



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İZABELLA ÜZÜM (*Vitis labrusca*)
ATIKLARINDAN DENEYSEL TASARIM
ARACILIĞIYLA ELDE EDİLEN
EKSTRELERİN İÇERİĞİNİN VE
PANKREATİK LİPAZ İNHİBİSYONUNUN
İNCELENMESİ**

Malek AL FARAJ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Merve BADEM

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10 / 09 /2024

Malek AL FARAJ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamda benden desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Merve BADEM, laboratuvar çalışmalarımda bana her türlü desteği veren sayın Dr. Öğr. Üyesi Şeyda KANBOLAT ve Dr. Nevin ULAŞ ÇOLAK hocalarıma, materyal temini için NATUVA'ya,

Yüksek lisans tez çalışmamı TYL-2023-10977 proje koduyla destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Malek AL FARAJ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

RESİMLER DİZİNİ

xi

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xii

ÖZET

xiii

ABSTRACT

xiv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

4

2.1. İzabella üzümü (kokulu üzüm) hakkında genel bilgiler

4

2.2. Oksidanlar ve Antioksidanlar

5

2.3. Lipaz enzimi

7

2.4. Obezite hakkında genel bilgiler

8

2.5. Polifenoller

9

2.6. Antosiyanin

10

2.7. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Yöntemleri

12

2.7.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

13

2.7.2. Nonkonvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

14

2.8. Deneysel Tasarım Hakkında Genel Bilgiler

16

2.8.1. Faktöriyel Tasarımlar

16

2.8.2. Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM)

17

3. GEREÇ ve YÖNTEM

18

3.1. Kullanılan cihazlar

18

3.2. Kullanılan kimyasallar

18

3.3. Materyalin Temini ve Liyofilizasyonu

18

3.4. Deneysel Tasarım ile Optimum Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi

18

3.4.1. Deney Tasarımının Design-Expert-11.1.2 ile Kurgulanması	19
3.4.1.1. Faktörlerin Belirlenmesi	21
3.4.1.2. Box-Behnken Optimizasyonu	21
3.5. Deneyisel Tasarımla Hazırlanan Ekstreler Üzerine Yapılan Analizler	21
3.5.1. Fenolik Bileşenlerin RP-HPLC ile Analizi	22
3.5.2. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini	22
3.5.3. Toplam Antosiyanozit Madde Miktar Tayini	23
3.5.4. Pankreatik Lipaz İnhibitör Etki Belirleme Çalışmaları	23
3.6. Optimum Ekstrenin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi	24
3.6.1. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Ölçümü	25
3.6.2. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini	25
3.6.3. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	25
3.7. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Fraksiyonel Faktöriyel Analiz Sonuçları	26
4.2. Box- Behnken Optimizasyonu	28
4.3. Deneyisel Tasarımla Hazırlanan Ekstreler Üzerine Yapılan Analiz	34
4.3.1. Fenolik Bileşenlerin RP-HPLC ile Analiz Sonuçları	34
4.3.2. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini Sonuçları	36
4.3.3. Toplam Antosiyanozit Madde Miktar Tayini Sonuçları	37
4.3.4. Pankreatik Lipaz İnhibitör Etki Belirleme Çalışmaları Sonuçları	38
4.4. Optimum Ekstrenin Antioksidan Aktivite Sonuçları	48
4.4.1. FRAP Ölçümü Sonuçları	48
4.4.2. CUPRAC Tayini Sonuçları	49
4.4.3. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini Sonuçları	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada değerlendirilecek bağımsız değişkenler	19
Tablo 2. Tasarım programı	20
Tablo 3. Box-Behnken tasarım programı	21
Tablo 4. Fenolik içeriğinin belirlenmesi için uygulanan HPLC şartları	22
Tablo 5. Faktöriyel tasarım ANOVA verileri	27
Tablo 6. Box-Behnken ANOVA karesel model verileri	28
Tablo 7. Gerçek faktörler açısından nihai denklem	34
Tablo 8. Gerçek faktörler açısından nihai denklem (simgesel)	34
Tablo 9. Ekstrelerin toplam fenolik, antosiyanozit madde miktarı ve Orlistat'ın lipaz enzim inhibisyonu sonuçları	47
Tablo 10. Numunelerin antioksidan aktivite sonuçları	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.	Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması 9
Şekil 2.	Antosiyanidinlerin genel yapısı 11
Şekil 3.	Ekstraksiyon yöntemleri 13
Şekil 4.	Standartların kromatogramı 35
Şekil 5.	11 nolu ekstrenin kromatogramı 35
Şekil 6.	16 nolu ekstrenin kromatogramı 36
Şekil 7.	Gallik asit'in kalibrasyon grafiği 36
Şekil 8.	Ekstrelerin fenolik madde miktar tayini sonuçları 37
Şekil 9.	Ekstrelerin antosiyanozit madde miktar tayini sonuçları 37
Şekil 10.	Orlistat'a ait lipaz enzim inhibisyonu grafiği 38
Şekil 11.	1 nolu (A) ve 2 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 38
Şekil 12.	3 nolu (A) ve 4 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 39
Şekil 13.	5 nolu (A) ve 6 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 39
Şekil 14.	7 nolu (A) ve 8 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 40
Şekil 15.	9 nolu (A) ve 10 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 40
Şekil 16.	11 nolu (A) ve 12 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 41
Şekil 17.	13 nolu (A) ve 14 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 41
Şekil 18.	15 nolu (A) ve 16 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 42
Şekil 19.	17 nolu (A) ve 18 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 42
Şekil 20.	19 nolu (A) ve 20 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 43
Şekil 21.	21 nolu (A) ve 22 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 43
Şekil 22.	23 nolu (A) ve 24 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 44
Şekil 23.	25 nolu (A) ve 26 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 44
Şekil 24.	27 nolu (A) ve 28 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 45
Şekil 25.	29 nolu (A) ve 30 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 45
Şekil 26.	31 nolu (A) ve 32 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri 46
Şekil 27.	Orlistat ve örneklerin IC ₅₀ değerleri 46
Şekil 28.	Numunelerin FRAP ve CUPRAC sonuçları 48
Şekil 29.	FRAP tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği 49
Şekil 30.	CUPRAC tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği 49
Şekil 31.	DPPH tayininde kullanılan BHT'e ait kalibrasyon grafiği 50

Şekil 32.	DPPH tayininde kullanılan 11'e ait kalibrasyon grafiği	50
Şekil 33.	DPPH tayininde kullanılan 16'ya ait kalibrasyon grafiği	51
Şekil 34.	Numunelerin DPPH sonuçları	51



RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Design Expert 11.1.2 program ile elde edilen tasarım gücü	19
Resim 2. Faktörlerin Pareto çizelgesi	26
Resim 3. Shapiro-Wilk test grafiği	27
Resim 4. Etanol yüzdesi minimum noktada model diyagramı	29
Resim 5. Etanol yüzdesi maksimum noktada model diyagramı	29
Resim 6. Mikrodalga gücü minimum noktada model diyagramı	30
Resim 7. Mikrodalga gücü maksimum noktada model diyagramı	30
Resim 8. Sıcaklık minimum noktada model diyagramı	31
Resim 9. Sıcaklık maksimum noktada model diyagramı	31
Resim 10. Sıcaklık faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	32
Resim 11. Sıcaklık faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	32
Resim 12. Mikrodalga faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	33
Resim 13. Mikrodalga faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	33

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABTS	2,2-Azino-bis(3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit)
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
DAD	Diyot dizi dedektörü
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	2,2 -Difenil-1-pikrilhidrazil
Ec	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Ekstraselüler matriks
FALGPA	N-[3- (2-Furil) akrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan konsantrasyon

ÖZET

İzabella Üzüm (*Vitis labrusca*) Atıklarından Deneysel Tasarım Aracılığıyla Elde Edilen Ekstrelerin İçeriğinin ve Pankreatik Lipaz İnhibisyonunun İncelenmesi

Sentetik bileşenlerin yan etkilerinin artması ile birlikte tüketicilerin doğal ve sağlıklı bileşenleri içeren ürünleri tercih etme oranları artmaya başlamıştır. Gıda endüstrisinde açığa çıkan atıklardan elde edilen ürünlerin sağlık açısından olumlu etkilerinin bulunması ve bu atıkların değerlendirilme maliyetinin düşük olması sebebiyle gıda atık ürünlerinin gıda, boya, ilaç ve kozmetik endüstrisi gibi farklı alanlarda değerlendirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu tez çalışmasında Karadeniz Bölgesi için endemik bir değer olan İzabella üzümü (*Vitis labrusca*)'nden elde edilecek posadan deneysel tasarımla hazırlanacak ekstrelerin içeriğinin ve pankreatik lipaz inhibitör etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan İzabella üzüm posası liyofilize edilerek öğütülmüş ve fraksiyonel faktöriyel dizayn tasarımına uygun şekilde ekstrelerin hazırlanması için kullanılmıştır. Elde edilen ekstrelerin fenolik içerikleri RP-HPLC ile belirlenmiştir. Ekstraksiyonu en çok etkileyen parametrelerin etanol yüzdesi, mikrodalga gücü ve sıcaklık olduğu saptanmıştır. Ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu için Box- Behnken Optimizasyonu kullanılmıştır. Tüm veriler göz önüne alındığında yüksek miktarda fenolik madde ve antosiyanin içeren ekstreler optimum ekstre olarak belirlenmiştir. Çalışmada üzüm posasından elde edilen ekstrelerin lipaz inhibitor etkili olduklarının tespit edilmesi ile birlikte, optimum ekstrenin lipaz inhibitor etkisinin Orlistat'a yakın olduğu bulunmuştur. Optimum ekstrelerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesine yönelik CUPRAC, FRAP ve DPPH radikali süpürücü aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Üzümün işlenmesi sonucu oluşan bu atıkların doğal antioksidan kaynağı olarak genel sağlığı iyileştirmeye ve oksidasyonla ilişkili hastalıkların önlenmesine yönelik gıda ve sağlık ürünlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği; obezite tedavisinde yeni lipaz inhibitor etkili farmakofor arayışında kullanılabilecek potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antosiyanozit, Fenolik, İzabella, Lipaz, Obezite

ABSTRACT

Investigation of Pancreatic Lipase Inhibitory Effects and Content of Extracts Obtained from Isabella Grape (*Vitis labrusca*) Wastes Through Experimental Design

As the side effects of synthetic components increase, consumers are increasingly opting for products containing natural and healthy ingredients. Due to the positive health effects of products derived from waste produced in the food industry and the low cost of processing these wastes, studies on the utilization of food waste products in various fields such as food, dye, pharmaceuticals, and cosmetics have accelerated. This thesis aims to investigate the content and pancreatic lipase inhibitory effects of extracts prepared with experimental design from the pomace of the Isabella grape (*Vitis labrusca*), an endemic value for the Black Sea Region. The Isabella grape pomace used in this study was lyophilized, ground, and used to prepare extracts according to a fractional factorial design. The phenolic contents of the obtained extracts were determined by RP-HPLC. The parameters that most affected the extraction were found to be ethanol percentage, microwave power, and temperature. Box-Behnken Optimization was used to optimize the extraction conditions. Considering all data, extracts containing high amounts of phenolic substances and anthocyanins were identified as optimal extracts. The study found that the extracts obtained from grape pomace exhibited lipase inhibitory effects, with the optimal extract's lipase inhibitory effect being close to that of Orlistat. To determine the antioxidant capacity of the optimal extracts, CUPRAC, FRAP, and DPPH radical scavenging activity studies were conducted. It is believed that these wastes resulting from the processing of grapes could contribute to the development of food and health products aimed at improving general health and preventing oxidation-related diseases as a natural source of antioxidants; they could also be a potential source for the search for new pharmacophores with lipase inhibitory effects in obesity treatment.

Key Words: Anthocyanoside, Isabella, Lipase, Obesity, Phenolic

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda, obezite başta olmak üzere, tedavisi zor ve pahalı olan kronik hastalıklarla mücadele eden hasta sayısının artması ve bu yönde yapılan araştırmalar, bu hastalıkların beslenme alışkanlıklarından olumlu veya olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir. Bu durum insanların sağlıklı beslenmeye olan ilgisini artırmıştır. Dolayısıyla, tüketiciler, üreticilerden doğal, kaliteli ve aynı zamanda prebiyotik, probiyotik, antioksidan gibi özelliklere sahip gıdalar talep etmektedir (1, 2).

Obezite; enerji alımı ve kullanımı arasındaki dengesizlikten kaynaklanan, insan sağlığını olumsuz etkileyecek şekilde anormal veya fazla yağ birikimi olarak tanımlanmaktadır (3). Obezite ve doğrudan ilişkili olduğu diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, kanser gibi birçok rahatsızlık, yüksek oranda sağlık sorunlarına ve küresel ölçekte ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (4). Obezite tüm dünyada hızla artmaktadır ve sağlık sistemlerine önemli bir yük getirmektedir. 2030 yılında dünya nüfusunun yaklaşık %39'unun aşırı kilolu, %20'sinin obez olacağı tahmin edilmektedir (5). Obezite tedavisinde diyet ile birlikte alınan lipidlerin sindiriminin inhibisyonunu ve lipidlerin absorpsiyonunun inhibisyonunu gerçekleştiren pankreatik lipaz inhibitörleri günümüzde geçerliğini koruyan sınırlı tedavi yaklaşımlarından biridir. Lipaz inhibitör etki ve obeziteyle ilişkili birçok diğer mekanizmayla etkisi kanıtlanmış sekonder metabolitleri içeren bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin, obezite tedavisinde kullanılma potansiyeli bulunmaktadır (6).

Karadeniz bölgesinde yetişen *Vitis labrusca* L. halk arasında “kokulu üzüm, izabella üzümü, çilek üzümü, Amerikan üzümü, siyah üzüm” olarak adlandırılmaktadır. *V. labrusca*, uzunluğu 3-12 m olan, sarılcı odunsu gövdeli, sıg ve geniş yapraklı, kalın kabuklu, çekirdekli, hızlı bir şekilde büyüyen bir bitkidir. Kalın kabuğu mavimsi siyah veya yeşil renkli, iç kısmı yumuşak olan kokulu üzüm kendine has keskin bir aromaya sahiptir. Bölge halkı tarafından, meyvenin iç kısmı kabuklarından ayrılarak yenilmekte, aynı zamanda içecek, marmelat, pekmez, pestil, sirke, turşu şeklinde de tüketilmektedir (7-11). İç kısmı, çekirdeği ve kabukları ile oldukça değerli olan kokulu üzümle ilgili birçok fitokimyasal çalışma mevcuttur ve bu çalışmalarda kokulu üzümün fenolik bileşikler, organik asitler, vitaminler ve mineraller, enzimler, monosakkaritler ve türevleri, azotlu bileşikler, terpenik bileşikler ve lipidler açısından zengin olduğu rapor edilmiştir (7, 11, 12).

Üzümün kabuk, çekirdek ve sapsarı “üzüm posası” olarak adlandırılır. Çoğunluğu kabuktan oluşan üzüm posasının yağ, protein, pektin ve şeker içeriğinin yüksek olduğu

bilinmektedir. Üzüm posası gübre üretimi, hayvanlar için besin kaynağı, gıda katkı maddesi gibi farklı amaçlarla yeniden değerlendirilebilmektedir. Aynı zamanda, sitrik asit üretimi, antosiyanozit içeriği ile gıdaların renklendirilmesi ve üzüm çekirdeklerinden lakkaz üretimi amacıyla kullanımı da bulunmaktadır (13, 14).

Üzüm türleri ile yapılan çalışmalarda, üzümde elde edilen ekstraktların antikanserojenik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antialerjik ve antiödem aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yara iyileştirici olarak, enflamasyon, diyabetik retinopati, damar sertliği, mikrodolaşım bozuklukları, gece körlüğü, oküler ışık hassasiyeti, kapiller kırılabilirlik, vasküler dejenerasyon, aşırı plaklar agregasyonu gibi hastalıkların tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır (8, 10, 15, 16).

Gıdalarda bulunan ve biyolojik etkiden sorumlu olan aktif bileşiklerin sindirim sisteminde görev alan enzimleri inhibe etme, termojenez artırma, adiposit farklılığı önleme, lipid metabolizmasını artırma, iştahı azaltma gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kilo kontrolünde etkili olduğu bildirilmektedir (17-20). Polifenolik bileşenlerin yağ metabolizması ile ilgili enzimleri (pankreatik lipaz, lipoprotein lipaz, ve gliserofosfat dehidrogenaz) inhibe ettiği çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir (17).

Deneysel tasarım, bir çalışmayı etkileyecek faktörlerin sistematik değişimine bağlı olarak elde edilecek sonuçtaki değişimin gözlenmesi ve yorumlanması amacıyla kullanılan istatistiksel bir yöntemdir (21). Deneysel tasarım, etkili parametrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin belirlenmesini ve beraber sistem üzerine etkisinin araştırılmasını, metodlar için güvenilirlik ve tekrarlanabilirliğin sağlanmasını, daha az deneme ile daha çok fazla parametrenin değerlendirilmesini sağlayan bir yeşil kimya uygulaması olarak sıklıkla tercih edilmektedir (21, 22).

Gıda endüstrisinde açığa çıkan atıkların değerlendirilme maliyetinin düşük olması, atıklardan elde edilen ürünlerin sağlık açısından olumlu etkilerinin olması ve toksisitesinin az olması sebebiyle gıda atık ürünleri araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Bununla birlikte atıklardan elde edilecek ürünlerin gıda, boya, ilaç ve kozmetik endüstrisi gibi farklı alanlarda sentetik bileşenlerin yerine kullanılabilecek doğal kaynaklı ajanlar olabileceği düşünülmektedir (23, 24).

Üzümün işlenmesi sonucu oluşan yan ürünlerden olan üzüm posasının zengin içeriği ile büyük bir uygulanabilir ticarete sahip olması fikri ile yola çıktığımız bu çalışmanın amacı Karadeniz Bölgesi için endemik bir değer olan İzabella üzümünden elde edilen posadan

deneysel tasarımıyla hazırlanan ekstrelerin içeriğinin ve pankreatik lipaz inhibitör etkilerinin incelenmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İzabella Üzümü (Kokulu Üzüm) Hakkında Genel Bilgiler

Bağcılık, özellikle 34°-49° kuzey ve güney enlemleri arasında, dünyanın her iki yarımküresinde yapılan önemli tarımsal faaliyetlerden biridir. Bağcılık faaliyetinin ürünü olan üzüm, genellikle taze olarak tüketilen sofralık üzüm, kuru üzüm ve şarap üretimi için kullanılmakla birlikte, üzüm suyu, sirke, pekmez, reçel gibi gıda ürünlerine de dönüştürülebilir (25).

Kuzey yarım kürede, 36° ile 42° enlemleri arasında bulunan Türkiye bağcılık için elverişli doğal koşullara sahiptir. Yaklaşık 7500 yıl önce Anadolu'da yetiştirilmeye başlanan üzüm, her zaman bu bölgede toplumsal, ekonomik ve sosyal yaşama önemli katkılarda bulunmuştur (26).

Türkiye'de 1.000'den fazla üzüm çeşidi vardır ancak ekonomik amaçlı olarak sadece 50 çeşit üzüm yetiştirilmektedir. Tarım bölgelerimiz içinde Karadeniz bölgesi yüksek nem oranına sahip olması sebebiyle bağcılıkta sonlarda yer almaktadır. Bu bölge koşullarında *Vitis labrusca* türüne ait beş farklı kokulu üzüm çeşidinin yetiştigi bilinmektedir. Bu beş tür aromatik üzüm Türkiye'nin kuzeyinde yaygın olarak bulunan ve ulusal çeşit olarak tescillenmiş türlerdir: Rizpem, Rizellim, yaygın, Rizessi ve Çeliksi (27).

Üzümün meyve ve yapraklarından faydalanmak mümkün olup, gıda maddesi olarak ve gıda sanayinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Türkiye, dünyada üzüm yetiştiriciliğinde önemli bir merkezdir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Türkiye'de 2019 üretim döneminde 4,1 milyon dönümlük alanda 4 milyon ton üzüm üretildiğini bildirmektedir (28).

Üzüm, içerdiği karbonhidrat ve mineral maddelerin yanı sıra, diğer meyvelerden ayrı ve özel bir yere sahip olmasının asıl nedeni, kabuklarında ve çekirdeklerinde oldukça yüksek miktarlarda bulunan fenolik bileşiklerdir. Doğal bileşikler arasında önemli bir yere sahip bu bileşikler, insan sağlığı için antioksidan özellik gösterir. Yapılan bilimsel araştırmalar, fenolik bileşiklerin vücudu çeşitli mekanizmalar aracılığıyla koruduğunu ve insan bağışıklık sistemini daha aktif hale getirdiğini göstermektedir. Üzümde en fazla bulunan polifenoller arasında flavonoller (kuersetin, kamferol, mirisetin), flavan-3-oller (kateşin, epikateşin, tanenler) ve antosiyaninler yer almaktadır. Flavonoid yapıda olmayan polifenoller arasında ise hidroksisinnamik asit ve gallik asit türevleri ile trans-resveratrol içermektedir (29).

Izabella “ilek zm, Amerikan zm, kokulu kara üzüm ve siyah üzüm” olarak bilinir ve Türkiye'de daha çok Karadeniz Bölgesi'nin sahil kesiminde yetiştirilmektedir (30). Kokulu zm boyu 3-12 metre arasında değişmekte olup, yaprakları geniş ve açık yeşil renktedir. Bu üzümlerin meyveleri yaz sonu ve sonbahar başında olgunlaşır. Meyvelerin rengi genellikle mavimsi-siyah veya yeşildir. Bu meyveler etinden kolayca ayrılabilen kalın bir kabuk ile karakterizedir (31).

Kokulu zm, Trabzon bölgesinde ceviz, dut ve diğer ağaçların etrafında tırmanarak yetiştirilmektedir. Kokulu zm optimum büyüme için iyi havalandırılmış ve nemli toprağı tercih eder. Bu bitki çelikleme(vegetatif) veya tohumlarla (genereatif çoğaltma) oğaltılabilir (30).

Üzümde A, B1, B2, C, niasin (B3) gibi birçok vitaminin yanı sıra potasyum, demir, sodyum ve kalsiyum gibi çeşitli mineral elementler, organik asitler, azotlu bileşikler, fenolik bileşikler, terpen bileşikleri, yağlar, monosakkaritler ve bunların türevleri gibi pek çok kimyasal bileşik bulunmaktadır. Ancak pigmentler ve tanenler, üzümün içeriğinin belirlenmesinde önemli rol oynayan ana fenolik gruplardır. Bu bileşikler büyük oranda üzüm kabuklarında bulunur ve meyvenin siyah ve kırmızı rengi antosiyanin grubu bileşiklerinden (malvidin, siyanidin, delfinidin ve petunidin) kaynaklanmaktadır (32-35). Üzümün kabuk kısmı antosiyanin, flavanol, hidroksisinnamik asit ve flavanol glikozitlerden zengindir. ekirdeğinde ise bol miktarda flavanol ve gallik asit bulunmaktadır (36, 37). zm kabuğu, anti-mutajenik aktivite ve lipit oksidasyonunun inhibisyonu gibi antioksidan özelliklere sahip, zengin bir antosiyanin ve doğal pigment kaynağıdır. Antosiyaninler ve tanenler de üzümde bulunan fenolik bileşiklerin önemli bir parçasıdır (35, 38). zm ekirdeği, kabuğu ve meyve atıkları içerdiği antosiyanin ve fenolik maddeler nedeniyle çok değerli bir antioksidan kaynağıdır (35, 39).

2.2. Oksidanlar ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşlenmemiş elektronlar bulunduran moleküller veya atomlardır. Bu moleküllerin eşlenmemiş elektronları sebebiyle yüksek reaktiviteye ve kararsızlığa sahip olması çevrelerindeki birçok molekülle etkileşime girmelerine neden olmaktadır. Özellikle canlı sistemlerdeki proteinler, yağlar, nükleik asitler (DNA, RNA) ve enzimlerin zarar görmesi yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar, inme, koroner hastalıklar, diyabet, kanser ve karaciğer hasarı gibi birçok hastalığın temelini oluşturmaktadır (40, 41).

Serbest radikaller dört gruba ayrılır: oksijen, kükürt, klor ve nitrojen. Oksijenden türetilmişlerse reaktif oksijen türleri (ROS), nitrojen kaynağı iseler reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılırlar (42).

Serbest radikaller tipik olarak hücrel oksijen metabolizması sırasında üretilir, ancak çoğu durumda “oksidatif stres” adı verilen çeşitli patolojik süreçlere de dahil olabilirler. Aşırı ROS ve RNS üretimi, bunların oluşum hızları ile biyolojik sistemin antioksidan kapasitesi arasında bir dengesizliğe yol açar. Biyolojik yapıların oksidasyonu sonucu reaktif türlerin aşırı üretimi çeşitli hücrel yapıların zarar görmesine neden olur. Bu, çağdaş uygarlığın hastalıklarının ana nedeni veya ikincil bir komplikasyonu olabilir (43).

Vücudumuz günlük metabolik aktiviteler sırasında oksijen kullanır. Bu aktiviteler sonucunda, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$), semiquinon ($Q^{\cdot}$), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) ve singlet oksijen gibi serbest radikaller oluşur. Radyasyon, ağır metaller, pestisitler gibi çevresel kirleticiler ve kullanılan ilaçlar da serbest radikal oluşumuna katkıda bulunur (44).

Serbest radikallerin oluşumunu engelleyen, oksidatif hasarları önleyen ve serbest radikalleri yakalayıp stabilize eden bileşiklere “antioksidanlar” denir. Antioksidanlar, vücutta bulunan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu türlerin verebileceği hasarı önlemek ve detoksifikasyon yapmak için görev alan savunma hücreleri olarak bilinmektedir (45).

Antioksidanların gıda ve farmasötik ürünlerde oksidatif bozulmayı önlemek amacıyla kullanılmaları, vücutta oksidatif stresin neden olduğu patolojik süreçlere karşı koruyucu rolleri nedeniyle bu konuda yapılan çalışmalara olan ilgi artarak devam etmektedir (46). Antioksidanların sınıflandırmaları farklı kriterlere göre değişiklik göstermektedir: Endojen antioksidanlar ve Ekzojen antioksidanlar.

Endojen antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki kategoride incelenmektedir (47, 48).

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferazlar (GST), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimatik antioksidan savunma sisteminin ayrılmaz parçaları olarak işlev görür (49).

Nonenzimatik antioksidan sistem, serbest radikalleri yakalayan ve başlangıç radikalik reaksiyonları önleyen bileşikler kapsamaktadır. Elektron vererek radikalleri etkisiz hale getirir veya yakalarlar, geçici olarak daha az reaktif serbest radikallere dönüşürler. Bu antioksidanlar gruptaki diğer antioksidanlar tarafından kolayca nötralize edilir. Hücrelerde bulunan başlıca antioksidan bileşikler E vitamini, C vitamini, karotenler, ferritin, seruloplazmin, selenyum, indirgenmiş glutatyon (GSH), manganez, ubikinon, çinko, flavonoidler, koenzim Q, melatonin, bilirubin, taurin ve sisteindir (43, 50).

