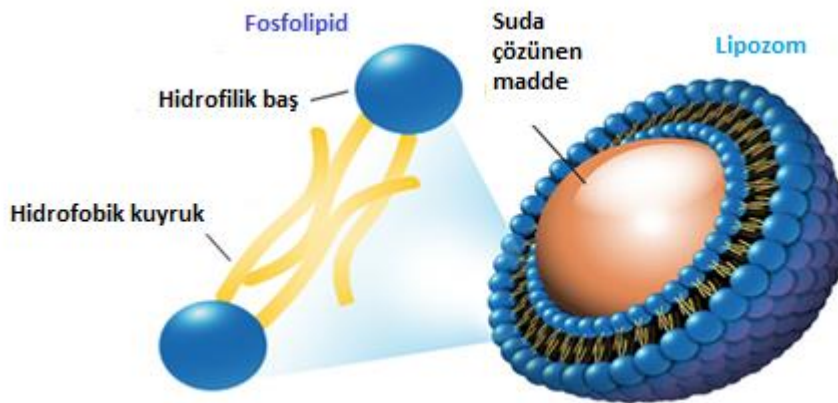
Enkapsülasyon teknolojisinde kullanılan kaplama materyalleri yardımcı madde olarak önemli bir role sahiptirler. Biyoaktif bileşimi kapsüllemek için, öncelikle kapsülleme matrisi olarak uygun bir kaplama malzemesi seçilmesi en birinci işlemdir. Mikrokapsülasyon sürecinde kullanılan kaplama maddeleri, malzemelerin özelliklerine ve hedeflenen mikrokapsül özelliklerine bağlı olarak geniş bir doğal veya sentetik polimer yelpazesinden seçilebilir. Kaplama malzemesinin kompozisyonu, mikrokapsüllerin işlevsel özelliklerinin ve belirli bir içeriğin performansının geliştirilmesinde kilit rol oynar. İdeal bir kaplama malzemesi, yüksek konsantrasyonlarda iyi reolojik özelliklere sahip olmalıdır ve kapsülleme sürecinde kolaylıkla kullanılabilir olmalıdır. Ayrıca, aktif malzemeyi homojen bir şekilde dağıtabilmeli ve emülsiyon haline getirebilmeli, üretilen emülsiyonu dengeleyebilmeli, işleme ve depolama süresince kapsüllenecek malzemeye reaksiyona girmemeli, aktif içeriği içinde tutabilmeli ve çevresel koşullara (örneğin, oksijen, ısı, ışık ve nem) karşı maksimum koruma sağlayabilmelidir. Ayrıca, kaplama malzemesi, gıda sanayisi tarafından kabul edilebilir çözünürlük oranına sahip olmalı, biyoaktif madde ile kimyasal reaksiyona girmemeli ve düşük maliyetli olmalıdır. Yaygın olarak kullanılan kaplama materyalleri Çizelge 1.3’de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Yaygın olarak kullanılan kaplama materyalleri.

Karbonhidrat	Nişasta, maltodekstrin, mısır şurubu katıları, dekstran, değiştirilmiş nişasta, sakkaroz, siklodekstrin
Gum	Akasya sakızı, agar, sodyum alginat, karagenan
Lipid	Mum benzeri, parafin, balmumu, tristearik asit, diasilgliserol, monoakilgliserol, sıvı yağlar, katı yağlar, katılaştırılmış sıvı yağlar, Lesitin
Protein	Gluten, kazein, jelatin, hemoglobin, peptit

1.15.3. Kaplama Materyali Olarak Lipozom

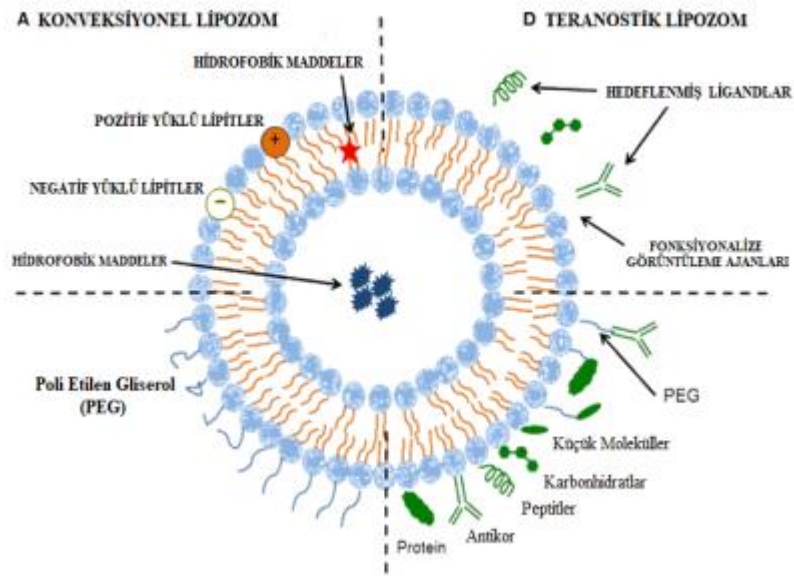
Lipozomlar, yapay mikroskobik keseciklerdir. Bu kesecikler, bir veya daha fazla eş-fosfolipid tabakasıyla çevrili olan ve merkezde ve katmanlar arasında hidrofilik bir bölme bulunan yapılardır. Aktif madde, lipozomun iç hidrofilik bölgesinde veya birden fazla fosfolipid tabakası arasında yer alabilir. Lipozomlar, boyutları ve tabakalarına bağlı olarak dört farklı türde sınıflandırılır[61]. Lipozomlar, küçük tek tabakalı kesecikler (SUV'lar), büyük tek tabakalı kesecikler (LUV'lar), çok tabakalı kesecikler (MLV'ler) ve çok hücreli kesecikler (MVV'ler) olarak adlandırılırlar. SUV tipi lipozomların boyutları 20 ila 100 nm arasında değişirken, 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 1.9'da görülmektedir.



Şekil 1.9. Lipozomun yapısı.

Lipozomlar çevresel etkilere karşı dayanıklılıkları ve suda çözünen bileşenleri hidrofilik merkezde suda çözünmeyen aktif bileşenleri ise hidrofobik merkezde tutma yetenekleri sayesinde biyolojik olarak uygun materyallerdir. Yan etkileri olmayan biyouyumlu lipozomlar biyoaktif bileşenleri hücre içine ve hücre bölümlerine ulaştırabilen yegâne taşıyıcıdır. Ayrıcı lipozomların boyutları da işlemlerle kolaylıkla ayarlanabilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle, lipozomlar birçok alanda kullanılmaktadır[61].

Çalışma kapsamında, biyolojik membranların temel bileşenlerinden biri ve doğal olarak çeşitli kaynaklarda bulunan lesitin kullanılmıştır. Emülsiyon üretiminde yüzey aktif madde olarak önemli bir rol oynamasının yanı sıra kapsülleme işlemlerinde de kullanılmasıyla avantaj sağlamaktadır. Lesitin kapsüllerinin oluşumu düşük ısılarda gerçekleştirilebilmekte, bu da enzimlerin kapsüllenmesinde kullanılabilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, tatlandırıcılar ve aroma bileşenleri gibi diğer aktif içeriklerin kapsüllenmesinde de lesitin ve polietilen karışımı kullanılmaktadır. Lesitin ayrıca besleyici bir madde olduğundan besin takviyelerinde de kapsüllenecek kullanılabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde, lesitin kaplama materyali olarak kullanımı avantaj sağlamaktadır[62]. Şekil 1.10'de lesitin farklı karakterde maddeleri tutma şekilleri verilmiştir.



Şekil 1.10. Lesitin farklı karakterde maddeleri tutma şekilleri.

1.16. *İN VİTRO* GASTROİNTESTİNAL SİSTEM

Sindirim süreci, vücudumuzun besinleri kullanılabilir hale getirmek için karmaşık bir sistem olan gastrointestinal sisteminin bir parçasıdır. Besinlerin vücuda alınmasından başlayarak ağızdan anüse kadar ilerleyen bu süreçte, enzimlerin ve hormonların sentezlenmesi ve salınımı, besinlerin sindirimi, emilimi ve atılımı gerçekleşir. Sindirim süreci, mekanik ve kimyasal olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Mekanik sindirim, ağızda çiğneme ve mide-barsak hareketleri ile gerçekleşir. Besinlerin fiziksel olarak parçalanması ve öğütülmesi bu aşamada meydana gelir. Kimyasal sindirim ise, parçalanmış besinlerin tükürük, mide asitleri, safra, karaciğer, pankreas ve barsak enzimleri gibi sindirim sıvılarıyla etkileşerek, dolaşıma geçebilecek formda dönüşümünü içerir. Bu aşamada besinlerin moleküler yapısı değişir ve sindirim ürünleri oluşur. Sindirim sistemi, farklı bölgelerde değişen pH değerlerine sahiptir. Mide sıvısı, asidik bir ortamda bulunur ve pH değeri 1.5-3.5 arasındadır. Bu asidik ortamda, besinlerin parçalanması ve sindirimi gerçekleşir. Barsak sıvısı ise, daha bazik bir ortamda bulunur ve pH değeri genellikle 7.5-8.5 arasındadır. Bu bazik ortamda, sindirim sürecinin son aşamaları tamamlanır ve besinlerin emilimi gerçekleşir. Çizelge 1.4’de sindirim sisteminin bazı bölgelerinin pH değerleri verilmiştir.

Çizelge 1.4. Çizelge sindirim sisteminin bazı bölgeleri ve pH değerleri.

ANATOMİK BÖLGE	GIDA KALIŞ SÜRESİ	pH
Ağız	1 dakikaya kadar	
Mide	1-3 saat	~ 1,5- 4,0
İnce Barsak	1-5 saat	~ 4,0- 7,0

İn vitro sindirim sistemlerinde amaç, hazırlanan kapsüllerin sindirim sistemindeki davranışları incelenerek kapsüllenmemiş materyal ile karşılaştırılmasının da yapılarak kapsüllemenin etkisinin tespitini yapmaktır. Bu amaçla; pH değerleri değişen (mide sıvısı pH 1,5 ve barsak sıvısı pH 6,8-7,4) ortamlar vücut ısısı (37°C) altında hazırlanarak sindirim sistemi taklit edilip kapsüllerin salınım özellikleri incelenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

2.1.1. Materyal Temini

Araştırmada kullanılan üzüm posalarının teminini sağlama aşamasında şarap fabrikaları ve meyve suyu fabrikaları ile iletişime geçilerek Kırklareli, Manisa, Ankara olmak üzere 3 farklı yöreden temin edilmiştir. Fabrika aracılığı ile atık ürünlerin ağustos ayından itibaren toplanması sağlanmıştır. Üzüm bitkisinin hasat zamanına dikkat edilerek toplanmıştır. Çalışmamızda kullanılan üzüm posalarının türleri ve elde edildikleri bölgeler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Deneyde kullanılan materyaller.

TEMİN EDİLEN MATERYAL HAKKINDA BİLGİLER				
Materyal	Üzüm Türü	Temin edilen bölge	Rakım (m)	Temin edilme zamanı
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Kırklareli, Merkez Kavaklı Bld.	171	Ekim
	<i>Michelle Paliero</i>	Manisa, Yunusemre Mah.	180	Ağustos
	<i>Kalecik Karası</i>	Ankara, Akkuzulu Mah.	1094	Eylül

2.1.2. Kimyasal Maddeler

Sigma-Aldrich firmasından temin edilen, *trans*-Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$) etken madde standart olarak kullanılmıştır. Kapsülleme aşamasında kullanılan Lesitin Alfasol firmasından temin edilmiştir. Ekstraksiyon ve analiz işlemleri için kullanılan çözücüler hplc grade çözücüler kullanılmıştır. Salınım aşamalarında tampon çözelti hazırlanmasında kullanılan $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, NaOH ve HCl kimyasallar Merck Millipore firmasından temin edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Manyetik karıştırıcı: Ekstraksiyon ve kapsülasyon aşamalarında Biosan (Magnetic Stirrer MSH-300) manyetik karıştırıcı kullanılarak hazırlanmıştır. Heidolph Hei-Vap Value HL/G1 marka Rotary Evaporatör: Solvent evaporasyonu basamaklarında kullanılmıştır. HPLC analizleri Shimadzu markalı LC-20AT model cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kütle

ölçümleri Shimadzu markalı LC-MS/MS8030 Plus ile gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış maddenin H-NMR ölçümleri JEOL ECZ500R (11.75 Tesla) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olan resveratrol yüklü Lesitin mikroküreleri ve boş Lesitin mikrokürelerinin elektron mikrografları, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak alınmıştır (Merkez Laboratuvarı).

2.2. YÖNTEM

Üzüm posası farklı ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilmiş ve en verimli metot nihai ekstraksiyon metodu olarak belirlenmiştir. Yapılan ekstraksiyon çalışmaları 6 başlık altında toplanabilir.

- Üzüm posalarının ekstraksiyona hazır hale getirilmesi
- Üzüm posası kurutma işlemleri
- Resveratrol miktarı en yüksek üzüm posasının belirlenmesi
- Ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi
- Farklı ekstraksiyon metotlarının uygulanması
- Ekstraksiyon verimlerinin karşılaştırılması

Üzüm posalarından resveratrolün ekstraksiyonunun yapılabilmesi için öncesinde materyalin ekstraksiyona hazır hale getirilmesi gerekmektedir. Bunun için ilk olarak atık posalardaki diğer safsızlıkların giderilmesi, çürük kabukların ayıklanması ve su ile toz giderimi gibi temizleme işlemlerinin yapılması gerekmektedir.

2.2.1. Üzüm Posası Kurutma İşlemleri

Kurutma işlemleri yapılırken etken maddenin en yüksek verimde elde edilmesi amaçlanarak en uygun kurutma yönteminin belirlenmesi amacıyla üç farklı yöntem denenmiştir. Etüvde 40 °C de, dışarda açık ortamda ve dışarda kapalı ortamda kurutmadır. Nem düzeyi %30'dan %2'ye düşünceye kadar kurutma işlemi yapılmıştır. Kurutma işlemi sonrasında materyalimize 110 W paslanmaz çelik öğütücü bıçaklı taşınabilir bir mekanik parçalayıcı kullanılarak öğütme işlemi yapılmıştır. Şekil 2.1'de öğütülmüş ve ekstraksiyona hazır hale getirilmiş üzüm posası verilmiştir.

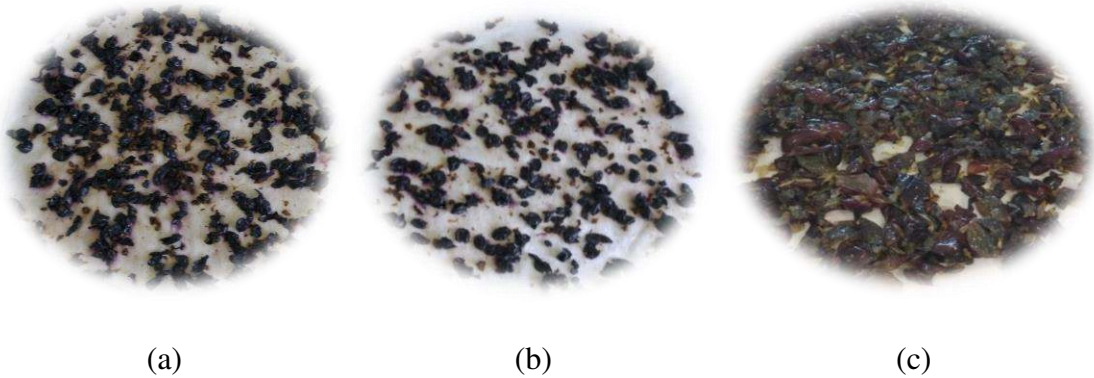


Şekil 2.1. Öğütülmüş üzüm posası.

Bu üç farklı yöntem ile kurutulup öğütülen posalar etanol ile ekstrakte edilerek resveratrol miktarı en yüksek kurutma yöntemine karar verilmiştir. Ekstraksiyon prosedürü genel olarak 10 gram bitki materyali ile uygun solvent (1:10) oranında karıştırıldı. 3 saat boyunca bu karıştırma işlemine devam edilecek şekilde tasarlanmıştır. Süzülerek filtrat ayrıldı. Süzüntü evapore edilerek geriye kalan katı madde 5 mL etanol ile çözündürülerek 0,45 µm'den filtrelenerek ayrı ayrı viallendi. HPLC' de gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçlar neticesinde kurutma yöntemi belirlendi. Analiz sonuçlarına bölüm 3.2'de yer verilmiştir.

2.2.2. Resveratrol İçeriği En Yüksek Üzüm Posasının Belirlenmesi

Çalışmamız kapsamında üç farklı bölgede şarap ve meyve suyu fabrikalarından üzüm posası temini yapılmıştır. Şarap ve meyve suyu fabrikalarının kullanmış oldukları üzüm türleri farklılık göstermesi sebebiyle atık üzüm posalarındaki resveratrol miktarları da değişkenlik göstermektedir. Öncelikle etken madde miktarının en yüksek olduğu üzüm posa türünün belirlenmesi amacıyla ekstraksiyon işlemleri yapılmıştır. Şekil 2.2'de farklı üzüm türleri verilmiştir.



Şekil 2.2. (a) Kalecik karası, (b) *Cabernet sauvignon* ve (c) *Michelle paliero*.

Ekstraksiyon prosedürü genel olarak 10 gram bitki materyali ile uygun solvent (1:10) oranında karıştırıldı. 3 saat boyunca bu karıştırma işlemine devam edildi. Süzülerek filtrate ayrıldı. Süzüntü evapore edilerek geriye kalan katı madde 5 mL etanol ile çözdürülerek 0,45 µm'den filtrelenerek ayrı ayrı viallendi. Analiz sonuçlarına bölüm 3.3' de yer verilmiştir. Çizelge 2.2'de gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları verilmiştir.

Çizelge 2.2. Gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları.

Üzüm posası türü	Ekstraksiyon Çözücü	Çözücü oranı	Süre
<i>Cabernet Sauvignon</i>	Etanol	1/10	3 saat
Kalecik Karası	Etanol	1/10	3 saat
<i>Michelle Paliero</i>	Etanol	1/10	3 saat

2.2.3. Ekstraksiyon Denemeleri

Ekstraksiyon denemelerinde ilk olarak klasik çözücü ekstraksiyonundan yararlanılarak çözücü, sıcaklık ve süre parametreleri belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon parametreleri belirlendikten sonra farklı ekstraksiyon metotları da denenerek resveratrol miktarları karşılaştırılmıştır. Resveratrolün ekstraksiyonu için birçok farklı metot vardır. Fakat amaç, en yüksek verimde etken madde teminini sağlayabilecek en uygun metodu belirleyebilmektir. Bu amaçla ekstraksiyon koşullarını belirlemek amacıyla literatür verileri de göz önünde bulundurularak ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar HPLC cihazında analiz edilip değerlendirilerek en uygun ekstraksiyon metodu belirlenmiştir.