Fenolik bileşikler oksidasyonun önlenmesinde oldukça etkili moleküllerdir. Araştırmalar, bu bileşiklerin antialerjik, anti-enflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik özellikleri olduğunu göstermektedir (51, 52). Ayrıca fenolik bileşiklerin kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz ve nörodejeneratif hastalıklarda da koruyucu etkilerinin olduğu düşünülmektedir (53, 54).

Fenolik bileşikler besinlerin tat, koku ve renk oluşumuna katkı sağlayan, antimikrobiyal ve antioksidatif etki gösteren sağlık açısından önemli bileşiklerdir. Üzümsü meyvelerin, yüksek antioksidan kapasiteleriyle bilinen fenolik bileşikler, organik asitler, taninler, antosiyaninler ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşikler içerdiği bilinmektedir. Antosiyaninlerin meyvelere çeşitli renkler verdiği bilinmektedir (55).

2.3. Lipaz Enzimi

Canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimler, belirli kimyasal reaksiyonları katalize etme konusunda eşsiz bir yeteneğe sahip biyomoleküller olarak bilinmektedir. Biyokimyasal süreçler boyunca yapısal bütünlüklerini koruyarak hem hücre içi hem de hücre dışı ortamda işlevsel olan enzimler reaksiyon hızını artırmaktadır (56).

Lipazlar, suda çözünen ve trigliseritler gibi suda çözünmeyen substratların ester bağlarının hidrolizini katalizleyerek bunları digliseritlere, monogliseritlere ve yağ asitlerine dönüşümünü sağlayan hidrolaz sınıfı üyeleri olarak bilinmektedir (57, 58). Çeşitli kimyasal özellikler sergileyen bu enzimler Karboksilesterazlar (EC 3.1.1.1) ve “gerçek” lipazlar (EC 3.1.1.3) olarak iki ana gruba ayrılırlar ve biyoteknolojik, biyomedikal alanlarda çok sayıda uygulama alanı bulunmaktadır (59). Mikrobiyal lipazlar seçicilikleri, stabilite ve geniş substrat spesifiklikleri nedeniyle endüstriyel ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Transesterifikasyon süreci yoluyla biyodizel üretiminde etkili biyokatalizör görevi görürler (60). Çeşitli endüstrilerde yeni veya geliştirilmiş lipazların uygulamalarına yönelik araştırmalar önemlidir ve artan bir ilgi ile devam etmektedir (61).

Lipazlar insan sindirim sisteminde pankreatik lipaz, hepatik lipaz, lipoprotein lipaz, endotelyal lipaz, hormon duyarlı lipaz ve gastrik lipaz şeklinde bulunmaktadır. Hepatositlerce sentezlenen Hepatik lipaz (HL), sinüzoidal endotel hücrelerinin yüzeyinde ve hepatositlerde bulunur. Lipoprotein lipaz (LPL), kas hücreleri ve yağ dokusu tarafından sentezlenir. HL ve LPL’de bulunan fosfolipit ve triglisertilerin hidrolizini sağlarlar. Pankreasta üretilen pankreatik lipaz, triglisertilerin bağırsakta yağ asitlerine hidroliz olmasını katalize eder. Hormon duyarlı lipaz, yağ dokusunda bulunur ve adipositlerde depolanan triglisertilerin hidrolizini gerçekleştirir. Gastrik lipaz midede sentezlenip salgılanır. Kolinerjik uyarılar, gastrik motilite, gastrin hormonu ve yemekler gastrik lipaz salgılanmasını uyarır. Gastrointestinal yolda alınan besin triglisertilerinin hidrolizini gerçekleştirir. Endotel hücreleri tarafından sentezlenen, plasenta, karaciğer tiroid dokusu ve makrofajlarda yayılım gösteren endotelyal lipaz enzimi ise fosfolipitlerin hidrolizinde görev alır. Lipazlar yağların sindirimi ve metabolizmasına katılarak lipidlerin taşınmasında önemli rol oynarlar (62).

2.4. Obezite Hakkında Genel Bilgiler

Obezite, vücuttaki fazla enerjinin yağ olarak depolanması sonucunda ortaya çıkan aşırı kilo durumu olarak tanımlanır. Başka bir deyişle, alınan enerjinin harcanandan daha fazla olmasıyla ortaya çıkar. Obezite, kronik metabolik bir hastalık olmasının yanı sıra diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi bulaşıcı olmayan birçok hastalığın ortaya çıkmasına veya bu hastalıklarla birlikte görülmesine neden olabilen klinik bir durumdur (63).

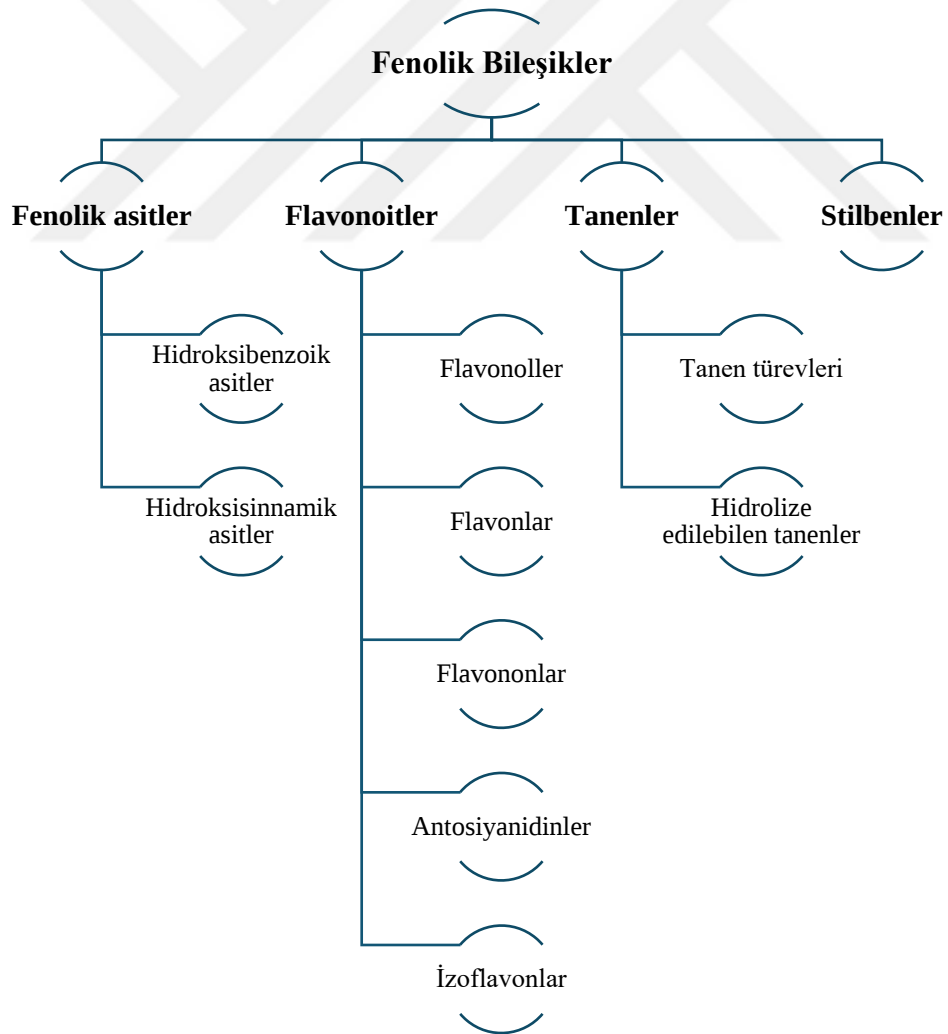
Obeziteyi sınıflandırırken, genellikle vücut yağı yerine vücut ağırlığı kullanılır. Çünkü yağ ağırlığını ölçmek daha zor ve maliyetlidir. Bu nedenle, basit, pratik ve maliyeti düşük bir hesap olan Vücut Kitle İndeksi (VKİ) tercih edilir. VKİ, vücut ağırlığının metre cinsinden boyun karesine bölünmesiyle elde edilen sayısal bir değerdir ve birimi kg/m^2 ’dir (Woolcott & Seuring, 2022). Yetişkinler için, 25.0 ile 29.9 kg/m^2 arasındaki bir VKİ değeri kilolu olarak tanımlanırken; 30 kg/m^2 veya daha yüksek bir VKİ değeri obez olarak tanımlanır (64).

Obezite oranlarındaki artış öncelikle hareketsiz bir yaşam tarzına, azalan fiziksel aktiviteye ve yüksek şeker ve rafine karbonhidratlar gibi sağlıksız diyet ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca genetik, hormonal, metabolik ve çevresel etkilerle birleşen bu faktörler, obezitenin artışına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (65, 66).

Epidemiyolojik araştırmalar, yüksek VKİ ile alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFL), kardiyovasküler hastalık, diyabet, çeşitli kanser türleri, kas-iskelet sistemi bozuklukları, kronik böbrek hastalığı dahil olmak üzere çok çeşitli kronik hastalıklar arasında bir korelasyon olduğunu rapor etmektedir (67).

2.5. Polifenoller

Bitkilerin normal metabolik süreçler sırasında veya çevresel faktörlere yanıt olarak (yaralar, sıcaklık değişiklikleri, UV radyasyonu ve enfeksiyonlar gibi) sentezledikleri organik bileşikler fenolik bileşikler olarak bilinir (68). Bu sekonder metabolitler yapılarındaki fenol halkalarının varlığına ve düzenine göre sınıflandırılabilir. Fenolik bileşikler, metil esterler, esterler ve glikozitler gibi fonksiyonel türevler olarak bulunabilir (69). Fenolik bileşikler aşağıda belirtildiği gibi farklı şekillerde de sınıflandırılabilir.



şekil 1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Hidroksil gruplarına bağı bir veya daha fazla aromatik halka içeren fenolik bileşikler, bitkilerde yaklaşık 8000'den fazla türüyle yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir. Basit fenolik asitlerden karmaşık tanenlere kadar uzanan bu bileşikler, bitkilerin UV ışığına, patojenlere ve yabancı organizmalara karşı savunmasına yardımcı olur (70). İnsan sağlığı için çok önemli olan fenolik bileşikler bitkilerin birçok kısmında bulunur ve besinin tadı, acılığı ve renginin oluşumunda önemli rol oynar. Lignanlar, tanenler, fenolik asitler, stilbenler ve flavonoidler gibi fenolik bileşikler meyvelerde, baklagillerde, sebzelerde, çayda, şarapta ve kahvede bol miktarda bulunur (71).

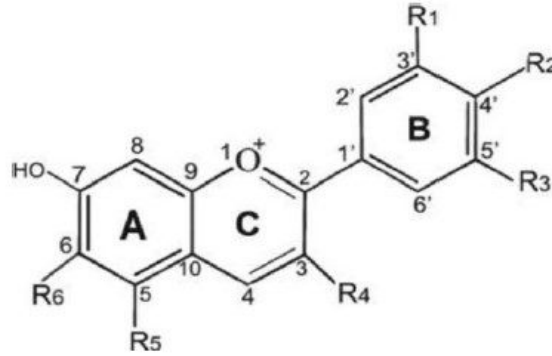
Fenolik bileşikler antioksidan, antiinflamatuar, antikanser, antimikrobiyal ve kardiyovasküler hastalıkları önleyici özellikleri nedeniyle insan sağlığında önemli yer tutar. Fenolik bileşikler, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak hücre hasarını önleyen doğal antioksidan bileşiklerdir. Bu durum kronik hastalıkların ve yaşlanmanın geciktirilmesinde önemli bir rol oynar. Fenolik bileşikler, inflamasyona neden olan maddelerin üretimini baskılayarak ve inflammatuar süreçleri düzenleyerek artrit ve diğer inflammatuar hastalıkların tedavisinde faydalı olabilir. Ayrıca, fenolik bileşikler hücre döngüsünü düzenleyerek, apoptozisi (programlanmış hücre ölümü) teşvik ederek ve kanserojen maddelerin detoksifikasyonunu artırarak kansere karşı koruyucu etki gösterebilir; kolesterol seviyelerini düşürerek, kan basıncını düzenleyerek ve kan damarlarının sağlığını koruyarak kardiyovasküler hastalık riskini azaltabilir; trombosit agregasyonunu engelleyebilir; beyin hücrelerini oksidatif stresten koruyarak ve nöroinflamasyonu azaltarak Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki sağlayabilir (72-80).

2.6. Antosiyaninler

Antosiyaninler (ACN'ler), meyve ve sebzelerin doğal renk özelliklerini belirleyen ve bu ürünlere kırmızıdan maviye kadar farklı renkler veren doğal renk maddeleridir. ACN'ler, yağda çözünen karotenoidler gibi renk maddelerine ek olarak, suyla da çözünebilirler, bu da endüstride renklendirici olarak kullanılmalarını kolaylaştırır. Ticari doğal renk katkısı olarak kullanılmak üzere, üzüm, üzüksü meyveler, kırmızı lahana, siyah havuç gibi meyve ve sebzelerden elde edilirler (81).

“Anthos (çiçek)” ve “kianos (mavi)” kelimelerinin birleşmesiyle oluşan antosiyanin pigment grubu, meyve, sebze ve çiçeklere parlak turuncudan pembeye, kırmızıdan maviye kadar değişen tonlarda renkler verir. ACN'ler, temel yapıları olan antosiyanidinlerin bir veya

birkaç şekerle ester bağı ile bağlanmasıyla oluşur. Bu durumda, ACN yapısındaki şeker olmayan kısım, yani antosiyanidinler, “aglikon” olarak adlandırılır. Antosiyanidinlerin temel yapısı ise, 2-fenilbenzopirilium (flavilium katyonu) oluşturur. Bu bileşik, oksijen içeren heterosiklik C halkasına bağlı, aromatik A halkası ve bu yapıya karbon-karbon bağıyla bağlı üçüncü bir aromatik B halkasından oluşur (82).



Şekil 2. Antosiyanidinlerin genel yapısı

Antosiyanidinler, doğada tek başlarına var olmazlar; genellikle şekerlerle birleşerek glikozit formunda bulunurlar ve bu birleşim sonucunda “antosiyenin” adını alırlar. Antosiyanidinlere çoğunlukla glukoz, ramnoz, galaktoz ve arabinoz gibi şekerler bağlanır. Oluşan ACN'lerin yapısında, genellikle bir adet olmak üzere, 2 veya 3 şeker bulunabilir. Şeker grupları ACN molekülünde, 3-monozit, 3-biozit veya trioit, 3,5-diglikozit, 3,7-diglikozit gibi şekillerde bulunabilir (83).

ACN'lerin suyla çözünebilen bir pigment grubu olması ve birçok doğal kaynaktan izole edilebilmesi, bu pigmentin doğal renk katkısı olarak kullanılmasını mümkün kılar. Ancak, endüstride kullanılan doğal renk maddelerinin başka bir önemli özelliği de stabilitesidir. ACN'ler genellikle stabil renk maddeleri değildir. ACN'lerin stabilitesini ve rengini etkileyen faktörler arasında hidroksil gruplarının sayısı, metoksil gruplarının konumu ve sayısı, şekerlerin sayısı ve türü, ve bu şeker molekülleriyle esterleşmiş alifatik ve aromatik asitler bulunmaktadır.

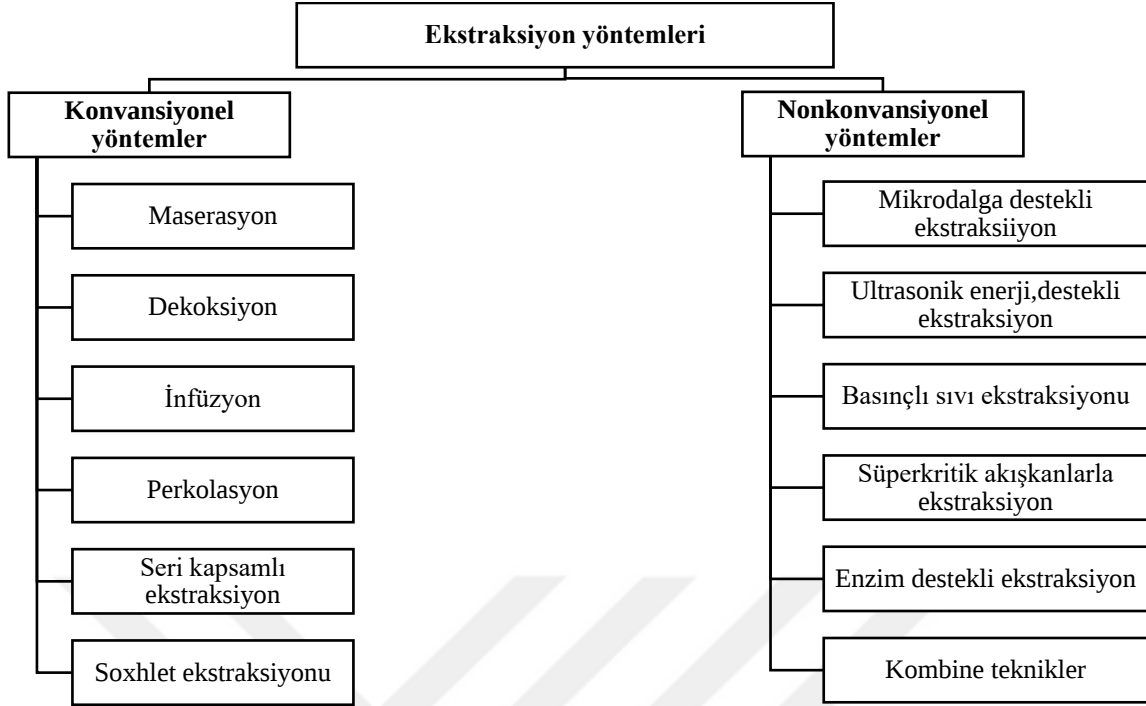
ACN molekülündeki hidroksil grupları arttıkça, antosiyanidin maksimum absorbansı artar ve rengi turuncudan maviye döner. Örneğin, %0.01 HCl-MeOH çözeltisinde pelargonidin λ_{max} değeri 520 nm (turuncu) iken, siyanidin 535 nm (turuncu-kırmızı) ve delfinidin 545 nm (mavi-kırmızı) düzeyindedir. Hidroksil gruplarının artması mavi rengi,

metoksil gruplarının artması ise kırmızı rengi artırır. ACN molekülündeki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı, molekülün oksidasyon stabilitesini etkiler (84-86). Hidroksil gruplarının artması ACN'lerin stabilitesini azaltırken, metoksil gruplarının artması stabiliteyi artırır (87). Bir çalışmada, asitlendirilmiş alkol çözeltisine eklenen siyanidin ve malvidin-3-glukozitlerinin oksidasyon stabilitesi incelenmiştir. ACN'ler, depolama sonrasında birkaç gün içinde renklerini kaybetmeye başlar. Ancak, malvidinin siyanidine göre daha yüksek bir oksidasyon direncine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun temel nedeni, malvidinin B halkasında bulunan fazla metoksil grup sayısıdır (88).

ACN molekülündeki glikozil bağının yeri ve sayısı, molekülün stabilitesini ve suya çözünürlüğünü etkiler. Üçüncü karbondaki glukozilasyon, ACN'lerin stabilitesini ve suya çözünürlüğünü artırır. Ayrıca, şeker molekülüne bağlı açıl gruplarının sayısı ve çeşidi, ACN'lerin pH değişimine, ısıya ve ışığa olan hassasiyetini azaltır ve stabilitesini artırır. Kopigmentasyon reaksiyonları, ACN'lerin rengini etkiler ve renk kalitesini artırır (89, 90). Bu reaksiyonlar, intra ve intermoleküler olarak iki şekilde gerçekleşir. İntermoleküler kopigmentasyonda, renkli ACN'ler ile renksiz kopigmentler arasında düşük enerjili bağlar oluşur. Yapılan araştırmalar, kırmızı üzümde bulunan başlıca ACN'in malvidin monoglikozit olduğunu göstermiştir. Bu ACN, reaktivitesi düşük ve stabil bir yapıya sahiptir. Üzümde bulunan diğer ACN'ler, delfinidin, siyanidin, petunidin ve peonidin monoglikozitleridir (82).

2.7. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Fenolik maddelerin ekstraksiyonu için konvansiyonel ve nonkonvansiyonel olmak üzere iki yöntem vardır (91).



Şekil 3. Ekstraksiyon yöntemleri

2.7.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

Yöntemlerdeki farklılıklara rağmen, tümünde belirli oranlarında organik solventler kullanılır. Metanol, su, kloroform, n-hekzan, etanol, propanol, etil asetat ve aseton gibi çözücüler, fitokimyasal ekstraksiyon verimliliğini etkileyen değişen polariteleri nedeniyle yaygın olarak kullanılır. Solvent seçimi, solvent gücü, polarite, kaynama sıcaklığı, reaktivite, viskozite, stabilite, güvenlik, mevzuata uygunluk ve potansiyel yeniden kullanılabilirlik gibi faktörlere bağlıdır.

Toz haline getirilmiş numunelerin kapalı bir sistemde bir çözücüyle karıştırılarak bunların oda sıcaklığında çalkalanmasıyla hazırlanan yöntem maserasyon denir. Ekstraksiyondan sonra katı parçalar, filtreleme, dekantasyon veya berraklaştırma yoluyla solventten ayrılır. Ancak bu yöntem zaman alıcıdır ve büyük solvent hacimleri gerektirir (91).

Bitki örneklerinin üzerine kaynamış su dökülerek kısa süre kaynatılması ve karışımın bekletilmesi ile hazırlanan yöntem infüzyon denir. Bu yöntem ısıya dayanıklı, suda çözünebilen fitokimyasallar için daha uygun olduğu bilinmektedir (91).

Maserasyona benzer şekilde, toz haline getirilmiş numunelerin kapalı bir sisteme yerleştirilmesini ve solventin kademeli olarak yukarıdan aşağıya geçirilmesi şeklindeki yöntem perkolasyon denir. Bu yöntem de maserasyonla aynı dezavantajlara sahiptir (91).

Daha geniş bir yelpazedeki fitokimyasalları elde etmek için ham ekstraktların artan polariteye sahip solventlerle parçalanarak uygulanan yöntem seri kapsamlı ekstraksiyon denir. Bu yöntem uzun süreli ısıtma nedeniyle ısıl hassasiyeti olan bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun değildir. Numunelerin ekstraksiyon ortamındaki bir toplama şişesinin üzerine konumlandırılan selüloz yüksüklere yerleştirilerek yoğunlaşan çözücüye maruz bırakılarak gerçekleştirilen yöntem Soxhlet ekstraksiyonu denir. Bu yöntem sürekli, diğer yöntemlere kıyasla daha az zaman ve solvent gerektirir; ancak ısıya hassas polifenollerin etkilenmesi sebebiyle dikkatli bir kullanım gerektirir (91).

2.7.2. Nonkonvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

Birçok araştırmacı düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı nedeniyle geleneksel ekstraksiyon yöntemlerini tercih etmektedir. Bununla birlikte, maserasyon, süzme ve soxhlet ekstraksiyonu dahil olmak üzere bu yöntemler, gerekli olan büyük miktarda organik çözücü nedeniyle çevresel sorunlara ve düşük verimliliğe sahiptir. Bu yöntemler genellikle zaman alıcı bir geri kazanım adımını ve ardından buharlaştırma yoluyla ekstrakt konsantrasyonunu içerir. Bu sorunları çözmek için süperkritik CO₂ ekstraksiyonu (SC-CO₂), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), ultrason destekli ekstraksiyon (UAE), enzim destekli ekstraksiyon (EAE) ve basınçlı sıvı ekstraksiyon (PFE) gibi çeşitli yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu modern teknikler kullanıcılara daha az solvent kullanımı, daha yüksek verim, daha az toksik kalıntı, daha iyi tekrarlanabilirlik ve daha kısa ekstraksiyon süreleri gibi avantajlar sunar.

MAE, çözünen madde-çözücü karışımını ısıtmak için mikrodalga radyasyonundan yararlanır ve budurum hedef fitokimyasalların difüzyonunu artırır. Daha az zaman ve solvent gerektirir (92). MAE verimliliği için solvent seçimi çok önemlidir. Genellikle mikrodalga radyasyonu emme kapasitelerinden dolayı metanol, etanol ve su tercih edilmektedir (93).

UAE, bitki dokularını bozan ve fitokimyasal difüzyonu artıran mikro boyutlu kabarcıklar oluşturmak için ultrasonik dalgalardan yararlanan, hem küçük hem de büyük ölçekli uygulamalara uygun, daha az solvent kullanımıyla daha hızlı ve verimli ekstraksiyon sağlayan uygun maliyetli bir yöntemdir. BAE, rosmarinik ve karnosik asit gibi bileşiklerin

ekstraksiyonunda özellikle etkilidir ve daha kısa ekstraksiyon süreleri ve daha düşük sıcaklıklar nedeniyle ısıya dayanıklı bileşikleri korur. Ancak yüksek enerji seviyelerinde uzun süreli sonikasyon, fitokimyasalları bozabilir ve istenmeyen değişikliklere neden olabilir (94).

Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu (ASE) olarak da bilinen PLE, yüksek sıcaklık ve basınç kullanarak fitokimyasalların ekstraksiyonuna yönelik gelişmiş bir tekniktir. 3.3 ila 20.3 MPa arasındaki basınçlarda ve 40 ila 200°C arasındaki sıcaklıklarda çalışan PLE, moleküllerin solventlerdeki desorpsiyonunu ve çözünürlüğünü artırır. Bu yöntem, geleneksel yöntemlere kıyasla minimum solvent kullanımıyla hızlı bir ekstraksiyon sağlar (95). PLE aynı zamanda suyun dielektrik özelliklerinin değiştiği yüksek sıcaklıklarda, solvent olarak suyun etkili bir şekilde kullanılmasına da olanak tanıyarak ekstraksiyon verimliliğini artırır (96). Avantajlarına rağmen PLE'nin düşük analit seçiciliği, müdahalelerin varlığı, yüksek ekstrakt seyreltmesi ve maliyetli gelişmiş enstrümantasyon ihtiyacı gibi sınırlamaları vardır. Solvent seçimi, PLE verimliliğini optimize etmek için kritik öneme sahiptir. Yaygın çözücüler arasında metanol, etanol ve bunların ekstrakte edilen spesifik fenolik bileşiklere göre uyarlanmış su karışımları bulunur (91).

SC-CO₂, süperkritik haldeki karbondioksiti solvent olarak kullanır. Bu yöntem, toksik olmaması, yanıcı olmaması, maliyet etkinliği ve yüksek saflıkta CO₂'nin yüksek bulunabilirliği nedeniyle tercih edilmektedir (97). Çeşitli basınç-sıcaklık kombinasyonları altında, tipik olarak 7.386 MPa'lık düşük basınçta ve CO₂'nin kritik noktası olan 31.6°C sıcaklıkta çalışır. Bu esneklik, ısıya duyarlı fitokimyasalların korunmasına olanak tanır (97). Ancak SC-CO₂'nin, CO₂'nin düşük polaritesi nedeniyle sınırlamaları vardır ve bu da onu polar olmayan bileşikler için uygun kılar. Yöntem, polifenollerin ekstraksiyonunu geliştiren etanol veya etil laktat gibi az miktarda polar organik çözücüler eklenerek polar bileşikler için uyarlanabilir. Optimum ekstraksiyon, yardımcı solvent tipinin, konsantrasyonunun, sıcaklığının ve basıncının dikkatli bir şekilde seçilmesini ve optimizasyonunu gerektirir (98).

EAE, hücre duvarlarını parçalamak için enzimleri kullanır ve sitoplazmik içeriklerin ekstraksiyon sıvısına, genellikle suya salınmasını kolaylaştırır (99). Selülaz, hemiselülaz ve pektinaz gibi enzimler hücre duvarlarını zayıflatarak, genellikle lignine bağlı olan bitki fitokimyasallarını daha erişilebilir hale getirir. Bu ön işlem polifenollerin ve diğer biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunu artırır. Çalışmalar, EAE'nin üzüm atıkları gibi bitki materyallerinden polifenol verimini artırmadaki etkinliğini göstermiştir. Ayrıca EAE,

organik solventler yerine su kullanarak çevre dostudur ve sürdürülebilir yaklaşımıyla dikkat çekmektedir (100, 101).

Hedef fitokimyasalların tamamen ekstrakte edilmesinde tek bir yöntemin yetersiz kaldığı durumlarda kombine ekstraksiyon teknikleri kullanılır. Bu yaklaşımla, çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin entegre edilerek fitokimyasal ekstraksiyonun genel verimliliği ve verimi önemli ölçüde artırılabilir.

2.8. Deneysel Tasarım Hakkında Genel Bilgiler

Deneysel tasarım, bir süreci etkileyen tüm parametrelerin etkilerini incelemek, birbirleriyle olan etkileşimlerini ve çıktı üzerindeki etkilerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, çıktıyı optimize etmek için süreçlerle ilgili girdileri yönetmek için gerekli bilgileri sağlar. Tasarım aşamasında kontrol edilebilir ve kontrol edilemeyen girdilerin belirlenmesi, deneysel tasarımın temel kavramlarının belirlenmesi ve anlaşılması açısından çok önemlidir (102).

Deneysel tasarımda kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen parametreler olmak üzere iki değişken tanımlanmaktadır. Kontrol edilebilen parametreler tasarımcı tarafından seçilir. Örnekler arasında deneyde kullanılan malzemenin türü ve miktarı, sıcaklık, basınç, uygulanan kuvvet, dalga boyu yoğunluğu ve mikrodalga gücü yer alır. Bu parametreler varyansı, ortalamaı etkileyebilir veya ikisini birden etkileyebilir ve sırasıyla X_d , X_a ve X_o olarak kategorize edilir. Kontrol edilebilir değişkenler, düzeyler olarak adlandırılan birden fazla değer alabilir (103). Kontrol edilemeyen parametreler ise sistemi olumsuz etkileyen bileşen etkileşimleri, titreşimler, gürültü, toz, nem, ortam sıcaklığı ve malzeme özelliklerinin bozulması gibi değişkenleri içerir. Amaç, sistemi kontrol edilemeyen parametrelere karşı daha az duyarlı hale getirmek için kontrol edilebilir parametreleri iyileştirmektir (104).

2.8.1. Faktöriyel Tasarımlar

Faktöriyel deneyler, her biri iki veya daha fazla düzeyde birden fazla faktör içeren, farklı faktörler arasındaki ana etkileri ve etkileşimleri incelemeyi temel almaktadır. Örneğin, mahsul çeşidine ve gübre türüne göre verimi inceleyen bir tarımsal deneyde, her iki faktör de deneyci tarafından kontrol edilebilirken, toprağın verimliliği kontrol edilemez. Bulgular, mahsullerin yetiştirildiği koşullara özeldir (105).

2.8.2. Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM)

Çoğu durumda, kontrol edilebilir değişkenleri (faktörleri) bir tepkiye bağlayan teorik modeller mevcut değildir veya aşırı karmaşıktır. Bu nedenle ilişkinin anlaşılabilmesi için deneysel verilerin kullanılması gerekmektedir. Box ve Wilson tarafından tanıtılan RSM, deneysel modelleme ve problem analizi için matematiksel ve istatistiksel teknikleri içerir. RSM'nin hedefleri deneysel alanda bilgi üretmek, deneysel değişkenliği güvenilir bir şekilde tahmin etmek ve deneyler için sıralı stratejiler önermektir (106).

RSM teknikleri şunları içerir:

- Bir yanıtı girdi değişkenleri veya faktörlerin seviyeleriyle ilişkilendirmek için deneyler tasarlamak ve analiz etmek.
- Faktöriyel ve kesirli faktöriyel planlar, merkezi bileşik ve Box-Behnken tasarımları gibi tasarımların kullanılması.
- Verimli modelleme ve analiz için D-optimality gibi kriterlere dayalı olarak bilgisayar tarafından oluşturulan tasarımların uygulanması (107).

RSM, bir yanıtın çeşitli faktörlerden etkilendiği süreçleri modellemek ve optimize etmek için kullanılır. Önemli faktörleri tanımlamak ve süreçleri etkili bir şekilde optimize etmek için çeşitli tasarım türlerini içerir. Günümüzde, RSM ile deney düzeneği hazırlayacak kullanıcılar için tarama ve optimizasyon yapabilmesine olanak tanıyan düzenli faktöriyel ve kesirli faktöriyel planlar, Plackett-Burman, merkezi bileşik, küçük bileşik, Box-Behnken ve hibrit tasarımlar gibi birçok tasarım aracı mevcuttur. Son zamanlarda özellikle test et ve değerlendir (D) kriterini temel alan bilgisayar yazılım programı tarafından tasarlanan deneysel uygulamalar önemli ölçüde artmıştır. Merkezi bileşik tasarım ve Box-Behnken tasarımı olmak üzere iki farklı RSM tekniği kullanılmaktadır (108).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında manyetik karıştırıcı (Heidolph MR), buzdolabı (Arçelik), evaporatör (Heidolph), hassas terazi (Ohaus Pioneer), inkübatör (Memmert), pH metre (Hanna), santrifüj cihazı (Elektromag), spektrofotometre cihazı (BMG Labtech Spectrostar Nano), vorteks (Heidolph Reax Top Vortex Mixer), liyofilizatör (Christ), mikro dalga fırın (START SYNTH), ultrasonik su banyosu (İsolab) ve HPLC (Shimadzu) kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler etanol, metanol, hidroklorik asit (HCl), metanol- HPLC saflıkta, asetik asit, Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi, DPPH, gallik asit, sodyum karbonat, troloks, BHT, tris, sodyum asetat (CH_3COONa), potasyum klorür (KCl), TPTZ, demir (III) klorür (FeCl_3), bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neukuproin, p-nitro fenil butirat (p-NPB), orlistat ve pankreatik lipaz enzimi Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır.

3.3. Materyalin Temini ve Liyofilizasyonu

Çalışma kapsamında kullanılacak İzabella üzüm posası yerel bir firma (NATUVA)'dan temin edilmiştir. Firmanın üzümü işleme sonucu açığa çıkan posa dondurucuda dondurularak liyofilizasyon işlemine kadar saklanmıştır. Liyofilizatör aracılığıyla posadan suyu uzaklaştırılarak kurutulmuştur. Elde edilecek kuru posa ekstraksiyon işlemlerinde kullanılmıştır.

3.4. Deneysel Tasarım ile Optimum Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi

Deneysel tasarım 6 parametre ile Design Expert-11.1.2 programı üzerinden "fraksiyonel faktöriyel dizayn" oluşturularak hazırlanmış ve faktörlerin sistem üzerine etkisi bu program üzerinden değerlendirilmiştir. Fraksiyonel faktöriyel dizayn oluşturulurken maks ve min olacak şekilde 2 seviyeli belirlenmiştir. Fraksiyonel faktöriyel design hazırlanırken deney sayısı parametre sayısı n olacak şekilde belirlendikten sonra, 2^{n-1} sayıda deney yapılarak oluşturulmuştur. Çalışmada değerlendirilecek bağımsız değişkenler ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, asit yüzdesi, mikradalga gücü ve etanol yüzdesi olarak belirlenmiştir. Bu değişkenlerin maks ve min değerleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada değerlendirilecek bağımsız değişkenler

Değişken	Minimum	Maksimum
Ekstraksiyon Süresi	60 sn	120 sn
Ekstraksiyon Sıcaklığı	25 °C	50 °C
Asit Yüzdesi	0.001	0,01
Mikrodalga gücü	300 W	500 W
Ultrasonik süresi	20 sn	60 sn
Etanol Yüzdesi	0	70

Design Expert 11.1.2 ile oluşturulan, deney şartlarını ve sayısı içeren çalışma programına göre deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Deney Tasarımının Design-Expert-11.1.2 ile Kurgulanması

Ekstraksiyon sürecine etki eden parametreleri belirlemek için deney tasarımı oluşturulmuş ve sonuçlar Design Expert 11.1.2 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Tasarım programı Tablo 2’da verilmiştir. 1.5 g liyofilize edilen posa 20 mL çözücü ile bu programda belirlenen şartlara göre ekstre edilmiştir.

Program ile elde edilen tasarım gücü aşağıdaki gibi elde edilmiştir. Gücün %80 üstü olması beklenmektedir. Programda elde edilen cevap gücü Resim 1’ da görüldüğü üzere %98.3 olarak görülmüştür.

Regular Two-Level Factorial Design											
Design Power											
	Name	Units	Delta (Signal)	Sigma (Noise)	Signal/Noise	Power for A	Power for B	Power for C	Power for D	Power for E	Power for F
	cevap		3	2	1.5	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%
Power is reported at a 5.0% alpha level to detect the specified signal/noise ratio.											
Power should be approximately 80% or greater for the effects you want to detect.											

Resim 1. Design Expert 11.1.2 program ile elde edilen tasarım gücü

Tablo 2. Tasarım programı

	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Faktör 5	Faktör 6
Sıra	A:Mikrodalga (MD) Süresi	B:Ekstraksiyon Sıcaklığı	C:Asit Yüzdesi	D:MD Gücü	E:Ultrasonik Banyo Süresi	F: Etanol Yüzdesi
	s	°C		W	s	
1	120	25	0,01	500	60	0
2	60	50	0,01	500	60	0
3	60	50	0,001	500	20	0
4	120	50	0,001	300	20	0
5	120	50	0,01	500	20	0
6	120	25	0,001	500	20	0
7	60	50	0,001	500	60	70
8	120	25	0,001	300	20	70
9	120	25	0,001	500	60	70
10	120	25	0,01	300	20	0
11	120	50	0,001	300	60	70
12	120	25	0,001	300	60	0
13	60	50	0,001	300	20	70
14	60	50	0,01	500	20	70
15	60	50	0,01	300	20	0
16	60	25	0,001	500	20	70
17	60	50	0,01	300	60	70
18	120	50	0,01	300	60	0
19	60	25	0,001	300	60	70
20	60	25	0,01	300	20	70
21	120	50	0,01	500	60	70
22	60	50	0,001	300	60	0
23	120	50	0,001	500	20	70
24	60	25	0,01	300	60	0
25	60	25	0,001	500	60	0
26	120	50	0,01	300	20	70
27	60	25	0,001	300	20	0
28	60	25	0,01	500	60	70
29	120	50	0,001	500	60	0
30	60	25	0,01	500	20	0
31	120	25	0,01	500	20	70
32	120	25	0,01	300	60	70

3.4.1.1. Faktörlerin Belirlenmesi

Program ile sıralamaya tabi tutulan veriler Design Expert 11.1.2 ile analiz edilmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

3.4.1.2. Box-Behnken Optimizasyonu

Merkez noktada 3 tekrarlı 3 parametre için rastgele sırayla toplam 15 deney gerçekleştirilmiştir ve verilere çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Modeli istatistiksel olarak değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Fenolik bileşenlerin analizinde elde edilen sonuçlardan vanilik asit miktarı göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3. Box-Behnken tasarım programı

Analiz Sayısı	Sıcaklık °C	Etanol Yüzdesi	Güç W
1	37,5	0	500
2	50	0	400
3	25	35	500
4	25	0	400
5	25	35	300
6	50	35	500
7	37,5	35	400
8	37,5	35	400
9	25	70	400
10	37,5	35	400
11	50	35	300
12	37,5	0	300
13	37,5	70	500
14	37,5	70	300
15	50	70	500

3.5. Deneysel Tasarımla Hazırlanan Ekstreler Üzerine Yapılan Analizler

Deneysel tasarımla belirlenen şartlara göre hazırlanan ekstratlar üzerinde RP-HPLC ile fenolik bileşenlerin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda daha önceden modifiye ve valide edilen bir yöntem kullanılmıştır (109).

Ayrıca Tablo 2’de belirtilen tasarım programına göre 32 ekstre üzerinde toplam fenolik ve antosiyanozit madde miktar tayini ile pankreatik lipaz enzim inhibisyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Fenolik Bileşenlerin RP-HPLC ile Analizi

Tablo 2, 3’te belirtilen şartlarda hazırlanan tüm ekstralar evaporatör ve liyofilizatör aracılığıyla kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kuru ekstralar 10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde HPLC saflıkta metanol ile çözülerek membran filtrelerden (0.45 µm) geçirilmiştir. Standart fenolik bileşik olarak benzoik asit, kersetin, şiringaldehit, *p*-hidroksi benzoik asit, *p*-kumarik asit, sinapik asit ve vanilik asit tercih edilmiştir. Fenolik bileşiklerin analizinde kullanılan yöntem şartları Tablo 4’de verilmiştir (109).

Tablo 4. Fenolik içeriğinin belirlenmesi için uygulanan HPLC şartları

Kolon	C18 kolonu (RP-C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm)
Akış hızı	1.5 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Dalga boyu	232, 246, 260, 270, 280, 290, 308, 328 nm
Dedektör	Diode Array Detector (DAD)
Yöntem	Gradient elüsyon
Hareketli faz	A: %100 metanol B: %2 sulu asetik asit çözeltisi (pH 2.8)

3.5.2. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Tablo 2’de belirtilen tasarım programına göre hazırlanan tüm ekstraların toplam çözülebilir fenolik madde miktarı tayini Slinkard ve Singleton (1977) tarafından kullanılan metod aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (110). Çalışmada kullanılacak ekstralar (10 mg/mL) ve standart bileşik (gallik asit; 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.63 µg/mL) çözeltilerinden 50 µL deney tüplerine pipetlenerek üzerine sırasıyla 2,5 mL distile su ve 250 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. Vortekslenen karışımlar oda ısısında 3 dk bekletildikten sonra üzerine 750 µL %20’lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenmiştir. Tüm tüpler vortekslenildikten sonra 2 saat oda ısısında bekletilerek süre sonunda örneklerin absorbansları 765’nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Gallik asit çözeltilerine karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak standarda ait kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

Çizilen bu grafiğe göre ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı $\mu\text{g GAE}/\mu\text{L}$ cinsinden hesaplanmıştır. Deneyde her örnek 3 paralel olacak şekilde çalışılmış ve kör olarak numunelerin kendi çözücülerini kullanılmıştır.

3.5.3. Toplam Antosiyanozit Madde Miktar Tayini

Tablo 2’de belirtilen tasarım programına göre hazırlanan tüm ekstrelerin antosiyanozit içeriği “pH diferansiyel yöntemi”ne göre gerekli modifikasyonlar gerçekleştirilerek tayin edilmiştir (111, 112). 100 mg ekstre üzerine 25 mL %1’lik HCl çözeltisi ilave edilerek 15 dakika santrifüj edilmiştir. 0.2 mL hacimde olacak şekilde süpernatant kısmı ikiye ayrılarak numuneler sırasıyla pH 1.0 KCl-HCl ve pH 4.5 $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$ tampon çözeltileri ile 2 mL’ye seyreltilmiştir. Numunelerin absorbansları önce 520 nm’de, 30 dakika sonra 700 nm’de ölçülerek, absorbans değerleri kaydedilmiştir. Numunelerde bulunan antosiyanozit miktarları eşdeğer siyanidin-3-glikozit cinsinden aşağıdaki eşitlik yardımıyla $\mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ekstre olarak hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam antosiyanozit madde miktarı} = \frac{(A \times Ma \times SF)}{(\epsilon \times l)} \times 1000$$

$A = \text{pH 1.0 } (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) - \text{pH 4.5 } (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}});$

Ma (Siyanidin-3-glikozit, cyd-3-glu): 449.2 g/mol; SF : seyreltme faktörü;

ϵ : 26900 $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;

l : ışığın aldığı yol, cm.

3.5.4. Pankreatik Lipaz İnhibitör Etki Belirleme Çalışmaları

Tablo 2’de belirtilen tasarım programına göre hazırlanan tüm ekstrelerin lipaz inhibitör etkileri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (113, 114). Numuneler (12.5-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve lipaz enzimi (Crude porcine PL type II, EC 3.1.1.3, 200 U/mL) 0.1 mM Tris-HCl tampon (pH 8) içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra 10 mM p-nitro fenil bütirat (p-NPB) substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Pozitif kontrol için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (12.5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) orlistat kullanılmıştır. Deney protokolü A (90 μL enzim solüsyonu, 5 μL tampon, 5 μL substrat solüsyonu), B (90 μL enzim solüsyonu, 10 μL tampon), C (90 μL enzim solüsyonu, 5 μL örnek solüsyonu, 5 μL substrat solüsyonu) ve D (90 μL enzim solüsyonu, 5 μL örnek solüsyonu, 5 μL tampon) olarak hazırlanmıştır. Kuyucuklara substrat solüsyonu hariç tüm çözeltiler eklendikten sonra pleytler 37 °C’de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ilgili kuyucuklara substrat çözeltisi konulduktan sonra tekrar 37 °C’de 10 dk inkübe edildikten sonra 405 nm dalga boyunda spektrofotometrede

örneklerin absorbansları okunmuştur. Her örnek 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Deneyde elde edilen sonuçların ortalaması alınarak, %inhibisyon değerleri aşağıdaki formülden hareketle hesaplanmıştır. Hesaplanan %inhibisyon verileri ve örneklerin logaritmik konsantrasyonları ile çizilen grafik yardımıyla örneklerin IC₅₀ değerleri bulunmuştur.

$$\% \text{ Pankreatik Lipaz İnhibisyon} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

3.6. Optimum Ekstrenin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Tablo 2’de belirtilen tasarım programına göre hazırlanan tüm ekstralar üzerinde toplam fenolik ve antosiyanozit madde miktar tayini ile birlikte RP-HPLC ile ekstraların fenolik bileşiklerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlara bakıldığında 11 nolu ekstrenin fenolik içerik açısından daha yüksek olduğu saptanmıştır ve metod optimizasyonu çalışmalarında elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. Ayrıca elde edilen bulgular değerlendirildiğinde 16 nolu ekstrenin içeriği açısından 11 nolu ekstre ile benzer olması sebebiyle, bu iki ekstrenin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için FRAP ölçümü, CUPRAC tayini ve DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Ölçümü

FRAP ölçümü için ekstralar 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış ve standart madde olarak Troloks kullanılmıştır. Deneyde kör olarak numunenin kendi çözücüsü kullanılmıştır. FRAP reaktifi deneyden önce taze olarak hazırlanarak çalışma sırasında manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Kalibrasyon için Troloks’un 62.5, 125, 250, 500, 1000 µM olacak şekilde beş farklı konsantrasyonda hazırlanmış metanol çözeltileri kullanılmıştır. Troloks ve numune çözeltilerinden 50’şer µL alınarak üzerine 1.5 mL FRAP reaktifi pipetlenmiştir. Tüpler vortekslenerek oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örneklerin absorbansları, 565 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Ekstrenin FRAP değeri standart madde olarak kullanılan Troloks ile karşılaştırılarak g numune başına µM Troloks değeri (TEAC) olarak ifade edilmiştir. Her örnek 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır (115).

3.6.2. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

Çalışmada ekstreler 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmıştır ve standart madde olarak Troloks kullanılmıştır. Deneyde kör olarak numunelerin kendi çözücüsü kullanılmıştır. Bu yöntem için standardın metanol ile seyreltilerek farklı derişimlerdeki çözeltileri (1000-500-250-125-62.5 μ M) hazırlanmıştır. Numune çözeltilerinden 500'şer μ L alınarak üzerine 1000 μ L $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ve 1000 μ L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pipetlenmiştir. Daha sonra test çözeltilerine 1000 μ L Nc reaktifi, numune körü için 1000 μ L reaktif çözücüsü pipetlenmiştir. Tüpler vortekslendikten sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansları 450 nm dalga boyunda spektrofotometre yardımıyla belirlenmiştir. Numunelerin antioksidan kapasitesi standart madde olarak kullanılan Troloks ile karşılaştırılarak TEAC (μ M) olarak ifade edilmiştir. Her örnek 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır (116).

3.6.3. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Çalışmada metanol ile hazırlanan 100 μ M'lık DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Standart madde olarak 0.01 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış BHT çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmada ekstrenin uygun konsantrasyonunun belirlenmesi için, hazırlanan numune ve DPPH çözeltisinden 1:1 oranında pipetlenip 40 dk beklenmesi suretiyle ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda radikalın mor menekşe rengi kalıcı ise numune konsantrasyonunun uygun olduğuna karar verilmiştir. Aksi durumda yani rengin kaybolması durumunda numune konsantrasyonu seyreltilerek aynı şekilde ön denemeye devam edilmiştir. Daha sonra belirlenen numune konsantrasyonu çözücüsü ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Aynı zamanda stok BHT çözeltisi de yarı yarıya seyreltilerek beş farklı dilüsyonu hazırlanmıştır. Tüplere 750 μ L DPPH çözeltisi ve 750 μ L numune çözeltisi alınarak vortekslendikten sonra tüpler oda sıcaklığında, karanlık ortamda, 55 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örneklerin absorbansı, 517 nm dalga boyunda, köre karşı spektrofotometre yardımıyla okunmuştur. Tüm numuneler 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır (117). Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonların logaritması grafiğe geçirilerek SC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

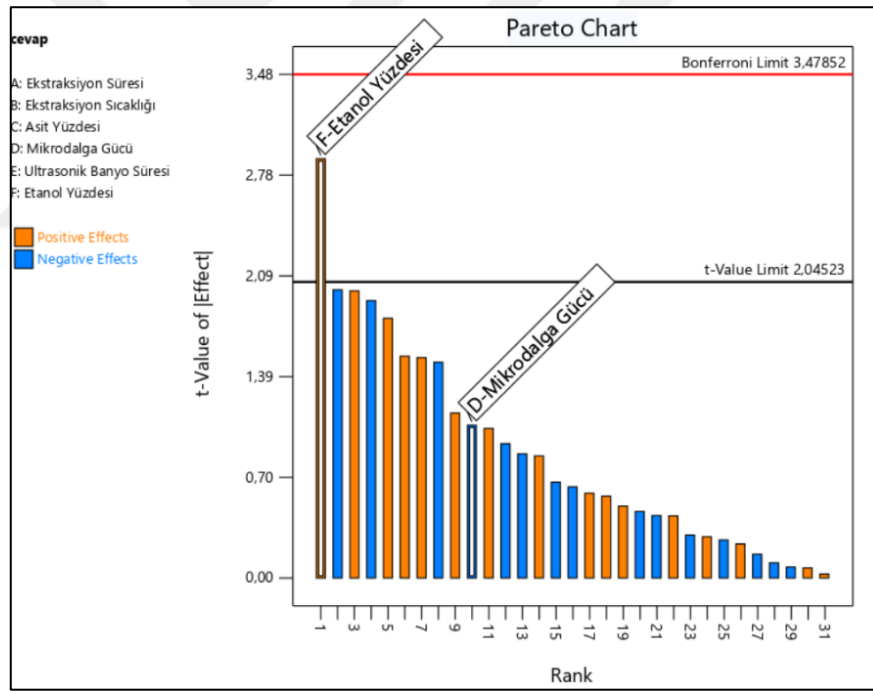
Deneysel tasarım süreçlerinde Box- Behnken optimizasyonu için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Biyokimyasal aktivite çalışmalarında sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

4. BULGULAR

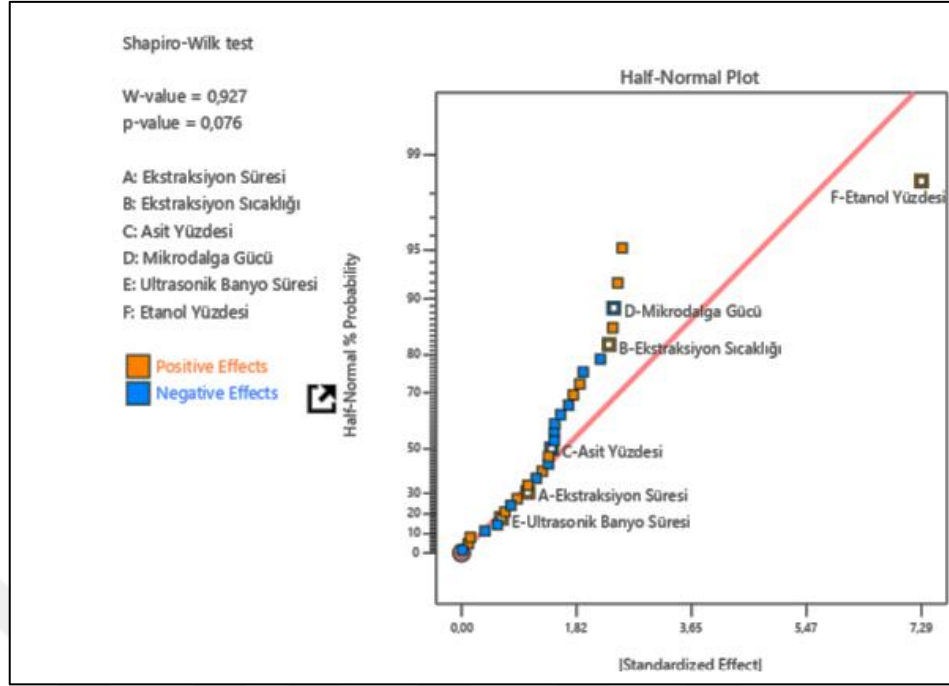
4. 1. Fraksiyonel Faktöriyel Analiz Sonuçları

2 seviyeli 6 parametre üzerinde yapılan fraksiyonel faktöriyel dizayn ile en çok etkiye sahip olan parametreleri belirlemek için 32 ayrı rastgele yürütme gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sürecine etki eden parametreleri belirlemek için deney tasarımı oluşturuldu ve sonuçlar Design Expert 11.1.2 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Ekstraksiyon sürecine en çok etki eden parametreler, etanol yüzdesi, mikrodalga gücü ve sıcaklık olarak tespit edildi. Fenolik asit olarak vanilik asit' e ait %alan verileri sisteme cevap olarak girildi.