2.2.3.1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonunda bağımsız değişkenler çözücü (etanol, metanol, saf su, MeOH-NH₄OH) konsantrasyonu (%50-80-100); sıcaklık (30-60-70-80 °C); ekstraksiyon süresi (30 dk- 1- 3 -24 saat) olarak seçildi. 10 g öğütülmüş üzüm posası 100 ml çözücüsü ile magnetik karıştırıcıda ekstrakte edildi. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml etanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmaları yapılan kadar -20°C'de saklanmıştır. Analiz sonuçlarına Bölüm 3.4.1'de verilmiştir. Çizelge

2.3’de Klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları verilmiştir.

Çizelge 2.3. Klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları.

Üzüm Posası (Gram)	Çözücü (V/V)	Süre (Saat)	Sıcaklık (°c)	Yöntem	Oran
10	Etanol	3	30	Karıştırma	1:5,1:10,1:1 5,1:20
10	%50 Etanol	3	30,70	Karıştırma	1:10
10	%80 Etanol	3	30	Karıştırma	1:10
10	%80 Etanol	30 dk	60	Karıştırma	1:10
10	%95 Etanol	1	70	Karıştırma	1:10
10	%100 Etanol	1	80	Karıştırma	1:10
10	%8 Metanol	1	30	Karıştırma	1:10
10	%100 saf su	12	30	Karıştırma	1:10
10	99,5 / 0,5 (Metanol- Amonyum hidroksit)	24	30	Karıştırma	1:10

2.2.3.2. Asidik Ortam Ekstraksiyonu

10 g öğütülmüş üzüm posası ile %1’lik hidroklorik asit içeren 100 ml saf su çözeltisi (v/v) 25°C’de 3 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Katı posa 100 ml etanol ile ekstrakte edildi. Tekrar süzme işlemi gerçekleştirilerek katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Evapore sonrası kalan katı ekstrakt, 10 ml etanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz

çalışmalarına kadar -20°C'de saklanmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 3.5'de yer almaktadır.

2.2.3.3. Refluks Etanol Ekstraksiyonu

10 g öğütülmüş üzüm posası 100 ml etanol çözücüsü içerisinde 2 saat boyunca refluks ekstraksiyonu uygulandı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml etanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz sonuçları bölüm Çizelge 3.5'de yer almaktadır.

2.2.3.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

Öğütülmüş üzüm posasından 10 gram alınıp 100 ml çözücü (etanol, metanol) eklenerek ultrasonik banyoda 25 ve 60°C sıcaklık 30 dakikalık zaman aralığında ekstrakte edildi. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Evapore sonrası kalan katı, 10 ml etanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzülüp ve viallendi. Analiz sonuçları bölüm Çizelge 3.5'de yer almaktadır.

2.2.3.5. Asit Hidrolizi

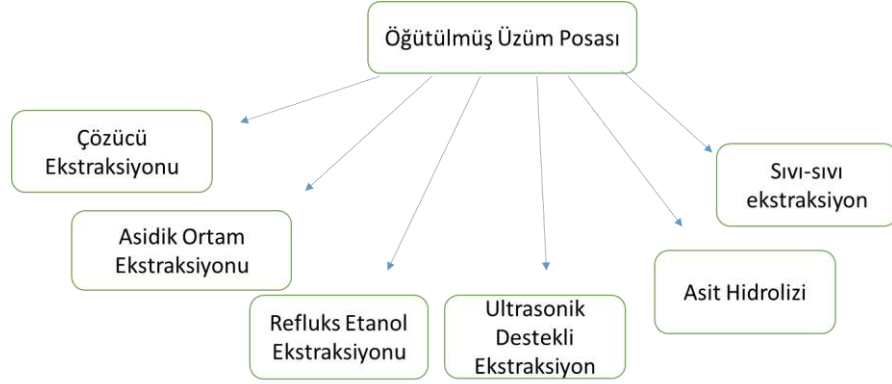
10 g öğütülmüş üzüm posası 100 ml etanol 20 dk 50°C' de ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işleminden toplanan süpernatant kısım hidroklorik asit kullanılarak pH 1'e ayarlandı, bu daha sonra geri akış altında 57°C'de 8 saat ısıtılır, bu, resveratrolün herhangi bir dimer veya trimerinin ve ayrıca glikozitlerin hidrolize edilmesini sağlamak içindir. Hidroliz etil asetat: eter karışımından yapılan bir ekstraksiyon solventi, bir ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu yoluyla sulu hidrolize edici solüsyondan resveratrol çıkarmak için kullanıldı (sıvı-sıvı ekstraksiyonundan önce sodyum karbonat kullanılarak pH 7'ye ayarlandı). Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen ekstrakt evapore edildi. Evapore sonrası kalan katı, 10 ml etanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzülüp ve viallendi. Analiz sonuçları bölüm Çizelge 3.5'de yer almaktadır.

2.2.3.6. Sıvı Sıvı Ekstraksiyon

10 g öğütülmüş üzüm posası 100 ml etanol çözücüsü 25°C'de 3 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Sıvı kısma 5ml saf su ve 35 ml hekzan ekstrakte edildi. Ayırma hunisine alınarak hekzan fazı ayrıldı. Bu işlem 2 defa daha tekrarlandı. Hekzan fazları birleştirildi ve etanol, su karışımı fazı evapore edilerek son hacmi 35 ml yapıldı. Sonrasında 25 ml etil asetat ve 25 ml saf su eklendi. Ayırma hunisine

alınarak fazların ayrılması beklendi. Etil asetat fazı ayrıldı ve kuruluğa kadar evapore edildi. 5 ml etanol ile viallendi. Analiz sonuçları bölüm Çizelge 3.5’de yer almaktadır.

Kısaca altı farklı ekstraksiyon yöntemi denenmiştir. Sonrasında karar verilen ekstraksiyon metodu üzerinden saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Bu çalışmada deneysel sürecin diyagramı Şekil 2.3’de verilmiştir.

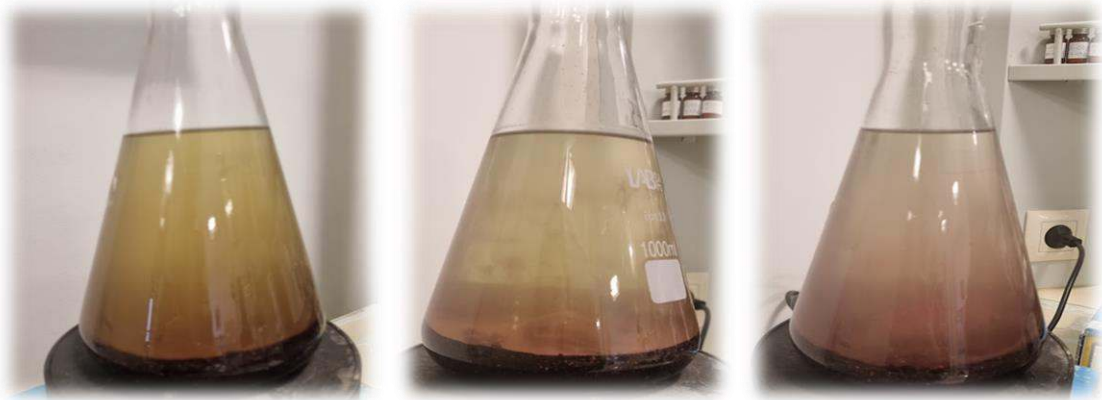


Şekil 2.3. Deneysel sürecin diyagramı.

2.2.4. Saflaştırma Denemeleri

2.2.4.1. Hekzan İle Ön Yıkama

10 g öğütülmüş üzüm posası ile 50(x3) ml hekzan çözücüsü 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve hekzan fazı ayrıldı. Ön yıkama işlemi uygulanan katı posa ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 3 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml etanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.5.1’de yer almaktadır. Şekil 2.4’da sırasıyla hekzan yıkamaları verilmiştir.



(a)

(b)

(c)

Şekil 2.4. (a) Birinci hekzan yıkama. (b) İkinci hekzan yıkama. (c) Üçüncü hekzan yıkama.

2.2.4.2. Adsorban Uygulaması

10 g öğütülmüş üzüm posası ile 100 ml etanol çözücüsü 25°C’de 3 saat boyunca karıştırıldı. Süzme işlemi gerçekleştirildi ve katı posa ayrıldı. Süzüntüye 0,5 g adsorban (aktif karbon, bioçar, alümina, florosil) eklendi ve 25°C’de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Adsorban süzülerek ayrıldı ve süzüntü ekstrakt evapore edildi. Elde edilen katı ekstrakt, 10 ml etanol ile çözdürüldü ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.5.2’de verilmiştir.

2.2.4.3. Silika Gel Kolon Kromatografisi

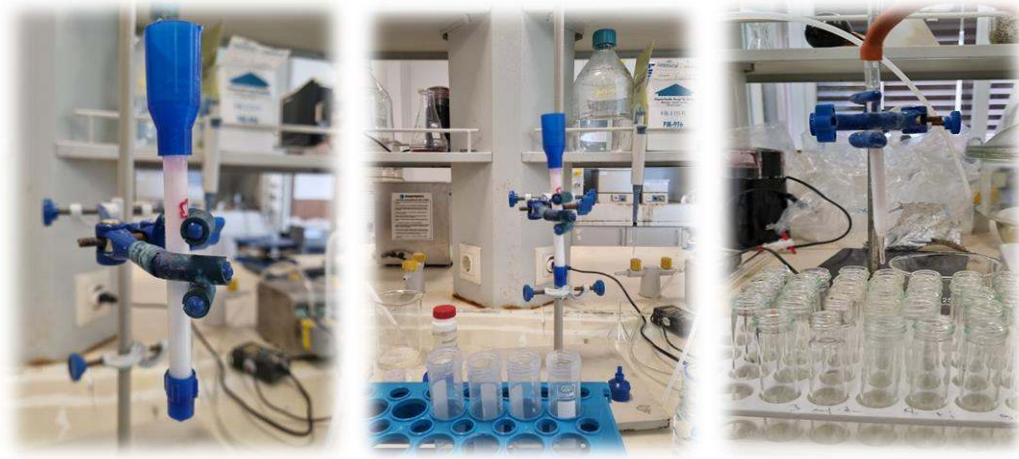
Açık cam kolon (2.5x21 cm) silica gel G60 ile dolduruldu. Ekstraksiyon sonrası evapore edildikten sonra kalan katı 2 ml etanolde çözdürüldü. Kolona yüklenmeden önce 4 mL kloroform-etil asetat-formik asit çözücü karışımı içinde yeniden çözüldü ve aynı bileşime sahip bir mobil fazla (25:10:1 kloroform, etil asetat ve formik asit) yürütüldü. Elüsyonlar, her biri 15 ml’lik 25 fraksiyon toplandı. Fraksiyonlar toplandı ve TLC ile analiz edildi. Sonrasında döner buharlaştırıcı ile vakum altında kurutuldu. 2 ml etanol içinde çözüldü ve ardından HPLC analizi için saklandı. Şekil 2.5Şekil 2.5’de kolon denemelerine ait fotoğraflar verilmiştir. Analiz sonuçları bölüm 3.5.3’de verilmiştir.



Şekil 2.5. Silika G60 kolon denemeleri.

2.2.4.4. Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi

Açık cam kolon sephadex ile dolduruldu. Ekstraksiyon sonrası evapore edildikten sonra kalan katı 100µl etanolde çözdürüldü. Kolona yüklenmeden önce 4 mL hekzan-etil asetat çözücü karışımı içinde yeniden çözüldü ve aynı bileşime sahip bir mobil fazla (heksan:etil asetat 9:1) yürütüldü. Elüsyonlar, her biri 1 ml'lik 10 fraksiyonda toplandı. Fraksiyonlar toplandı ve TLC ile analiz edildi. Sonrasında döner buharlaştırıcı ile vakum altında kurutuldu. 2 ml etanol içinde çözüldü ve ardından HPLC analizi için saklandı. Şekil 2.6'da kolon demelerine ait fotoğraflar verilmiştir. Analiz çalışmalarına kadar -20°C'de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.5.4'de verilmiştir.



Şekil 2.6. Sephadex LH-20 kolon denemeleri.

2.2.4.5. Flash Kromatografi

Estraksiyon basamaklarında karar verilen nihai metot ile elde edilen *trans*-resveratrolün saflaştırılması ve zenginleştirilmesi için denemeler yapılmıştır. Zenginleştirme metodunun belirlenmesi için farklı denemeler yapılmıştır. Denemelerde kullanılan kartuşlar SiliaSep™ C18 12 g ve SiliaSep™ HP 12 g olmak üzere iki tanedir. Çizelge 2.4’de yapılan denemeler verilmiştir. Farklı çözücü sistemleri ve akış hızlarında gradient sistemler uygulanmıştır.

Çizelge 2.4. Flash kromatografi metot denemeleri.

A Mobil Fazı	B Mobil fazı	Kartuş (12g)	Akış hızı (ml/dk)	%B değişim	Süre (dk)
Hekzan	Etil Asetat	C18 & Si	10,20,30,50	%0-100	30
Su	Metanol	C18 & Si	10,20,30,50	%0-100	30

Bu denemeler sonucunda diğerlerine göre daha iyi sonuç alınan metot Çizelge 2.5’de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Flash kromatografi metot.

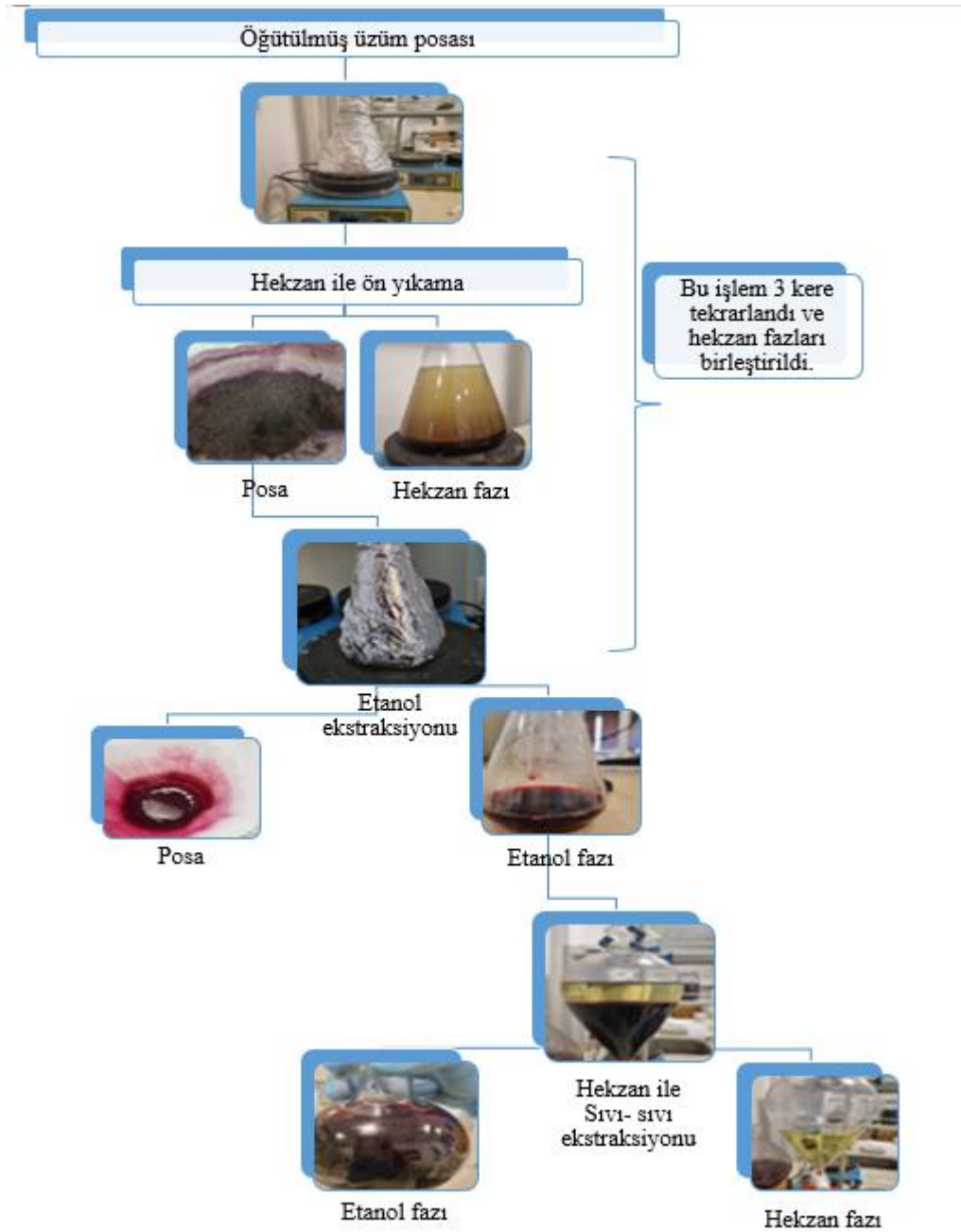
FLASH KROMATOĞRAFI METODU	
Kolon	SiliaSep™ C18 12 g
Akış Hızı	15 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	Ortam Sıcaklığı
Kolon Şartlama Süresi	2,0 dakika
Flash Modu	Sıvı Enjeksiyon
UV dalga boyu	ELSD ve 254, 265, 280, 305 nm
UV Threshold (Min.Eşik)	0,05 AU
UV Hassasiyeti	Düşük
Fraksiyon Toplama	Fraksiyon piklerini topla
A Mobil Fazı	Su
B Mobil Fazı	Metanol
Metod Süresi	30 dakika

Gradient yürütme metodu uygulanmıştır. Fraksiyonlar toplandı ve TLC ile analiz edildi. Sonrasında döner buharlaştırıcı ile vakum altında kurutuldu. 2 ml etanol içinde çözülde ve ardından HPLC analizi için saklandı. Analiz çalışmalarına kadar -20°C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 3.5.5’de verilmiştir.

2.2.5. Nihai Karar Verilen Ekstraksiyon Metodu

100 g öğütölmüş üzüm posası boyar madde giderimi amacıyla ön yıkama olması açısından 500 ml hekzan çözöcüsü ile 30°C’de 1 saat karıştırıldı. Bu işlem 2 defa daha tekrarlandı. Ardından süzme işlemi gerçekleştirildi ve posa alınarak hekzan fazı atıldı. Posa üzerine 500 ml Etanol/su (95:5) karışımı eklendi ve 24 saat boyunca 30°C’de magnetik karıştırıcıda ekstrakte edildi. Süzme işlemi uygulanılarak posa atıldı ve 2 defa daha aynı işlem

uygulandı. Tüm ekstraktlar birleştirildi. Birleştirilen ekstraktlara boyar madde giderimi ve diğer safsızlıklarında uzaklaştırılması adına hekzan ile sıvı- sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Çözeltinin son hacmi (500ml) kadar hekzan (500ml) eklendi. Ayırma hunisine alındı. Ayırma hunisinde çalkalanıp gazı alınarak fazların ayrılması için bir süre beklendi. Sonrasında hekzan fazı ayrılarak etanol fazı bir balonda toplandı. Ekstrakt çözeltisi döner buharlaştırıcıda son hacmi 10 ml olacak şekilde evapore edildi. Şekil 2.7Şekil 2.7’de *trans*-resveratrolün izolasyonu için nihai karar verilen ekstraksiyon yöntemi ve saflaştırma basamakları verilmiştir.