Elde edilen pareto grafiği en çok etkiye sahip faktörleri ve etki etme seviyelerini vermektedir. Parametre ve etki seviyeleri Resim 2’de verilmiştir.



Resim 2. Faktörlerin Pareto çizelgesi



Resim 3. Shapiro-Wilk test grafiği

Eğim çizgisi üzerinin haricinde bulunan her nokta etkili olan faktörleri temsil etmektedir. Kırmızı çizginin dışındaki her nokta istatistiksel olarak anlamlı sonuç verenler grubuna dahil edilir. Seçilen model için ANOVA verileri Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Faktöriyel tasarım ANOVA verileri

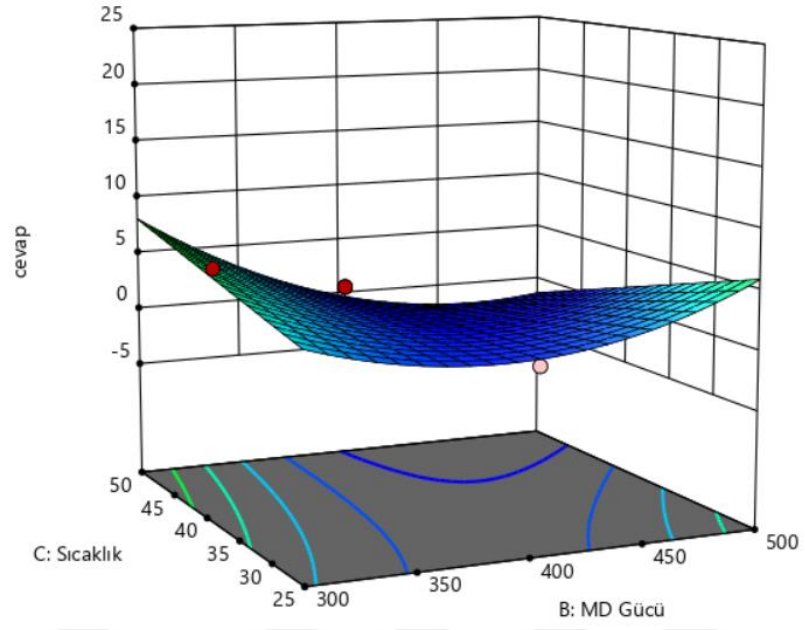
Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Model	732,69	66,61	4,86	0,0011	Anlamlı
A-Ekstraksiyon Süresi	13,57	13,57	0,9896	0,3317	
B-Ekstraksiyon Sıcaklığı	34,89	34,89	2,54	0,1264	
C-Asit Yüzdesi	22,54	22,54	1,64	0,2145	
D-Mikrodalga Gücü	37,52	37,52	2,74	0,1137	
E-Ultrasonik Banyo Süresi	6,25	6,25	0,4555	0,5075	
F-Etanol Yüzdesi	455,33	455,33	33,20	< 0.0001	
EF	42,25	42,25	3,08	0,0945	
ACD	39,73	39,73	2,90	0,1043	
Kalan	274,31	13,72			
Kor. Total	1007,00				

4.2. Box- Behnken Optimizasyonu

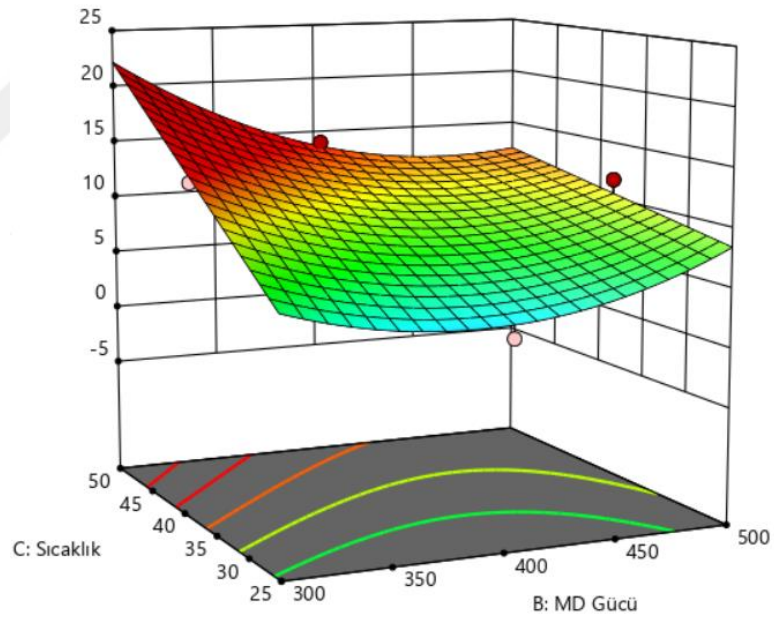
Merkez noktada 3 tekrarlı 3 parametre için rastgele sırayla toplam 15 deney gerçekleştirilmiştir ve verilere çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Modeli istatistiksel olarak değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Azaltılmış ANOVA karesel model verileri Tablo 5’de gösterilmiştir. Vanilik asit fenolik analiz sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Etkileşimlerin vanilik asit cevabı üzerine etkisi minimum ve maksimum noktalarda Resim 4-13’de sırası ile gösterilmiştir.

Tablo 6. Box-Behnken ANOVA karesel model verileri

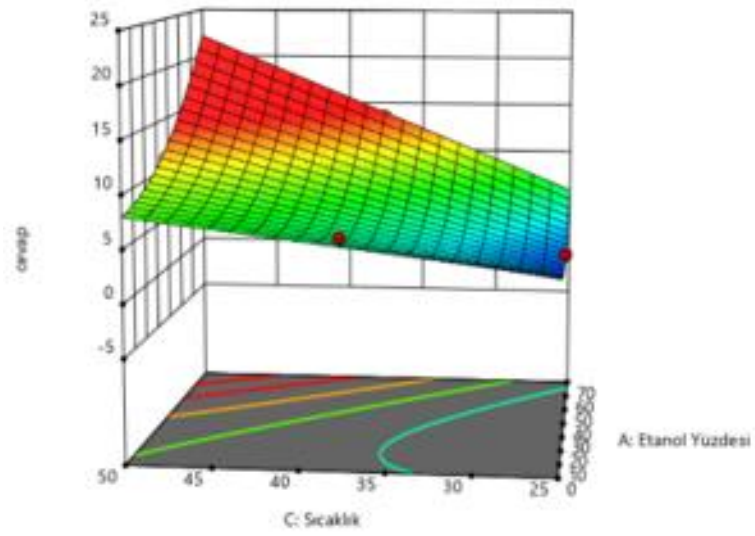
Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Model	354.76	39.42	37.22	0.0005	Anlamlı
A-Etanol Yüzdesi	138.53	138.53	130.80	< 0.0001	
B-MD Gücü	24.41	24.41	23.04	0.0049	
C-Sıcaklık	39.38	39.38	37.18	0.0017	
AB	3.25	3.25	3.06	0.1404	
AC	33.00	33.00	31.16	0.0025	
BC	36.32	36.32	34.29	0.0021	
A²	34.16	34.16	32.25	0.0024	
B²	49.55	49.55	46.79	0.0010	
C²	0.2477	0.2477	0.2339	0.6491	
Kalan	5.30	1.06			
Uyum Eksikliği	4.90	1.63	8.30	0.1095	Anlamlı Değil
Saf Hata	0.3939	0.1970			
Kor Toplam	360.06				
R²	0.9727	CV %	5.08	Std.Sapma	3.66



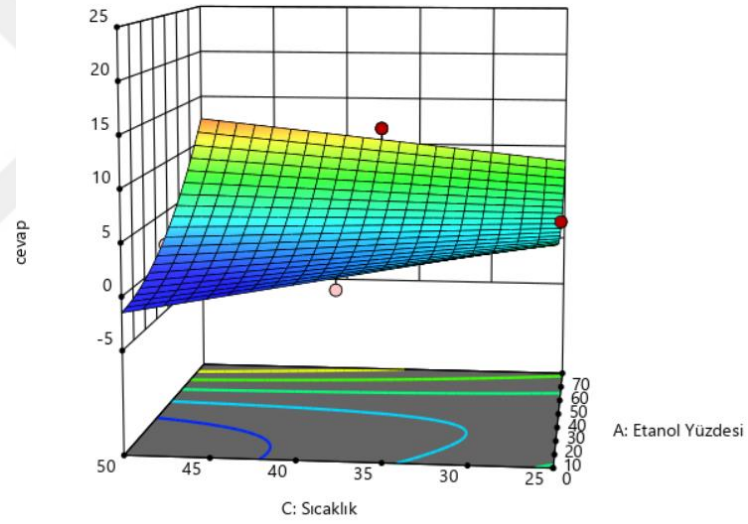
Resim 4. Etanol yüzdesi minimum noktada model diyagramı



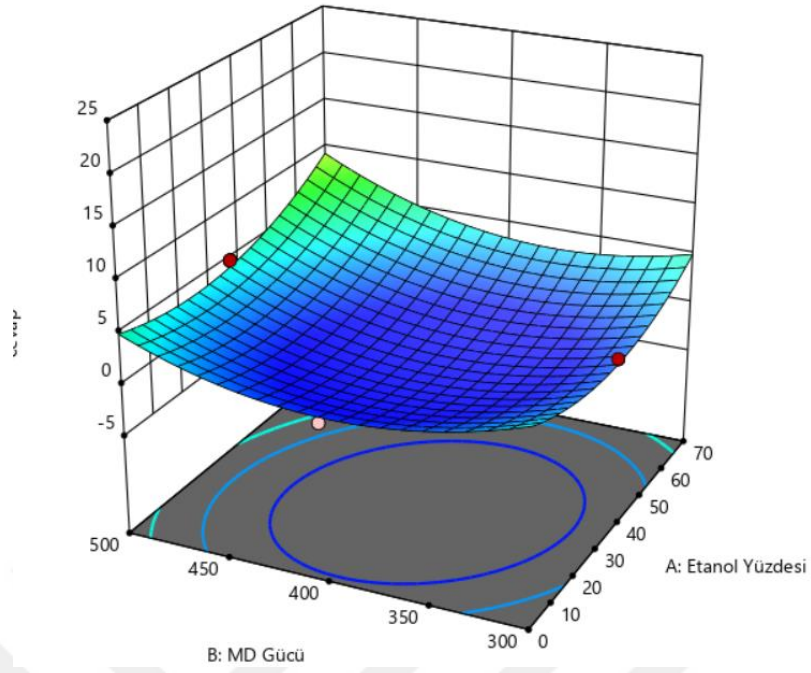
Resim 5. Etanol yüzdesi maksimum noktada model diyagramı



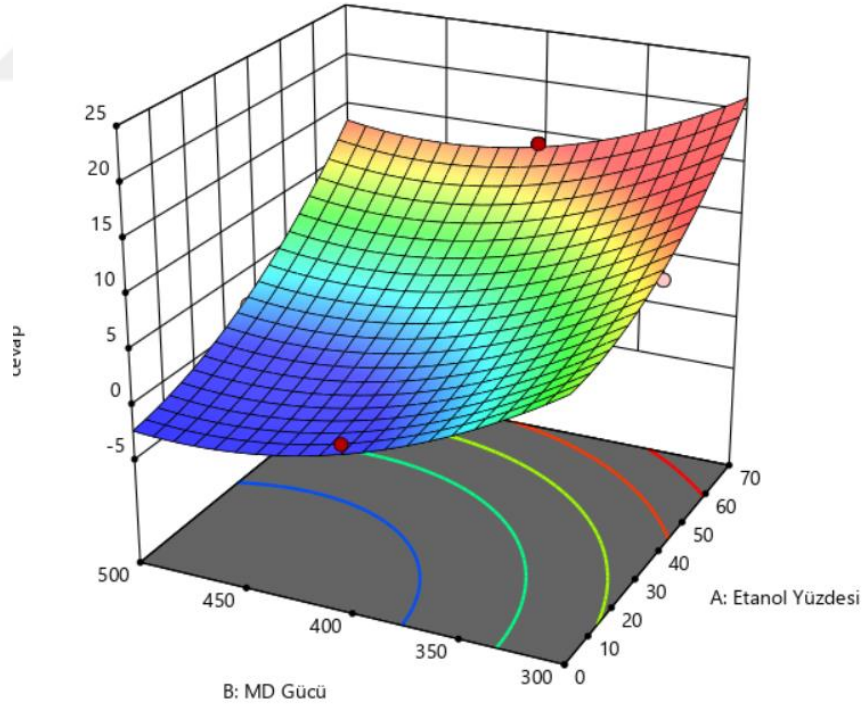
Resim 6. Mikrodalga gücü minimum noktada model diyagramı



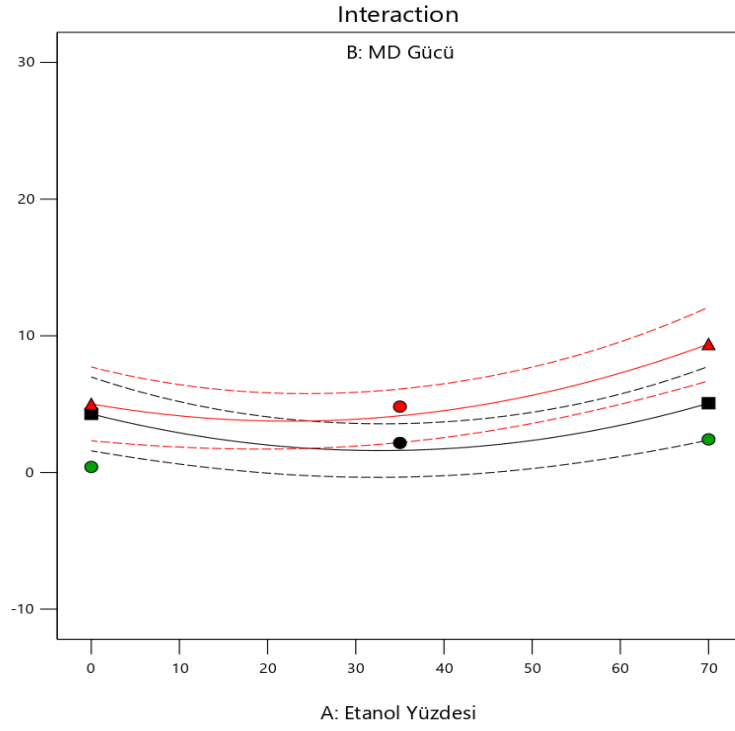
Resim 7. Mikrodalga gücü maksimum noktada model diyagramı



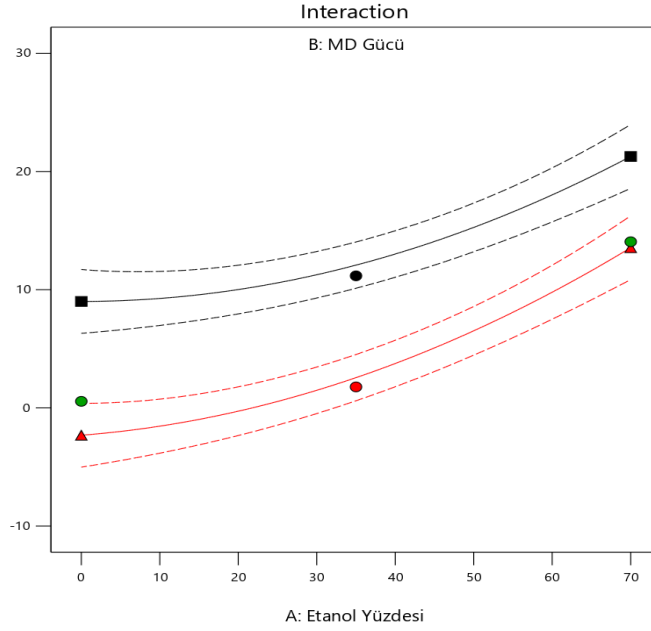
Resim 8. Sıcaklık minimum noktada model diyagramı



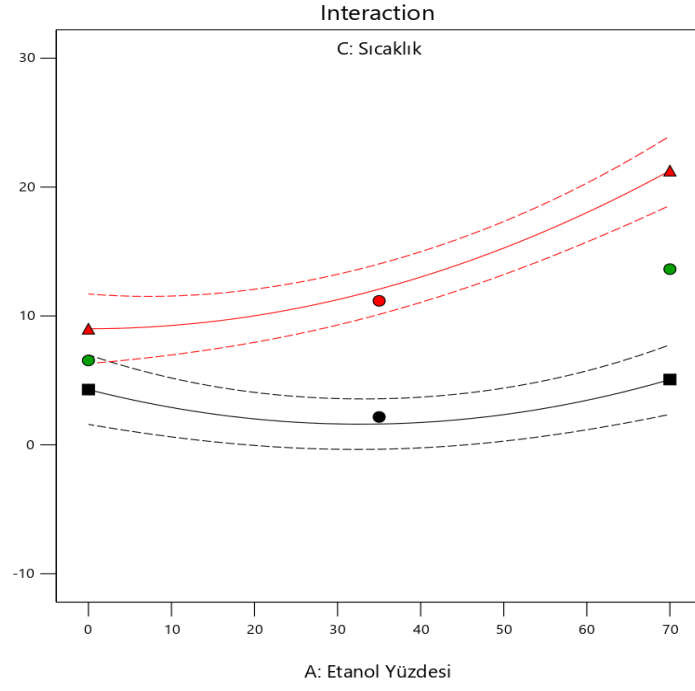
Resim 9. Sıcaklık maksimum noktada model diyagramı



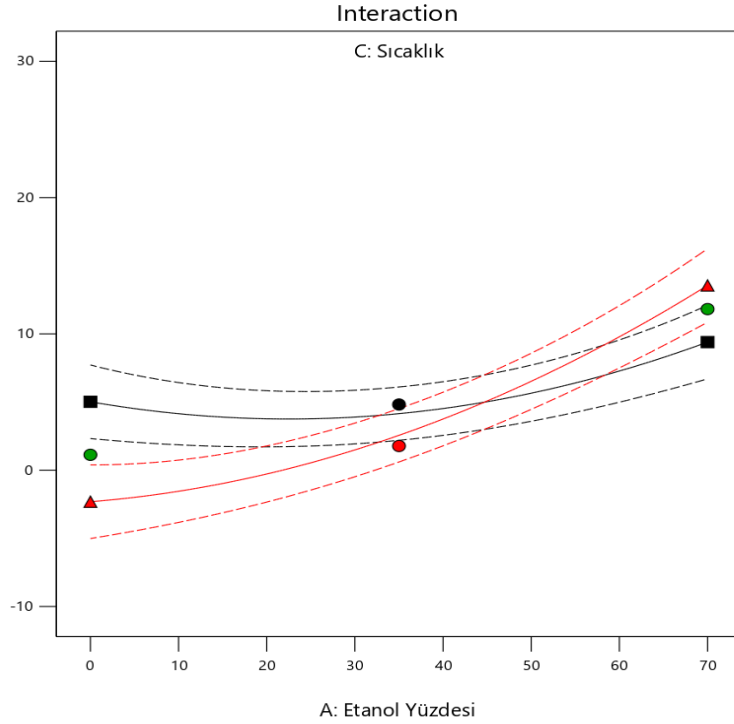
Resim 10. Sıcaklık faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği



Resim 11. Sıcaklık faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği



Resim 12. Mikrodalga faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği



Resim 13. Mikrodalga faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği

Tablo 7. Gerçek faktörler açısından nihai denklem

Vanilik Asit	=
+32,03994	
-0,302250	Etanol Yüzdesi
-0,221731	Mikrodalga Gücü
+0,911947	Sıcaklık
+0,006566	Etanol Yüzdesi * Sıcaklık
-0,002411	Mikrodalga Gücü * Sıcaklık
+0,002499	Etanol Yüzdesi ²
+0,000368	Mikrodalga Gücü ²

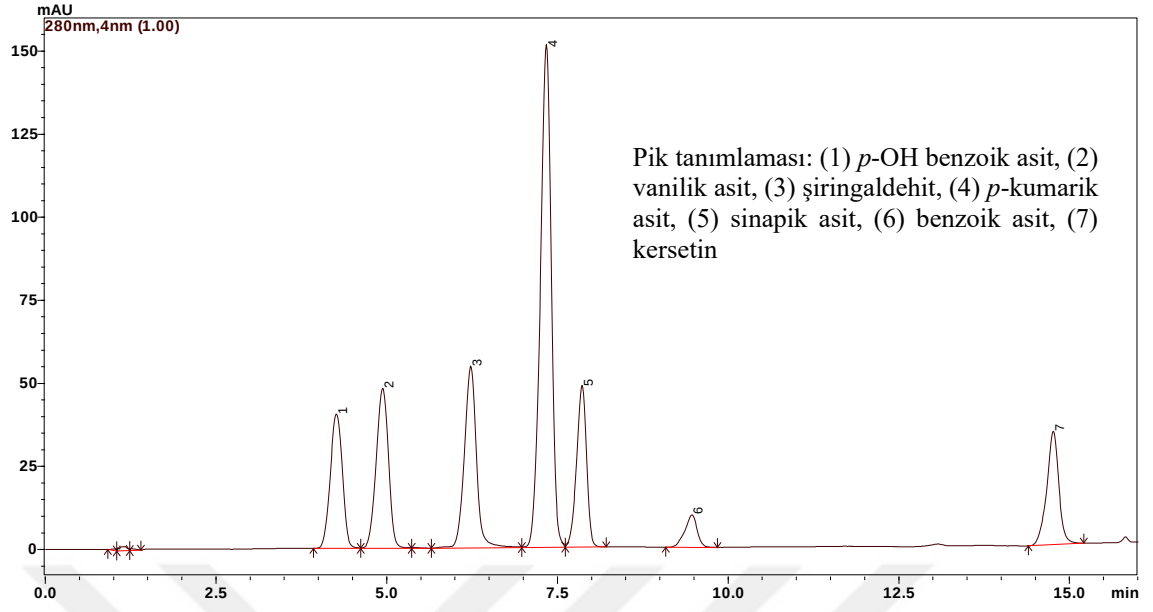
Tablo 8. Gerçek faktörler açısından nihai denklem (simgesel)

Vanilik Asit	=
+1,42	
+4,16	A
-1,75	B
+2,22	C
+2,87	AC
-3,01	BC
+3,06	A ²
+3,68	B ²

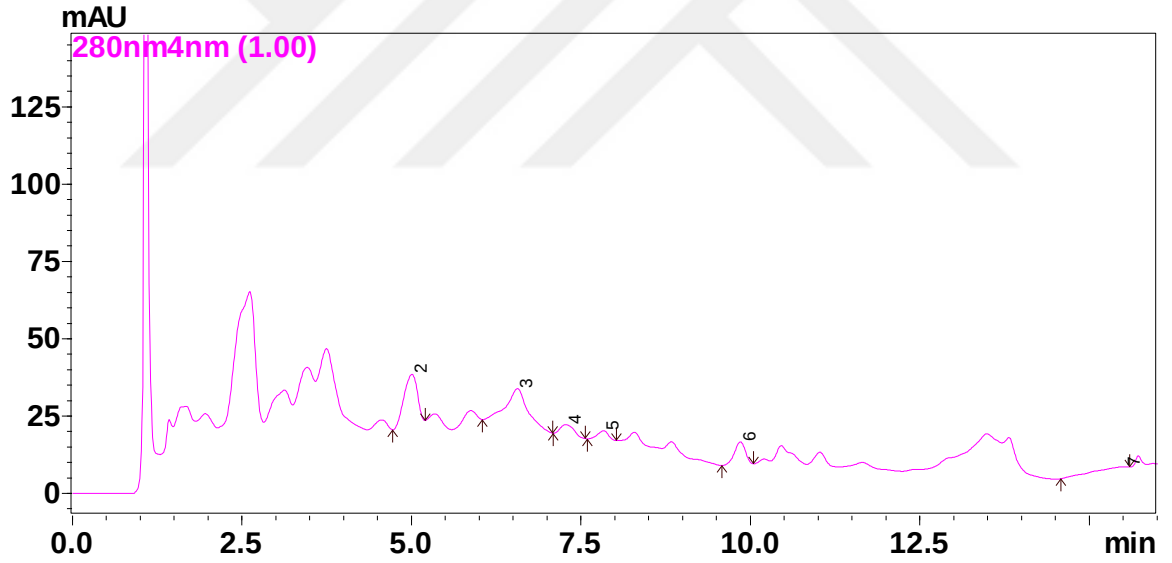
4.3. Deneysel Tasarımla Hazırlanan Ekstreler Üzerine Yapılan Analiz

4.3.1. Fenolik Bileşenlerin RP-HPLC ile Analiz Sonuçları

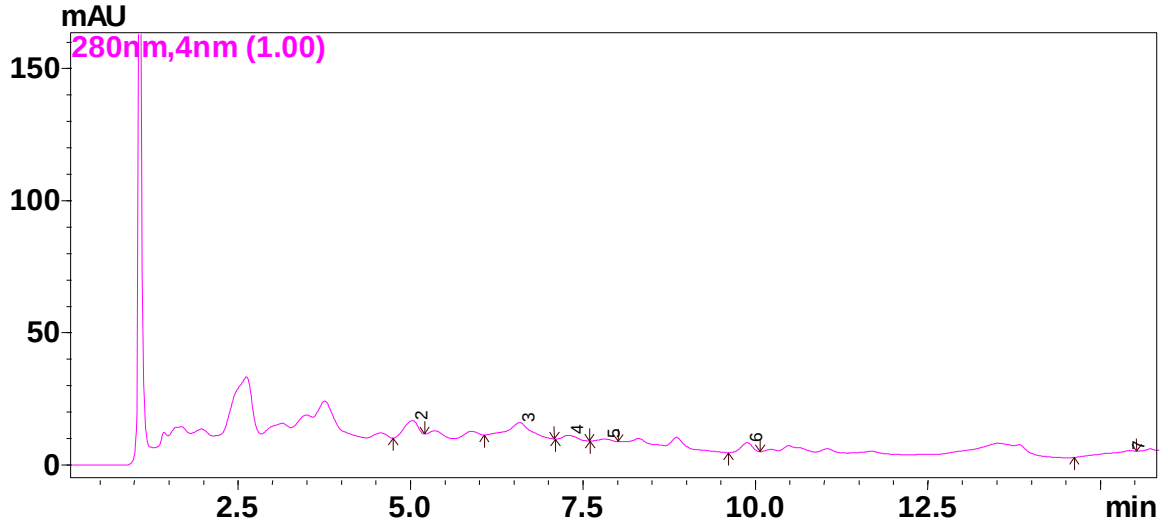
Bu çalışmada, kokulu üzüm posasından elde edilen ekstrelerin fenolik içeriğinin belirlenmesi için RP-HPLC kullanılmıştır. Standart olarak p-OH benzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin kullanılmıştır. 11 ve 16 nolu ekstrelerin vanilik asit, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, sinapik asit ve benzoik asit içerdiği tespit edilmiştir. Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin ve ekstrelerin kromatogramı Şekil 4-6'da verilmiştir.



Şekil 4. Standartların kromatogramı



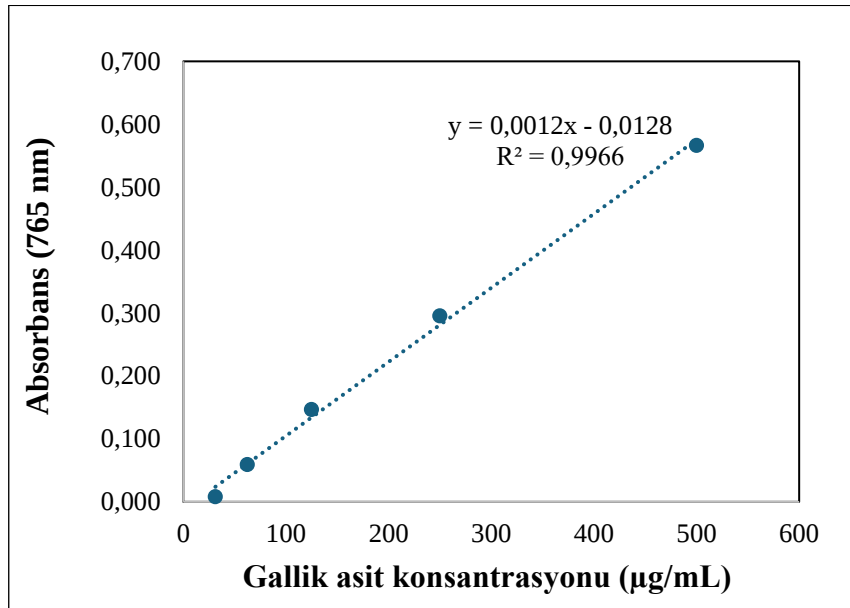
Şekil 5. 11 nolu ekstrenin kromatogramı



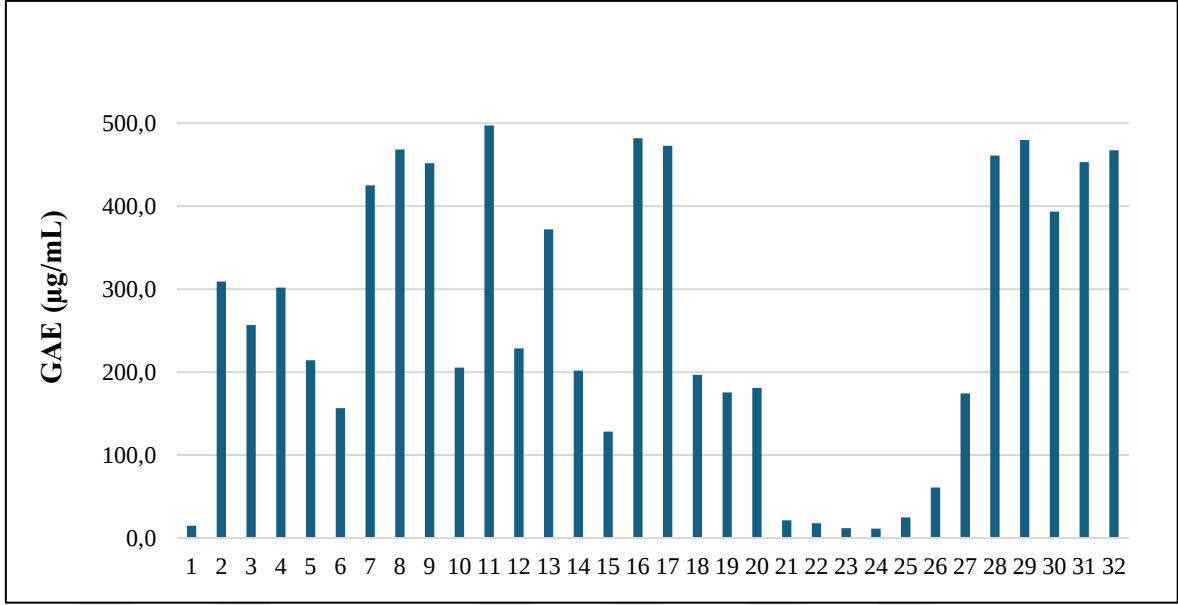
Şekil 6. 16 nolu ekstrenin kromatogramı

4.3.2. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini Sonuçları

Tez kapsamında çalışılan ticari atık olarak oluşan kokulu üzüm posasından elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde, gallik asitin kalibrasyon eğrisinden yararlanılmıştır. Gallik asit için çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 7’de verilmiştir. Örneğin içerdiği toplam fenolik madde miktarı GAE (mg/µL) olarak Şekil 8’de yer almaktadır.



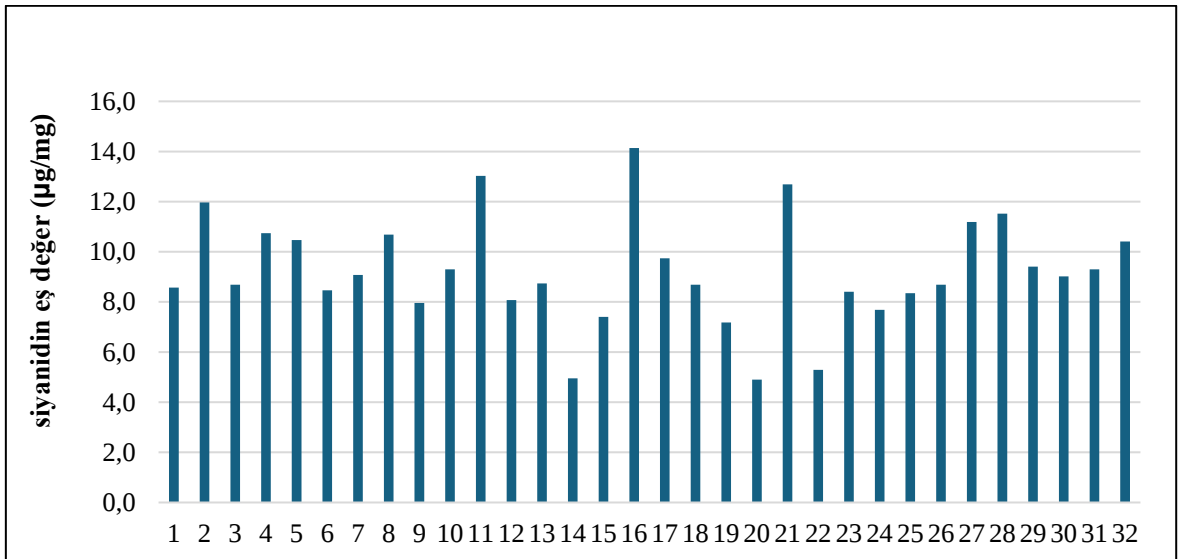
Şekil 7. Gallik asit’in kalibrasyon grafiği



Şekil 8. Ekstrelerin fenolik madde miktar tayini sonuçları

4.3.3. Toplam Antosiyanozit Madde Miktar Tayini Sonuçları

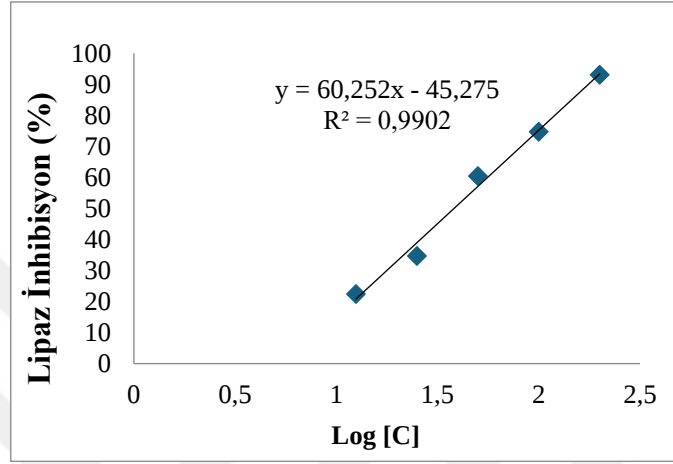
Tez kapsamında çalışılan ticari atık olarak oluşan kokulu üzüm posasından elde edilen ekstrelerin toplam antosiyanozit miktarlarının belirlenmesinde, pH diferansiyel yöntemi kullanılmıştır. Örneklerde bulunan antosiyanozit miktarları siyanidin-3-glikozit eşdeğeri (μg siy-3-glikozit /mg örnek) olarak olarak Şekil 9’da yer almaktadır.



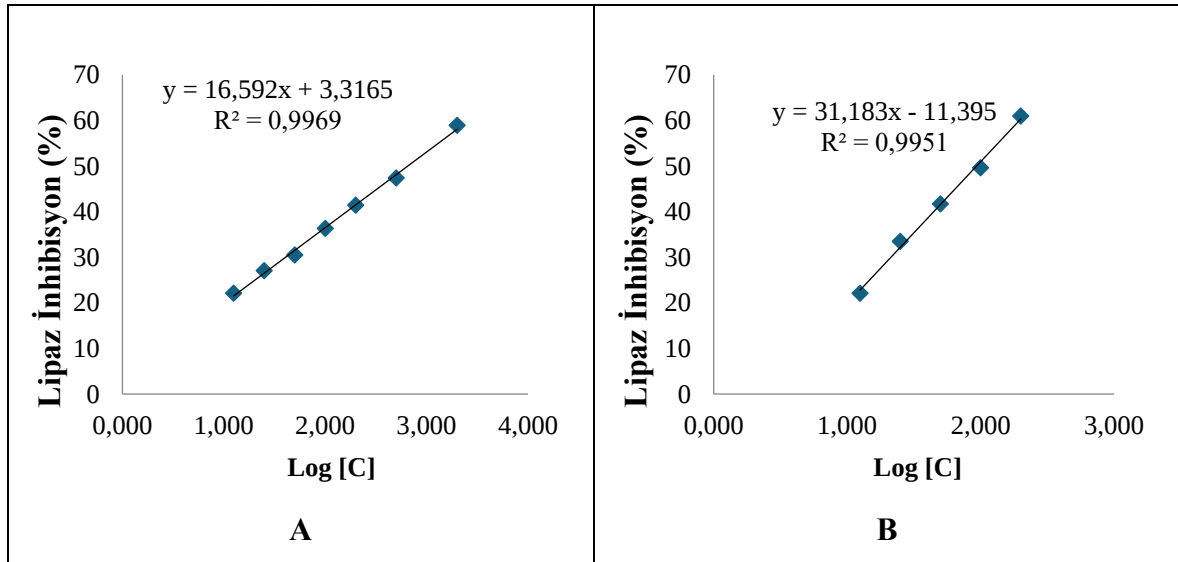
Şekil 9. Ekstrelerin antosiyanozit madde miktar tayini sonuçları

4.3.4. Pankreatik Lipaz İnhibitör Etki Belirleme Çalışmaları Sonuçları

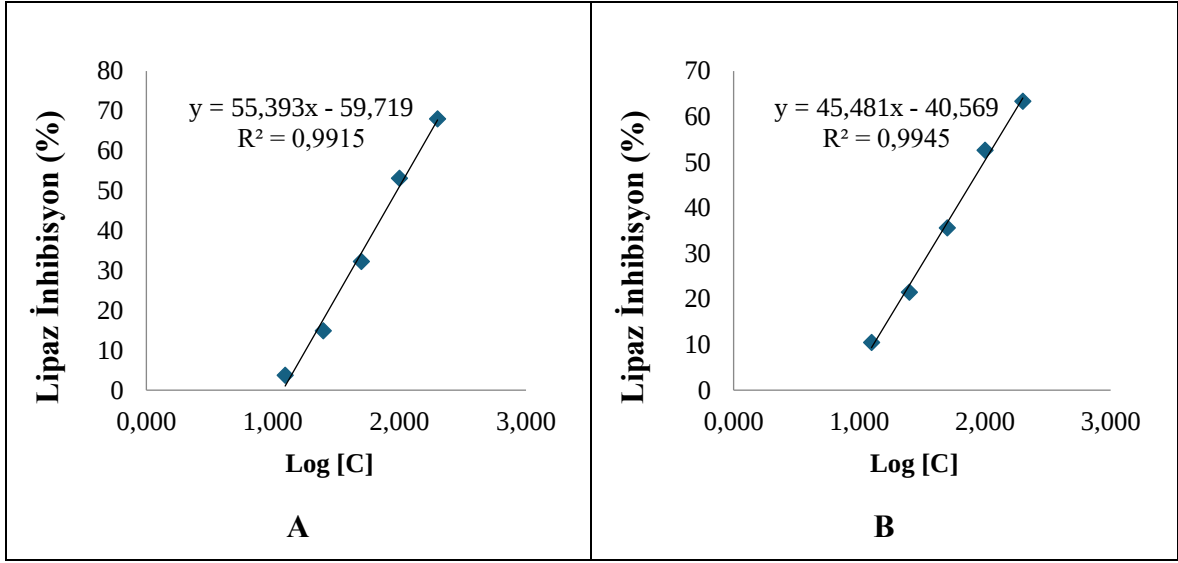
Tez kapsamında çalışılan ticari atık olarak oluşan kokulu üzüm posasından elde edilen ekstrelerin ve Orlistat'ın lipaz enzim inhibisyonuna ait log [C]- %inhibisyon grafikleri ile birlikte örneklerin IC₅₀ değerleri Şekil 10-27'de ve Tablo 9'da verilmiştir.



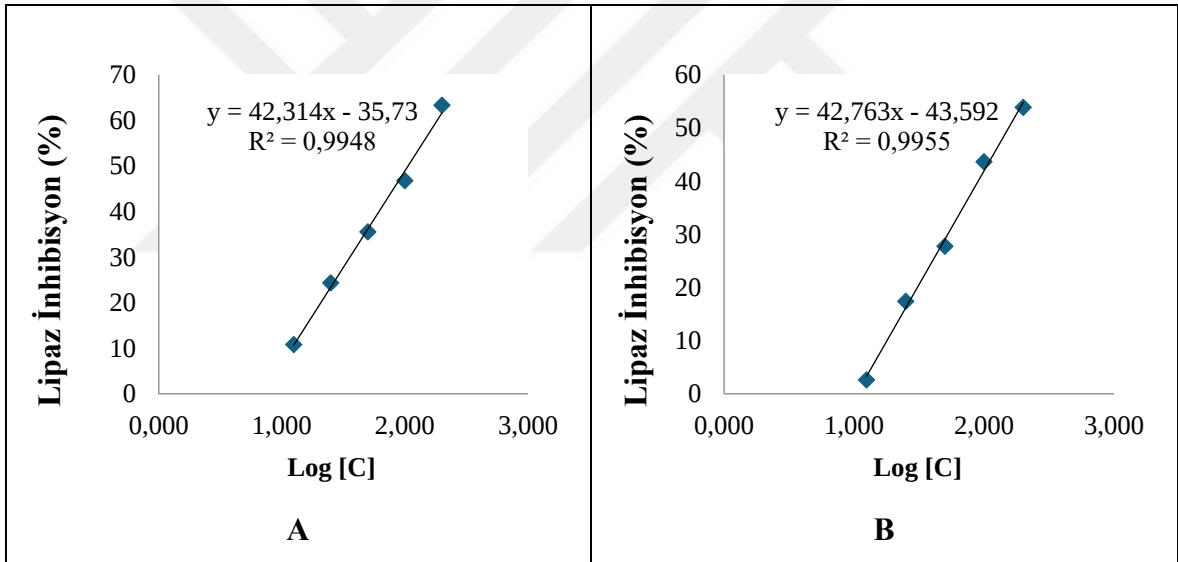
Şekil 10. Orlistat'a ait lipaz enzim inhibisyonu grafiği



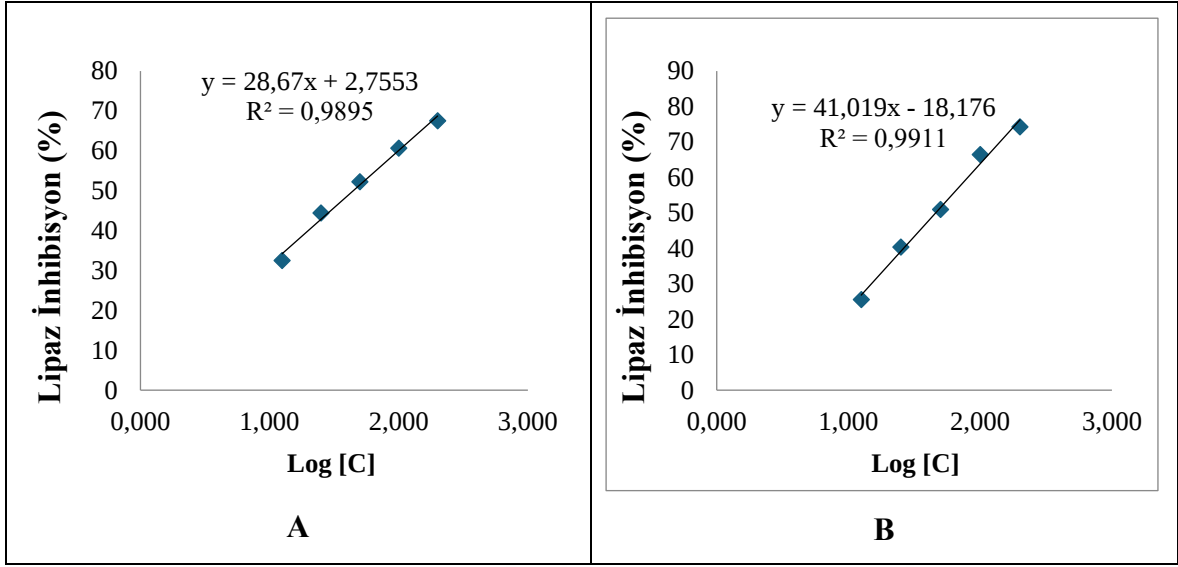
Şekil 11. 1 nolu (A) ve 2 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



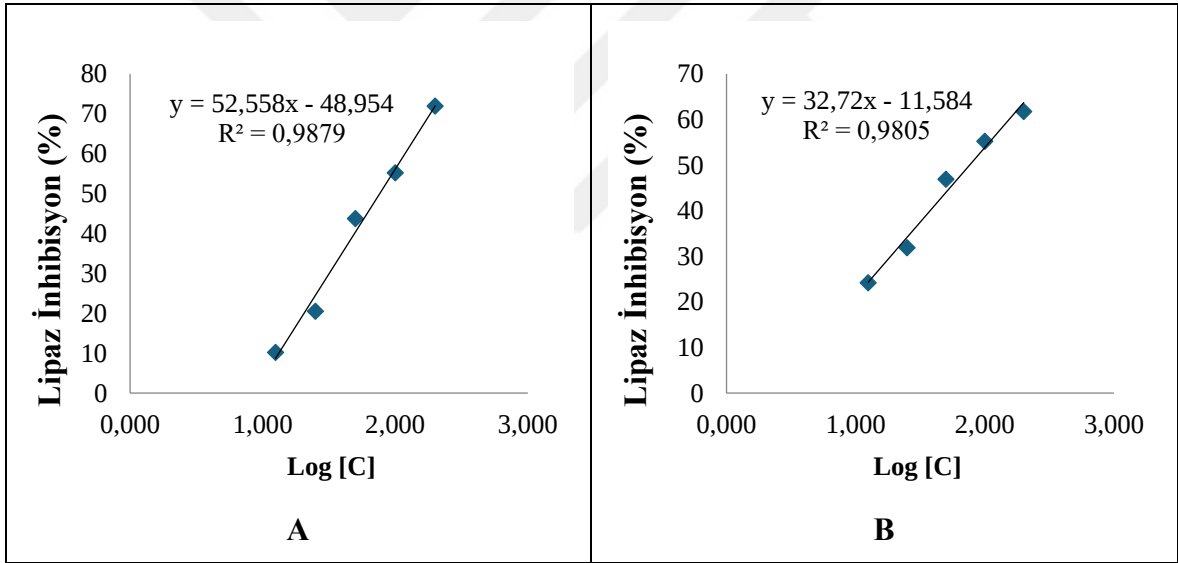
Şekil 12. 3 nolu (A) ve 4 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



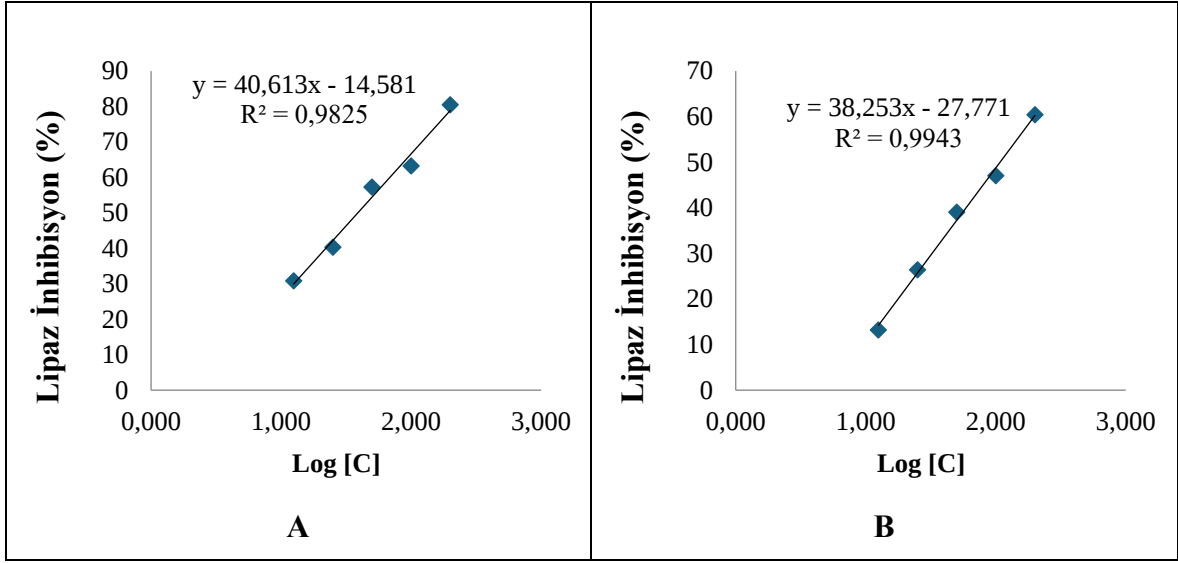
Şekil 13. 5 nolu (A) ve 6 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



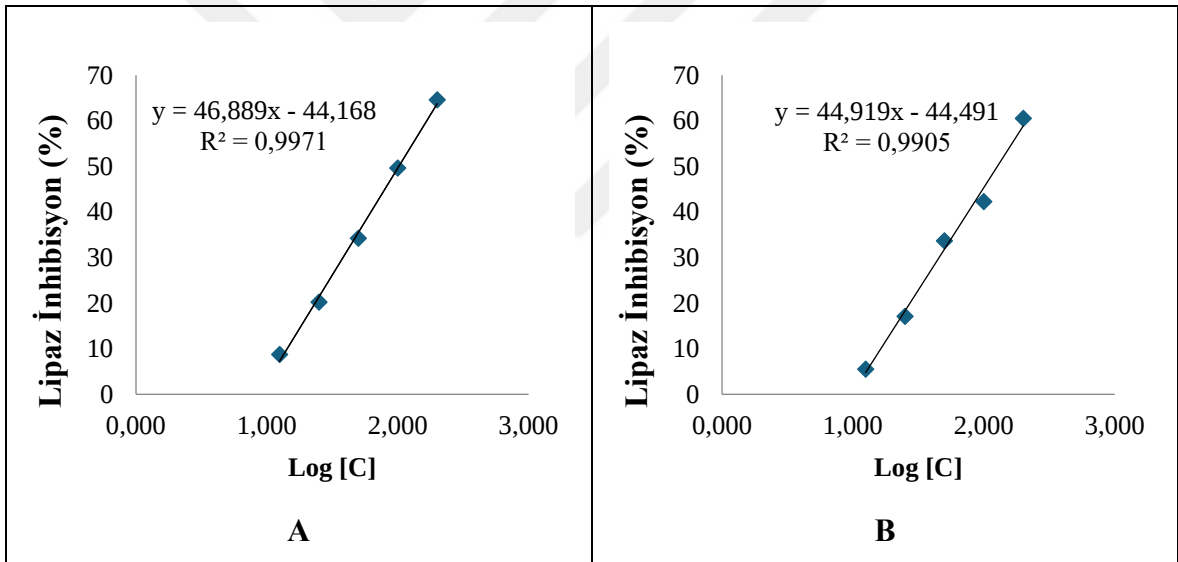
Şekil 14. 7 nolu (A) ve 8 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



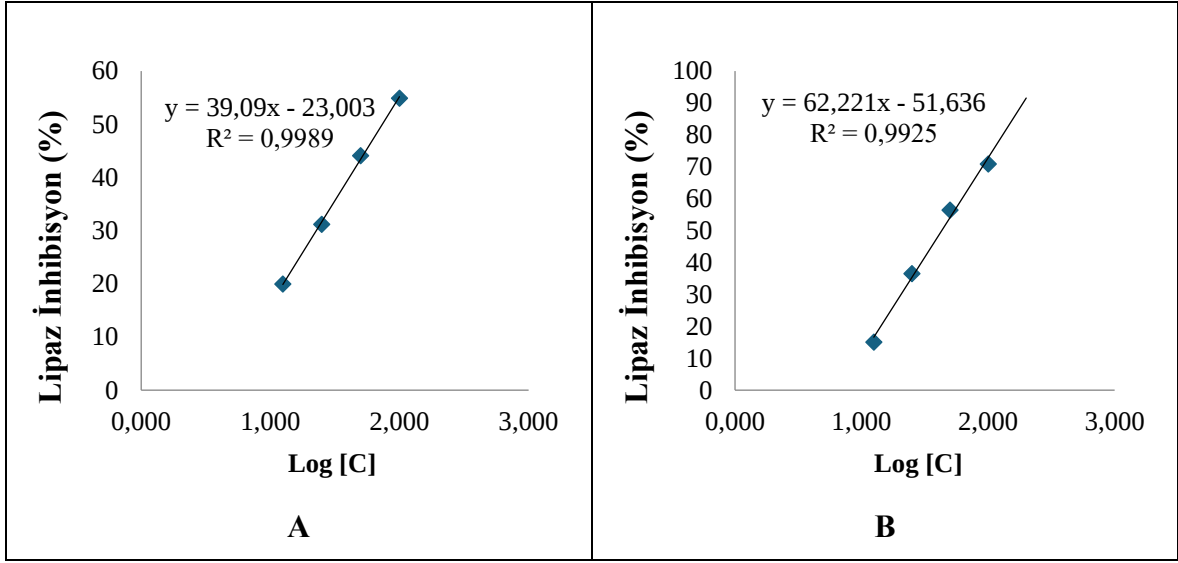
Şekil 15. 9 nolu (A) ve 10 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