Şekil 2.7. *Trans*-resveratrolün nihai karar verilen ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları.

2.2.6. Nihai Karar Verilen Zenginleştirme Metodu

Bölüm 2.2.5’de geliştirilmiş ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilip son hacmi 10ml olan ekstrakt alınarak silica gel G60 kolon kromatografi ile zenginleştirilmesi yapılmıştır. Şekil 2.8’de resveratrolün kolon kromatografisi ile zenginleştirilmesi basamakları verilmiştir.

2.2.6.1. Ekstrakt İçin En İyi Mobil Fazın Belirlenmesi İçin TLC

İnce tabaka kromatografisi çeşitli çözücü karışımları ve oranları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun amacı resveratrolü kolon ile ayırmak için kullanılabilecek en iyi çözücü sistemini belirlemektir. Literatüre göre resveratrol için bazı TLC sistemleri geliştirilmiştir. Bu veriler içerisinde seçimler yapılarak denemeler yapılmıştır. Çizelge 2.6’da en iyi çözücü sisteminin belirlenmesi için TLC’de gerçekleştirilen çözücü karıştırıcı/oran listesi verilmiştir.

Çizelge 2.6. En iyi çözücü sisteminin belirlenmesi için TLC’de gerçekleştirilen çözücü karıştırıcı/oran listesi.

	Çözücü Sistemi / Karışım	Çözücü Oranı
1	Kloroform: Etanol	4:1
2	Kloroform: Etanol	7:2.5
3	Kloroform: Methanol	7:2
4	n-Hekzan: Etil Asetat	4:1
5	n-Hekzan: Etil Asetat: Asetonitril	7:2:1
6	n-Hekzan: Etil Asetat: Asetonitril	10:2:1
7	n-Hekzan: Etil Asetat	4:1.5
8	Kloroform: Etil asetat: Formik asit	20:9:1

Çözücü sistemi belirleme denemeleri yapıldıktan sonra en iyi çözücü sistemi seçildi ve kolon kromatografisinde bölüm 2.2.4.3’de anlatıldığı gibi yürütme yapıldı. TLC takibi yapılarak pozitif çıkan fraksiyonlar toplandı ve döner buharlaştırıcı ile vakum altında kurutuldu. 2 ml etanol içinde çözüldü ve ardından HPLC analizi için saklandı.



Şekil 2.8. Resveratrolün kolon kromatografisi ile zenginleştirilmesi.

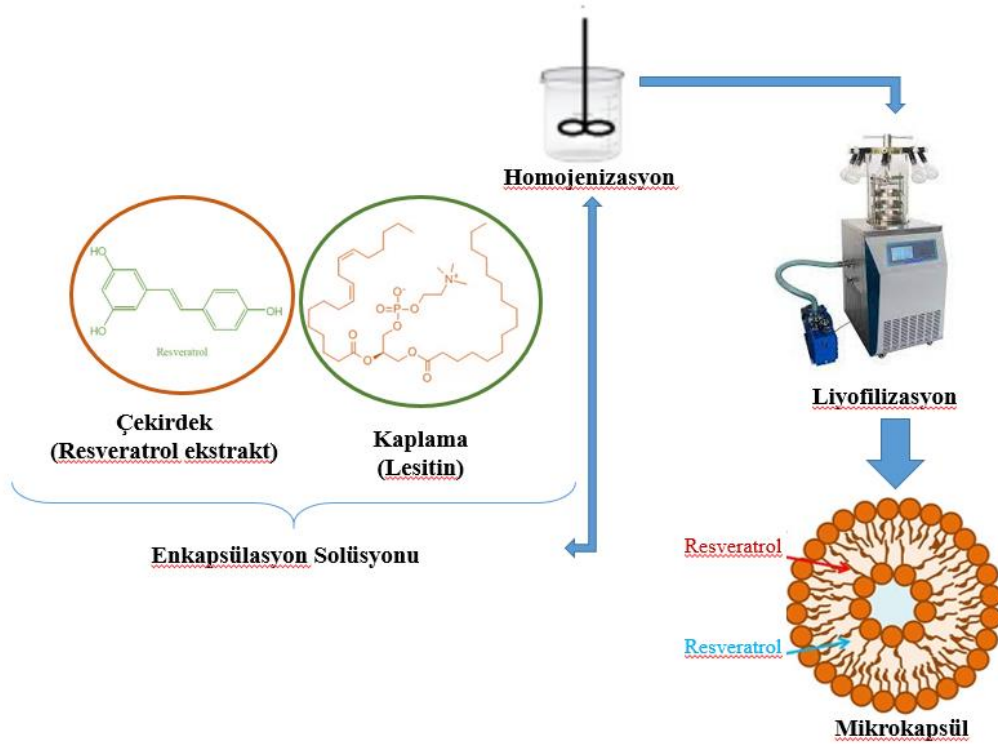
2.2.7. Homojenizasyon

Silika G-60 kolon kromatoğrafisinde zenginleştirilmiş ekstrakt homojenizasyon işlemi öncesi derin dondurucudan çıkarılarak çözülmesi sağlandı. Sonrasında etanolde çözünerek hazır hale getirildi. Farklı oranlarda kaplama maddesi ile karıştırılarak ön denemeler yapılmış ve optimum metod belirlenmiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar neticesinde, %2'lik lesitin tozu saf su içerisinde çözülerek bir gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı. Hazırlanan lesitin çözeltisi ve zenginleştirilmiş resveratrol karışımı (en az 100 ppm resveratrol olacak şekilde) 1:1 ve 1:2 olmak üzere iki farklı çekirdek: kaplama maddesi oranında karıştırıldı. Liyofilizatör işlemi öncesi 24 saat boyunca magnetik karıştırıcıda şiddetli karıştırılarak homojenize olmaları sağlandı.

2.2.8. Liyofilizasyon İşlemi ile Enkapsülleme

Liyofilizasyon işlemi için homojen hale getirilen etanol ve saf su içeren karışım liyofilizatöre konmadan önce 24 saat -20°C 'de donduruldu. Dondurulan ekstrakt -85°C sıcaklık ve 50 millitor basınç altında liyofilizatör cihazında kuruyana kadar 3 gün bekletildi. Liyofilizatörde kurutularak toz forma getirildi. Toz numuneler deneylerde ve analizlerde kullanılmak üzere nem almayacak şekilde desikatörde ve 4°C 'de saklandı.

Şekil 2.9 Şekil 2.9'da enkapsülasyon aşamaları verilmiştir.



Şekil 2.9. Enkapsülasyon aşamaları.

2.2.8.1. Enkapsülasyon Verimliliği

Lesitin ile kapsülleme işlemi sonrasında resveratrolün kapsül içerisine ne kadar başarılı bir şekilde hapsedildiğini ve korunduğunu ölçmek amacıyla elde edilen etken madde yüklü kapsüllerden 50 mg alınarak magnetik karıştırıcı da 10 dk süre ile 50 mL salım ortamında (etanol) bekletilmiştir. Elde edilen çözelti süzölmüş ve serbest etken madde miktarı HPLC analizi ile ölçölmüştür. Sonrasında aşğıdaki eşitlik kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon Verimliliği} = \frac{\text{Başlangıçtaki RSV miktarı} - \text{Serbest RSV Miktarı}}{\text{Başlangıçtaki RSV Miktarı}} \times 100$$

Buradaki eşitlikte belirtilen “başlangıçtaki RSV miktarı” enkapsülasyon verilerine göre kapsüllenen toplam resveratrol miktarıdır. Serbest RSV miktarı ise, kapsüllerin resveratrol çözücüsü içerisinde karıştırıldıktan sonra ölçölen çözeltideki ölçölen miktardır.

2.2.8.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ile Görüntü Analizi

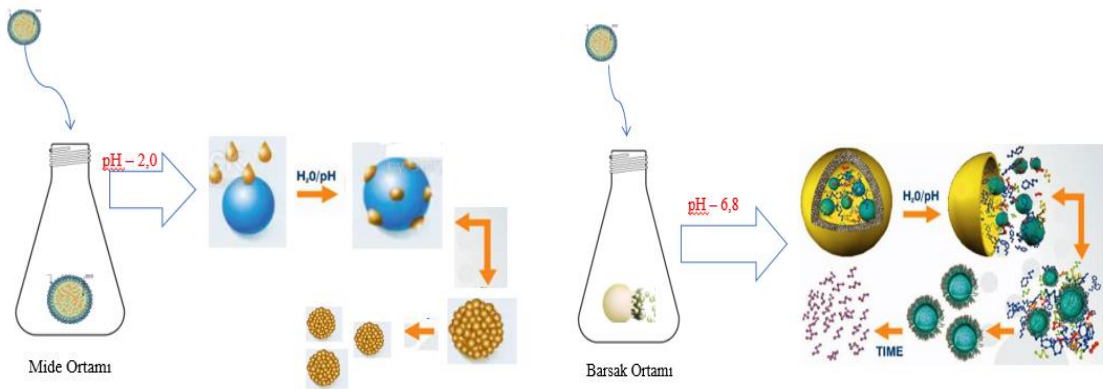
Taramalı elektron mikrofrafı (SEM), kapsülleme işlemlerinde resveratrol yüklü lesitin kapsüllerini karakterize etmek için faydalanılan yöntemlerdendir. Bu yöntem, dar bir

elektron ışını uygulayarak örnek yüzeylerinden yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etmek amacıyla kullanılır. Resveratrol yüklü lesitin ve boşlesitin kapsülleri farklı büyütme oranlarında elektron mikrografları alınmıştır. Büyütme oranları 500x, 1000x, 5000x olarak belirtilmiştir. Bu büyütme oranları, mikrokürelerin daha detaylı incelenmesini sağlar ve yapıları üzerindeki ayrıntıları gözlemlemeye olanak tanır.

Leistin ile enkapsüllenen resveratrol ekstraktının morfolojisi SEM (FEI Marka Quanta FEG 250 Model) cihazında 20kV artan voltajlı yüksek vakumda incelendi. İnceleme için görüntü 500x, 1000x ve 5000x yakınlaştırma ile alındı.

2.2.9. Resveratrol Yüklü Kapsüllerin *İn Vitro* Salınım Çalışmaları

Son yıllarda kapsülleme sonrası kapsüllenen molekülün biyoyararlanımının ölçülmesi için ilaç salınım sistemleri kullanılmaktadır. İlaç salınım sistemlerinde çalışmalar *in-vitro* ve *in-vivo* yapılabilir eğer ki metot doğru seçilirse bu iki yöntemde de sonuçlar birbirine yakın çıkmaktadır. *İn-vitro* çalışmalarla sindirim sistemi simülasyonları yapılmaktadır. Sindirim sisteminde görevli merkezler farklı pH değerlerine sahip yerlerdir. Bizim çalışmamızda *in-vitro* olarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde farklı kapsülleme materyalleri için sindirim sisteminde görevli en önemli yerlerden olan bağırsak ve midenin simülasyonları yapılmıştır. Midenin pH değeri, 1,5-4,0 arasında olup barsağın ise pH değeri 6,8-7,4 arasındadır. Literatürde yapılmış bazı çalışmalardan yola çıkarak zenginleştirmiş olduğumuz molekülün kapsülleme sonrası biyoyararlanımının artmış olduğunun tespiti için bağırsak ve mide simülasyonu yapılmıştır. Bağırsak ve mide simülasyonu sonucunda ortama salınan resveratrol miktarları yapılan HPLC analizleri ile ölçülerek % salınımları hesaplanmıştır.



Şekil 2.10. Laboratuvarda yapılan in-vitro salınım testleri mide ve barsak ortamı.

Salınım çalışmaları sindirim sisteminde görevli iki ortam (mide ve barsak) Şekil 2.4’de

gösterilmiş olduğu gibi modellenerek laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir. Mide ortamı *in vitro* olarak pH'ı 1,5 olacak şekilde hidroklorik asit (HCl) ve potasyum klorür (KCl) kullanılarak hazırlandı. Bir erlen içerisinde 30 ml alınarak üzerine lesitin ile kapsüllenmiş kapsüllerden 0,15 g eklendi ve 37 °C' de ve ağzı kapalı durumda karışmaya bırakıldı. 30 dakika aralıklarla ortamdaki 2 ml çözelti alınarak HPLC analizi için viallendi. Alınan her çözelti kadar HCl/KCl ortam çözeltisi eklendi. Bu işlem 2 saat sonuna kadar yapıldı. Elde edilen tüm süpernatantlar HPLC analizi için viallendi. Kontrol grubu olarak kapsüllenmemiş resveratrol standardı kullanıldı.

Barsak ortamı içinse, pH 6,8 fosfat tamponu kullanılarak hazırlandı. Erlen içerisinde 30 ml alınarak 30 ml alınarak üzerine lesitin ile kapsüllenmiş kapsüllerden 0,15 g eklendi ve 37 °C' de ve ağzı kapalı durumda karışmaya bırakıldı. 30 dakika aralıklarla ortamdaki 2 ml çözelti alınarak HPLC analizi için viallendi. Alınan her çözelti kadar ortam çözeltisi eklendi. Bu işlem 2 saat sonuna kadar yapıldı. Elde edilen tüm süpernatantlar HPLC analizi için viallendi. Kontrol grubu olarak kapsüllenmemiş resveratrol standardı kullanıldı. Böylelikle kapsüllenmiş ve kapsüllenmemiş resveratrolün salınım sonuçları karşılaştırılarak kapsüllemenin resveratrolün biyoyararlanımına etkisi değerlendirildi. Lesitin kapsül içerisinde resveratrolün salım değerleri aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Salınımı} = \frac{M_t}{M_o} \times 100$$

M_t= bir t anındaki salınan resveratrol miktarı,

M_o= Başlangıçta (t=0) anındaki salınmış resveratrol miktarını göstermektedir.

Zamana bağlı olarak değişen salınım değerlerinin sonuçları ve bu sonuçlara göre hesaplanan % salınım sonuçları Bölüm 3.10'da verilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, üzüm posasından ekstrakte edilip zenginleştirilen *trans*-resveratrolün biyoyararlılığının da artırılması amacıyla doğal ve biyoyumlu olan lesitin ile resveratrol yüklü kapsüllerin hazırlanması hedeflenmiştir. Öncelikle en uygun ve verimli ekstraksiyon ve zenginleştirme yöntemi belirlenmiştir. Sonrasında enkapsülasyon yöntemi olarak resveratrolün çözücüsünün etanol olması, sıcaklığa dayanımının az olması vb. sebeplerden dolayı kapsülleme yöntemi olarak liyofilizasyon yöntemi seçilmiştir. Yapılan literatür taramalarına göre resveratrolün günlük maksimum dozunun 3500 mg olduğu ve genellikle 50-200 mg aralıklarında alımının tercih edildiği görülmektedir. Çalışmamızda etken madde oranını en az 100mg'da sabit tutarak kapsüller elde edilmiştir.

3.1. HPLC ANALİZ METODU

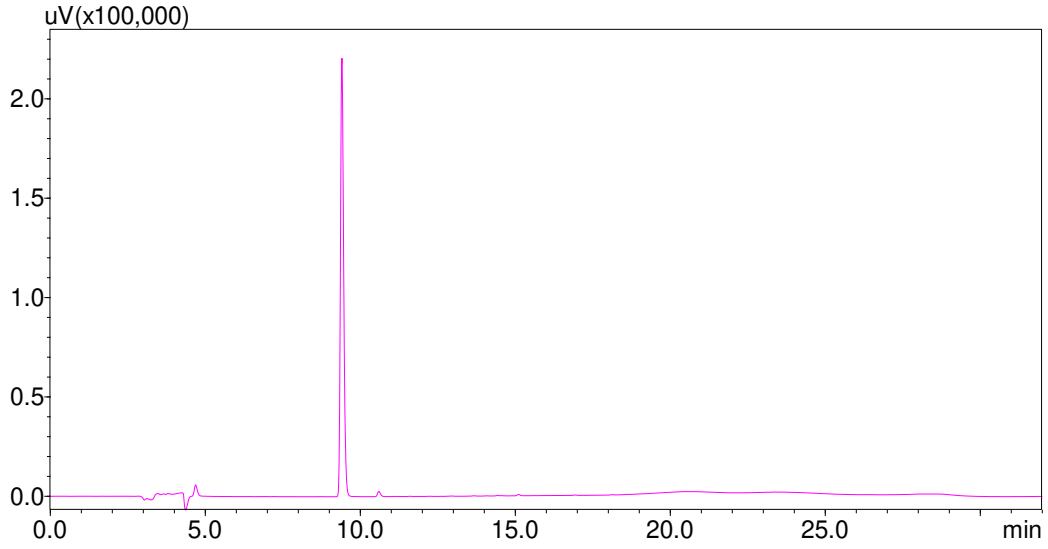
Çizelge 3.1. Hplc analiz koşulları ve uygulanan gradient yürütme metodu.Çizelge 3.1’de hplc analiz koşulları ve uygulanan gradient yürütme metodu ayrıntılı olarak verilmiştir. Çalışmalar ODS ve C18 kolonlarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Hplc analiz koşulları ve uygulanan gradient yürütme metodu.

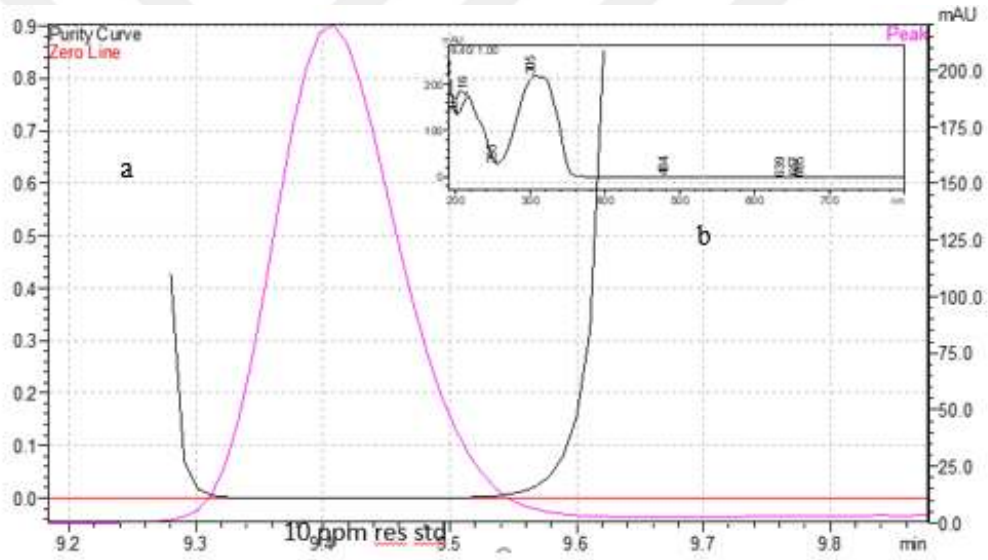
HPLC Çalışma Metodu	
Kolon	C18 Kolon (4,6*250mm- 5,0 µm)
Akış hızı	0,8 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	30 °C
UV detection	305 nm
A Çözücüsü	0,8 ml/dk
B Çözücüsü	Ultra saf su (1 L ultra saf suya 0,90 g potasyum fosfat monobazik eklenir.)
Metot Süresi	32 dakika

3.1.1. HPLC Standart Kalibrasyon Grafiği

Standart kalibrasyonu *trans*-resveratrol standardı ($\geq 99\%$ (HPLC), Sigma Aldrich) metanol çözücü (%99,5, HPLC grade, ISOLAB) ile 10 ppm olarak hazırlanmıştır. $R^2 = 0,999$ ve %RSD: 3,358 değerleri olarak hesaplanmıştır ve spesifik dalga boyu 305 ± 1 nm olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.1’de resveratrol standardının hplc kromatogramı verilmiştir. Şekil 3.2’de ise resveratrol standarda ait olan a) uv sepktrum taraması ve spesifik dalga boyu b) pik saflığını içeren görsel bulunmaktadır.



Şekil 3.1. Resveratrol standardının hplc kromatogramı.

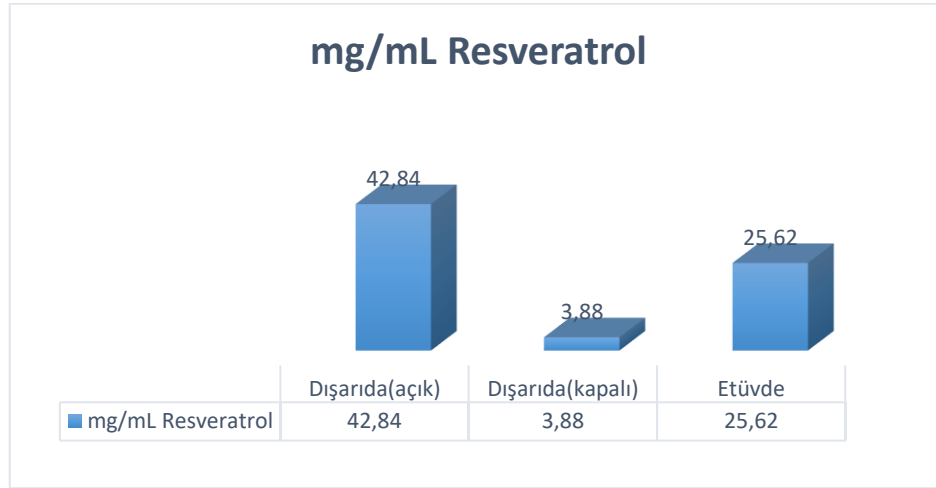


Şekil 3.2. Resveratrol standarda ait a) uv spektrum taraması ve spesifik dalga boyu b) pik saflığı.

3.2. ÜZÜM POSASI KURUTMA YÖNTEMİ BELİRLEME SONUÇLARI

Fabrika atığı olarak farklı bölgelerden temin edilen üzüm posalarının en verimli kurutma yöntemine, etüvde 40 °C de, dışarda açık ortamda ve dışarda kapalı ortamda olacak şekilde 3 farklı yöntem denendi ve sonuçları HPLC ile analiz edilerek karar verildi. Bulunan sonuçlara göre kurutma sonrası üzüm posalarındaki resveratrol değerleri; dışarda açık ortamda> etüvde>dışarda kapalı ortamda şeklinde değişmektedir. Sonuçlar

neticesinde üzüm posalarının dışarda kurutulmasına karar verilmiştir. Şekil 3.3’de üzüm posası ekstraktlarının farklı kurutma yöntemleriyle resveratrol düzeylerinin karşılaştırılması verilmiştir.



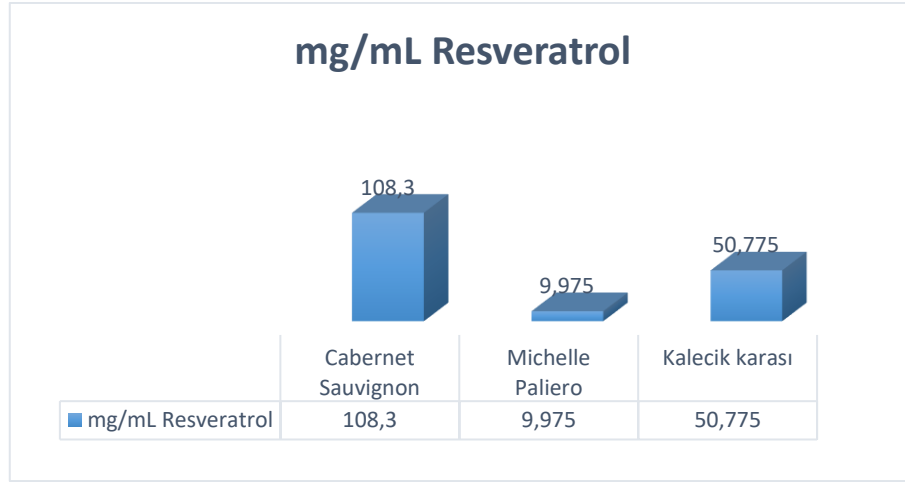
Şekil 3.3. Ekstraktların farklı kurutma yöntemleriyle resveratrol düzeylerinin karşılaştırılması.

Yukarıda verilen karşılaştırmadan da görüleceği üzere en yüksek etken madde miktarı dışarıda doğal yöntemle kurutmada elde edilmiştir. Bunun sebebi *trans*-resveratrol molekülü ısı ve ışık gibi dış etkenlerde etkilenen bir molekül olmasıdır.

3.3. RESVERATROL İÇERİĞİ EN YÜKSEK ÜZÜM POSASININ BELİRLENMESİ

Üzüm posası genellikle şarap ve meyve suyu fabrikalarının atığı olmaktadır. Şaraplık ve meyve suyu olarak kullanılan üzümlere baktığımızda etken madde oranları çok fazla değişkenlik göstermektedir. Şaraplık ve meyve suyu için kullanılan üzüm türleri de farklıdır. Meyve suyu fabrikalarında sıkmalık olarak genellikle ince kabuklu ve bol suyu üzüm türleri seçilirken şaraplık olarak kullanılacaklarda kalın ve aromalı kabuk seçilmektedir. Özellikle şarap yapımı için üzümler özenle yetiştirilmekte olup toplama, sulama ve budama zamanları gibi birçok parametreye dikkat edilerek etken madde miktarının etkilenme durumunu en aza indirecek şekilde harekete edilmektedir. Yine farklı bölgelerdeki şarap fabrikalarının kullanmış olduğu türler değiştiği için posalardaki resveratrol miktarları da değişmektedir. Bu sebeple fabrika atığı olarak farklı bölgelerden temin edilen üzüm posalarından *trans*-resveratrol miktarı en yüksek bölgeye ait türün belirlenmesi amacıyla posaların hepsi aynı şartlarda etanol ile 3 saat süre ile ekstrakte

edildi ve sonuçları HPLC ile tayin edildi. Bulunan sonuçlara göre; *trans*-resveratrol miktarı; Cabernet Sauvignon> Kalecik Karası> Michelle Paliero şeklinde bulundu. Şekil 3.4’de farklı türdeki üzüm posalarının resveratrol düzeylerinin karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 3.4. Farklı türdeki üzüm posalarının resveratrol düzeylerinin karşılaştırılması. Sonuçlar neticesinde Kırklareli bölgesi şarap fabrikalarının atığı olan tür olarak Cabernet Sauvignon olduğu düşünülen üzüm posasının kullanılmasına karar verildi.

3.4. EKSTRAKSİYON DENEMELERİ HPLC SONUÇLARI

3.4.1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Bölüm 2.2.3.1’de anlatılan bağımsız değişkenlerle yapılan klasik çözücü ekstraksiyonu çalışmalarında *trans*-resveratrol izolasyonu için potansiyel çözücü, sıcaklık ve süre parametrelerini belirlemek için farklı değişkenler kullanılmıştır. Parametreler değiştirilerek gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda ekstraktların HPLC’ de resveratrol miktarları ölçülmüştür. Elde edilen analizler sonucunda en yüksek resveratrol miktarı veren parametre optimum parametre olarak belirlenmiştir. En yüksek verim etanol çözücüsü kullanılarak 30°C’de ve 24 saat sürede elde edilmiştir.

3.4.1.1. Çözücü Optimizasyonu

Süre 3 saat, sıcaklık oda koşullarında çözücü optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar HPLC cihazında analiz edilerek değerlendirilmiştir. Bu çözücülerden elde edilen ekstraktlarda yapılan HPLC ölçüm sonuçları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Optimum ekstraksiyon için çalışılan çözen karışımları;

Çözücü 1: Etanol : Su (50:50)

Çözücü 2: Etanol: Su (80:20)

Çözücü 3: Etanol: Su (95:5)

Çözücü 4: Su (%100)

Çözücü 5: Metanol: Su (95:5)

Çizelge 3.2. HPLC ölçüm sonuçları.

	Çözücü 1	Çözücü 2	Çözücü 3	Çözücü4	Çözücü 5
Resveretrol	8,5	20,1	42	Tespit	10,2
Miktarı(mg/L,ppm)				edilemedi	

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek verimin etanol ile sağlandığı görülmektedir. Resveratrol polar bir molekül olmasına rağmen yapı itibariyle apolar kısımda barındırmaktadır. Bu sebeple polar çözücü olan suda çözünürlüğü yok denecek kadar azdır. Öte yandan metanol ile yapılan denemede de güzel sonuç elde edilmiştir fakat etanoldeki resveratrol miktarı daha yüksek bulunmuştur. Bazı literatür verilerinde metanolde tercih edilmiştir fakat bizim çalışmamızda biyolojik uyumluluğu daha yüksek olan etanole karar verilmiştir.

3.4.1.2. Sıcaklık Optimizasyonu

Sıcaklık optimizasyonunun sağlanması için 30°C, 40°C ve 60°C değerleri çalışıldı. Elde edilen ekstratların HPLC’de analizleri gerçekleştirildi ve maksimum resveratrol değerinin elde edildiği sıcaklık belirlendi. Ölçüm sonuçları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. HPLC ölçüm sonuçları.

	30°C	40°C	60°C
Resveretrol			
Miktarı(mg/L,ppm)	42,840	2,880	1,525

Sıcaklık optimizasyonu çalışmalarında sıcaklık ne kadar arttırılırsa etken madde miktarının doğru orantılı olarak azaldığını gördük. Bunun sebebinin de daha öncede belirttiğimiz gibi resveratrol molekülünün dış etkenlere karşı hassas bir molekül

olmasından kaynaklı olduğu bilinmektedir.

3.4.1.3. Süre Optimizasyonu

Süre optimizasyonunun sağlanması için 30,60, 180 dakikalar ve 24 saat çalışıldı. Bu sürelerde yapılan ekstraksiyon sonuçları HPLC ile analiz edildi. Sonuçlar Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC ölçüm sonuçları.

	30 dk	60 dk	180 dk	24 saat
Resveretrol				
Miktarı(mg/L,ppm)	6,095	16,515	25,620	32,095

Optimum ekstraksiyon çözücüsünü, sıcaklığını ve süresini belirlemek amacıyla yapılan klasik çözücü ekstraksiyon denemeler sonucunda, çözücü 4(%100 Su) kombinasyonu en düşük değeri verirken, çözücü 3 Etanol: Su (95:5) en yüksek değeri vermiştir. Çözücü 1 (Etanol: Su (50:50)),2 (Etanol: Su (80:20)) ve 3 (Etanol: Su (95:5)) kombinasyonlarına baktığımızda üçünün de aynıdır. Fakat burada etkili olan şey etanolün konsantrasyonudur. HPLC ölçüm sonuçlarına göre su miktarı artırılıp etanol miktarının azaltılmasıyla çözücü konsantrasyonları değerlendirildiğinde çözücü 1 (Etanol: Su (50:50)) <çözücü 2 (Etanol: Su (80:20)) <çözücü 3 şeklinde bir sonuç elde edilmiştir. Çözücü 3 (Etanol: Su (95:5)), 4 (%100 Su) ve 5 (Metanol: Su (95:5)) kombinasyonlarına baktığımızda ise çözücünün değiştirilmesinin resveratrol miktarını da etkilediği en yüksek değerin polarite indeksi 5,2 olan etanol çözücüsü ile elde edildiği tespit edildi. Buna göre optimum ekstraksiyon çözücüsü etanol olarak belirlendi.

Optimum süreyi ve sıcaklığı belirlemek için yapılan çalışmalarda da elde edilen HPLC analiz sonuçları değerlendirilerek en yüksek resveratrol miktarının 24 saatlik sürede oda sıcaklığı 30°C’ de elde edildiği görüldü.

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile çözücü, sıcaklık ve süre parametreleri belirlendikten sonra denenen ekstraksiyon yöntemlerinin sonuçları aşağıdaki Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmalarının sonuçları.

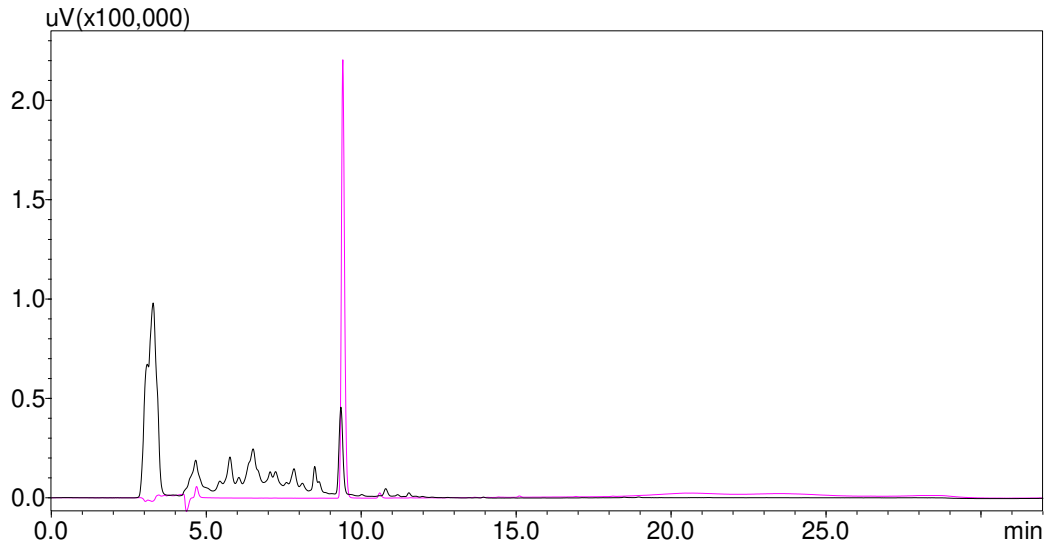
Deney Kodu	Ekstraksiyon Yöntemi	Resveratrol Miktarı (mg/L, ppm)
E-3	Asidik Ortam	<1,0
E-2	Refluks	<1,0
E-10	Ultrasonik banyo	<1,0
M-1	Asid Hidrolizi	<1,0
E-12	Sıvı- Sıvı	3,5
B-1	Etanol, 30°C, 24h	23,5

Yapılan ekstraksiyon çalışmalarında resveratrol miktarları incelenmiştir. Refluks, asid hidrolizi, ultrasonik banyo, asidik ortam ve sıvı- sıvı ekstraksiyonu ile yapılan çalışmalarda *trans*- resveratrol düzeylerinin çok çok düşük bazılarında tespit bile edilememiş olduğu aynı zamanda çok fazla safsızlığın ve elde edilen HPLC kromatogramlarında şekil anomaliliklerinin olduğu gözlenmiştir. *Trans*- resveratrol düzeylerinin düşük olmasının sebebi, *trans*- resveratrol molekülünün ısı, ışık, sıcaklık vb. kaynaklara maruziyetine karşı duyarlı olması sebebiyle molekülde bozulmalar veya cis formuna dönüşümler söz konusu olmaktadır. Doğada her şey kararlılığa gitme eğilimindedir. Genel yapı itibariyle *trans*-resveratrol kararlı bir moleküldür. Ancak ışık, ısı, oksijen ve nem gibi dış etkenler *trans*-resveratrolün cis formuna dönüşümü için uyarıcı etki gösterebilmektedir. Bu sebeple ekstraksiyon metodu olarak refluks ve ultrasonik banyo ekstraksiyonları cis formuna dönüşümüne sebep olmuş olabilmektedir. Buda totaldeki *trans*-resveratrol düzeyinin düşmesine ortamda cis-resveratrol oluşumuna da sebep olmuştur. HPLC kromatogramlarında *trans*-resveratrol ve cis-resveratrol alıkonma zamanları farklıdır. Bu sebeple *trans*-resveratrol düzeyinin düşük çıkması olası olabilmektedir. Diğer ekstraksiyon metotları olan asidik ortam, asid hidrolizi ve sıvı-sıvı ekstraksiyon metotlarında da *trans*-resveratrol düzeyleri düşük bulunmuş olup üzüm posasından *trans*-resveratrolün ekstraksiyonu için uygun bulunmamıştır.

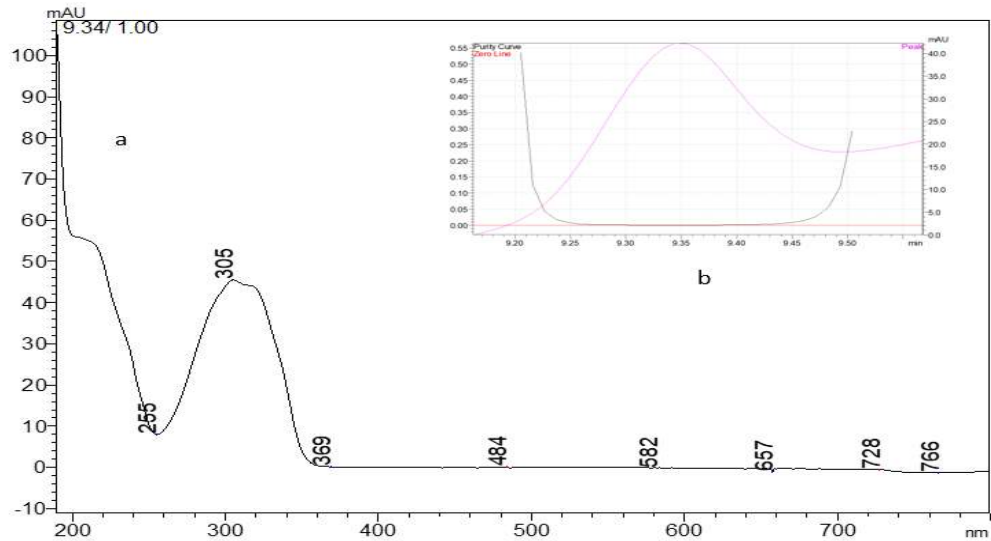
Trans-resveratrol miktarı en yüksek ekstraksiyon metodunun klasik çözücü ekstraksiyonu olan etanol ile 30°C’de 24 saat boyunca yapılan yöntemin olduğu bulunmuştur. Etanolün

çözücü olarak kullanıldığı klasik çözücü ekstraksiyonunda 1 g posadan elde edilen maksimum resveratrol miktarı 30°C’de ve 24 saat ekstraksiyon sonucunda 1,0575 mg’dır. Elde edilen bu optimum koşullarda ekstraksiyonu yapılan üzüm posasının (B-1) HPLC kromatogramı Şekil 3.5’de UV spektrumu ve pik saflığı Şekil 3.6’da verilmiştir.