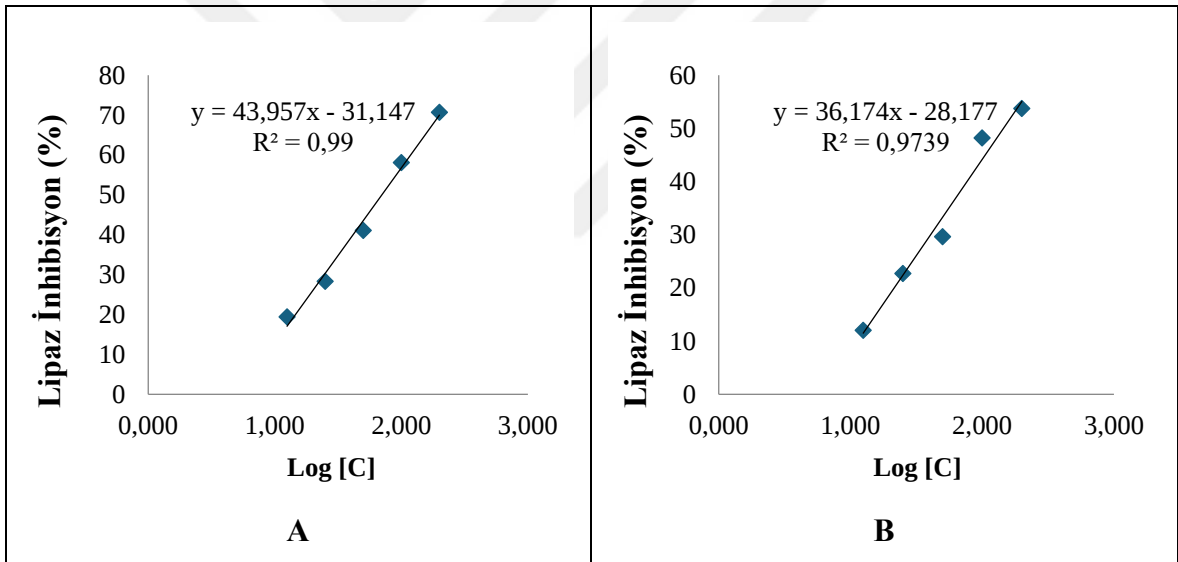
Şekil 16. 11 nolu (A) ve 12 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



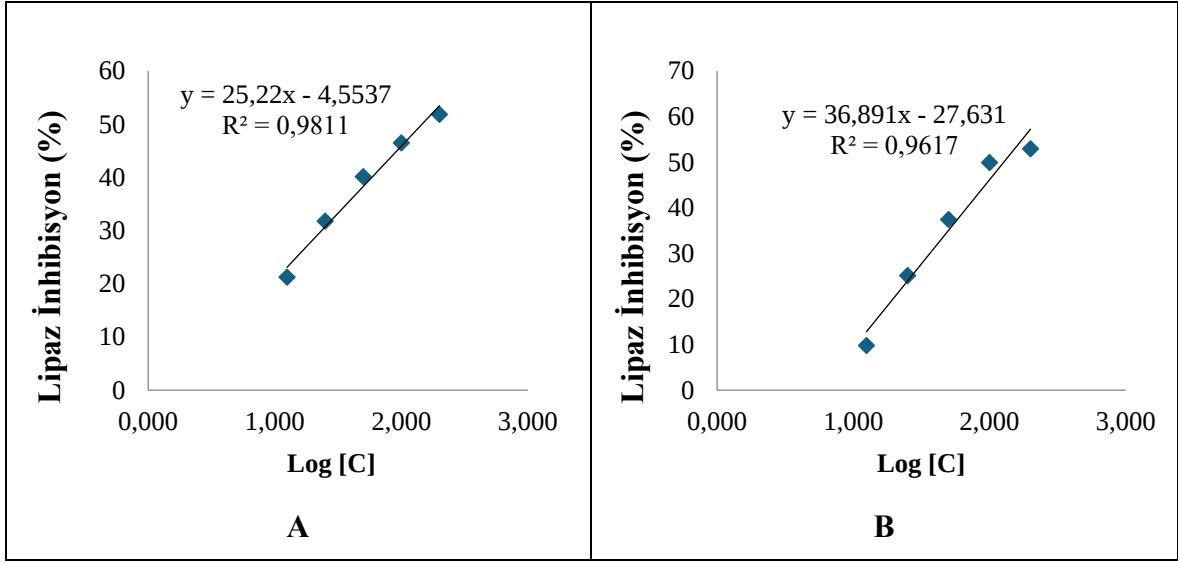
Şekil 17. 13 nolu (A) ve 14 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



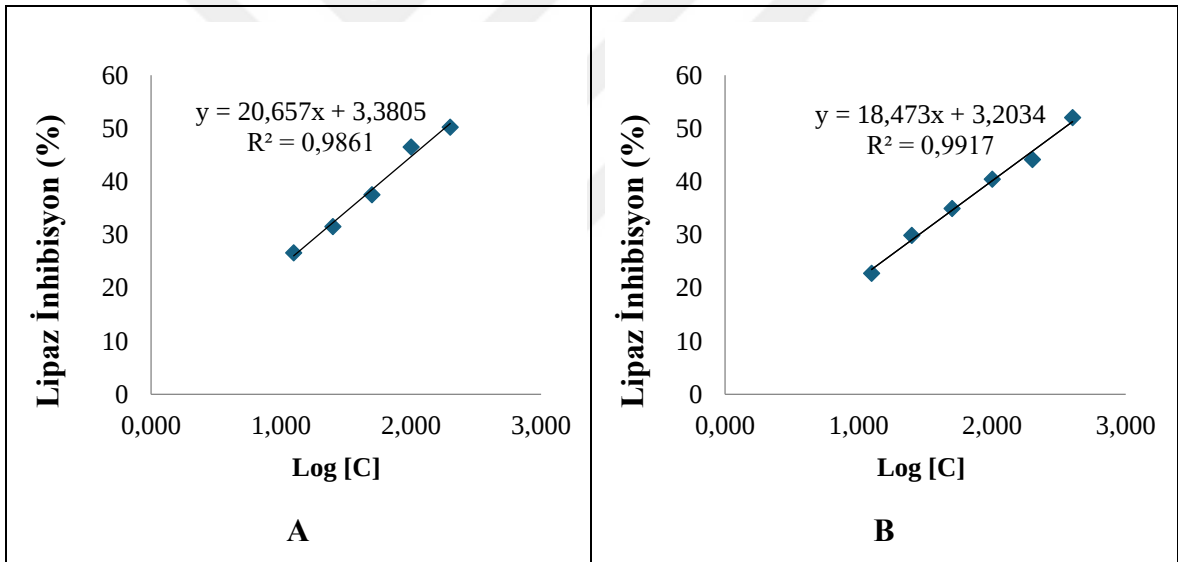
Şekil 18. 15 nolu (A) ve 16 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



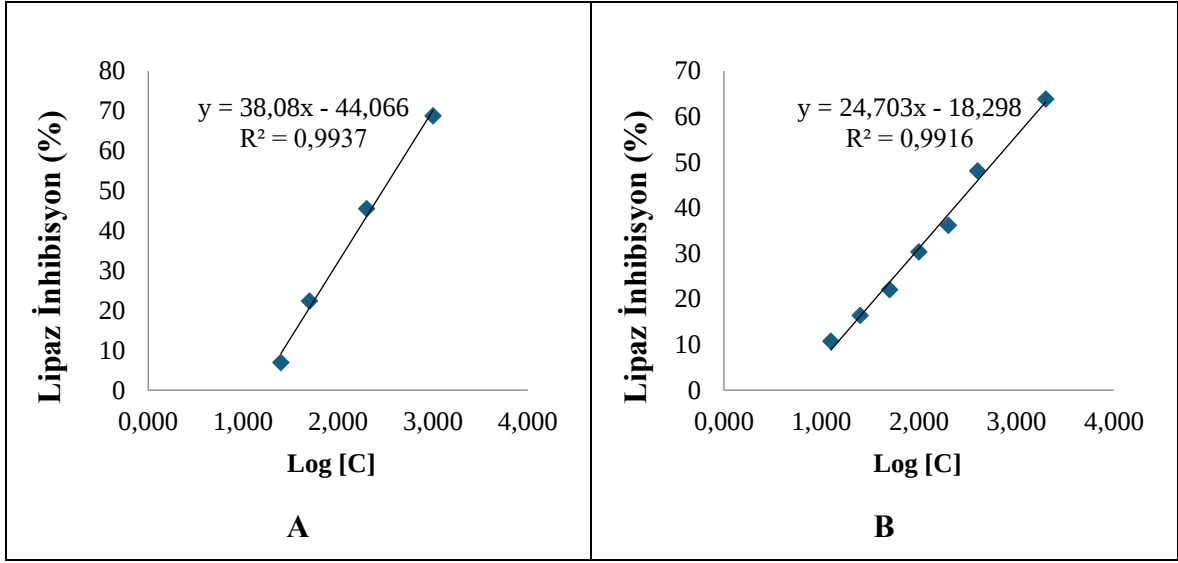
Şekil 19. 17 nolu (A) ve 18 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



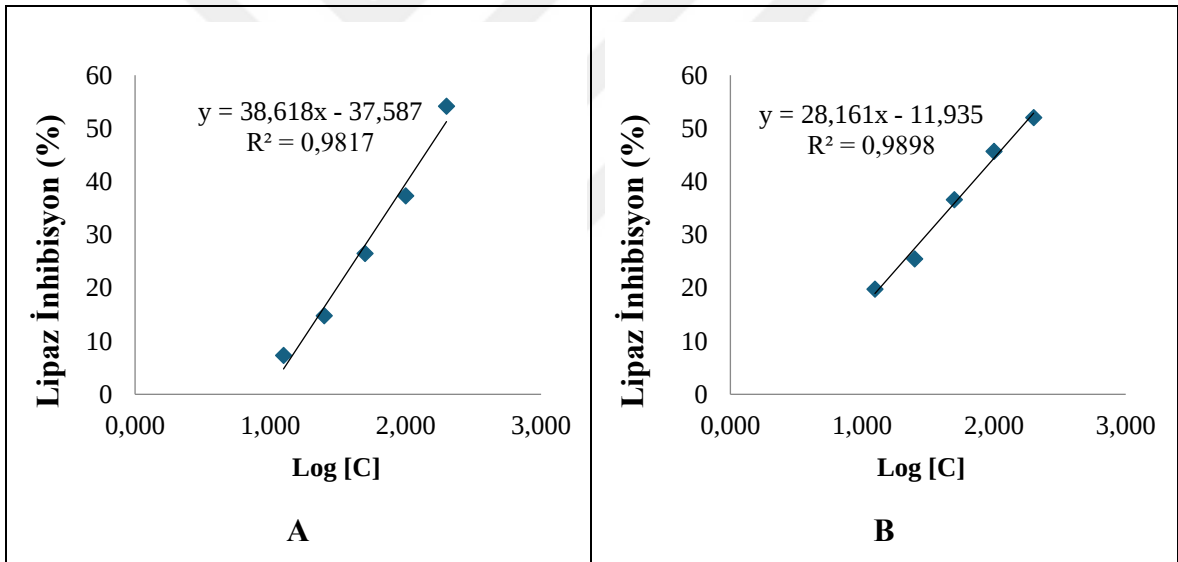
Şekil 20. 19 nolu (A) ve 20 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



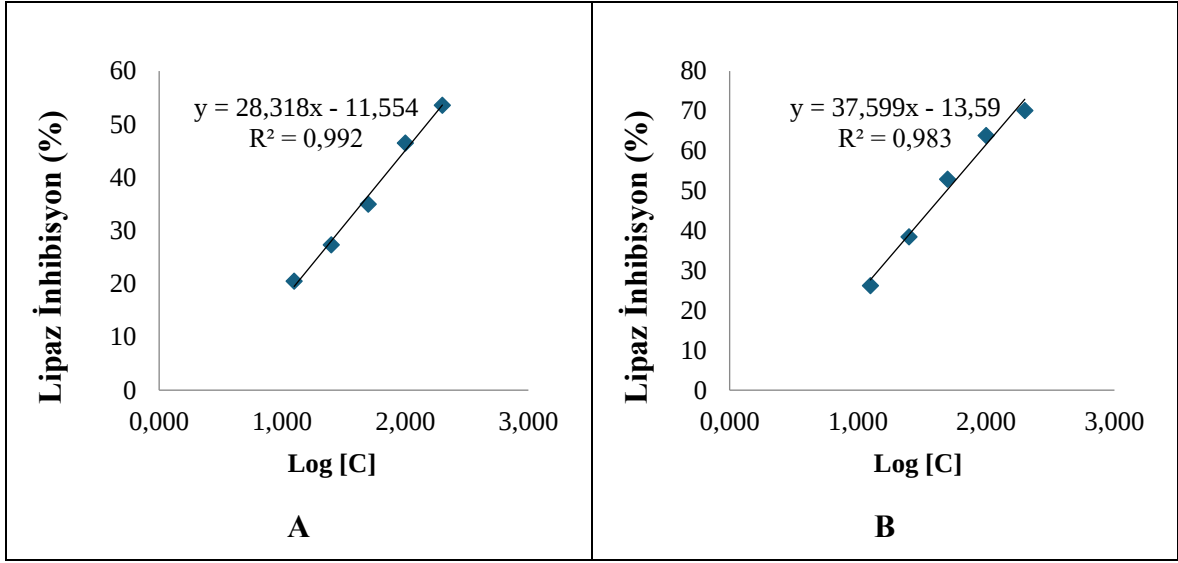
Şekil 21. 21 nolu (A) ve 22 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



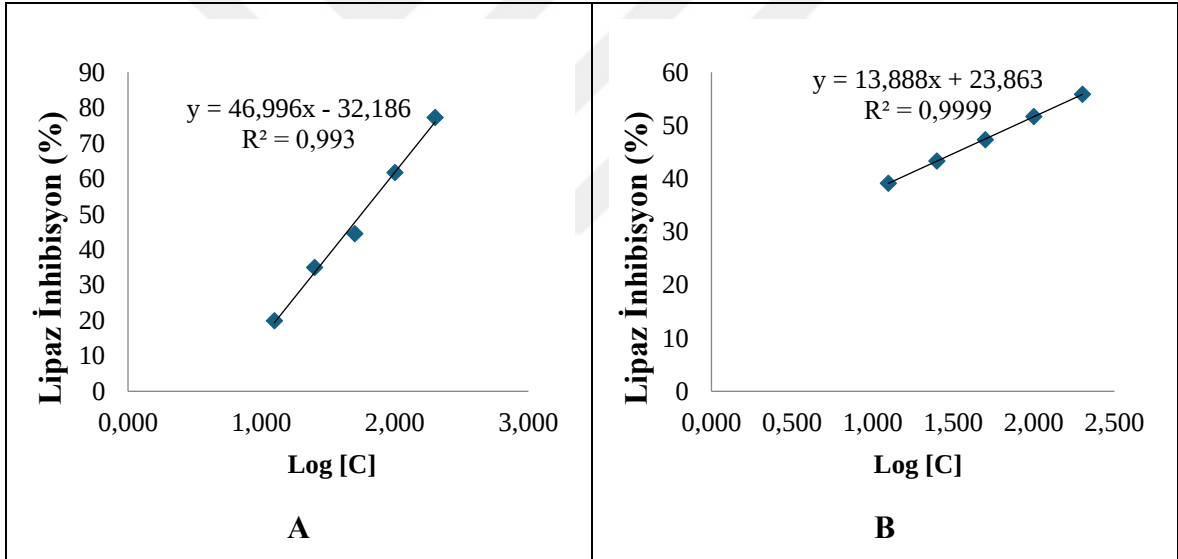
Şekil 22. 23 nolu (A) ve 24 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



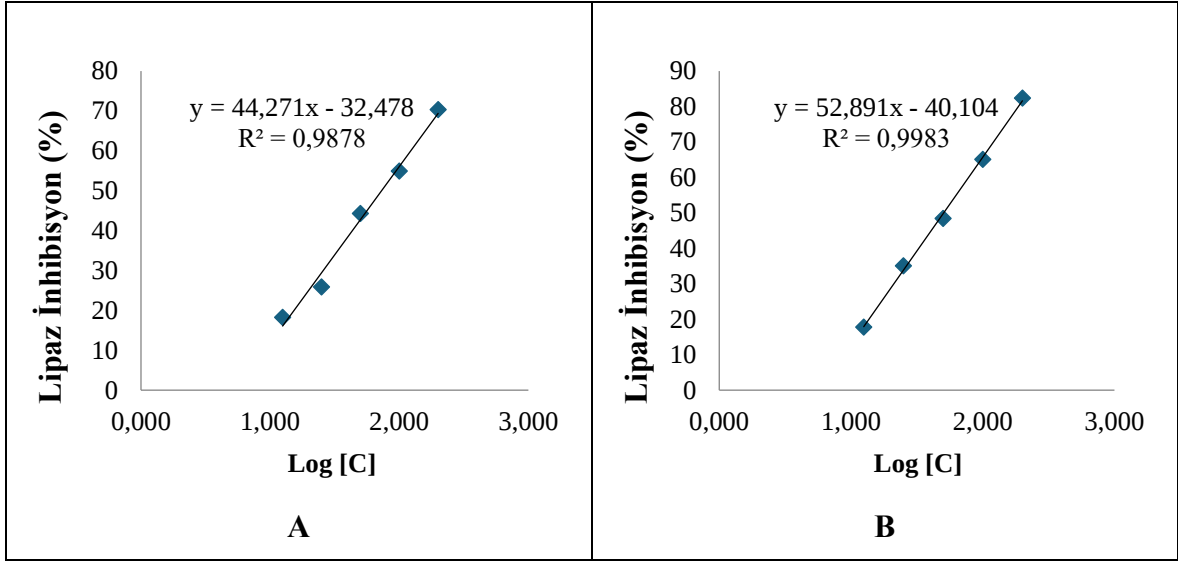
Şekil 23. 25 nolu (A) ve 26 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



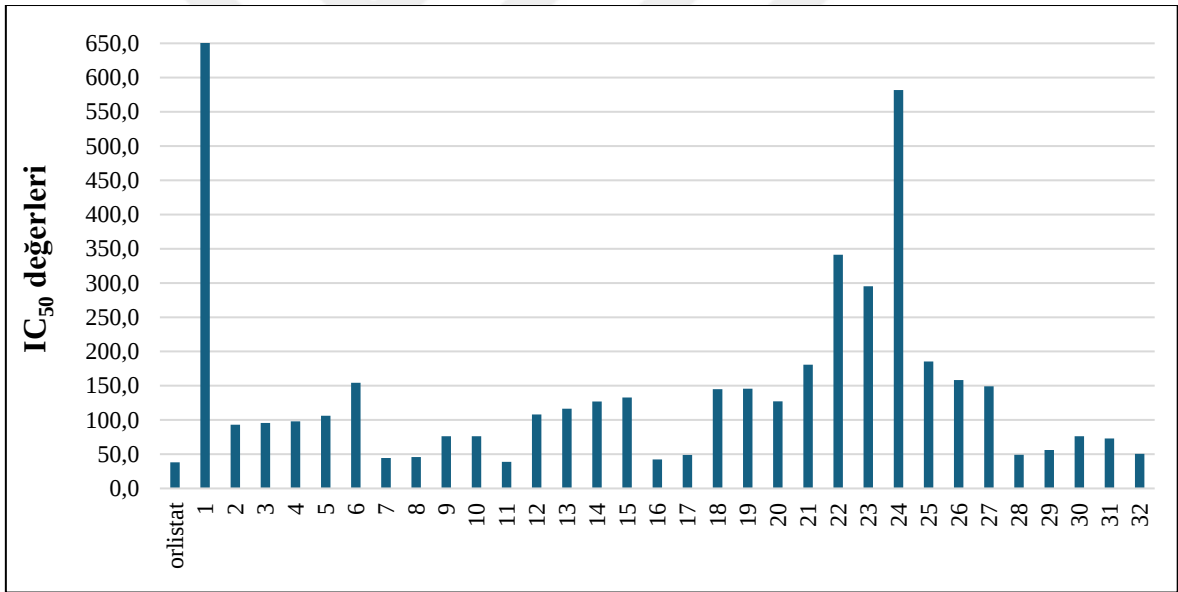
Şekil 24. 27 nolu (A) ve 28 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



Şekil 25. 29 nolu (A) ve 30 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



Şekil 26. 31 nolu (A) ve 32 nolu (B) örneklerin lipaz enzim inhibisyonu grafikleri



Şekil 27. Orlistat ve örneklerin IC₅₀ değerleri

Tablo 9. Ekstrelerin toplam fenolik, antosiyanozit madde miktarı ve Orlistat'ın lipaz enzim inhibisyonu sonuçları

Örnekler	Toplam fenolik madde miktarı GAE (mg/g)	Toplam antosiyanozit madde miktarı (µg siy-3-glükozit /mg)	Lipaz enzim inhibisyonu IC ₅₀ değeri (µg/mL)
1	14.833 ± 1.667	8.572 ± 0.957	651.051 ± 9.065
2	309.278 ± 3.469	11.968 ± 1.051	93.081 ± 1.082
3	256.778 ± 1.735	8.683 ± 1.012	95.662 ± 2.012
4	301.778 ± 2.406	10.743 ± 2.310	98.030 ± 1.820
5	214.278 ± 2.927	10.465 ± 1.358	106.180 ± 2.672
6	156.500 ± 3.005	8.461 ± 0.591	154.391 ± 6.214
7	425.111 ± 5.672	9.073 ± 0.294	44.451 ± 1.894
8	468.444 ± 2.970	10.687 ± 1.613	45.926 ± 1.379
9	451.778 ± 2.097	7.960 ± 1.089	76.341 ± 4.028
10	205.389 ± 1.273	9.296 ± 0.762	76.235 ± 3.684
11	497.333 ± 1.443	13.025 ± 3.398	38.918 ± 1.067
12	228.444 ± 0.962	8.071 ± 1.314	107.912 ± 1.964
13	372.056 ± 3.368	8.739 ± 0.937	116.506 ± 1.643
14	201.778 ± 2.927	4.954 ± 0.697	126.936 ± 1.056
15	128.167 ± 2.887	7.403 ± 1.310	132.856 ± 0.968
16	481.778 ± 2.406	14.138 ± 5.087	42.345 ± 0.682
17	472.889 ± 3.758	9.741 ± 2.449	48.851 ± 0.984
18	196.778 ± 0.962	8.683 ± 2.122	144.923 ± 2.034
19	175.389 ± 1.735	7.181 ± 1.086	145.584 ± 2.184
20	180.944 ± 6.989	4.898 ± 0.898	127.155 ± 3.218
21	21.222 ± 3.758	12.691 ± 2.682	180.650 ± 3.654
22	17.889 ± 5.672	5.288 ± 1.032	341.384 ± 4.346
23	11.778 ± 2.546	8.405 ± 2.264	295.271 ± 2.687
24	11.222 ± 1.273	7.681 ± 2.196	581.789 ± 9.280
25	24.833 ± 2.500	8.349 ± 2.934	185.368 ± 2.059
26	60.944 ± 4.194	8.683 ± 2.089	158.241 ± 2.035
27	174.278 ± 10.353	11.188 ± 2.961	149.166 ± 2.580
28	460.944 ± 8.347	11.522 ± 1.874	49.121 ± 1.974
29	479.833 ± 7.120	9.407 ± 0.935	56.077 ± 1.875
30	393.444 ± 2.927	9.017 ± 1.265	76.205 ± 1.325
31	453.167 ± 9.465	9.296 ± 1.814	72.950 ± 1.697
32	467.333 ± 1.667	10.409 ± 4.081	50.533 ± 1.056
Orlistat	-	-	38.131 ± 0.720

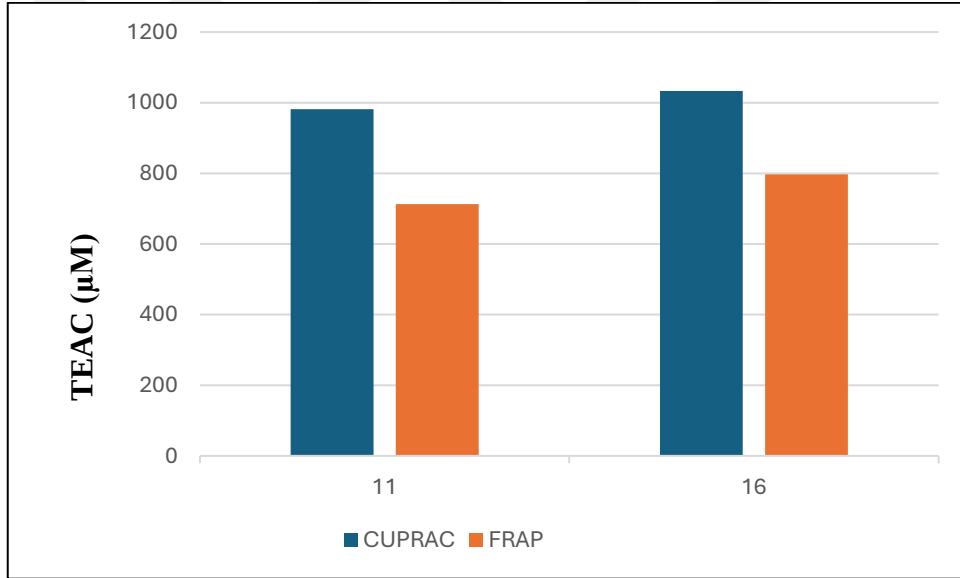
4.4. Optimum Ekstrenin Antioksidan Aktivite Sonuçları

11 ve 16 nolu ekstrelerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda elde edilen sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 28’de gösterilmiştir.

Tablo 10. Numunelerin antioksidan aktivite sonuçları

Test Bileşikleri	CUPRAC ¹	FRAP ²	DPPH ³
11	981.551 ± 2.617	712.788 ± 1.868	0.0569 ± 0.0006
16	1033.580 ± 1.662	797.333 ± 2.889	0.0371 ± 0.0011
BHT	-	-	0.0055 ± 0.0004

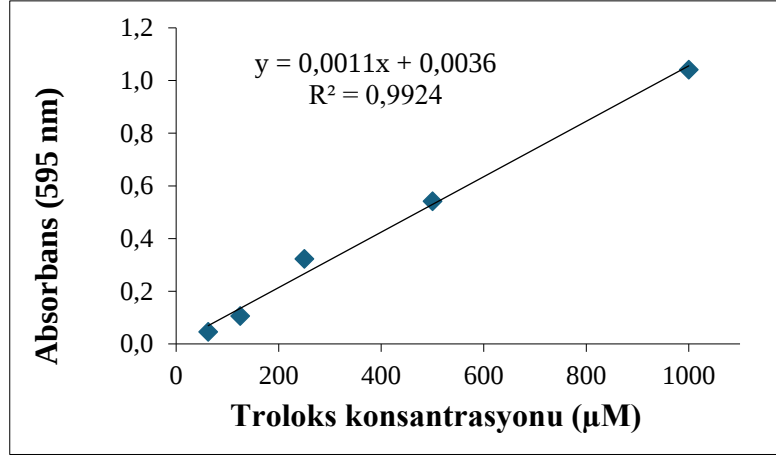
¹CUPRAC değeri bakır indirgeyici antioksidan gücünü (μM trolox eşdeğeri/gram), ²FRAP değeri demir indirgeyici antioksidan gücünü (μM trolox eşdeğeri/gram), ³DPPH değeri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesini (mg/mL), BHT değeri bütillenmiş hidroksi tolueni gösterir.