Elde edilen kromatogram incelendiğinde pik saflık değeri ne kadar iyi bir değer olsa da kromatogramda çok fazla safsızlık görünmektedir. Özellikle üzüm posası içeriğindeki boyarmaddelerin girişiminin olduğu boyarmadde gideriminde şu an için bu metodun etkili olmadığı görülmektedir. Bu sebeple saflaştırma işlemleri yapılmıştır.



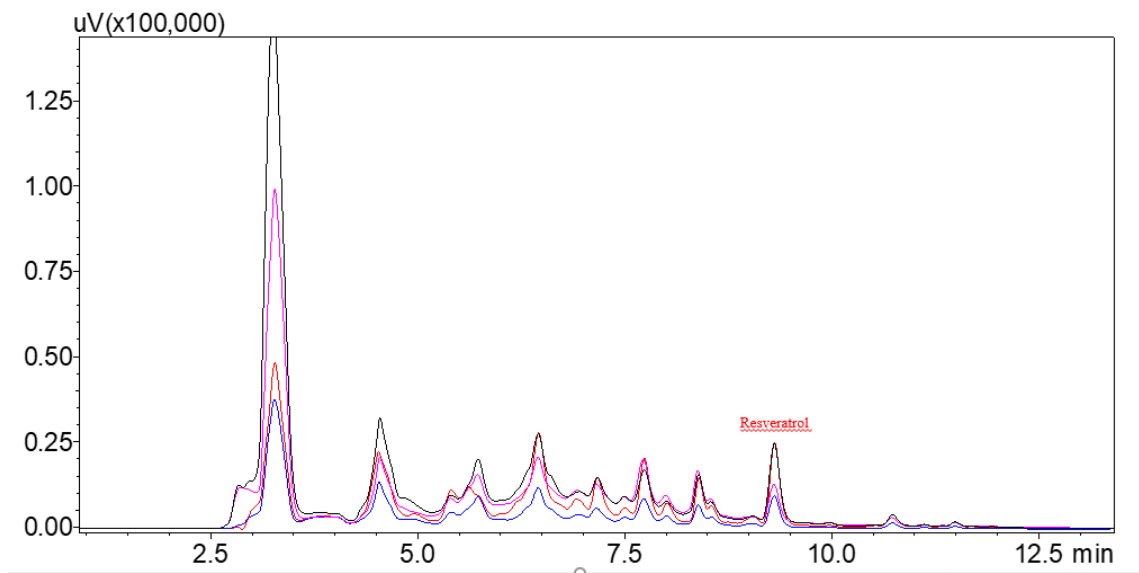
Şekil 3.5. Etanol ekstraksiyonu (siyah) ve standart hplc kromatogramı (pembe).



Şekil 3.6. Etanol ekstraksiyonun a) UV spektrumu b) pik saflığı.

3.5.2. Adsorban Uygulama

Optimize etmiş olduğumuz ekstraksiyon yöntemimizde hala istenmeyecek düzeyde safsızlık bulunmaktadır. Bu safsızlıkların giderilmesinin bir diğer yolu da adsorban denemeleri olduğu için farklı karakterde adsorbanlar denenerek safsızlık giderimleri ölçülmüştür. Bu bağlamda bioçar, alümina ve florosil denenmiştir. Şekil 3.9’de deneme sonuçlarının HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, adsorban kullanımının diğer safsızlıkları giderdiği fakat bir miktar *trans*-resveratrolü de tuttuğu tespit edilmiştir. Bu sebeple adsorban denemeleri geliştirilen ekstraksiyon metodumuza katılmamıştır.



Şekil 3.9. Etanol ekstraksiyonu (siyah), florosil (pembe), alümina (kırmızı), bioçar (mavi) hplc kromatogramı.

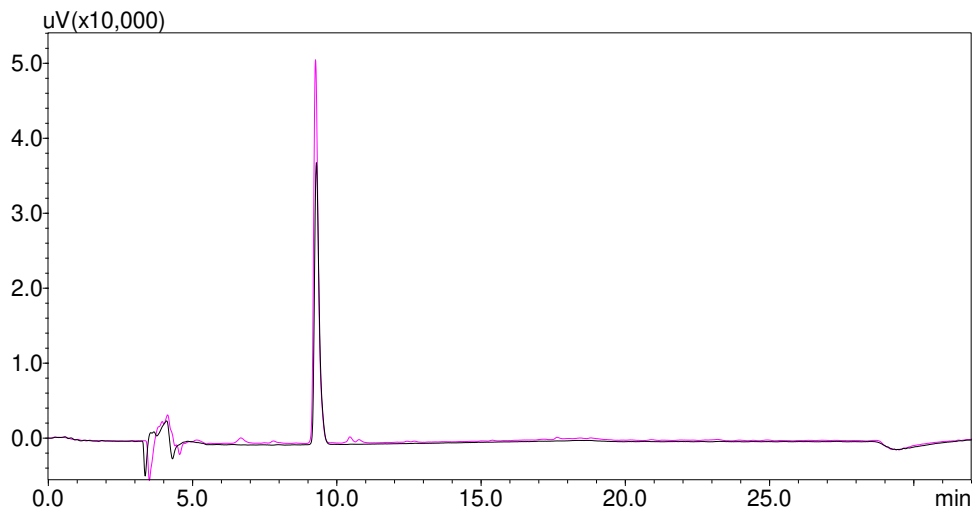
3.5.3. Silika Gel Kolon Kromatoğrafisi

Silika dolgu maddesinin polar karakterde olması ve diğer dolgu maddelerine göre daha maliyet açısından daha uygun olması tercih edilme sebebi olmuştur. Silika G-60 kolon uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı aşağıdaki Çizelge 3.6’de verilmiştir.

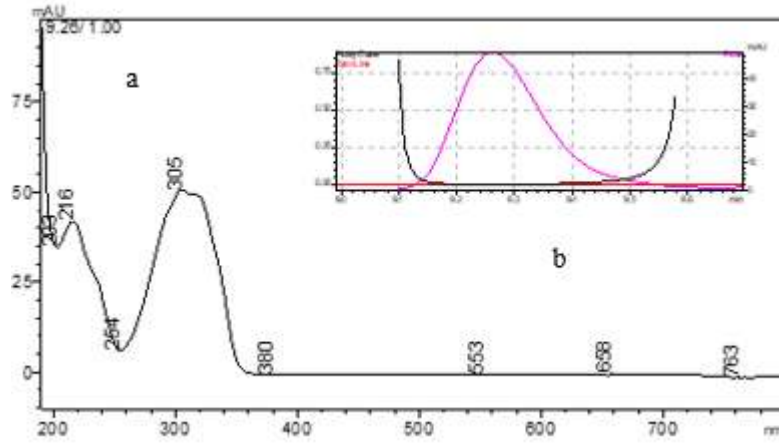
Çizelge 3.6. Silika G-60 kolon uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı.

Elüent numarası	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Trans-resveratrol</i> varlığı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Elüent numarası	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
<i>Trans-resveratrol</i> varlığı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Toplanan fraksiyonların HPLC analizi sonuçlarında elüent numaraları 15 ve 16'nın *trans-resveratrol* miktarları (mg/L,ppm) sırasıyla 6,6 ve 3,63 bulunmuştur. En yüksek değer 15. Elüente olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.10'de 15. Elüente ait HPLC kromatogramı ve Şekil 3.11'da pik saflığı verilmiştir. Kromatogram incelendiğinde safsızlıkların birçoğunun giderildiği görülmektedir. Özellikle boyarmaddelerin birçoğunun kolon tarafından tutulduğu tespit edilmiştir. Burada en önemli etken mobil faz seçimidir. Silika kolonda *trans-resveratrol* saflaştırılması için en uygun mobil faz kombinasyonu kloroform, etil asetat ve formik asit olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.10. 15. Elüent (mavi) ve resveratrol standardına(pembe) ait HPLC kromatogramı.



Şekil 3.11. 15. Elüent a) UV spektrumu b) pik saflığı.

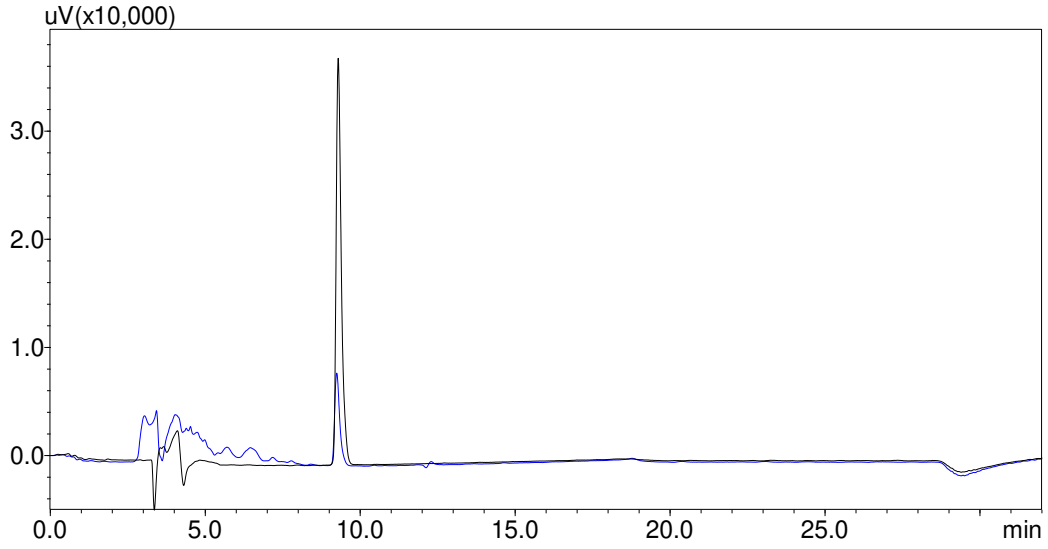
3.5.4. Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi

Sephadex LH-20 kolon uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı aşağıdaki Çizelge 3.7’de verilmiştir.

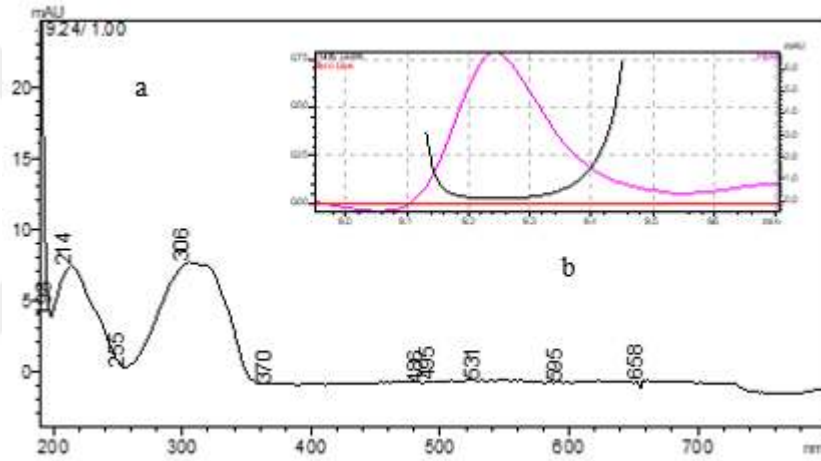
Çizelge 3.7. Sephadex LH-20 kolon uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı.

Elüent numarası	1	2	3	4	5
<i>Trans-resveratrol</i> varlığı	-	-	-	+	-

Toplanan fraksiyonların HPLC kromatogramları incelendiğinde 4 numaralı elüente *trans-resveratrol* varlığı tespit edilmiştir. Şekil 3.12’de 4 numaralı elüente ait kromatogram ve Şekil 3.13’de pik saflığı verilmiştir. Kromatogramdan da anlaşılabacağı üzere sephadex kolon uygulaması safsızlıkların giderilmesinde çok etkili olmuştur. Boyar maddelerin neredeyse tamamını tutmuş *trans-resveratrol*’ün saf bir şekilde elde edilmesini sağlamıştır. Fakat sephadex kolon maliyetli olması açısından tercih edilmemiştir.



Şekil 3.12. 4 numaralı elüent (mavi) ve resveratrol standardına (siyah) ait kromatogram.

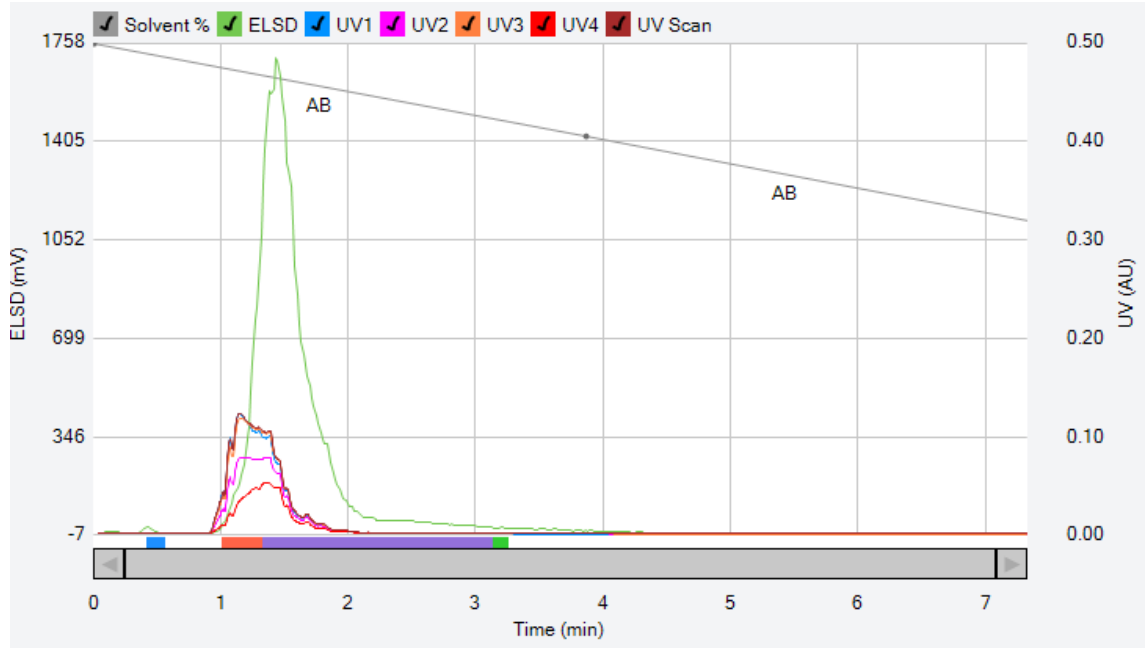


Şekil 3.13. 4 numaralı elüente ait pik saflığı.

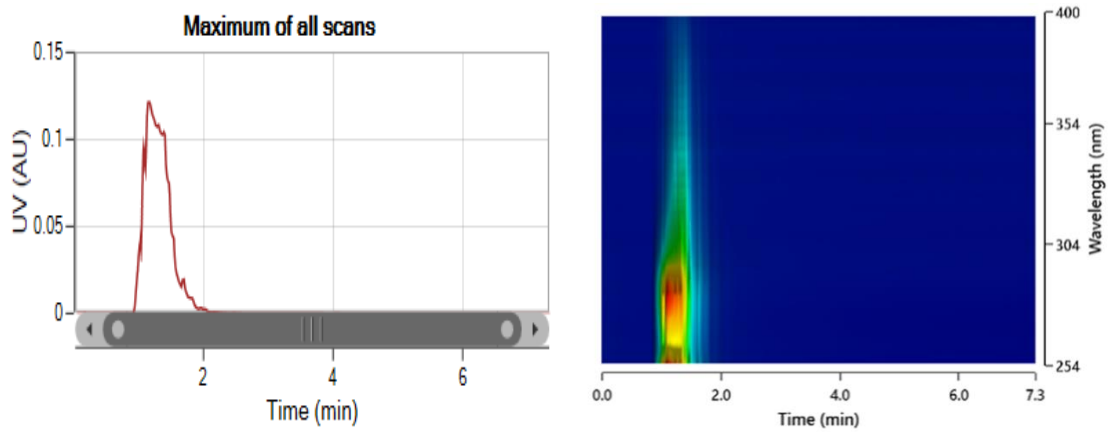
3.5.5. Flash Kromatografi Sonuçları

Flash kromatografi denemelerinde farklı çözücü sistemleri ile farklı 2 farklı kartuş denenerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen ekstraksiyon metodumuzdan elde edilen ekstrakt etanolde çözünerek ve hidrofilik membran filtreden geçirildikten sonra cihaza enjeksiyonu yapılmıştır. Elde edilen veriler neticesinde SiliaSep™ HP 12 g kullanılarak yapılan ve hekzan/etil asetat çözücü sistemli yapılan denemelerde az miktarda olsa bir saflaşma görülmüş fakat boyar madde ve safsızlıkların giderilemediği görülmüştür. Diğer bir metot olan SiliaSep™ C18 12 g kartuş ile su/metanol çözücü sistemi kullanılarak yapılan denemede sonuçlar daha iyi bulunmuştur. İlk denenen metotlarda herhangi bir ayırım olmadığı resveratrolün safsızlıklarla birlikte geldiği tespit edilmiş ve bu sebeple flash kromatografi denemelerinin SiliaSep™ C18 12 g kartuş ile

su/metanol çözücü sistemi kullanılarak yapılmasına karar verilmiştir. Şekil 3.14’de flash kromatografi datasında görüldüğü gibi 5 adet fraksiyon toplanmıştır.



Şekil 3.14. Flash kromatografi datası.



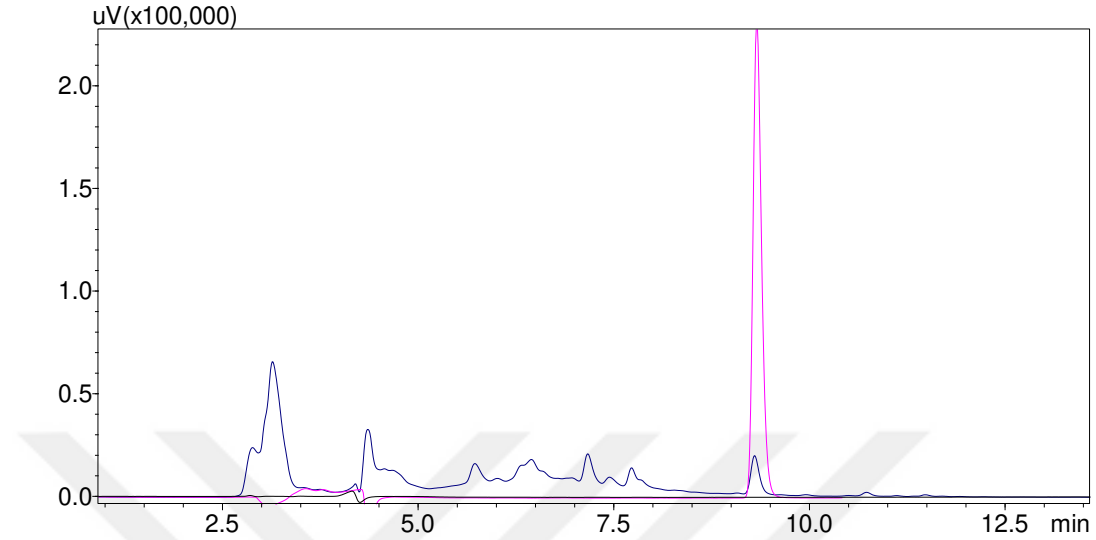
Şekil 3.15. Genel tarama spektrumu.

Toplanan fraksiyonlar HPLC’de analiz edilerek resveratrol miktarları değerlendirilmiştir. Çizelge 3.8’de toplanan elüentler ve resveratrol varlığı verilmiştir.

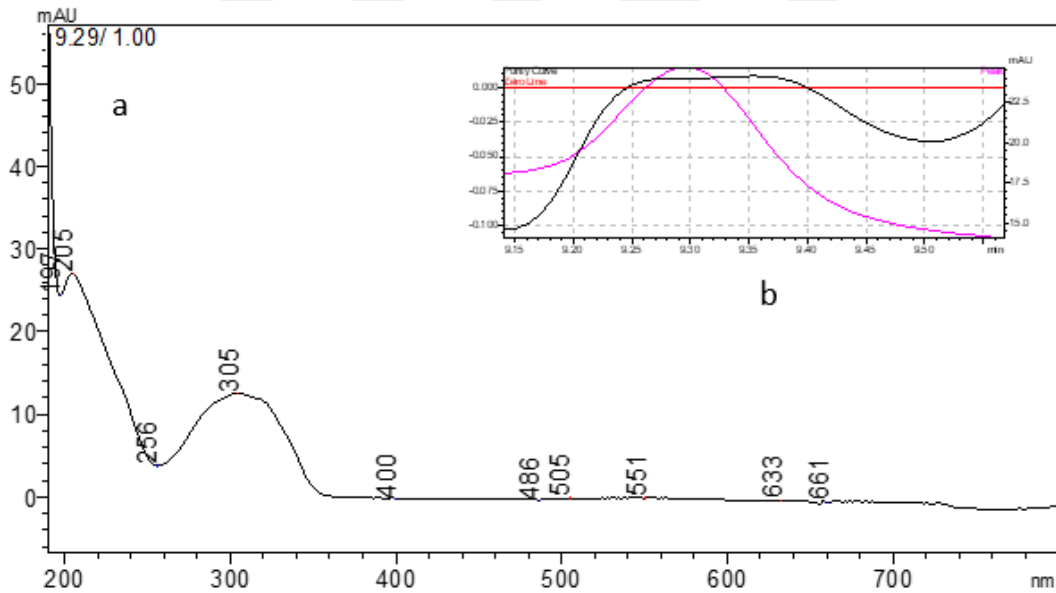
Çizelge 3.8. Flash kromatografi uygulamasında toplanan elüentler ve resveratrol varlığı.

Fraksiyon numarası	1	2	3	4	5
<i>Trans</i> -resveratrol varlığı	-	-	-	+	-

4 numaralı fraksiyonda resveratrol varlığı tespit edilmiştir. 4 numaralı fraksiyona ait hplc kromatogramı Şekil 3.16’da Şekil 3.17’de ise 4 numaralı fraksiyonun a) UV spektrum b) pik saflığı verilmiştir.



Şekil 3.16. 4 numaralı fraksiyon (siyah) ve resveratrol standardına ait HPLC kromatogramı.



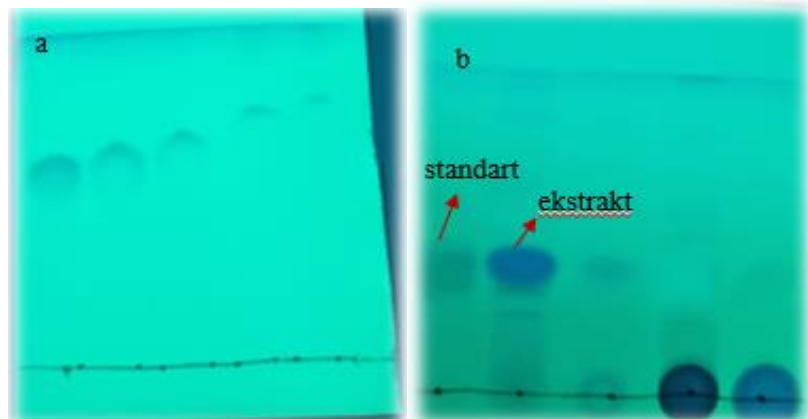
Şekil 3.17. 4 numaralı fraksiyonun a) UV spektrum b) pik saflığı.

Flash kromatografi ile edilen veriler sonucunda safsızlıkların bir miktar uzaklaştırılmasında etkili olduğu fakat geliştirilmesi gerektiği tespitine varılmıştır. Standart ile aynı alıkonma zamanında gelen pikler incelenerek UV spektrumu ve pik saflığı ölçülmüştür. Şekil 3.17’de de görüldüğü gibi pik saflığı istenilen düzeyde çıkmamıştır. Pik saflığı değerinin 0,99-1,00 aralığında olması istenir fakat bizim elde

ettiğimiz fraksiyonumuzun pik saflığı değeri 0,89 olarak ölçülmüştür. Buda bize safsızlığın olduğunu ve ortamda girişim oluşturduğunu göstermektedir. Bu sebeple zenginleştirme basamağımızda flash kromatografinin kullanılmasının uygun olmadığı bulunmuştur.

3.6. TLC UYGULAMASI

İlk olarak çalışmanın duyarlılığını ölçmek amacıyla, 5, 10, 20, 50,100 ppm resveratrol standartları etanol çözücüsü içinde hazırlanarak silikagel G kaplı alüminyum plaka üzerine 10 µl'lik hacimlerle uygulanmıştır. 5 farklı konsantrasyonda resveratrol UV Lamba altında çıplak gözle gözlenebildi. Şekil 3.18' de standartlara ait TLC plakası verilmiştir. Literatür verileri incelenerek TLC yöntemlerinden bu çalışmamız için en uygun olanının belirlenmesi amacıyla Çizelge 2.6'da verilen metotlar denenmiştir. Denenen yöntemler sonucunda 25:10:1 kloroform, etil asetat ve formik asit metoduna karar verilmiştir. Silika-60 kolon kromatografisinde zenginleştirme işlemi yapılırken resveratrol içeriği bilinen fraksiyonun toplanması TLC takibi yapılarak yapılmıştır. Fraksiyonlar alüminyum plakaya enjekte edilerek 10-15 dakika boyunca 25:10:1 kloroform, etil asetat ve formik asit mobil fazında TLC tankı içerisinde yürütüldü. Tank içerisinde çıkarıldıktan sonra çözücünün iyice uçması beklendi ve UV lamba altında sonuçlar gözlemlendi. Şekil 3'18 de TLC işlemi sonucunda elde edilen sonuçlar verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken resveratrol standardı ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir.



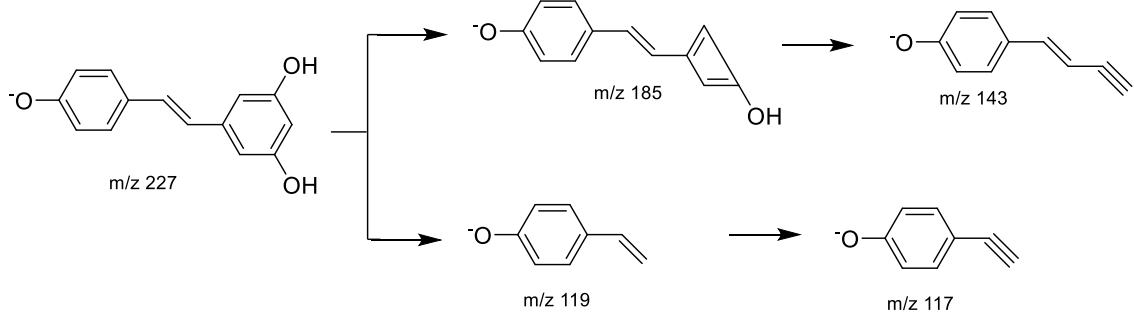
Şekil 3.18. (a) Standartlara ait TLC sonuçları ve (b) silika kolon fraksiyonları.

3.7. LC-MS/MS KÜTLE TAYİNİ SONUÇLARI

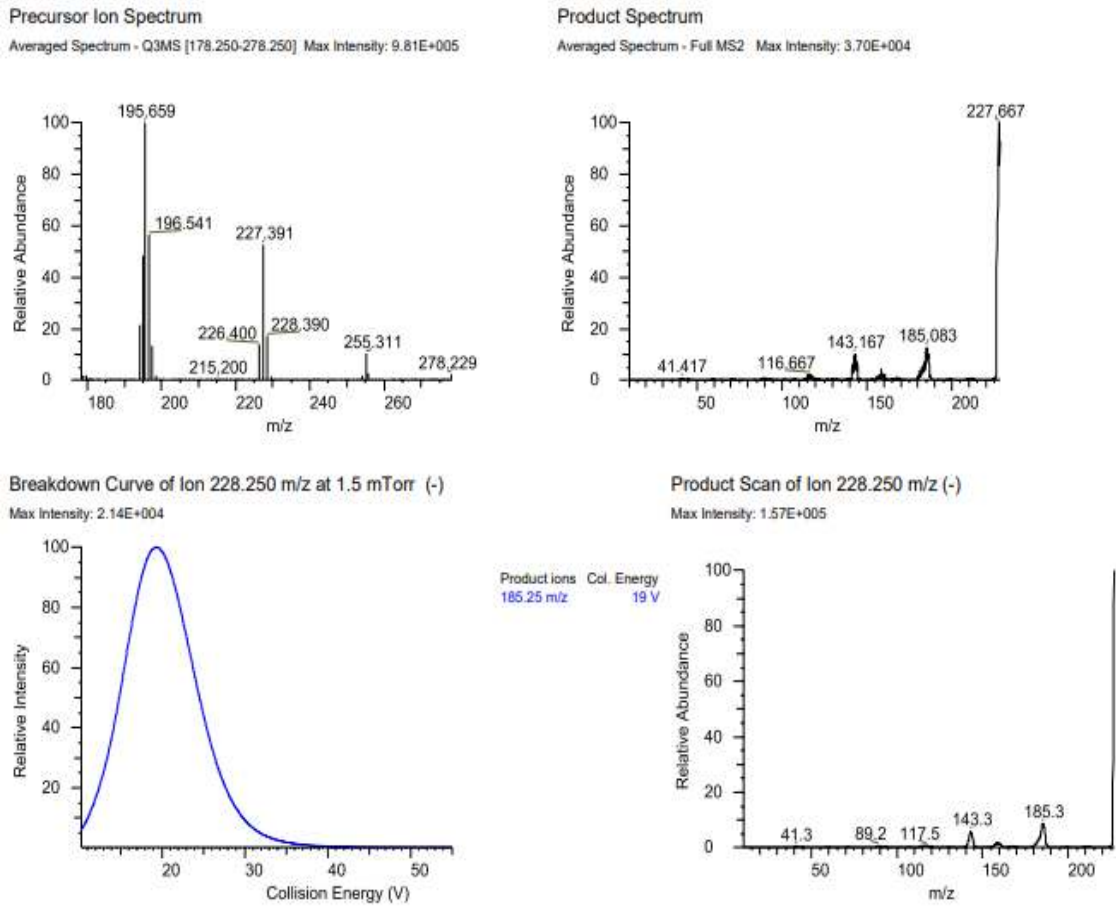
Kütle analizleri Thermo TSQ Quantis LC-MS/MS cihazında kalitatif analiz yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen ve flash kromatografi ile saflaştırılan *Trans*-resveratrol olduğu düşünülen ekstrakt analiz edilmiştir. *Trans*-resveratrol bileşiğinin molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$ ve molekül ağırlığı 228,25 g/mol'dür. Resveratrol bileşiğinin precursor moleküler iyonu $m/z=228.250$ 19V collision enerjisiyle ikinci quadropolden gönderildiğinde parçalanma gazı yardımıyla kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak kütesel olarak 185.250, 143.167 ve 114.667.0 karakteristik parçalanma iyonlarına dönüştüğü izlenmiştir. Parçalanma ürünlerine ait moleküler iyonlar Şekil 3.19'de verilmiştir. Şekil 3.20'de LC-MS/MS dataları verilmiştir. Çizelge 3.9'de *Trans*-resveratrol molekülüne ait pozitif ve negatif iyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.9. *Trans*-resveratrol molekülüne ait pozitif ve negatif iyon değerleri.

Pozitif İyon Değerleri	Negatif İyon Değerleri
196,541	195,541
215	226,4
228	278,229
255	



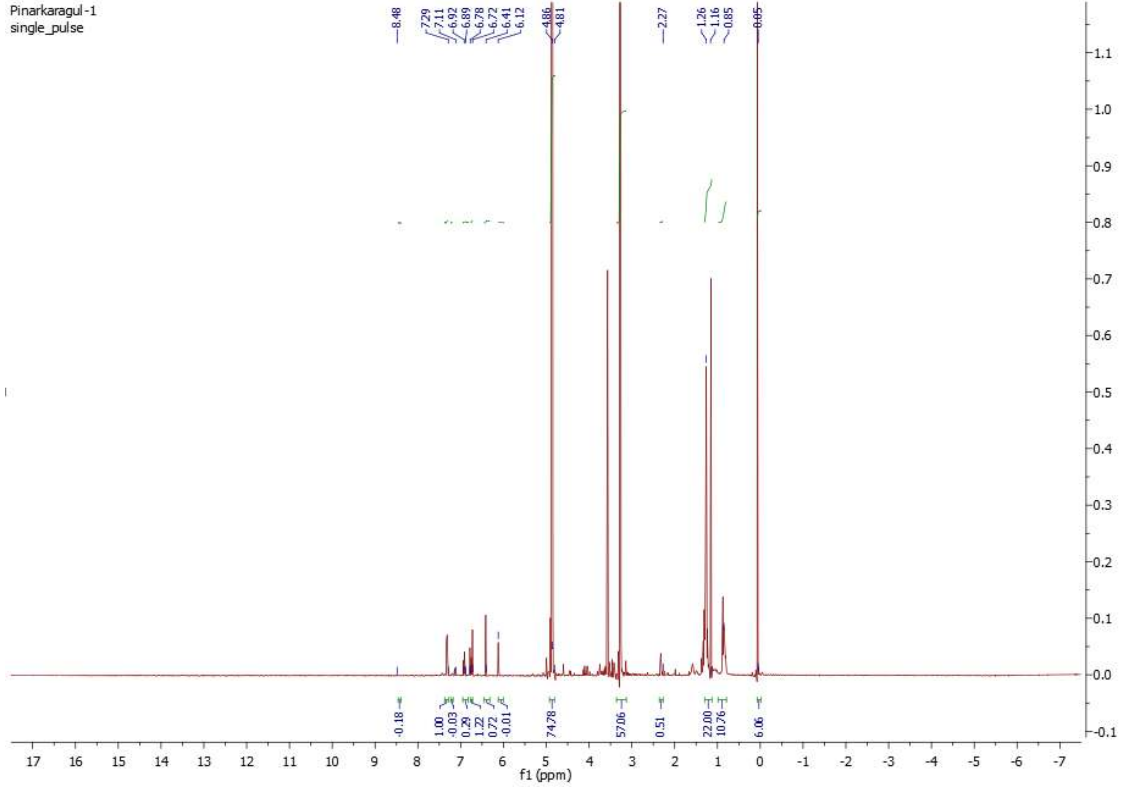
Şekil 3.19. Resveratrol ve parçalanma ürünlerine ait moleküler iyonlar.



Şekil 3.20. LC-MS/MS dataları.

3.8. H-NMR SONUÇLARI

^1H -NMR analizleri JEOL ECZ500R (11.75 Tesla) marka NMR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen *Trans*-resveratrol olduğu düşünülen ekstraktın ^1H -NMR spektrumları metanol- d_6 ($\text{CD}_3\text{OD}-d_6$) içerisinde hazırlanarak bileşiklerin farklı kimyasal çevreye sahip protonlarının kimyasal kayma değerleri tespit edilmiştir. İzole edilen bileşiğin ^1H -NMR spektrumlarında, çözücü olarak kullanılan $\text{CD}_3\text{OD}-d_6$ ya ait spesifik metil pikleri 3.35 ppm ve değerinde gözlenmiştir. Aromatik benzen halkasına ait multipler piklerin kimyasal kayma değeri 6.11–6.98 ppm aralığında, alifatik $=\text{C}-\text{H}$ pikine ait dubletin kimyasal kayma değeri 7.36–7.40 ppm ve aromatik benzen halkasına ait diğer fenolik $\text{O}-\text{H}$ protonuna ait pik ise 9.24 ppm kimyasal kayma değerinde gözlenmiştir. Bu piklere ait integrasyon oranları da sonuçları doğrulamaktadır. Şekil 3.21’de İzole edilen resveratrolün ^1H -NMR kimyasal kayma (δ) değerleri (ppm) verilmiştir.



Şekil 3.21. İzole edilen resveratrolün ^1H -NMR kimyasal kayma (δ) değerleri (ppm).
 ^1H NMR (500 MHz,) δ 7.37 – 7.27 (m, 1H), 7.17 – 7.04 (m, 1H), 6.96 – 6.88 (m, 1H),
 6.78 – 6.68 (m, 1H), 6.45 – 6.34 (m, 1H), 6.13 – 6.04 (m, 1H), 5.04 – 4.92 (m, 1H).

3.9. ENKAPSÜLASYON SONRASI KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

3.9.1. Enkapsülasyon % Verimi

Resveratrol terapötik etkiler göstermesine rağmen sudaki çözünürlüğü çok düşük olması sebebiyle biyoyumumluluğu da çok düşüktür. Bu sebeple klinik uygulamalarda kullanılabilirliği sınırlıdır. Tez çalışmamız kapsamında lesitin ile kapsülleme sonucunda sudaki çözünürlüğünün, kimyasal kararlılığının, biyoyararlanımının artırılması ve ısı, ışık gibi dış etkenler karşı dayanıklılığının artırılması amaçlanmıştır. Enkapsülasyon verimi için, kapsül yüzeyindeki resveratrol miktarının belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Enkapsülasyon yüzeyindeki resveratrol miktarının az olması enkapsülasyon prosesinin daha başarılı ve etkin olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada çalışılan 2 farklı kaplama maddesi oranı kapsül yüzeyindeki resveratrol miktarını

etkilemiştir. 1/1 ve 1/2 kaplama maddesi oranlarında yapılan çalışmada enkapsülasyon verimleri karşılaştırılmıştır.