Şekil 28. Numunelerin FRAP ve CUPRAC sonuçları

4.4.1. FRAP Ölçümü Sonuçları

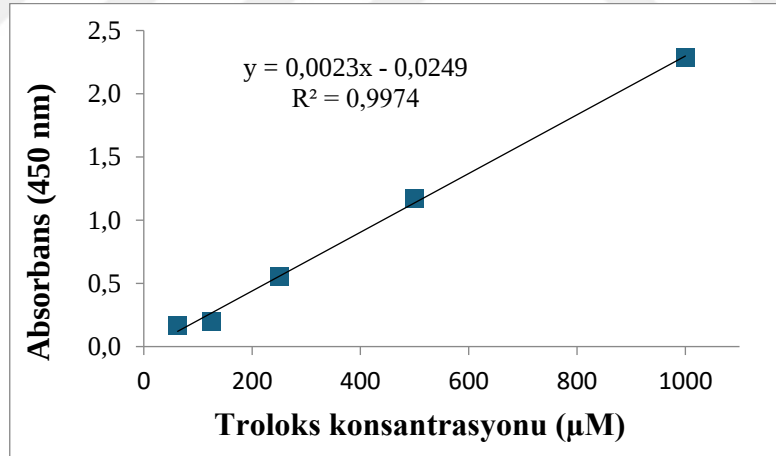
11 ve 16 nolu ekstrelerin FRAP değerleri Troloks’a ait kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak TEAC (μM) olarak Şekil 28’de ve Tablo 10’da gösterilmiştir. Troloks’un kalibrasyon grafiği Şekil 29’da verilmiştir.



Şekil 29. FRAP tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği

4.4.2. CUPRAC Tayini Sonuçları

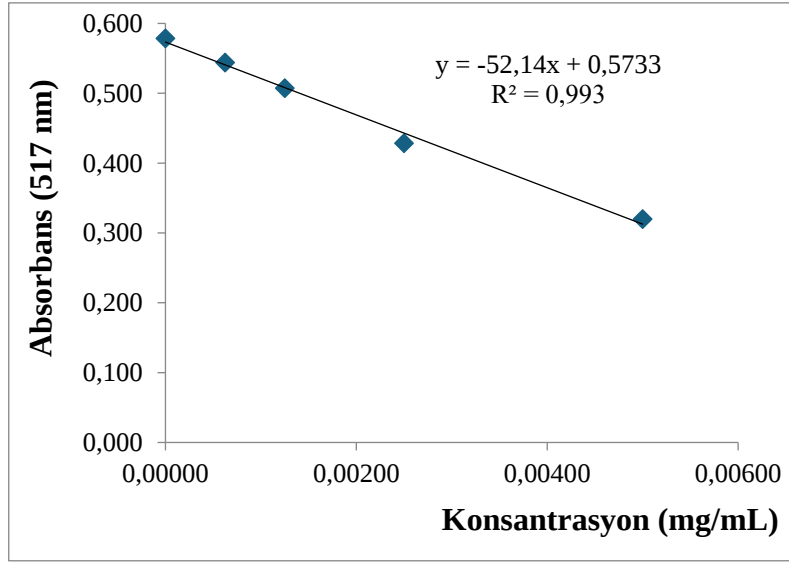
11 ve 16 nolu ekstrelerin CUPRAC değerleri Troloks'a ait kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak TEAC (µM) olarak Şekil 28'de ve Tablo 10'da gösterilmiştir. Troloks'un kalibrasyon grafiği Şekil 30'da verilmiştir.



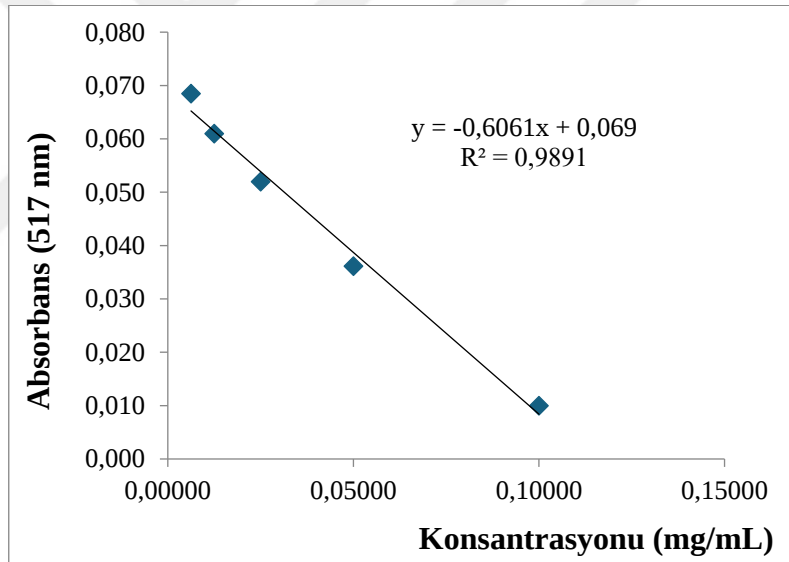
Şekil 30. CUPRAC tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği

4.4.3. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini Sonuçları

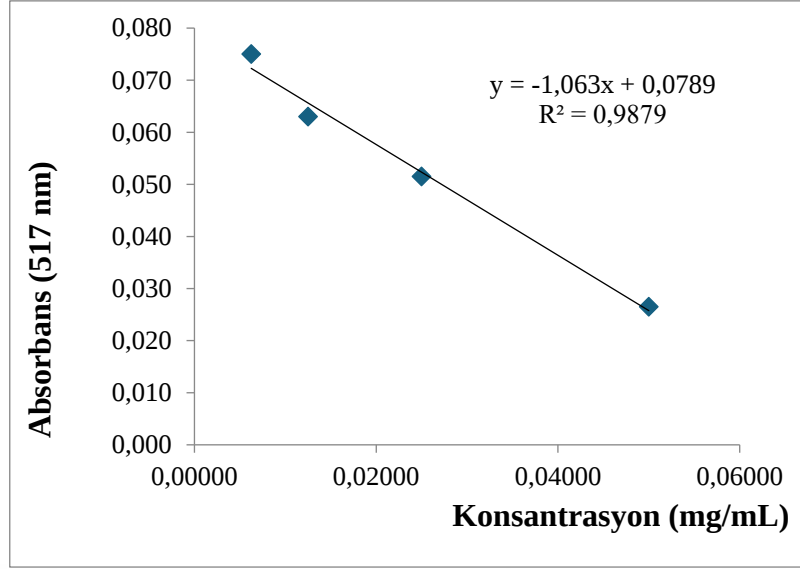
11 ve 16 nolu ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktivitesi BHT'nin etkisi ile karşılaştırılmıştır. Örneklerin konsantrasyon-absorbans değerleri ile elde edilen grafikler Şekil 31-33'de verilmiştir. BHT ve örneklerin SC₅₀ değerleri Şekil 34'de ve Tablo 10'da belirtilmiştir.



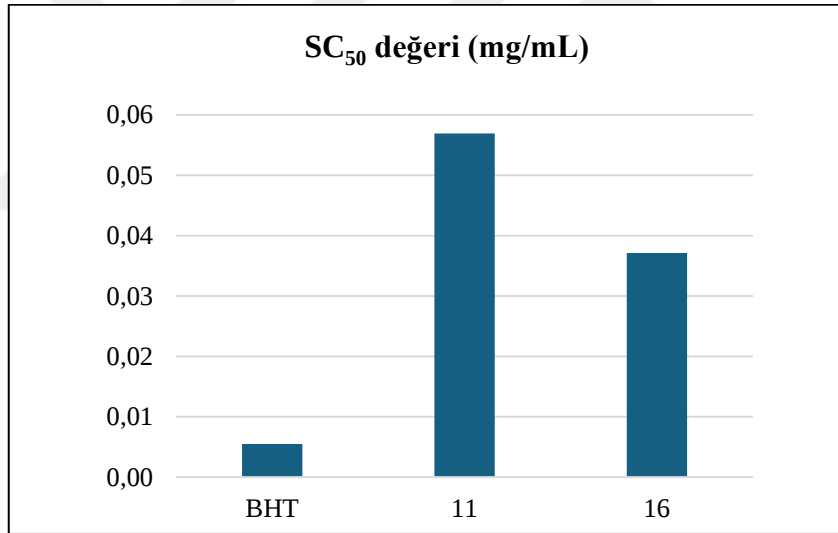
Şekil 31. DPPH tayininde kullanılan BHT'e ait kalibrasyon grafiği



Şekil 32. DPPH tayininde kullanılan 11'e ait kalibrasyon grafiği



Şekil 33. DPPH tayininde kullanılan 16'ya ait kalibrasyon grafiği



Şekil 34. Numunelerin DPPH sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karadeniz bölgesinde yetişen *V. labrusca* L. halk arasında “kokulu üzüm, izabella üzümü, çilek üzümü, Amerikan üzümü, siyah üzüm” olarak farklı isimlerle bilinmektedir. Kendine has keskin bir aromaya sahip olan kokulu üzüm bölge halkı tarafından gıda maddesi olarak meyve, meyve suyu, marmelat, pekmez, pestil, sirke ve turşu gibi farklı şekillerde tüketilmektedir (7-11). Ekonomik olarak değerli olan kokulu üzüm üzerine yapılan birçok fitokimyasal çalışma sonucunda, *V. labrusca*’nın fenolik bileşikler, organik asitler, vitaminler ve mineraller, enzimler, monosakkaritler ve türevleri, azotlu bileşikler, terpenik bileşikler ve lipitler açısından zengin olduğu rapor edilmiştir (7, 11, 12).

Gıda atık ürünlerinin değerlendirilme maliyetinin düşük olması, atıklardan elde edilen ürünlerin sağlık açısından olumlu etkilerinin olması ve toksisitesinin az olması sebebiyle bu konudaki araştırmalar hız kazanmıştır. Bununla birlikte atıklardan elde edilecek ürünlerin gıda, boya, ilaç ve kozmetik endüstrisi gibi farklı alanlarda sentetik bileşenlerin yerine kullanılabilecek doğal kaynaklı ajanlar olabileceği düşünülmektedir (23, 24). Üzümün işlenmesiyle açığa çıkan kabuk, çekirdek ve sap kısımlarını içeren üzüm posası gübre üretimi, hayvanlar için besin kaynağı, gıda katkı maddesi gibi farklı amaçlarla yeniden ekonomiye kazandırılmaktadır. Çoğunluğu kabuktan oluşan üzüm posasının yağ, protein, pektin ve şeker içeriğinin yüksek olması, gıda üretimi için ucuz bir hammadde olması sebebiyle kullanımı tercih edilmektedir (13-14).

Birçok çalışmada fenolik bileşikler tat ve lezzet ile ilişkilendirilmektedir. Literatürlerde, üzüksü meyvelerde antosiyanozit, proantosiyanidin, kersetin, kemferol, mirsetin ve flavonoller, elajik asit gallokateşin, epigallokateşin, kateşin, epikateşin, resveratrol gibi fenolik bileşikler bulunduğu rapor edilmiştir. Üzüm türleri ile yapılan çalışmalarda, üzümde elde edilen ekstraktların antikanserojenik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antialerjik, antiödem etkilerinin yanı sıra yara iyileştirici olarak, enflamasyon, diyabetik retinopati, damar sertliği, mikrodolaşım bozuklukları, gece körlüğü, oküler ışık hassasiyeti, kapiler kırılabilirlik, vasküler dejenerasyon gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olduğu bildirilmiştir (8, 10, 15, 16). Gıda ve boya endüstrisinde de çeşitli amaçlarla kokulu kara üzüm pulpundan yararlanıldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (8, 14, 118-121). Gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin sindirim sisteminde görev alan enzimleri (pankreatik lipaz, lipoprotein lipaz, ve gliserofosfat dehidrogenaz) inhibe etme,

termojenezi arttırma, adiposit farklılığı önleme, lipit metabolizmasını arttırma, iştahı azaltma gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kilo kontrolünde etkili olduğu bildirilmektedir (17-20).

Deneysel tasarım, bir çalışmayı etkileyecek faktörlerin sistematiksel değişmesine bağlı olarak elde edilecek sonuçtaki değişimin gözlenmesi ve yorumlanması amacıyla kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Deneysel tasarım araştırmacılara çalışma tekrar sayısı, numune ve kimyasal miktarı ile birlikte zamandan tasarruf edilme avantajı sağlamaktadır (29). Deneysel tasarımla optimizasyon çalışmalarında kullanılan yüzey yanıt metodu çok az deneme ile çok fazla parametrenin değerlendirmesi sağladığı için böyle çalışmalar yeşil kimya ve uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir (21, 22).

Üzümün işlenmesi sonucu oluşan yan ürünlerden olan üzüm posasının zengin içeriği ile büyük bir uygulanabilir ticarete sahip olması fikri ile yola çıktığımız bu çalışmada, ilk kez Karadeniz Bölgesi için endemik bir değer olan İzabella üzümünden elde edilen posadan deneysel tasarımla hazırlanan ekstraların içeriği ve pankreatik lipaz inhibitör etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan kokulu üzüm posası Trabzon'da kurulmuş yerel bir firma (NATUVA)'dan temin edilerek liyofilizatör ile kurutulmuştur. Elde edilen kurutulmuş atık posa öğütülerek 2 seviyeli 6 parametre üzerinde yapılan fraksiyonel faktöriyel dizayn tasarımına uygun şekilde ekstraları hazırlanmıştır. Elde edilen 32 ekstrenin fenolik içerikleri (p-OH benzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, p-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin) RP-HPLC ile belirlenerek ekstraksiyonu en çok etkileyen parametrelerin etanol yüzdesi, mikrodalga gücü ve sıcaklık olduğu saptanmıştır. Ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu için Box- Behnken Optimizasyonu kullanılmıştır. Etanol yüzdesi, mikrodalga gücü ve sıcaklık parametreleri üzerinden 15 ekstre hazırlanarak ekstraların fenolik içerikleri belirlenmiştir. Yöntem istatistiksel olarak varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen verilerin anlamlı olduğu saptanmıştır. Deneysel tasarımla hazırlanan 32 ekstrenin fenolik ve antosiyanozit içeriği ile pankreatik lipaz inhibitör etkileri incelenmiştir. Tüm veriler göz önüne alındığında yüksek miktarda fenolik madde ve antosiyanin içeren 11 ve 16 numaralı ekstralar optimum ekstre olarak belirlenmiştir. Çalışmada üzüm posasından elde edilen ekstraların lipaz inhibitor etkili oldukları tespit edilmesi ile birlikte, 11 ve 16 numaralı ekstraların lipaz inhibitor etkilerinin Orlistat'a yakın olduğu bulunmuştur. Ayrıca, RP-HPLC çalışmalarında elde edilen

ekstrelerin fenolik içeriklerine dair sonuçların total fenolik madde miktar tayininde elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Optimum ekstre olarak belirlenen 11 ve 16 numaralı ekstrelerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesine yönelik CUPRAC, FRAP ve DPPH radikali süpürücü aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. CUPRAC sonuçlarına göre 11 ve 16 numaralı ekstrelerin bakır (II) indirgeme kapasitesi sırasıyla 981.551 ± 2.617 , 1033.580 ± 1.662 μM Trolox eşdeğeri/g olarak bulunmuştur. FRAP sonuçlarına göre 11 ve 16 numaralı ekstrelerin demir (III) indirgeme kapasitesi sırasıyla 712.788 ± 1.868 , 797.333 ± 2.889 μM Trolox eşdeğeri/g olarak belirlenmiştir. DPPH radikali süpürücü aktivite sonuçlarına göre 11 ve 16 numaralı ekstrelerin serbest radikal süpürme kapasiteleri sırasıyla 0.0569 ± 0.0006 , 0.0371 ± 0.0011 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar 16 numaralı ekstrenin daha yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir.

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyon sürecinin optimizasyonu ile ilgili bir çalışmada, çevre dostu çözücüler kullanılarak üzüm ve böğürtlen tohumlarından ekstreler hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ultrasonik dalgaların ekstraksiyon sürecine yardımcı olarak kullanıldığında, geleneksel yöntemlere kıyasla ekstraksiyon verimliliğinin arttığını göstermiştir. Üzüm çekirdeklerinden fenolik bileşiklerin optimum ekstraksiyon koşulları %60 etanol ve 35.9 dakika olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstrelerin antihemolitik aktivitesi, hücrelerdeki ROS'nin üretiminin baskılanması ve antioksidan kapasitesi (FRAP, DPPH, Toplam fenolik madde miktar tayinin) incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar fenolik bileşikler açısından zengin ekstrelerin biyolojik aktivitelerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (122).

Başka bir çalışmada, Antioquia'da (Kolombiya) organik olarak yetiştirilen Izabella üzümünden polifenollerin ekstraksiyonu için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen ekstrelerin antioksidan aktiviteleri ile göğüs kanseri hücrelerindeki kemoprotektif etkileri incelenmiştir. Ekstrelerin total fenolik ve flavonoit madde miktarı, monomerik antosiyanin içeriği, ORAC oksijen radikal absorbans kapasitesi ile MCF-7 hücrelerindeki mitokondriyal membran depolarizasyonu, ROS artışı ve kromatin yoğunlaşması araştırılmıştır. Ekstraksiyon yöntemlerinin iyileştirilmesinin ekstrelerin etkinliğini ve fenolik madde içeriğini artıracakını vurgulanmıştır (123).

Üzümün (*V. labrusca*) işlenmesi ile arta kalan atıkların Hepatoma Doku Kültürü (HTC) hücrelerinde antioksidan ve antiproliferatif aktiviteye sahip ekstrelerin elde

edilmesini amaçlayan bir çalışmada etanol ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri 196.5 µM TEAC/100 g of ve 178.8 µM TEAC/100 g olduğu saptanmıştır. Etanol ekstresinin antioksidan gücünün yüksek olmasıyla birlikte HTC hücrelerindeki sitotoksik etkisinin de daha yüksek olduğu gözlenmiştir (124).

Üzüm kabuğundaki toplam fenolik bileşik içeriği, antioksidan kapasitesi ve toplam antosiyanin düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde yetişen *V. labrusca*'nın 16 genotipi incelenmiştir. Analiz edilen örneklerdeki toplam fenolik bileşik içeriği 5.650-115.650 mg GAE/kg KA, antioksidan kapasitesi 45-709 mikromol trolox/gram KA, toplam antosiyanin düzeyi 2.037-32.788 mg/kg arasında değiştikleri gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada kateşin, epikateşin ve trans-resveratrol miktarları sırasıyla 13.131-0 mg/kg KA, 5.080-0 mg/kg KA, 98-0 mg/kg KA olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile *V. labrusca*'nın kabuk, çekirdek ve yapraklarının fenolik maddelerce zengin olduğu ve doğal antioksidan olarak kullanılabileceğini vurgulanmıştır (125).

Şarap yapımı sırasında oluşan atık yan ürünlerin değerlendirilmesi ile ilgili bir çalışmada, geleneksel ve geleneksel olmayan ekstraksiyon yöntemlerinin Burgona üzümleri (*V. labrusca*)'nden hazırlanacak ekstraktlar için ekstraksiyon verimi, toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hazırlanan tüm numuneler için antioksidan kapasite ile toplam fenolik içeriği arasında önemli korelasyonlar olduğu gözlemlenmiştir (126).

V. labrusca çekirdekleri için ekstraksiyon solventlerini, antioksidan aktivite ve trans-resveratrol içeriğine ilişkin yanıt yüzey metodolojisiyle optimizasyonu ile ilgili başka bir çalışmada, soğuk presleme yöntemiyle elde edilen yağın yağ asitleri ve antioksidan aktivite kapasitesi (DPPH, ABTS ve FRAP, toplam fenolik ve flavonoit miktar tayini) belirlendi. Ekstraksiyon optimizasyonu, solvent etkilerinin (su, etanol ve aseton) ve bunların karışımlarının yanıtlar üzerindeki analizini mümkün kılan istatistiksel yöntemler kullanıldı. Üçlü çözücü fraksiyonu içeren ekstraktların saf çözücüyle karşılaştırıldığında yaklaşık 20 kat artan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldu saptandı. Optimize edilmiş ekstraksiyon yöntemi, bu atıkların gıda endüstrisi için potansiyel bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiştir (127).

Doğu Karadeniz bölgesinde yetişen *V. vinifera* (Katikara) ve *V. labrusca* (Izabella) üzüm çeşitlerinin posalarının antioksidan aktivitesi ve fenolik bileşik içeriklerinin incelendiği çalışmada, Ordu'dan elde edilen örneklerin organik asitler, fenolik bileşikler,

antioksidan aktivite ve mineral içerikleri incelenmiştir. İzabella üzüm posasının kimyasal profilinin daha zengin olduğu (187.960 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g FW}$, trans-resveratrol içeriği 46.820 $\mu\text{g/g FW}$, vanilik asit içeriği 116.400 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$, C vitamini içeriği 12.830 $\text{mg}/100 \text{ g FW}$) ve buna bağlı olarak daha belirgin şekilde daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (128).

Gebelik sırasında üzüm suyu ile birlikte veya üzüm suyu olmadan yüksek yağlı diyetin Wistar sıçanlarında gebelikte kilo alımı, biyokimyasal parametreler ve plazma ve karaciğerdeki oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendirildiği çalışmada kırk dokuz sıçan kontrol diyet grubu, yüksek yağlı diyet grubu, üzüm suyu-kontrol diyet grubu ve üzüm suyu-yüksek yağlı diyet grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı. Deney süresince sıçanların kilo alımı takip edildi. Laktasyondan sonra anne farelere ötenazi uygulanarak kan ve karaciğer örnekleri toplandı. Yüksek yağlı diyet, karaciğerdeki karbonil düzeylerinin yanı sıra toplam kolesterol ve trigliserit serum düzeylerini de artırdığı gözlemlendi; ancak üzüm suyu diyetinin serumdaki yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve üre düzeylerini azalttığı ve üzüm suyu tüketimi gebelikte vücut ağırlığı artışını azalttığı saptandı. Gebelikte yağdan zengin beslenmenin sağlık açısından zararlı etkileri olabileceği ancak üzüm suyu tüketimi oksidatif hasarların önlenmesi ve sağlığın iyileştirilmesi açısından önemli bir alternatif olabileceği bildirildi (129).

Brezilya'da yaygın olarak üretilen *V. vinifera* ve *V. labrusca* üzümlerinin biyoaktif bileşik içerikleri ile *in vitro* antioksidan aktivitelerinin belirlendiği çalışmada, üzümlerdeki ana polifenollerin ekstraksiyonunda farklı yöntemlerin etkinliğini değerlendirilmesi amacıyla dört farklı ekstraksiyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Değerlendirilen ekstraksiyon yöntemleri arasında, en iyi hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği gösteren sıvı-sıvı ekstraksiyonu en iyi yöntem olarak seçilmiştir. Değerlendirilen üzüm örneklerinin antioksidan aktivitesi, trans-resveratrol içeriğiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm numuneler arasında *V. labrusca* çeşitlerinin, özellikle Brezilya'nın güneyinde yaygın olarak yetiştirilen Bordô ve Concord üzümlerinin, daha yüksek biyoaktif bileşik içeriğinin varlığıyla bağlantılı olarak daha yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir (130).

Başka bir çalışmada, *V. labrusca* yaprağından elde edilen su ekstresinin diyabetik sıçanların karaciğerleri üzerindeki antioksidan etkisi ve bu durumun metabolik ve biyokimyasal parametrelerde ortaya çıkan değişiklikler değerlendirilmiştir. Diyabetik sıçanlara 30 gün boyunca günlük intragastrik olarak (50, 100, 200 mg/kg ekstre) verilmiştir.

Çalışmanın sonucunda, diyabetik sıçanların karaciğerlerindeki TBARS ve karbonil seviyelerinde azalmalar ve sülfhidril seviyelerindeki artışlar gözlenmiştir. Bu durum ekstre dozuna bağlı bir antioksidan etkinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca 200 mg/kg ekstre uygulamasının diyabetik sıçanlarda kilo kaybını önlediği (200 mg/kg) ve 50 mg/kg ekstre uygulamasının LDL kolesterol, üre ve AST seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu nedenle, asma yaprağı ile yapılan kronik tedavinin, antioksidan, hepatoprotektif ve olası hipolipidemik etkileri nedeniyle diyabetik komplikasyonların tedavisi ve/veya önlenmesi için yardımcı olabileceği belirtilmiştir (131).

Bir çalışmada *V. labrusca*'dan elde edilen üzüm suyunun (organik ve konvansiyonel) kronik alımının, yüksek yağlı diyet (HFD) ile desteklenen sıçanların farklı beyin bölgelerindeki oksidatif stres üzerindeki antioksidan ve nöroprotektif etkisi araştırıldı. Toplam 40 erkek sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup 1'e standart diyet ve su, grup 2'ye HFD ve su, grup 3'e HFD ve geleneksel üzüm suyu, grup 4'e ise HFD ve organik üzüm suyu verildi. 3 aylık deney süreci sonunda sıçanlara başları kesilerek ötenazi uygulandı ve serebral korteks, hipokampus ile beyincik izole edilerek oksidatif stres analizi için buz üzerinde homojenize edildi. HFD ve kontrol gruplarında kalori tüketiminin, HFD ve üzüm suyu takviyesi yapılan gruplara göre daha yüksek olduğu ve HFD diyet grubunun diğer hayvanlara göre daha fazla kilo aldığı gözlemlendi. Ayrıca HFD'nin serebral korteks ve hipokampusta lipid peroksidasyonunu (TBARS) ve protein hasarını (karbonil) arttırdığı, serebral korteks ve serebellumda enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemin azalttığı, tüm beyin dokularında katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerini azalttığı ve tüm serebral dokularda nitrik oksit üretimini arttırdığı gözlemlendi. Geleneksel üzüm suyu ve organik üzüm suyu verilen gruplarda bu oksidatif değişiklikleri iyileştirdiği bulundu. Çalışmada üzüm sularının oksidatif hasarla ilişkili bazı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceğini vurgulandı (132).