Resveratrol yüklemesi yapılan kapsüllerin enkapsülasyon verim hesabı Bölüm 2.2.8.1’de verilen eşitlik kullanılarak yapılmıştır.

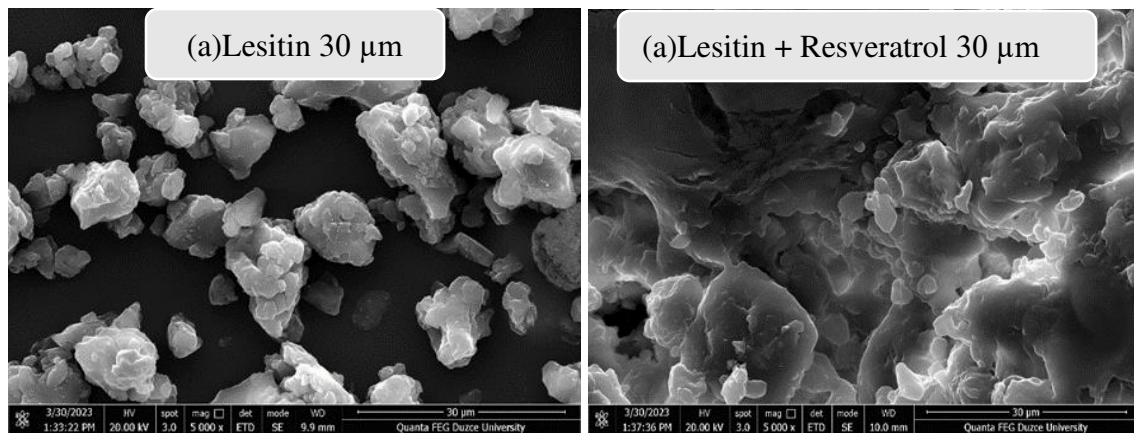
1/1 çekirdek: kaplama maddesi oranı enkapsülasyon verimliliği= %65

1/2 çekirdek: kaplama maddesi oranı enkapsülasyon verimliliği= %80

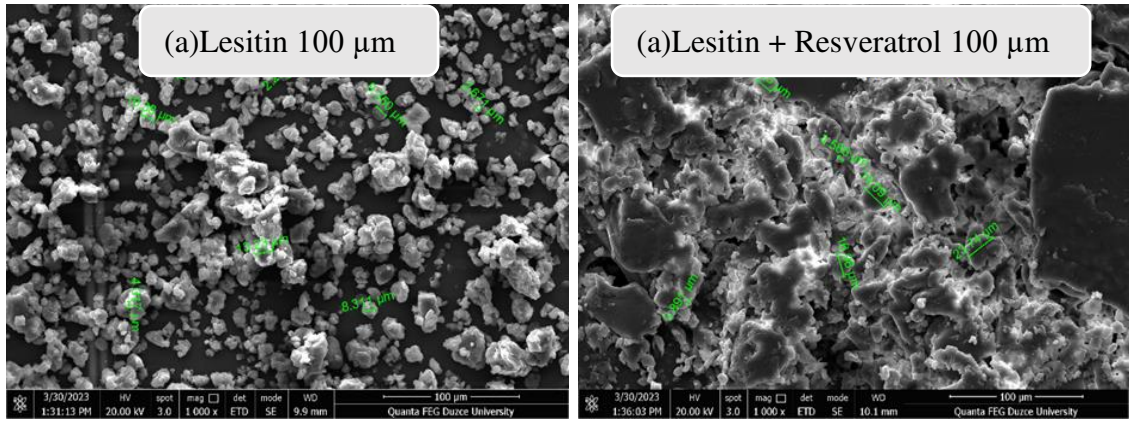
Hesaplamalar sonucunda enkapsülasyon verimi %80 olarak bulunan 1/2 çekirdek: kaplama maddesi oranının en yüksek verimde bulunmuştur. Elde etmiş olduğumuz bu sonucu literatür verileri de doğrulamaktadır. Çilek vd. (2012)’nin yapmış oldukları çalışmasında çekirdek: kaplama maddesi oranının arttırıldıkça enkapsülasyon etkinliğinin de arttığını belirtmişlerdir.

3.9.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları

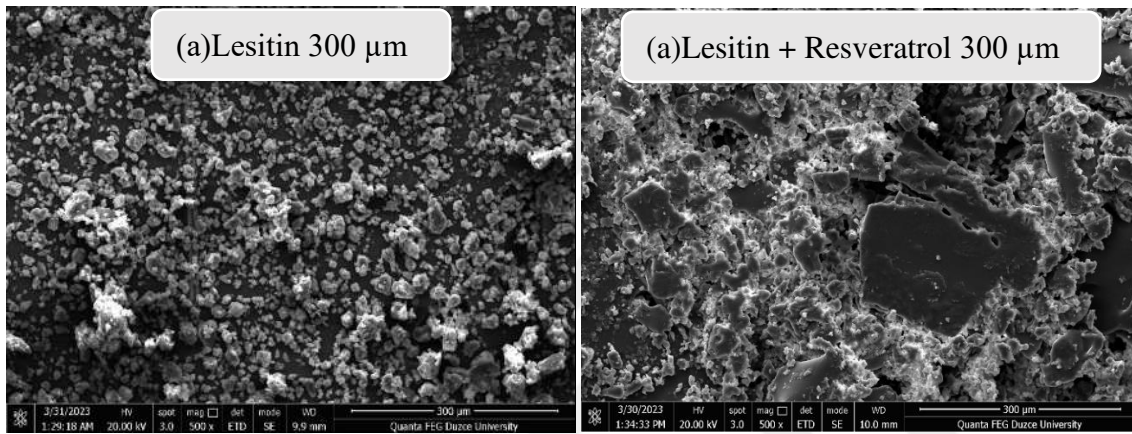
SEM görüntüleri 20 kV vakum altında Quanta FEG 250 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yapıldı. Görüntüleme kaplama materyali olan lesitin ve etken madde yüklü lesitin için ayrı ayrı yapılmıştır. Leistin ile liyafilizatörde kapsüllenen mikrokapsüllerin dış yüzey yapılarına bakıldığında kaplama maddesinin kompozisyonundan etkilendikleri görülmektedir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde lesitin SEM görüntüsüne baktığımızda hidrofor grupların birbirini ittiğini, *trans*-resveratrol yüklü lesitin kapsüllerinde ise polar kısımların etkisiyle grupların bir araya geldiğini görüyoruz. Aynı zamanda kapsüllerin pürüzlü olduğu da görülmüştür. Elde edilen görüntüler aşağıda verilmiştir. Şekil 3.22’de 30 µm, Şekil 3.23’da 100 µm ve Şekil 3.24’de de 300 µm SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.22. (a) Lesitin ve (b) Lesitin + Resveratrol 30 µm görüntüsü.



Şekil 3.23. (a) Lesitin ve (b) Lesitin + Resveratrol 100 µm görüntüsü.

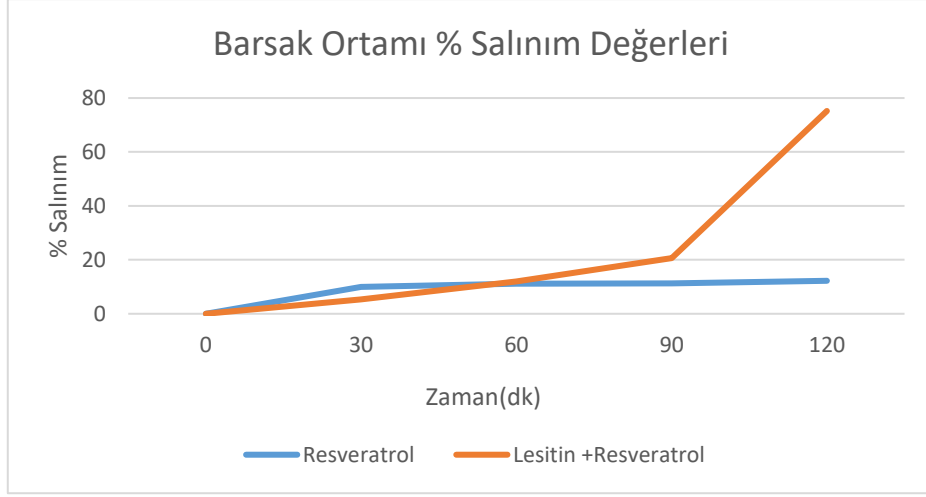


Şekil 3.24. (a) Lesitin ve (b) Lesitin + Resveratrol 300 µm görüntüsü.

3.10. RESVERATROL YÜKLÜ KAPSÜLLERİN *İN VİTRO* SALINIM ÇALIŞMALARI

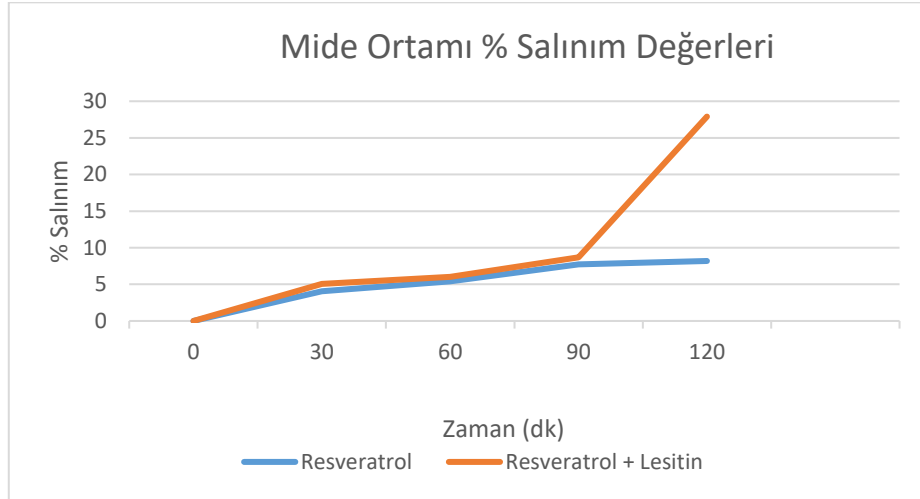
Resveratrolün oral yollarda alımı oldukça yaygın olmakla birlikte sudaki çözünürlüğü çok düşüktür. Buda kullanımını sınırlandırmaktadır. Resveratrolün sudaki çözünürlüğünün geliştirilmesi amacıyla lesitin ile kapsüllenmesi sağlanmıştır. Elde edilen lesitin-resveratrol kapsüllerinin sindirim sistemi boyunca salınımını belirlemek için *in vitro* sindirim ortamı oluşturuldu. Liyafilizatörde kurutulmuş kapsüllerden 30ml çözelti hacminde vücut sıcaklığında (37°C) mide ve barsak pH değeri aralıklarında resveratrol salımı incelenmiştir. Bu amaçla, çözelti ortamlarına 0,1500g lesitin- resveratrol kapsül eklenerek belirli aralıklarla (t=30,60,90,120dk) numuneler alındı. Alınan örneklerin HPLC ile analizleri gerçekleştirildi ve resveratrol miktarı tayin edildi.

Elde edilen verilerle % ilaç salınım miktarları Bölüm 2.2.9'da verilen eşitliğe göre hesaplanarak aşağıda grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 3.25. Lesitin yüklü kapsüllerin (turuncu) ve resveratrol standardının(mavi) barsak ortamındaki %salınım değerleri.

Şekil 3.25’de görüldüğü gibi lesitin ile kapsüllenen resveratrol moleküllerinin ilk 90 dk sabit bir artışla %20’lerde olan salınımı, 120. Dakikada ise %80’lere ulaşmaktadır. Kapsüllenmemiş resveratrol ise ortamda çözünmeden kalmıştır. Buradan çıkarılan sonuçla kapsüllenen resveratrolün çözünürlüğünün barsak ortamında arttığı söylenebilir. Aynı işlemler mide simülasyonu içinde yapılmıştır. Elde edilen verilerle % ilaç salınım miktarları Bölüm 2.2.9’da verilen eşitliğe göre hesaplanarak aşağıda grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 3.26. Lesitin yüklü kapsüllerin (turuncu) ve resveratrol standardının(mavi) mide ortamındaki %salınım değerleri.

Şekil 3.26’de görüldüğü gibi lesitin ile kapsüllenen resveratrol moleküllerinin ilk 5 dk sabit bir artışla %5’lerde olan salınımı, 5. Dakikadan sonra çok az artarak %25’lere ulaşmış ve sabit kalmıştır. Kapsüllenmemiş resveratrol ise ortamda çözünmeden kalmıştır. Buradan çıkarılan sonuçla kapsüllenen resveratrolün çözünürlüğünün

kapsüllenmemiş resveratrole göre daha iyi olduğu fakat yine de istenilen düzeyde olmadığı görülmektedir. Tüm bu sonuçlar neticesinde kapsüllenen resveratrolün                barsak ortamında çok iyi olduğu fakat mide ortamında daha düşük olduğu görülmüştür. Buda molekülün mide ortamında kararlı olduğu barsak ortamına gelindiğinde tamamen salınımının gerçekleşerek barsaktan emiliminin gerçekleşebileceği sonucunu göstermektedir.



4. SONUÇ

Bu araştırma ile sanayi atığı olarak atığa veya hayvan yemine gönderilen, yeterince değerlendirilmeyen ve içeriğinde birçok faydalı bileşen barındıran üzüm posasının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu değerlendirme içerdiği resveratrol ile potansiyel sağlık faydalarını artırma potansiyeline sahip olan bir üründen faydalanılması ve aynı zamanda atık yönetiminin yapılması açısından önemli bir adımdır. Resveratrolün sağlık üzerinde olan etkileri geçmişten günümüze bilinmektedir ancak gıdalar ile doğrudan alımında güçlükler vardır ve resveratrol molekülü depolamaya oldukça hassas bir bileşiktir. Resveratrolün sağlık üzerinde birçok yararlı etkisi bulunmaktadır. Bunlar arasında kardivasküler sisteme etkileri, antioksidan, antirombosit, anjiogenezi antikanserojen ve antiinflamatuvar etkileri en başta gelmektedir. Dünyada en yaygın ölüm sebeplerine bakıldığında en başta ve damar hastalıkları gelmektedir. Ülkemizde ise bu oran %33,5'dir. Her yıl kalp ve damar hastalıkların sebebiyle bu kadar fazla ölüm olması bilim insanlarının da dikkatini çekerek bu konu üzerinde araştırmalarını yoğunlaştırmışlardır. Kalp ve damar rahatsızlıklarının sebebinin birçoğu sağlıksız beslenmeden kaynaklanmaktadır. Diyetinde fazla miktarda et tüketimi zamanla damarların tıkanmasına sebebiyet verip kalp ve damar rahatsızlıklarının oluşumunu arttırmaktadır. Bilim insanlarının dikkatini çeken bir konuda Fransızların fazla et tüketmeleri ve yüksek yağlı beslenmelerine rağmen kalp ve damar rahatsızlık oranlarının çok düşük olmasıdır. Bu konu üzerine araştırmalar yürütülmüş olup bunun sebebinin kırmızı şarap tüketiminden kaynaklı olduğu bulunmuştur. Düzenli şarap tüketen insanlarda kalp ve damar rahatsızlığına yakalanma olasılığı çok daha düşük olarak belirtilmiştir. Prseton (2001)'in bildirdiğine göre yüksek yağlı diyetlerde kırmızı şarap tüketimin kalp ve damar rahatsızlıklarını önemli derecede azalttığı ve hatta önlediği belirtilmiştir. Bu durum bilim insanlarını şarap içeriğini araştırmaya itmiş ve şarap içeriğinde birçok faydalı bileşik olduğunu tespit etmişlerdir. Kırmızı şarapların bu kadar bileşence zengin olmasının sebebi şarap üretimi sırasında üzümün preslenerek kabuk içeriğindeki bileşenlerin bir kısmının üzüm suyuna geçmesidir. Üzüm çok sayıda fenolik bileşik içermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda şarabın bu etkinliğinin büyük ölçüde içinde bulundurduğu stilben ailesine ait bir polifenolik bileşik olan "Resveratrol"den kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Resveratrol bileşiği üzümün çekirdek

ve kabuğunda bol miktarda bulunur. Üzüm olgunlaşmaya yakın ortaya çıkarak savunma mekanizması görevi görerek meyveyi çeşitli enfeksiyonlara karşı korumaktadır. Farklı birçok meyvede resveratrol bulunmaktadır. Üzümde tespit edilen yaklaşık resveratrol miktarı 28 µg/g'dır.

Ülkemiz coğrafi özellikle sebebiyle birçok üzüm türüne ev sahipliği yapmaktadır. En çok üzüm üretimi yapan ülkeler arasında 5. Sırada yer alan Türkiye'de yıllık üzüm üretimi yaklaşık 3,65 milyon ton civarındadır. Üretilen üzümler sofralık ve şaraplık olarak 2 sınıfa ayrılmıştır. Sofralık olarak yetiştirilen türler genellikle meyve suyu, şıra, kurutmalık, pestil vb. gibi şeylerin yapımında kullanılması için yetiştirilmekte olup iri, ince kabuklu ve bol sulu türler seçilmektedir. Şaraplık olarak yetiştirilen türler ise, küçük taneli, aromalı ve kalın kabuklu türlerdir. Şarap fabrikalarının kullanmış olduğu türlere bakıldığında resveratrol oranı daha yüksek türlerdir. Üretilen üzümlerin yaklaşık %3'ü şaraplık olarak değerlendirilmektedir. İşlenen şaraplık üzümden %15-25 oranında posa elde edildiği dikkate alınacak olursa, üzüm posası üretimi küçümsenmeyecek boyuttadır.