V. labrusca üzümlerinden elde edilen Güney Brezilya kırmızı şarabındaki alkolsüz etil asetat fraksiyonunun (EAF) anti-aterosklerotik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü nakavt (LDLr(-/-)) fareler hiperkolesterolemik diyetle tabi tutuldu ve 12 gün boyunca EAF (3, 10 ve 30 mg/kg) uygulandı. Tedavi sonunda plazma lipid düzeyi, vasküler reaktivite ve aterosklerotik lezyonlar değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 3 mg/kg EAF tedavisinin, kontrol hiperkolesterolemik farelere kıyasla toplam kolesterol, trigliseritler ve

LDL seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı; aynı zamanda hiperkolesterolemik LDLr(-/-) farelerden izole edilmiş torasik aortta asetilkolinin neden olduğu vazodilatasyonun da korunduğu gözlemlendi (133).

V. labrusca üzüm posası'nın da içinde bulunduğu bazı tarım işletmesinin ürettiği kalıntıların toplam fenolik içeriğinin, antioksidan aktivitesinin (DPPH, ABTS ve beta-karoten ağartma yöntemi) ve fenolik kompozisyonunun değerlendirildiği çalışmada, üzüm posasından elde edilen etanol ve sulu ekstraktların fenolik içerikleri 16.57 ± 0.19 mg GAE/g ve 4.41 ± 0.01 mg GAE/g olarak saptanmıştır. Fenolik içeriğine bağlı olarak yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca GC-MS analizlerinde üzüm posasının gallik asit, epikateşin, kersetin, izovanilik asit, p-kumarik asit, kafeik asit ve resveratrol içerdiği bulunmuştur (134).

Üzüm çekirdeği ile yapılan bir çalışmada, elde edilen ekstrenin pankreatik lipaz ve lipoprotein lipazı üzerine inhibisyon etkisinin olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ekstrenin içeriğinde bulunan flavonoidler, prosiyanidinler ve diğer fenolik bileşiklerin sinerjistik etkileri ile diyet yağlarının emilimini engelleyerek adipoz doku artışını önlediği saptanmıştır (18). Üzüm çekirdeği ekstresinin lipaz inhibitör etkisinin olduğu; ancak *in vivo* çalışmalarla bu etkinin araştırılması gerektiği ileri sürülmektedir (17, 135, 136).

Bu çalışma ile, kokulu üzüm atıklarından fenolik maddelerce zenginleştirilmiş ekstrenin elde edilmesi için yöntem optimizasyonu, bu atıkların doğal antioksidan kaynağı ve lipaz enzim inhibitörü olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Bu ekstraktların kullanımı, genel sağlığı iyileştirmeye ve oksidasyonla ilişkili hastalıkların önlenmesine yönelik gıda ve sağlık ürünlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Ayrıca, üzüm atıklarının obezite tedavisinde kullanılabilecek yeni lipaz inhibitör etkili farmakoforların arayışında kullanılabilecek potansiyel bir kaynak olduğu düşünülmektedir. Ekstre içerisindeki aktif bileşiklerin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ve literatürde yer alan farklı çalışmalar değerlendirildiğinde, tarımsal endüstriyel işleme ile birlikte açığa çıkan atıkların biyoaktif maddeler açısından zengin olduğu, gıda endüstrisi ve ilaç endüstrisi tarafından yeniden kullanılabilmesinin ekonomik ve çevresel anlamda önem arz ettiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Dicken SJ, Batterham RL (2021). The role of diet quality in mediating the association between ultra-processed food intake, obesity and health-related outcomes: A review of prospective cohort studies. *Nutrients* 14(1): 23.
2. Sarma S, Sockalingam S, Dash S (2021). Obesity as a multisystem disease: Trends in obesity rates and obesity-related complications. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 23: 3-16.
3. Kayar H, Utku S (2013). Çağımızın hastalığı obezite ve tedavisi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 6: 2.
4. Altunkaynak Z, Özbek E (2006). Obezite: Nedenleri ve tedavi seçenekleri. *Van Tıp Dergisi* 13(4): 138-142.
5. Çam H (2014). Adölesanlarda internet bağımlılığı prevalansı ile psikopatolojik semptomlar ve obezite arasındaki ilişkinin incelenmesi. Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Sivas.
6. Kurt K (2019). Birinci basamakta obezite yönetimi. *Klinik Tıp Aile Hekimliği Dergisi* 11(2): 55-60.
7. Güder A (2012). Kokulu üzüm (*Vitis labrusca* L.)'nin antioksidan aktivitesi, resveratrolün izolasyonu ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Samsun.
8. Saltoglu S (2014). Kokulu kara üzümünden yeni teknolojilerle elde edilen biyoaktif ekstraktların ayran üretiminde kullanılması. Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Samsun.
9. Kurt A (2015). Farklı olgunlaşma periyodunun kokulu üzüm (*Vitis labrusca* L.) meyvesinin besin içeriğine olan etkisi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
10. Sözbir D (2021). Isabella üzüm (*Vitis labrusca* L.) suyu ile zenginleştirilmiş probiyotik yulaf sütü içeceği üretimi ve depolama süresince probiyotik bakterilerin canlılığının belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, İzmir.

11. Üneş D (2016). İzabella üzümü (*Vitis labrusca* L.) meyvesinin fenolik bileşenleri ve antioksidan etkisinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Endüstri Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Bartın.
12. Jayaprakasha K, Selvi T, Sakariah K (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. Food Research International 36(2): 117-122.
13. Gezer G (2011). Modeling drying kinetics of grape seeds and skins from Turkish cultivars. Master's thesis, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
14. Demirkol M (2016). Kokulu kara üzüm (*Vitis labrusca* L.) posası katkılı yoğurtların depolama süresince bazı fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ordu.
15. Pehlivan M, Güleriyüz M (2004). Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. Bahçe 33(1-2), 51-57.
16. Fettahoglu B (2021). (*Vitis labrusca* L.) ve (*Vaccinium myrtillus* L.) meyvelerinin laktofermente ekstrelerinin bağırsak sağlığı üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Üsküdar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Biyomühendislik Bilim Dalı, İstanbul.
17. Ercan P, Nehir S (2014). Obeziteyi önleyen gıda bileşenleri. Akademik Gıda 12(1): 69-77.
18. Birari B, Bhutani K (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. Drug Discovery Today 12(19-20): 879- 889.
19. Wang H, Du Y, Song H (2010). A-glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. Food Chemistry 123(1): 6-13.
20. Kazemipoor M, Radzi M, Cordell A, Yaze I (2012). Safety, efficacy and metabolism of traditional medicinal plants in the management of obesity: A review. International Journal of Chemical Engineering and Applications 3(4): 288-292.
21. Pingo E (2020). Deneysel tasarım uygulanarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ilaç analizi ve validasyonu. Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Analitik Kimya Bilim Dalı, İstanbul.

22. Myers H, Montgomery C, Geoffrey G, Borrer M, Kowalski M (2004). Response surface methodology: A retrospective and literature survey. *Journal of Quality Technology* 36(1): 53-78.
23. Bridle B, Timberlake F (1996). Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry* 58: 103-109.
24. Fan G, Han Y, Gu Z, Chen D (2008). Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *Swiss Society of Food Science and Technology* 41: 155-160.
25. Aydın S, Çelik S (2011). Bazı sofralık üzüm çeşitlerinin tane yarıлма direnci, tane eti sertliği ve tane elastikiyetlerinin belirlenmesi üzerinde araştırma. *Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Şanlıurfa, 4-8 Ekim 2011, 63-69.*
26. Aktaş E, Tan S (2007). Tarım politikasındaki değişiklikler ve bağıcılık: Çanakkale ili örneği. 2. Troas Bölgesi Değerleri Sempozyumu. Çanakkale, 31 Ağustos- 2 Eylül 2007, 199-211.
27. Akden S (2024). Farklı bor dozlarının kokulu üzümün (*Vitis labrusca*) tuzluluğa olan dayanımı üzerine etkilerinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Ordu.
28. Özcan H (2023). Isabella üzüm (*Vitis labrusca* L.) özütü kullanılarak bazı nano metal oksitlerin yeşil sentezi ve yapısal karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Düzce.
29. Polat Ş (2019). Organik ve konvansiyonel tarım teknikleri ile yetiştirilen üzüm ve bu üzümlerin işlenmesi ile elde edilen üzüm ürünlerinin resveratrol ve mineral madde içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Diyarbakır.
30. Usta T (2022). Kokulu kara üzüm (*Vitis labrusca* L.) meyvesinin farklı tekniklerle kurutularak bisküvi üretiminde kullanımı. Yüksek lisans tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Konya.
31. Robinson J, Harding J (2015). *The Oxford companion to wine: American Chemical Society, Oxford University Press, United Kingdom; Sayfa:265.*

32. Çelik H, Ağaoğlu Y, Fidan Y, Marasali B, Söylemezoğlu C (1998). Genel Bağcılık Sunfidan AŞ Mesleki Kitaplar Serisi, Ankara; Sayfa: 253.
33. Abe LT, Mota RVd, Lajolo FM, Genovese MI (2007). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* cultivars. Food Science and Technology 27: 394-400.
34. Güder A (2012). *Vitis labrusca* L. (kokulu üzüm)'nin antioksidan aktivitesi, resveratrolün izolasyonu ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Samsun.
35. Üneş D (2016). İzabella üzümü (*Vitis labrusca* L.) meyvesinin fenolik bileşenleri ve antioksidan etkisinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Endüstri Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Bartın.
36. Demirkol M (2016). Kokulu kara üzüm (*Vitis labrusca* L.) posası katkılı yoğurtların depolama süresince bazı fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ordu.
37. Yu J, Ahmedna M (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. International Journal of Food Science & Technology 48(2): 221-237.
38. Rockenbach II, Rodrigues E, Gonzaga LV, Caliari V, Genovese MI, Gonçalves AESS, Fett R (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. Food Chemistry 127(1): 174-179.
39. Toaldo IM, Fogolari O, Pimentel GC, Gois JS, Borges DL, Caliari V, Bordignon-Luiz M (2013). Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. LWT-Food Science and Technology 53(1): 1-8.
40. Badem M (2019). *Barbarea auriculata* var. *paludosa*, *B. integrifolia* ve *B. plantaginea* (Brassicaceae)'nın biyokimyasal, fitokimyasal ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Ana Bilim Dalı, Trabzon.
41. Velioglu S (2000). Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. Gıda 25(3).

42. Halliwell B, Gutteridge JM (2015). Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press, USA.
43. Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences* 63(1): 68-78.
44. Young I, Woodside J (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 54(3): 176-186.
45. Yılmaz İ, Üner MH (2021). Oksidatif stres ve antioksidanların iş sağlığına etkileri. *Karaelmas Journal of Occupational Health and Safety* 5(1): 79-87.
46. Gulcin İ (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3): 651-715.
47. Haida Z, Hakiman M (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Science & Nutrition* 7(5): 1555-1563.
48. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MR (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113(3): 189-207.
49. Rajput VD, Harish, Singh RK, Verma KK, Sharma L, Quiroz-Figueroa FR, Sushkova S (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology* 10(4): 267.
50. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants* 10: 1-29.
51. Azeem M, Hanif M, Mahmood K, Ameer N, Chughtai FRS, Abid U (2023). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: A review. *Polymer Bulletin* 80(1): 241-262.
52. Jiang Q, Im S, Wagner JG, Hernandez ML, Peden DB (2022). Gamma-tocopherol, a major form of vitamin E in diets: Insights into antioxidant and anti-inflammatory effects, mechanisms, and roles in disease management. *Free Radical Biology and Medicine* 178: 347-359.

53. Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F (2020). Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Antioxidants* 9(9): 864.
54. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N (2013). Potential applications of antioxidants-A review. *Journal of Pharmacy Research* 7(9): 828-835.
55. Fettahoğlu B (2021). *Vitis labrusca* ve *Vaccinium myrtillus* meyvelerinin laktofermente ekstrelerinin bağırsak sağlığı üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Üsküdar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, İstanbul.
56. Jegannathan KR, Nielsen PH (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. *Journal of Cleaner Production* 42: 228-240.
57. Lim SY, Steiner JM, Cridge H (2022). Lipases: it's not just pancreatic lipase. *American Journal of Veterinary Research* 83(8).
58. Glogauer A, Martini VP, Faoro H, Couto GH, Müller-Santos M, Monteiro RA, Krieger N (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories* 10: 1-15.
59. Messaoudi A, Belguith H, Gram I, Hamida JB (2010). Classification of EC3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology* 9(48): 8243-8247.
60. Korman TP, Sahachartsiri B, Charbonneam DM, Huang GL, Beauregard M, Bowie JU (2013). Dieselzymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. *Biotechnology for Biofuel* 6: 1-13.
61. Panizza P, Cesarini S, Diaz P, Giordano SR (2015). Saturation mutagenesis in selected amino acids to shift *Pseudomonas* sp. acidic lipase Lip I. 3 substrate specificity and activity. *Chemical Communications* 51(7): 1330-1333.
62. Ordovas JM (1999). Endothelial lipase: A new member of the family. *Nutrition Reviews* 57(9): 284-287.
63. Eren FA (2023). Obezite kliniğine başvuran hastalarda obezitenin sosyal izolasyona etkisi ve maliyeti: Sağlık ekonomisi perspektifinden bir bakış. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Sağlık Ekonomisi Ana Bilim Dalı, İstanbul.

64. Apovian CM (2016). Obesity: Definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care* 22(7):176-185.
65. Polyzos SA, Mantzoros CS (2019). Obesity: Seize the day, fight the fat. *Elsevier* 92: 1-5.
66. Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C (2018). Obesity as a disease. *Medical Clinics* 102(1): 13-33.
67. Boutari C, Mantzoros CS (2022). A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. *Elsevier* 133:155217.
68. Cheynier V (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews* 11(2): 153-177.
69. Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1): 191-203.
70. Shah S, Ukaegbu C, Hamid H, Alara O (2018). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the stems of *Flammulina velutipes* and *Hypsizygus tessellatus* (white and brown var.) extracted with different solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization* 12: 1947-1961.
71. Han X, Shen T, Lou H (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8(9): 950-988.
72. Albishi T, John JA, Al-Khalifa AS, Shahidi F (2013). Antioxidant, anti-inflammatory and DNA scission inhibitory activities of phenolic compounds in selected onion and potato varieties. *Journal of Functional Foods* 5(2): 930-939.
73. Kaur S, Mondal P (2014). Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *Journal of Microbiology & Experimentation* 1(1): 00005.
74. Zhang H, Tsao R (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and antiinflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 8: 33-42.

75. Zhang XL, Guo YS, Wang CH, Li GQ, Xu JJ, Chung HY, Ye WC, Li YL, Wang G (2014). Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. Food Chemistry 152: 300-306.
76. Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK (2006). Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. The AAPS Journal 8(3): E443.
77. Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, Mattila P, Jula A (2008). Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. The American Journal of Clinical Nutrition 87(2): 323-331.
78. Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D, Witztum JL (2004). Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. Circulation 110(5): 637-641.
79. Cirillo G, Curcio M, Vittorio O, Iemma F, Restuccia D, Spizzirri UG, Puoci F, Picci N (2016). Polyphenol conjugates and human health: a perspective review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 56(2): 326-337.
80. Kotecha R, Takami A, Espinoza JL (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. Oncotarget 7(32): 52517.
81. Giusti MM, Wrolstad RE (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in Food Analytical Chemistry 1: 2.13.
82. Dıblan S (2013). Kalecik karası üzümünden (*Vitis vinifera* L.) üretilen kırmızı üzüm suyunun çeşitli durultma yardımcı maddeleri ile durultulması ve durultmanın üzüm suyu rengi üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara.
83. Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Trends in Food Science & Technology 21(1): 3-11.
84. Cemeroğlu BS (2011). Meyve ve sebze işleme teknolojisi. 7. Baskı, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara; Sayfa:1-636.
85. Gonnet JF (2001). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanin revisited-3. A further description using CIELAB differences and assessment of matched colours using the CMC model. Food Chemistry 75(4): 473-485.

86. Mazza G (2018). Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. CRC Press, Florida; Sayfa: 1-384.
87. Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MAA (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. Food Research International 44(2): 499-509.
88. Sarni-Manchado P, Cheynier V, Moutounet M (1997). Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. Phytochemistry 45(7): 1365-1369.
89. Turfan Ö (2008). Nar suyu konsantresi üretim ve depolama sürecinde antosiyaninlerdeki değişimler. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara.
90. Koc BE, Türkyılmaz M, Özkan M (2012). Siyah havuç suyu konsantresinin akide şekerlerinde renklendirici olarak kullanılması ve monomerik antosiyaninlerin depolama stabilitesinin belirlenmesi. Academic Food Journal 10(1): 30-39.
91. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. Current Research in Food Science 4: 200-214.
92. Alara OR, Abdurahman NH (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa* calyces: Kinetic modelling and process intensification. Industrial Crops and Products 137: 528-535.
93. Pinela J, Prieto M, Carvalho AM, Barreiro MF, Oliveira MBP, Barros L, Ferreira IC (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. Separation and Purification Technology 164: 114-124.
94. Zu G, Zhang R, Yang L, Ma C, Zu Y, Wang W, Zhao C (2012). Ultrasound-assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. International Journal of Molecular Sciences 13(9): 11027-11043.
95. Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. Chinese Medicine 13: 1-26.

96. Maqsood S, Benjakul S, Abushelaibi A, Alam A (2014). Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(6): 1125-1140.
97. Morgan E (2013). Natural products| supercritical fluid chromatography. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* 2000: 3445-3450
98. Khaw KY, Parat MO, Shaw PN, Falconer JR (2017). Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules* 22(7): 1186.
99. Puri M, Sharma D, Barrow CJ (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology* 30(1): 37-44.
100. De Camargo AC, Regitano-d'Arce MAB, Biasoto ACT, Shahidi F (2016). Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry* 212: 395-402.
101. Gómez-García R, Martínez-Ávila GC, Aguilar CN (2012). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech* 2: 297-300.
102. Mäkelä M (2017). Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review. *Energy Conversion and Management* 151: 630-640.
103. Khuri AI, Mukhopadhyay S (2010). Response surface methodology. *Wiley interdisciplinary reviews: Computational Statistics* 2(2): 128-149.
104. Khuri AI, Cornell JA (2019). Response surfaces: designs and analyses. Second edition. CRC Press, Florida; Sayfa: 1-536.
105. Yeten B, Castellini A, Guyaguler B, Chen W (2005). A comparison study on experimental design and response surface methodologies. Paper presented at the SPE Reservoir Simulation Conference, Texas, 31 Ocak-2 Şubat 2005.
106. Khayet M, Cojocar C, García-Payo C (2007). Application of response surface methodology and experimental design in direct contact membrane distillation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 46(17): 5673-5685.

107. Dean A, Voss D, Draguljić D, Dean A, Voss D, Draguljić D (2017). Response surface methodology. *Design and Analysis of Experiments* 565-614.
108. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5): 965-977.
109. Korkmaz N, Sener SO, Akkaya S, Badem M, Aliyazicioglu R, Abudayyak M, Ozgen U (2019). Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas. *Turkish Journal of Biochemistry* 44(3): 278-288.
110. Slinkard K, Singleton VL (1997). Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49-55.
111. Teng Z, Jiang X, He F, Bai W (2020). Qualitative and quantitative methods to evaluate anthocyanins. *eFood* 1: 339-346.
112. Güder A (2012). *Vitis labrusca* L. (Kokulu üzüm)'nin antioksidan aktivitesi, resveratrolün izolasyonu ve karakterizasyonu, Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Samsun.
113. Sener O, Ozgen U, Kanbolat S, Korkmaz N, Badem M, Hanci H, Iscan S (2021). Investigation of therapeutic potential of three endemic *Cirsium* species for global health problem obesity. *South African Journal of Botany* 141: 243-254.
114. Bustanji Y, Al-Masri M, Mohammad M, Hudaib M, Tawaha K, Tarazi H, AlKhatib S (2011). Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of *Ginkgo biloba*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 26(4): 453-459.
115. Benzie F, Strain J (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In *Methods in Enzymology* 299: 15-27.
116. Apak R, Güclü K, Ozyürek M, Karademir E, Ercag E (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57: 292-304.

117. Molyneux P (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin journal of science and technology* 26: 211-9.
118. De Souza B, Thomazini M, De Carvalho Balieiro C, Fávaro-Trindade S (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing* 93: 39-50.
119. Souza M, Caldas L, Tohidi D, Molina J, Souto P, Figueiro R, Zille A (2014). Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24: 691-698.
120. Kuck S, Noreña Z (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry* 194: 569-576.
121. Kuck S, Noreña Z (2019). Application of gum arabic, β -cyclodextrin, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin to microencapsulation by molecular inclusion of grape skin extract (*Vitis labrusca* var. Isabel). *Journal of Food Processing and Preservation* 43(2): e13874.
122. Junior TK, De Moura C, Cruz TM, Marques MB, Carmo MAVd, Deolindo CTP, Granato D (2023). Optimization of the green chemistry-like extraction of phenolic compounds from grape (*Vitis labrusca* L.) and blackberry (*Rubus fruticosus* L.) seeds with concomitant biological and antioxidant activity assessments. *Plants* 12(14): 2618.
123. Vélez MD, Llano-Ramirez MA, Ramón C, Rojas J, Bedoya C, Arango-Varela S, Gil M (2023). Antioxidant capacity and cytotoxic effect of an optimized extract of isabella grape (*Vitis labrusca*) on breast cancer cells. *Heliyon* 9(6).
124. Rocha AM, Viegas BL, Fontana M, Lucchetta L, Almeida IV, Vicentini VEP, Düsman E (2023). Grape Bagasse Extracts: Antioxidant and Cytotoxic Activity in HTC Cells. *Waste and Biomass Valorization* 14(12): 4071-4079.
125. Tahmaz Karaman H, Yuksel Kuskü D, Söylemezoğlu G, Çelik H (2022). Phenolic compound and antioxidant capacity contents of *Vitis labrusca* L. genotypes. *Journal of Tekirdağ Agriculture Faculty* 19(2).

126. Barriga-Sánchez M, Hiparraguirre HC, Rosales-Hartshorn M (2022). Chemical composition and mineral content of Black Borgoña (*Vitis labrusca* L.) grapes, pomace and seeds, and effects of conventional and non-conventional extraction methods on their antioxidant properties. *Food Science and Technology* 42: e120021.
127. Dalposso PV, Aguiar CMd, Torquato AS, Tiuman TS, Martin CA, Zara RF, Cottica SM (2021). Optimization of antioxidant extraction and characterization of oil obtained by pressing cold from *Vitis labrusca* seeds. *Food Science and Technology* 42: e47420.
128. Keskin N, Bilir Ekbic H, Kaya O, Keskin S (2021). Antioxidant activity and biochemical compounds of *Vitis vinifera* L. (cv. 'Katikara') and *Vitis labrusca* L. (cv. 'Isabella') grown in Black Sea Coast of Turkey. *Erwerbs-obstbau* 63(1): 115-122.
129. Gonçalves LK, Bortolato G, Dario Braccini Neto R, Rocha Frusciante M, Funchal C, Dani, C (2018). Grape juice consumption with or without high fat diet during pregnancy reduced the weight gain and improved lipid profile and oxidative stress levels in liver and serum from wistar rats. *Beverages* 4(4): 78.
130. Burin VM, Ferreira-Lima, NE, Panceri CP, Bordignon-Luiz MT (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal* 114: 155-163.
131. Dos Santos Lacerda D, Santos CF, Oliveira AS, Zimmermann R, Schneider R, Agostini F, Gomez R (2014). Antioxidant and hepatoprotective effects of an organic grapevine leaf (*Vitis labrusca* L.) extract in diabetic rats. *RSC Advances* 4(95): 52611-52619.
132. Cardozo MG, Medeiros N, Dos Santos Lacerda D, De Almeida DC, Henriques JAP, Dani C, Funchal C (2013). Effect of chronic treatment with conventional and organic purple grape juices (*Vitis labrusca*) on rats fed with high-fat diet. *Cellular and Molecular Neurobiology* 33: 1123-1133
133. Hort, MA, Schuldt EZ, Bet ÂC, DalBó S, Siqueira, JM, Ianssen C, Maraschin M (2012). Anti-atherogenic effects of a phenol-rich fraction from Brazilian red wine (*Vitis labrusca* L.) in hypercholesterolemic low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Journal of Medicinal Food* 15(10): 936-944.

134. Melo PS, Bergamaschi KB, Tiveron AP, Massarioli AP, Oldoni TLC, Zanús MC, De Alencar SM (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues/Composicao fenolica e atividade antioxidante de residuos agroindustriais. *Ciência Rural* 41(6): 1088-1094.
135. Tucci A, Boyland J, Halford G (2010). The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents, diabetes. *Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 3: 125-143.
136. Moreno A, Ilic N, Poulev A, Brasaemle L, Fried K, Raskin I (2003). Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 19: 876- 879.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Malek AL FARAJ
Uyruğu : Suriye
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Al-Zaytoonah University of Jordan	2020
Lise	Namer Özel Okulları	2011

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Asistanı	Ürdün Özel Al-Zaytoonah Üniversitesi'nde	2019-2021

YABANCI DİL

Arapça, İngilizce, Türkçe

UZMANLIK ALANI

Biyokimya

YAYINLAR

1. Sunoqrot, S., Alfaraj, M., Hammad, A. A. M., Kasabri, V., Shalabi, D., Deeb, A. A., ... & Yousef, I. (2020). Development of a thymoquinone polymeric anticancer nanomedicine through optimization of polymer molecular weight and nanoparticle architecture. *Pharmaceutics* 12(9), 811.
2. Hammad, A. M., Ibrahim, Y. A., Khair, S. I., Hall, F. S., Alfaraj, M., Jarrar, Y., & Abed, A. F. (2021). Metformin reduces oxandrolone-induced depression-like behavior in rats via modulating the expression of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α . *Behavioural Brain Research* 414, 113475.

3. Hammad, A. M., Meknas, S. J., Hall, F. S., Hikmat, S., Sari, Y., Al-Qirim, T. M., ... & Amawi, H. (2022). Effects of waterpipe tobacco smoke and ceftriaxone treatment on the expression of endocannabinoid receptors in mesocorticolimbic brain regions. *Brain Research Bulletin* 185, 56-63.
4. Hammad, A. M., Alzaghari, L. F., Alfaraj, M., Al-Qerem, W., Talib, W. H., Alasmari, F., ... & Hall, F. S. (2023). Acetylsalicylic acid reduces cigarette smoke withdrawal-induced anxiety in rats via modulating the expression of NFκB, GLT-1, and xCT. *Frontiers in Pharmacology* 13, 1047236.
5. Hammad, A. M., Alzaghari, L. F., Alfaraj, M., Al-Shawaf, L., & Sunoqrot, S. (2023). Nanoassemblies from the aqueous extract of roasted coffee beans modulate the behavioral and molecular effects of smoking withdrawal-induced anxiety in female rats. *Drug Delivery and Translational Research* 13(7), 1967-1982.