Bu çalışmada üzüm posası atığından resveratrolün optimum ekstraksiyon koşulları altında izolasyonu ve kolon kromatografisi ile zenginleştirilmesi sağlanmış olup lesitin ile kapsüllemesi yapılmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarında geleneksel metoda ilaveten farklı yenilikçi metotlarda denenmiştir. Fakat optimum değerler etanol çözücüsü ile klasik ekstraksiyon yapılarak elde edilmiştir. Saflaştırma basamağında hekzan ile yapılan ön yıkamaların resveratrolün saflığı ve derişimini önemli derecede etkilediği görülmüştür. Saflaştırma çalışmalarında adsorban uygulaması kısmında boyar madde giderimi için kullanılabileceği fakat resveratrolü de bir miktar adsorbe ettikleri için çok sağlıklı sonuç elde edilemeyeceği tespit edilmiştir. Resveratrolün hekzan ile ön yıkama, etanol ile 24 saatlik ekstraksiyon ve silika G-60 kolondan izolasyonu basamakları sonucunda eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bileşiğe ait yapı tayinleri, LC-MS/MS, HPLC ve NMR ile yapılmıştır. LC-MS/MS uygulamasında moleküler iyon pikleri [M]⁺ ve [M]⁻ parçalanma ürünleri saptanmıştır. HPLC analizleri ile referans standart madde ile karşılaştırılmıştır. NMR sonuçlarında ise aromatik benzene, alifatik =C-H pikine ve fenolik O-H protonlarına ait pikler gözlenmiştir. Resveratrol sudaki çözünürlüğü çok düşük olan bir moleküldür. Sudaki çözünürlüğünün arttırılması suda çözünür bir molekül ile kaplanarak arttırılabilir. Resveratrol molekülü ısı ve ışık gibi uyaranlara hassas bir molekül olup bozulmalar veya cis formuna dönüşümler gerçekleşebilmektedir. Bu sebeple ekstraksiyonları karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Zenginleştirme

aşamasında yenilikçi bir metot olan flash kromatografi cihazı kullanılmıştır. Giderek yaygınlaşan flash kromatografi hızlı çözümler sunması ve kolay kullanılabilir olması sebebiyle diğer yöntemlerden daha avantajlıdır. Çalışmalarımız yapılırken farklı metotlar ve kartuşlar kullanılmıştır. En güzel sonuç su-metanol mobil fazlı sistemle C-18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Fakat elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde istediğimiz saflıkta resveratrol elde edilememiştir. Denemeler sonucunda edinmiş olduğumuz tecrübe daha uzun bir kolonun kullanılmasıdır. Daha uzun bir kartuş kullanılarak su-metanol mobil fazlı sistemde yürütme yapılarak resveratrol saflaştırılabilir.

Biz denemelerimizde yüksek saflıkta resveratrol elde etmiş olduğumuz silika kolon ile zenginleştirme işlemlerimizi gerçekleştirdik. Zenginleştirilerek toplanan resveratrol lesitin ile kapsüllendi. Elde edilen bulgular, enkapsülasyon çalışmaları ile önemli sonuçlar elde edildiğini ve resveratrolün enkapsülasyonunda, resveratrolün sudaki çözünürlüğünün düşük olması sebebiyle sudaki çözünürlüğünü arttırıcı biyoyoumlu lesitin tek başına kullanımı ve 1:2 (etken madde / kaplama maddesi) oranında kullanımı daha iyi sonuç vermiştir.

Enkapsülasyon yöntemi seçilirken, resveratrolün sıcaklığa dayanıklılığının düşük olması gibi sebeplerden ötürü liyofilizasyon yöntemine karar verilmiştir. Spray dryer yöntemide denenmiş fakat ürünümüz alkol içerikli olduğu için riskli bulunmuştur. Liyofilizasyon işlemi yapılırken optimum sürenin 3 gün olduğu bulunmuştur. Kaplama maddesi kullanımı resveratrolün depolama stabilitesini ve biyoyararlanımını önemli derecede arttırmıştır. Biyoyararlanımının test edilmesi amacıyla yapılan in-vitro salınım testleri neticesinde kapsüllenen resveratrol molekülünün, kapsüllenmemiş moleküle göre sudaki çözünürlüğünün artmış olduğu sonuçlar neticesinde tespit edilmiştir. Özellikle barsak ortamında ilk 30 dakikada resveratrol yüksek miktarda çözünerek 1 saatin sonunda hemen hemen tamamen çözünerek salınım gerçekleştirmiştir. Mide ve barsaktaki çözünürlüğü çok düşük olması sebebiyle tüketimi zor bu nedenle biyoyararlılığı zayıf olan resveratrolün, kapsüllendikten sonra tüketilmesinin mümkün olduğu görülmüştür. İçermiş olduğu etken madde miktarı belirlenerek doz ayarlaması yapıp kullanıma hazır hale getirilebileceği görüldü. Piyasada satılan birçok ürün incelendiğinde mg olarak satışları mevcut olup çok pahalıya temin edilmektedir. Fakat atıkların değerlendirilmesinden ortaya çıkan ürün çok daha uygun maliyete gelecektir.

Elde edilen sonuçlar neticesinde, gelecekte resveratrolün ilaç ve fonksiyonel gıda alanlarında kullanımının artabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, üzüm posası gibi bir

atık ve çevre kirliliği oluşturabilecek malzemenin değerlendirilmiş olması sebebiyle önemli bir adımdır. Aynı zamanda, endüstriyel atıkların sürdürülebilir bir şekilde kullanımını teşvik etmekte ve değerli bileşiklerin geri kazanılmasını sağlamaktadır. Öte yandan resveratrol gibi biyoyararlanımı düşük ve sudaki çözünürlüğü çok az olan molekülün kapsüllenerek çözünürlüğü arttırılmıştır. Üzüm posasından resveratrolün zenginleştirilmesi ve lesitin ile enkapsülasyonu başarıyla geręekleřtirilmiřtir. Piyasada satılan biręok ürün incelendiğinde mg olarak satışları mevcut olup çok pahalıya temin edilerek sudaki çözünürlüğü düşük olduğu için kullanımları oldukça sınırlıdır. Resveratrol pahalı bir hammadde olup ülkemiz kaynaklarından üretilmesi ve ticarileştirilmesi ekonomiye önemli ölçüde katkı sağlayacaktır. Böylesine değerli değerli bir bileşen içeren fabrika atıklarının, atık ya da hayvan yemi olarak kullanılması yerine ekonomik açıdan katma değeri yüksek ürünlere dönüştürölmesine ön ayak oluşturması açısından çalışmamız oldukça önemlidir.



5. KAYNAKLAR

- [1] M. L. Özdüven, L. Coşkuntuna, ve F. Koç, “Üzüm Posası Silajının Fermantasyon Ve Yem Değer Özelliklerinin Saptanması”, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, c. 6, sayı 1, ss. 45–50, 2005.
- [2] Vikipedi. "Üzüm". Erişim 14 Mayıs, 2023. <https://tr.wikipedia.org/wiki>.
- [3] O. Sevindik ve S.Selli,“Üzüm çekirdek yağı eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri”, *The Journal of Food*, c. 42, sayı 1, ss. 95-103, 2017.
- [4] N. Keskin , İ. S. Gökçen , B. Kunter , S. Cantürk ve B. Karadoğan , "Üzüm fitokimyasalları ve türkiye’de yetiştirilen üzüm çeşitleri üzerindeki araştırmalar", *Turkish Journal of Forest Science*, c. 1, sayı. 1, ss. 93-111, Nis. 2017.
- [5] A. Sümbül, E. Yıldız, ve Y. Bilgisi, “Türkiye’de Yetiştiriciliği Yapılan Sofralık, Kurutmalık ve Şaraplık Üzümlerin Üretim Projeksiyonu”, *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, c. 5, sayı 1, ss. 17–22, 2022.
- [6] V. Louli, N. Ragoussis, ve K. Magoulas, “Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products”, *Bioresource Technology*, c. 92, sayı 2, ss. 201–208, 2004.
- [7] N. Keskin, Tefik Noyan ve B. Kunter,“ Health from Grape by Resveratrol: Review”, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical*, c.29, sayı 5, ss. 1273-1279, 2009.
- [8] L. Creasy ve M. Creasy,“Grape chemistry and the significance of resveratrol: an overview”, *Pharmaceutical Biology*, s.36, ss. 8-13, 1998.
- [9] E. H. Siemann ve L. L. Creasy, “Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine”, *American Journal of Enology and Viticulture*, c. 43, sayı 1, ss. 49–52, Oca. 1992.
- [10] G. J. Soleas, D. M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, E. Tsang, ve E. P. Diamandis, “Comparative evaluation of four methods for assay of ‘cis-’ and ‘trans-’ resveratrol”, *American Journal of Enology and Viticulture*, c. 48, sayı 2, ss. 169–176, 1997.
- [11] L. Chen, G. E. Remondetto, ve M. Subirade, “Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems”, *Trends in Food Science & Technology*, c. 17, sayı

- 5, ss. 272–283, May. 2006.
- [12] E. Wenzel ve V. Somoza, “Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol”, *Molecular nutrition & food research*, c. 49, sayı 5, ss. 472–481, May. 2005.
- [13] T. Walle, “Bioavailability of resveratrol”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, c. 1215, sayı 1, ss. 9–15, 2011.
- [14] P. Vitaglione vd., “Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans”, *Molecular nutrition & food research*, c. 49, sayı 5, ss. 495–504, May. 2005.
- [15] T. Walle, F. Hsieh, M. H. DeLegge, J. E. Oatis, ve U. K. Walle, “High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans”, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, c. 32, sayı 12, ss. 1377–1382, Ara. 2004.
- [16] J. Ortuño vd., “Matrix effects on the bioavailability of resveratrol in humans”, *Food Chemistry*, c. 120, sayı 4, ss. 1123–1130, Haz. 2010.
- [17] G. Ergin Kızılçay ve S. Ertürk Toker, “Effect of glycyrrhizic acid on the bioavailability of resveratrol after oral administration in rabbit plasma using HPLC with fluorescence detection”, *Microchemical Journal*, c. 168, Eyl. 2021.
- [18] J. Grgić, G. Šelo, M. Planinić, M. Tišma, ve A. Bucić-Kojić, “Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds”, *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, c. 9, sayı 10, ss. 1–36, Eki. 2020.
- [19] G. Alleweldt ve J. V. Possingham, “Progress in grapevine breeding”, *Theoretical and Applied Genetics*, c. 75, sayı 5, ss. 669–673, May. 1988.
- [20] G. Baydar, N. Çetin, F. Hallaç ve Z. Babalık, "Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi". *Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu*'nda sunuldu, Tekirdağ, Türkiye, 2005.
- [21] V. Uylaşer, K. İnce, "Şaraptaki antioksidanlar ve fenolik bileşikler". *Türkiye 10. Gıda Kongresi* “ Erzurum, Türkiye, 2008.
- [22] Tenderis, B. (2010). ' Üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu ', Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, Türkiye.
- [23] G. Kont, Ş. Özkan ve A. Toprak, " Üzüm sektörü araştırma raporu" İzmir Ticaret

Odası, Türkiye, Rap. 22, 2022.

- [24] “Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)”. <https://www.tuik.gov.tr/> (erişim 15 Mayıs 2023).
- [25] “TİM - Türkiye İhracatçılar Meclisi”. <https://tim.org.tr/tr/default> (erişim 15 Mayıs 2023).
- [26] A. Teixeira vd., “Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review”, *International journal of molecular sciences*, c. 15, sayı 9, ss. 15638–15678, Eyl. 2014.
- [27] I. Doymaz ve N. A. Akgün, “Study of thin-layer drying of grape wastes”, *Chemical Engineering Communications*, c. 196, sayı 7, ss. 890–900, Tem. 2009.
- [28] I. Sánchez-Alonso, A. Jiménez-Escrig, F. Saura-Calixto, ve A. J. Borderías, “Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies”, *Food Chemistry*, c. 101, sayı 1, ss. 372–378, Oca. 2007.
- [29] K. Brijwani, A. Rigdon, ve P. V. Vadlani, “Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing”, *Enzyme Research*, c. 2010, 2010.
- [30] A. Schieber, F. C. Stintzing, ve R. Carle, “By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments”, *Trends in Food Science & Technology*, c. 12, sayı 11, ss. 401–413, Kas. 2001.
- [31] D. R. Kammerer, J. Kammerer, R. Valet, ve R. Carle, “Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients”, *Food Research International*, c. 65, sayı PA, ss. 2–12, Kas. 2014.
- [32] L. Tiemi, A. Renata, V. da Mota, F. Maria Lajolo ve M. Inés Genovese “Phenolic compounds and antioxidant activity of Vitis labrusca and Vitis vinifera cultivars”, *Food Science and Technology*, c. 27, sayı 2, ss. 394-400, 2007.
- [33] E. M. Yahia ve A. Carrillo-Lopez, “Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables”, 2018. Norman F. Haard Journal of Chemical Education 1984 61 (4), ss. 277.
- [34] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, ve C. I. Ukaegbu, “Extraction of phenolic compounds: A review”, *Current research in food science*, c. 4, ss. 200–214, Oca.

2021.

- [35] S. Häkkinen, “Flavonols and phenolic acids in berries and berry products”, *Medical Sciences*, ss.90, 2000.
- [36] K. A. Onat, M. Sezer, ve B. Çöl, “Fenolik Bileşiklerden Sinamik Asit, Kafeik Asit ve p-kumarik Asit’in Bazı Biyolojik Aktiviteleri”, *Journal of the Institute of Science and Technology*, ss. 2587–2598, Ara. 2021.
- [37] M. O. Downey, N. K. Dokoozlian, ve M. P. Krstic, “Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research”, *American Journal of Enology and Viticulture*, c. 57, sayı 3, ss. 257–268, 2006.
- [38] M. Gerogiannaki-Christopoulou, P. Athanasopoulos, N. Kyriakidis, I. A. Gerogiannaki, ve M. Spanos, “trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties”, *Food Control*, c. 17, sayı 9, ss. 700–706, Eyl. 2006.
- [39] B. Halliwell, “Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker?”, *Free Radical Biology and Medicine*, c. 32, sayı 10, ss. 968–974, May. 2002.
- [40] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, ve A. Crozier, “Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases”, *Antioxidants & Redox Signaling*, c. 18, sayı 14, s. 1818, May. 2013.
- [41] L. Frémont, “Minireview: Biological effects of resveratrol”, *Life Sciences*, c. 66, sayı 8, ss. 663–673, Oca. 2000.
- [42] J. A. Baur ve D. A. Sinclair, “Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence”, *Nature reviews. Drug discovery*, c. 5, sayı 6, ss. 493–506, Haz. 2006.
- [43] M. Gülcü, “Biyoaktif Bir Bileşen: Resveratrol ”, *Gıda ile Beslenme Dergisi*, s. 5, 2019.
- [44] J. M. Pezzuto, “Resveratrol: Twenty Years of Growth, Development and Controversy”, *Biomolecules & Therapeutics*, c. 27, sayı 1, s. 1, Oca. 2019.
- [45] B. C. Vastano, Y. Chen, N. Zhu, C. T. Ho, Z. Zhou, ve R. T. Rosen, “Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*”, *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, c. 48, sayı 2, ss. 253–256, Şub. 2000.

- [46] I. Odriozola-Serrano *vd.*, “Stability and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Rosehip Extracts during In Vitro Digestion”, *Antioxidants* 2023, Vol. 12, Page 1035, c. 12, sayı 5, s. 1035, Nis. 2023.
- [47] J. M. Smoliga ve O. Blanchard, “Enhancing the delivery of resveratrol in humans: if low bioavailability is the problem, what is the solution?”, *Molecules (Basel, Switzerland)*, c. 19, sayı 11, ss. 17154–17172, Kas. 2014.
- [48] E. Wenzel ve V. Somoza, “Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol”, *Molecular nutrition & food research*, c. 49, sayı 5, ss. 472–481, May. 2005.
- [49] V. Weinborn *vd.*, “Measurement of Saccharin and trans-Resveratrol Metabolites in Urine as Adherence Markers for Small Quantity Lipid-Based Nutrient Supplement Consumption”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, c. 69, sayı 3, ss. 1107–1114, Oca. 2021.
- [50] R. F. Furchgott, “Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle”, *Circulation research*, c. 53, sayı 5, ss. 557–573, 1983.
- [51] C. K. Chen ve C. R. Pace-Asciak, “Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta”, *General Pharmacology*, c. 27, sayı 2, ss. 363–366, 1996.
- [52] E.K. Naderali, P.J. Doyle ve G. Williams, “Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs ”, *Clinical Science*, c. 98, sayı. 5, ss. 537-43, 2000.
- [53] B. Fauconneau, P. Waffo-Teguo, F. Huguet, L. Barrier, A. Decendit, ve J. M. Merillon, “Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests”, *Life Sciences*, c. 61, sayı 21, ss. 2103–2110, Eki. 1997.
- [54] J. G. Zou, Y. Z. Huang, Q. Chen, E. H. Wei, T. C. Hsieh, ve J. M. Wu, “Resveratrol inhibits copper ion-induced and azo compound-initiated oxidative modification of human low density lipoprotein”, *Biochemistry and molecular biology international*, c. 47, sayı 6, ss. 1089–1096, 1999.
- [55] S. Khanna, S. Roy, D. Bagchi, M. Bagchi, ve C. K. Sen, “Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed

- proanthocyanidin extract”, *Free Radical Biology and Medicine*, c. 31, sayı 1, ss. 38–42, Tem. 2001.
- [56] M. Ermlia Juan, M. Pilar Vinardell, ve J. M. Planas, “The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful”, *The Journal of nutrition*, c. 132, sayı 2, ss. 257–260, 2002.
- [57] Y. Dobrydneva, R. L. Williams, ve P. F. Blackmore, “trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets”, *British journal of pharmacology*, c. 128, sayı 1, ss. 149–157, 1999.
- [58] P. Shukla ve U. Bajwa, “Microencapsulating Functional Ingredients for Various Food Products”, *Indian Food Industry Mag*, c.32, sayı.3, ss. 31-41, 2013.
- [59] M. Augustin, L. Sanguansri, C. Margetts, ve B. Young, “Microencapsulation of food ingredients”, *Food Australia*, c.53, ss. 220-223, 2001.
- [60] A. Lopez-Rubio, R. Gavara, ve J. M. Lagaron, “Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials”, *Trends in Food Science & technology.*, c. 17, sayı 10, ss. 567–575, Eki. 2006.
- [61] V. P. Torchilin, “Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers”, *Nature Reviews Drug Discovery* 2005 4:2, c. 4, sayı 2, ss. 145–160, Şub. 2005.
- [62] H. H. Hatanaka “Egg lecithin process”, United States. Patent US4844926A, Haz. 1987.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Pınar KARAGÜL

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Doğal, Bitkisel Ve Kozmetik Ürünler	Düzce Üniversitesi	2023
Y. Lisans	Kimya Bölümü	Düzce Üniversitesi	2018
Lisans	Kimya Bölümü	Düzce Üniversitesi	2016
Lise	Matematik-Fen	Hacı Zehra Akkoç Kız Anadolu Lisesi	2011

YAYINLAR

A. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Pınar Aydın, Halil İbrahim Uğraş, Bora Karagül, Şeref Karadeniz, Bazı Aminoasit Gümüş Tuzlarının Sentezi ve Karakterizasyonu', İleri Teknoloji Bilimleri Dergisi, 7(2), 36-46, 2018

A2. Mert DÖNMEZ, Şeref KARADENİZ, Taner YOLDAS, Gülşah AYDIN, Pınar KARAGÜL, Osman AKSU, Pınar GÖÇ RASGELE, 'Comparison of Chemical Contents of Extracts in Different Solvents of Propolis Samples Produced in Duzce Province' International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research, 1(3), 137-146, 2020.